



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



**GERSON DE ALMEIDA QUEIROZ**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM *IL33* E  
*IL1RL1* NA ASMA**

Salvador, BA  
2016

**GERSON DE ALMEIDA QUEIROZ**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM *IL33* E  
*IL1RL1* NA ASMA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alexandrina Figueiredo.  
Co-orientadora: Profa. Dra. Valdirene Leão Carneiro.

Salvador  
2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo cuidado em todos os momentos e pelo seu amor incondicional por mim; por ter guiado e conduzido os meus passos durante toda a minha vida, em especial, nesses dois anos.

Aos meus pais, pelo amor a mim dedicado e pela educação pautada em princípios retos e na integridade de carácter; aos meus irmãos pelas palavras de incentivo, carinho e amor a mim dedicados; aos meus familiares por terem sonhado esse sonho junto comigo.

À Universidade Federal da Bahia pela oportunidade de crescimento acadêmico.

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

A minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Camila Alexandrina Figueiredo pelo voto de confiança e pela oportunidade de poder participar de uma equipe tão comprometida e unida; pelo direcionamento acadêmico e pelo exemplo de pesquisadora a ser seguido, e digno de admiração!

A Valdirene Carneiro leão, minha co-orientadora, pela dedicação e compartilhamento de saberes e aprendizado durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Ryan Costa, pela amizade e por estar sempre disponível e pronto a ajudar, além das contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos projetos SCAALA e ProAR, bem como professores e colaboradores envolvidos, sem os quais este trabalho não seria desenvolvido, em especial ao Prof. Dr. Maurício Lima Barreto, Dr<sup>a</sup> Neuza Alcantara Neves e Dr. Álvaro Cruz.

À Dilcea, Juci e Aline pelo carisma, simpatia, competência, comprometimento e disposição em ajudar sempre, obrigado por tudo. Vocês são demais!

Aos amigos Anaque, Hugo, Raimon e Héllen pelo companheirismo, e pelas contribuições para execução deste trabalho.

As colegas Alana, Emília, representando o LAA, pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

À estudante de Iniciação científica Talita, que colaborou grandemente com parte da execução e elaboração deste trabalho.

A minha namorada, Luciana Oliveira, pelo incentivo, companheirismo, carinho e paciência durante todos esses dias. Obrigado por tornar os meus dias mais especiais!

A todos os pacientes e seus familiares, sem os quais, não seria possível este trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À CNPq pelo suporte financeiro na aprovação do projeto, do qual este projeto faz parte.

Feliz o homem que acha a sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; por que melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. **Provérbios 3: 13-14.**

## RESUMO

QUEIROZ, Gerson de Almeida. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM *IL33* E *IL1RL1* NA ASMA GRAVE. 93f. 2016. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Asma e atopia são condições determinadas por fatores ambientais e genéticos. Vários estudos de associação do genoma têm sido realizados para tentar entender os componentes genéticos de tais condições. Os genes *IL33* e *IL1RL1* são os mais replicados em estudos do tipo GWAS em todo o mundo. A citocina IL-33 e o seu receptor ligado à membrana (ST2L) ou sua forma solúvel (sST2), em conjunto são potentes moduladores de inflamação do tipo Th2. Quando ligada ao ST2L, IL-33 produzida por múltiplas células da resposta inata e adaptativa, induz citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5 e IL-13, aumentando a resposta e inflamação Th2, principal característica da asma e alergias. Por outro lado, quando a IL-33 se liga ao sST2, neutraliza o seu efeito, impedindo sua ligação ao ST2L. Vários polimorfismos nestes genes têm sido associados com a asma e atopia. Assim, os fatores genéticos que afetam *IL33* e *IL1RL1* podem influenciar a susceptibilidade para asma e atopia. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* na asma e atopia em uma população Latina. Estratégias diferentes foram usadas para, um estudo de coorte de asma leve e um estudo caso-controle de asma grave. O alelo A para rs1041973 em *IL1RL1* na coorte SCAALA foi positivamente associado com IL-5 produção (OR 1,36, IC 95% 1,09-1,84, P=0,044) IgE específica (OR 1,40, IC 95% 1,07-1,84, P=0,013) e SPT (OR 1,48, IC 95% 1,08-2,03, P=0,014), ambos contra o ácaro *B. tropicalis*. Além disso, indivíduos atópicos com o genótipo AA de rs1041973 mostraram uma diminuição da produção de sST2 comparado com indivíduos com os genótipos AC e CC (P <0,05). O alelo G do SNP *IL33* rs12551256 foi negativamente associado com asma (OR 0,71, IC 95% 0,53-0,94, P=0,017). Em relação ao estudo caso controle do ProAR, o alelo A do rs1420101 em *IL1RL1*, foi positivamente associado com asma atópica (OR 1,29, IC 95% 1,05-1,66, P=0,046) e negativamente com FEV1 (BETA -2,37, IC 95% -4,67; -0,07, P=0,043). Além disso, este mesmo alelo mostrou uma diferença estatisticamente significante com uma menor produção de sST2 plasmático em indivíduos controle (P <0,001). O alelo C do rs2381416 foi positivamente associado com SPT para *A. flavus*. (OR 7,2, IC 95% 1,05-3,37, P=0,033), epitélio de cão (OR 1,52, IC 95% 1,19-3,47, P=0,009) e gato (OR 1,52, IC 95% 1,04-2,63, P=0,048). Estes dados sugerem que os SNPs nos genes *IL33* e *IL1RL1* podem ter um impacto sobre o desenvolvimento de asma e alergia na população brasileira. No entanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar o impacto funcional de tais polimorfismos aqui descritos no desenvolvimento de asma e atopia.

**Palavras-chave:** Asma, atopia, polimorfismos, *IL33/IL1RL1*, imunogenética.

## ABSTRACT

QUEIROZ, Gerson de Almeida. STUDY OF INFLUENCE OF IL33 AND IL1RL1 POLYMORPHISMS IN SEVERE ASTHMA. 93f. 2016. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Asthma and atopy are conditions determined by environmental and genetic factors. Several genome-wide association studies have been conducted to try to understand the genetic components of such conditions. The *IL33* and *IL1RL1* are the most replicated genes in GWAS studies worldwide. The cytokine IL-33 and its receptor, membrane bound (ST2L) or its soluble form (sST2) together are potent Th2-type inflammation modulators. When bound to ST2L, IL-33 produced by multiple cells of the innate and adaptive response, induce proinflammatory cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13, increasing the response and Th2 inflammation main feature of asthma and allergies. On the other hand, when IL-33 binds to sST2, neutralizes their effect by preventing its binding to ST2L. Several polymorphisms in these genes have been associated with asthma and atopy. Thus, genetic factors that affect *IL33* and *IL1RL1* may influence susceptibility to asthma and atopy. In this context, this study aimed to evaluate the influence of polymorphisms in *IL33* and *IL1RL1* in asthma and atopy in a Latino population. To verify that he have used to different strategies, a cohort study for mild asthma and a case-control study for severe asthma. The A allele for rs1041973 in *IL1RL1* in SCAALA cohort was positively associated with IL-5 production (1.36 OR, 95% CI 1.09-1.84, p=0.044) specific IgE (OR 1.40, 95% CI 1.07-1.84, p=0.013) and SPT (OR 1.48, 1.08-2.03 95% CI, p=0.014), both against *B. tropicalis* mite. Furthermore, atopic individuals with the AA genotype of rs1041973 showed a decreased production of sST2 as compared to individuals with the AC and CC genotypes (P<0.05). The G allele of *IL33* SNP was negatively associated with asthma (OR 0.71, 95% CI 0.53-0.94, p=0.017). Regarding the ProAR case control study the A allele of rs1420101 in *IL1RL1* was positively associated with atopic asthma (OR 1.29, 95% CI 1.05-1.66, P=0.046) and negatively associated with FEV1 (BETA - 2.37, 95% CI -4.67 ; -0.07, P=0.043). In addition, this same allele showed a statistically significant difference with a lower production of plasma sST2 in control subjects (P<0.001). The C allele of rs2381416 was positively associated with SPT to *A. flavus*. (OR 7.2, 95% CI 1.05 to 3.37, P = 0.033), dog (OR 1:52, 1:19 to 3:47 95%, P = 0.009) and cat epithelium (OR 1:52, 95% CI 1.04-2.63, P = 0.048). These data suggest that SNPs in *IL33* and *IL1RL1* genes may have an impact on the development of asthma and allergy in Brazilian population. However, further studies should be conducted to further elucidate the functional impact of such polymorphisms described herein in the development of asthma and atopy.

**Keywords:** Asthma, atopy, polymorphisms, *IL33/IL1RL1*, immunogenetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Complexo da resposta Th2 na asma.....	18
Figura 2. O papel das ILC2 no pulmão.....	21
Figura 3. Ativação biológica da via de sinalização IL-33/IL1RL1.....	27
Figura 4. Estratégias atuais e futuras para tratamento da resposta Th2 na asma	31

### Manuscript 1:

Figure 1. Plasma levels of sST2 in atopic subject with A allele of rs1041973.....	41
Figure 2. Expression of <i>IL1RL1</i> , flanking the rs1041973 and rs873022 polymorphisms, in chromosome 2.....	42
Figure 3. LD plots of SNPs of <i>IL1RL1</i> and <i>IL33</i> .....	45

### Manuscrito 2:

Figura 1. Expressão dos SNPs <i>IL1RL1</i> rs1420101 e rs13424006 no tecido pulmonar e no sangue total.....	63
Figura 2. Níveis plasmáticos de sST2 em indivíduos controles para os SNPs <i>IL1RL1</i> rs1420101 e rs13424006.....	64
Figura 3. Impacto funcional de SNPs <i>IL1RL1</i> e <i>IL33</i> .....	68



## LISTA DE TABELAS

### Manuscript 1:

Table 1. Baseline subject demographic characteristics.....	39
Table 2. Characterization of the studied SNPs in <i>IL33</i> e <i>IL1RL1</i> .....	39
Table 3. Significant associations between SNPs on <i>IL33</i> with asthma and markers of atopy.....	40
Table 4. Significant associations between SNPs on <i>IL1RL1</i> with asthma and markers of atopy.....	40
Supplemental Table 1. All <i>IL1RL1</i> SNPs associated.....	52
Supplemental Table 2. All <i>IL33</i> SNPs associated.....	53

### Manuscrito 2:

Tabela 1. Descrição demográfica da população.....	60
Tabela 2. Informações gerais dos polimorfismos.....	61
Tabela 3. Associação do <i>IL33</i> SNP rs2381416 com marcadores de atopia.....	61
Tabela 4. Associação do <i>IL1RL1</i> SNP rs1420101 com asma e FEV1.....	62
Tabela 5. Associação do <i>IL1RL1</i> SNP rs13424006 com asma e positividade ao teste cutâneo para vários aeroalérgenos.....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

Chr: Cromossomo (*Chromossome*)  
CI: Intervalo de confiança (*confidence intervals*)  
DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)  
GWAS: Estudo de Associação Ampla do genoma (*Genome Wide Association Studies*)  
Ig: Imunoglobulina (*Immunoglobulin*)  
IL: Interleucina (*Interleukin*)  
IL1RL1: Receptor semelhante à interleucina-1 (*interleukin 1 receptor like 1*)  
LD: Desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium*)  
MAF: Alelo de menor frequência (*minor allele frequency*)  
OR: Razão de chances (*Odds ratio*)  
ProAR: Programa para o controle da Asma e da Rinite Alérgica na Bahia (*Asthma and Allergic Rhinitis Control Program in Bahia*)  
PWM: *pokeweed*  
SCAALA: Mudanças sociais asma e alergia na América Latina (*Social Changes Asthma and Allergy in Latin America*)  
SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único (*single-nucleotide polymorphisms*)  
SPT: Teste cutâneo (*Skin Prick Test*)  
Th: Células T auxiliares (*T helper*)  
TLR: Receptor tipo Toll (*Toll-Like Receptor*)  
NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)  
IkK: Quinase inibidora de NF- $\kappa$ B (kinase inhibitor NF- $\kappa$ B)  
I- $\kappa$ B $\alpha$ : Inibidor citoplasmático de NF- $\kappa$ B (cytoplasmic inhibitor of NF- $\kappa$ B)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
	2.1 Epidemiologia da asma.....	14
	2.2 Fenótipos de asma.....	16
	2.3 Fisiopatologia da asma.....	17
	2.4 Papel da rota IL-33/IL1RL1 na imunopatologia da asma.....	24
	2.5 Influência de fatores genéticos na asma.....	28
	2.6 Tratamento da asma.....	29
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE E OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
	3.1 Geral.....	32
	3.2 Específicos.....	32
<b>4</b>	<b>Manuscript 1: <i>IL33</i> and <i>IL1RL1</i> variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population.....</b>	<b>33</b>
	4.1 Abstract.....	33
	4.2 Introduction.....	34
	4.3 Materials and Methods.....	35
	4.4 Results.....	38
	4.5 Discussion.....	42
	4.6 References.....	47
	4.7 Supplementary Results.....	52
<b>5</b>	<b>Manuscrito 2: Polimorfismos na rota IL-33/IL1RL1 estão associados com gravidade de asma, função pulmonar e atopia em estudo do tipo caso-controle em adultos.....</b>	<b>54</b>
	5.1 Resumo.....	54
	5.2 Introdução.....	55
	5.3 Materiais e métodos.....	56
	5.4 Resultados.....	60
	5.5 Discussão.....	65
	5.6 Conclusão.....	69
	5.7 Referências.....	70
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença complexa multifatorial ocasionada pelos fatores ambientais juntamente com a predisposição genética individual, sendo que o impacto do componente genético pode variar de 35% a 95% (Savenije, Mahachie John et al. 2014; Sarnowski, Sugier et al. 2016). Nas últimas duas décadas a prevalência de asma e outras doenças alérgicas têm aumentado mundialmente, crescendo principalmente em países desenvolvidos (Daley, Park et al. 2012). A asma pode ser classificada em fenótipos de asma leve, moderada ou grave (Li, Hawkins et al. 2013). Sendo que o aumento da hiperresponsividade das vias aéreas e limitação do fluxo aéreo são umas das principais características desta doença (Howrylak, Moll et al. 2016).

A descoberta de genes que possuem relação com o desenvolvimento desta doença tem crescido nos últimos cinco anos, em decorrência de estudos de ampla associação do genoma (GWAS). Estes estudos envolvem a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) contidos nos genes de interesse (Grotenboer, Ketelaar et al. 2013). As alterações de um único nucleotídeo podem ocorrer por todo o genoma e influenciam na susceptibilidade a doenças podendo-se inferir sua relação com os fenótipos de determinada enfermidade (Koberle, Koch et al. 2016).

Há alguns anos duas moléculas, a interleucina-33 (IL-33) e seu receptor ST2 foram descobertas e estudos mostraram uma possível relação destas moléculas com o desenvolvimento de asma e alergias (Schmitz, Owyang et al. 2005; Kurokawa, Matsukura et al. 2011). A IL-33 é uma citocina da família IL-1 e é liberada quando células epiteliais das vias aéreas são expostas a estímulos exógenos, como micróbios e alérgenos, fazendo com que várias células do sistema imunológico sejam ativadas na interação da IL-33 com seu receptor ST2L, incluindo mastócitos, basófilos, macrófagos, células dendríticas e células Th2, levando a produção de várias moléculas pró-inflamatórias (Schmitz, Owyang et al. 2005).

O ST2L, membro da superfamília de receptores IL-1 do tipo Toll do gene *IL1RL1*, está localizado no cromossomo 2q12 e é expresso na superfície de mastócitos, células Th2, células T regulatórias e macrófagos. Além disso, está presente também no soro em uma forma solúvel (sST2). A ligação da IL-33 com ST2L possui um papel importante nas alergias e na asma, embora esse mecanismo não esteja totalmente

esclarecido. No entanto, polimorfismos localizados em *IL33* e *IL1RL1* já foram associados com a dermatite atópica e outras doenças alérgicas e podem contribuir de maneira positiva ou negativa para o desenvolvimento das mesmas (Reijmerink, Postma et al. 2008).

Contudo, dentro deste contexto complexo da asma alérgica e a forte associação de fatores genéticos relacionados com a rota IL-33/IL1RL1 com a asma alérgica, como tem sido evidenciado por estudos do tipo GWAS realizado até agora em outras populações não latinas, e pela busca necessária por novas formas terapêuticas para o tratamento da asma e alergias, de um modo geral, justifica-se o presente trabalho que investigou a influência de polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* associados à asma e marcadores de alergia nunca antes explorados em uma população brasileira altamente miscigenada. Este trabalho será apresentado em duas etapas seguidas da revisão de literatura que são: i) estudo do papel de polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* com asma leve em amostra populacional de Salvador-BA e; ii) estudo do tipo caso-controle envolvendo polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* com asma grave e fenótipos/marcadores relacionados a alergia, também em Salvador-BA.

## REVISÃO DA LITERATURA

### Epidemiologia da asma

A asma, uma doença inflamatória das vias aéreas que apresenta uma fisiopatologia multifatorial, sendo uma das doenças crônicas mais comuns entre indivíduos em todas as faixas etárias (Masoli, Fabian et al. 2004; Romantowski, Gawinowska et al. 2015). A asma acomete 334 milhões de pessoas em todo o mundo, e sua principal causa de morbimortalidade consiste no rápido estreitamento das vias aéreas (Asher and Pearce 2014; Faiz, Donovan et al. 2016).

Em uma escala global, ao longo dos anos, a asma tem permanecido como uma das principais causas de morbidade, independentemente da idade, sexo ou condição social. Isto, em grande parte, é devido à complexidade de fatores envolvidos no desenvolvimento e fisiopatologia da doença, apesar das várias opções terapêuticas de combate à asma, já existentes (Chogtu, Bhattacharjee et al. 2016).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a urbanização associada às emissões elevadas de poluentes e um estilo de vida mais ocidentalizado estão correlacionados com um aumento da frequência da asma (D'Amato, Vitale et al. 2015). A poluição atmosférica é um indutor importante de exacerbações de sintomas clínicos desta doença. Condições meteorológicas como pressão atmosférica elevada, temperaturas baixas e redução da umidade, desempenham um papel importante na difusão e acumulação de poluentes no ar, podendo induzir diretamente a asma (Wang 2016).

A asma atópica é um sério problema de saúde, que acomete pessoas em todos os lugares do mundo, independente de grupo etário (Lai, Beasley et al. 2009). Sua prevalência mundial varia em torno de 1% a 21% em adultos, e chega a afetar cerca de 20% das crianças com idade entre 6 a 7 anos com episódios de sibilância grave no período de um ano (To, Stanojevic et al. 2012).

A asma representa uma das doenças crônicas que mais gera custos, afetando uma parcela de 7% a 17% da população americana (Valet, Gebretsadik et al. 2011). Aproximadamente 40 milhões de americanos são diagnosticadas com asma, esta inflamação crônica das vias aéreas é responsável por um custo de 50 bilhões por

ano para a sociedade, além da perda significativa de produtividade das pessoas que sofrem desta afecção (Sullivan, Ghushchyan et al. 2011; Akinbami, Moorman et al. 2012; Moorman, Akinbami et al. 2012). Nos Estados Unidos, a asma refratária, sem resposta ao tratamento, afeta aproximadamente 60% e 50% dos pacientes adultos e pediátricos, respectivamente (Stanford, Gilsenan et al. 2010).

No Brasil, anualmente, ocorrem cerca de 350.000 internações por asma, e esta doença se constitui a quarta maior causa de hospitalizações no Sistema Único de Saúde (Lipworth, Kaliner et al. 2005). Um estudo transversal realizado com 109.104 escolares do 9º ano (8ª série) do ensino fundamental de escolas públicas e privadas de todos os estados brasileiros e do Distrito Federal apontou uma maior prevalência de sintomas de asma nas cidades de Salvador (BA) (24,6%) e Vitória da Conquista (BA) (30,5%), sendo a prevalência média entre os adolescentes brasileiros próxima de 20% (Barreto 2014).

Em outro estudo com 197 asmáticos, acompanhados durante um período de pelo menos 1 ano no programa de tratamento a asma e rinite alérgica na Bahia (ProAr) a asma grave impactou de forma negativa na renda familiar em uma população carente de renda média. A asma foi a principal responsável por 47% dos desempregos, muitas vezes causados pela limitação de atividades do cotidiano e entradas frequentes em emergências. Por outro lado, com o tratamento adequado, a qualidade de vida destes asmáticos melhorou em 74%, aumentando a renda das famílias em US\$ 711/ano, conforme os seus membros voltaram a trabalhar (Franco, Nascimento et al. 2009).

A maior parte dos custos que asma acarreta ao sistema de saúde possui ligação direta com visitas frequentes às unidades de emergência e hospitalizações por causa de exacerbações agudas e crônica relacionadas à doença (Kumar, Herbert et al. 2016). Exacerbações agudas da asma são definidas em termos clínicos, sendo caracterizada por uma piora dos principais sintomas da afecção (Dougherty and Fahy 2009). A asma refratária, não respondente ao tratamento, expõe o paciente ao maior risco de exacerbações futuras e, portanto, tem um impacto significativo sobre o estilo de vida, no uso de recursos de saúde e custos com saúde (Sadatsafavi, Rousseau et al. 2014). Estes casos de asma refratária são considerados mais deletérios aos indivíduos, podem estar associados com imunopatologias diversas, bem como fenótipos múltiplos de asma.

## **Fenótipos de asma**

A forma mais grave da asma está associada com sintomas constantes e pode dificultar vários aspectos da vida do paciente, como realizar algumas atividades do cotidiano, má qualidade de vida, e em alguns casos, crise broncoobstrutiva tão intensa que pode levar até mesmo a morte (Bostantzoglou, Delimpoura et al. 2015).

Nos últimos anos, a literatura tem mostrado um número muito grande de informações sobre crianças e adultos que têm sido acometidos por fenótipos de asma alérgica (Garcia-Marcos 2016). Nestes casos, há um predomínio da resposta imune Th2 na inflamação das vias respiratórias (Muraro, Lemanske et al. 2016).

A asma atópica engloba várias células e mediadores inflamatórios (Lin, Fang et al. 2016). A infiltração de células inflamatórias produz uma grande variedade de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas que atuam através de mecanismos autócrinos e parácrinos, não só para regular a função das células inflamatórias, mas também das células epiteliais, endoteliais, músculo liso e fibroblastos (Koziol-White and Panettieri 2011; Li, Riddle et al. 2011).

A asma, apesar de ser considerada uma doença tradicionalmente alérgica, uma grande parcela dos indivíduos que possuem esta doença não apresentam alergia (Strina, Barreto et al. 2014). A prevalência de asma não atópica, na América Latina, é maior do que a asma atópica. Este dado tem sido relacionado a fatores socioeconômicos e à qualidade nutricional (D'Innocenzo 2014).

Alguns quadros de asma exacerbada têm sido relacionados a fenótipos com inflamação neutrofílica das vias aéreas. A interleucina-17 (IL-17), uma citocina regulada positivamente nas vias aéreas de alguns pacientes asmáticos, parece ser responsável pela ativação e recrutamento de neutrófilos, bem como o aumento da viabilidade destas células no epitélio aéreo (Murcia, Vargas et al. 2016). Sendo assim, asma associada à produção de IL-17 e a presença predominante de neutrófilos é geralmente caracterizada por uma maior gravidade, obstrução do fluxo de ar e resistência aos esteróides (Yang, Jiang et al. 2016). Estudos com amostras do tecido pulmonar de asmáticos graves evidenciaram uma maior percentagem de neutrófilos em comparação com asmáticos controlados (Ordonez, Shaughnessy et al. 2000; Moore, Hastie et al. 2014). Estas e outras células inflamatórias exercem papel fundamental na fisiopatologia da asma.



## **Fisiopatologia da asma**

Asma atópica é classicamente causada por uma reação de hipersensibilidade do tipo 1, que resulta em uma resposta do tipo Th2, mediados por células inflamatórias com aumento da produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 e anticorpos IgE (Nabe 2014). Esta é uma molécula medeia às reações alérgicas e tem um papel central na fisiopatologia da asma atópica, uma vez que está presente na resposta alérgica de fase precoce e tardia (Samitas, Delimpoura et al. 2015).

Logo após a primeira exposição ao alérgeno, as células T naive mudam o seu fenótipo para o subgrupo de linfócitos conhecidos como Th2. Conseqüentemente, citocinas como IL-4 e IL-13 são produzidas e liberadas, aumentando a expressão do receptor de baixa afinidade para IgE (FceRII) e células B são estimuladas a produzir IgE específica contra o alérgeno (Samitas, Lotvall et al. 2010).

O receptor de alta afinidade para IgE (FceRI) são expressos na superfície de mastócitos e basófilos e, em níveis muito baixos, nas células apresentadoras de antígenos (MacGlashan 2008). A ativação do FceRI medeia a regulação de IgE, ativação de monócitos e células apresentadoras de antígeno e a diferenciação de células B. Logo, a densidade da expressão do FceRI em mastócitos humanos é diretamente proporcional aos níveis de IgE (Rosenwasser and Meng 2005; Stone, Prussin et al. 2010).

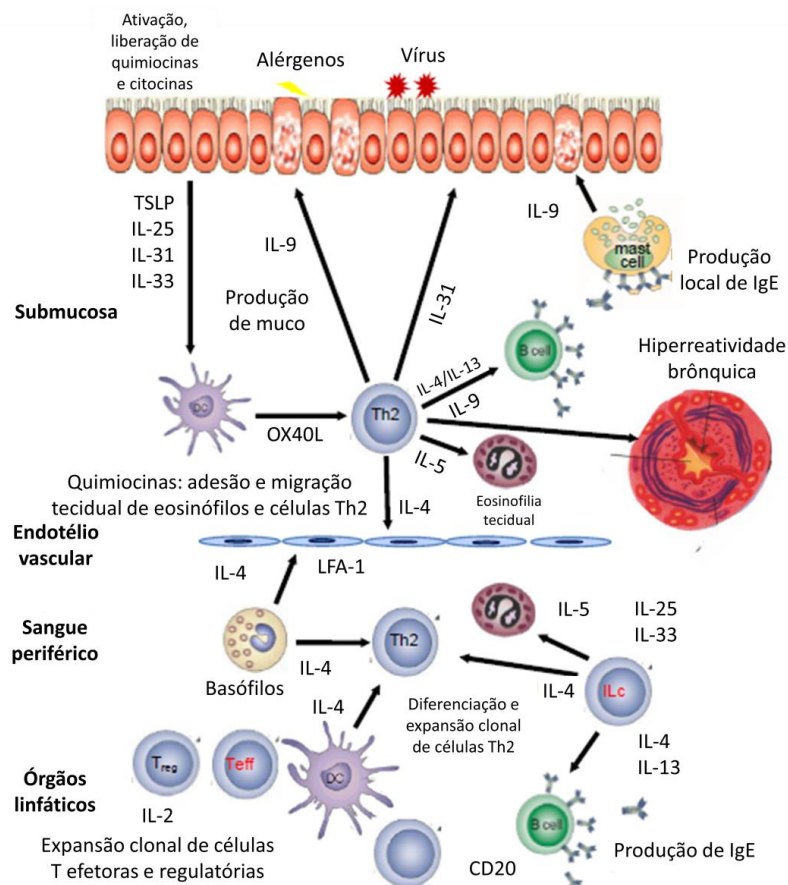
Antígenos comumente são introduzidos nas vias aéreas por inalação e se difundem através da mucosa sensibilizando os mastócitos pela ligação da IgE específica ao seu receptor de alta afinidade (Hofmann and Abraham 2009). Uma segunda exposição ao mesmo alérgeno resulta em degranulação de mastócitos com rápida liberação de compostos químicos como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, além de outros mediadores pró-inflamatórios (Samitas, Delimpoura et al. 2015). Estes desempenham papel central na imunopatogênese da asma, sendo responsáveis, em grande parte, pela hiperresponsividade das vias aéreas, obstrução reversível do fluxo aéreo e remodelamento, desencadeando os principais sintomas da asma que incluem sibilos, tosse e dispneia (Dong, Xiong et al. 2016; Wang, Hu et al. 2016).

A hiperresponsividade das vias aéreas é uma das principais características da asma, pois se refere à capacidade do brônquio de sofrer estreitamento em resposta a

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

A Figura 1 resume a complexa rede da resposta imune Th2. A ativação do epitélio resulta em liberação de TSLP, IL-25, IL-31 e IL-33 e contribui para respostas Th2 por células T e células linfoides inatas. As citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e quimiocinas liberadas por estas células ativadas desempenham um papel importante na produção de IgE específica para o aeroalérgeno, ativação e degranulação de mastócitos, ativação e recrutamento de eosinófilos para o local de inflamação, bem como a permissividade da passagem de outras células inflamatórias pelo endotélio, além do aumento da produção de muco e maior contração do musculo liso, resultando em hiperreatividade das vias aéreas.

**Figura 1:** Complexo da resposta imune Th2 na asma. A ativação das células epiteliais e liberação de IL-25, IL-31, IL-33 e TSLP contribui para respostas do tipo 2 de células T e células linfoides inatas. Estas citocinas desempenham um papel na produção de IgE específica para o alérgeno, eosinofilia, permissividade do endotélio para o recrutamento de células inflamatórias para tecidos inflamados, produção de muco e diminuição do lúmen dos brônquios pelo aumento da contração dos músculos lisos.



**Fonte:** Adaptado de Agache, I. e Akdis, C. A. “Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine”. *Allergology International*, 2016.

Na asma, o estresse oxidativo contribui para a inflamação das vias aéreas através da indução da expressão genes inflamatórios. O fator de transcrição sensível a redox, fator nuclear NF-κB participa em uma grande variedade de respostas inflamatórias, regulando a atividade de citocinas nas vias aéreas (Schuliga 2015).

A diversidade celular da resposta imune inflamatória Th2 forma uma complexa rede de citocinas como IL-4, IL-5, e IL-13, dentre outras que são secretadas, principalmente, por células do sistema imune, além de algumas citocinas liberadas a partir de células teciduais, particularmente células epiteliais das vias aéreas. Este tipo de resposta é elaborada por células da imunidade inata e adquirida como as células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2s), basófilos, eosinófilos, mastócitos, sendo, quase todas, orquestradas pelos linfócitos T e B do tipo Th2 (Agache and Akdis 2016).

### Linfócitos Th2

Os linfócitos conhecidos como T helper do tipo 2, produtor de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, desempenham um papel importante na patogênese da asma, pelo menos em alguns subtipos de asma (Yao, Sun et al. 2016). Estas moléculas pró-inflamatórias fazem parte do grupo de citocinas relacionado com a inflamação crônica do tipo Th2 e atuam como uma ponte entre a imunidade inata e humoral, interligando os dois tipos de respostas. Além disso, essas citocinas também são produzidas e secretadas por ILC2s, favorecendo condições no epitélio brônquico que contribuem para o agravamento de sintomas clínicos da asma.

### ILC2s

Recentemente, as células epiteliais das vias respiratórias e células do sistema imune têm sido proeminentemente relacionadas à patogênese da asma (Wesolowska-Andersen and Seibold 2015). O epitélio brônquico é um elemento fundamental das vias respiratórias e constitui-se uma barreira física com muitas propriedades imunológicas, proporcionando proteção ao hospedeiro contra antígenos externos.

Por outro lado, na asma, o epitélio brônquico se comporta de maneira anormal, representando um componente essencial para promover inflamação das vias aéreas e remodelação que podem levar a sintomas crônicos (Carsin, Mazon et al. 2016).

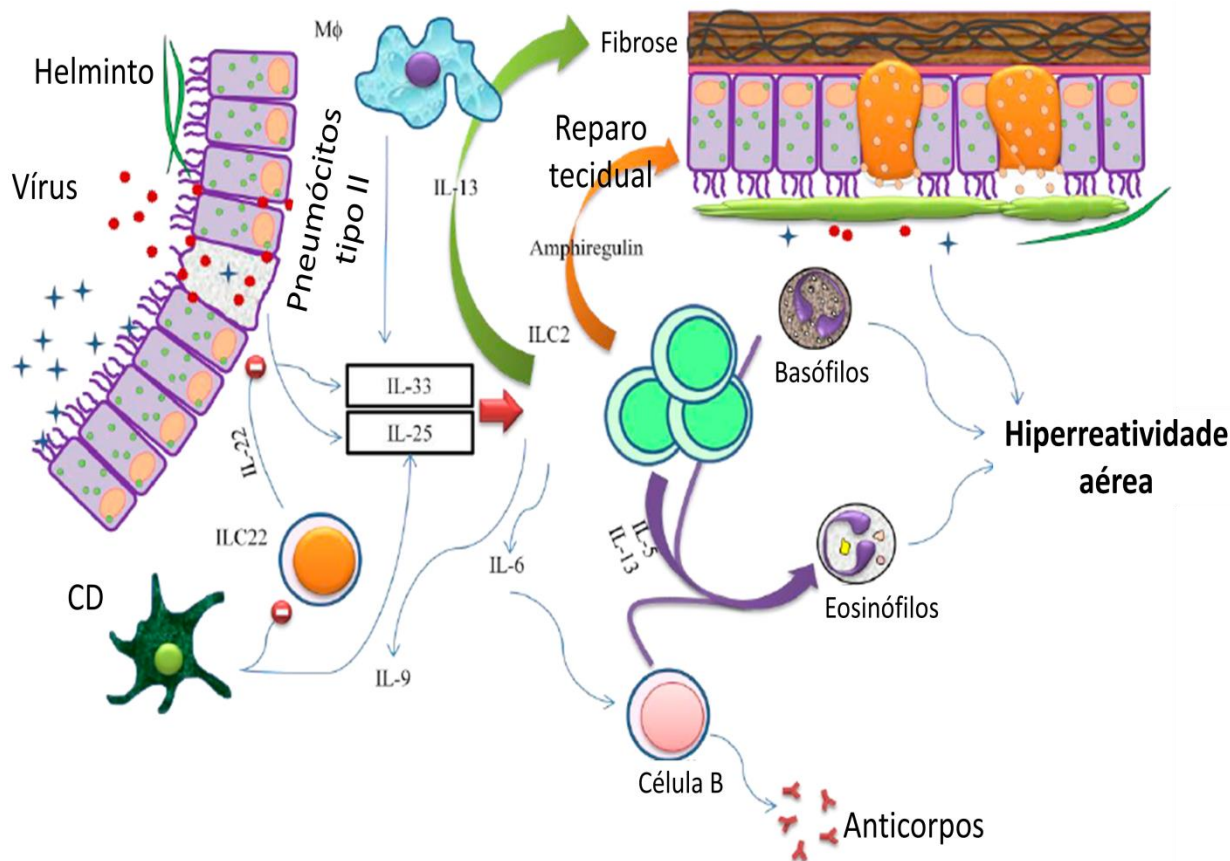
Em geral, ILCs constitui-se um elemento diferenciado do sistema imune inato. Proporcionando uma resposta inicial do hospedeiro por meio de citocinas específicas, imediatamente após a detecção de estímulos externos na primeira linha de defesa. O papel desafiador inicial das respostas imunes aos vários patógenos é executado por ILCs que possuem a capacidade de secretar citocinas efetoras rapidamente (Monticelli, Sonnenberg et al. 2011).

ILC2s que secretam IL-5 e IL-13, são um exemplo de imunidade do tipo 2. Esta imunidade induz ativação de mastócitos, basófilos, eosinófilos e aumenta os níveis de IgE sérico (Ozyigit, Morita et al. 2015). Este subconjunto de ILCs reside em vários tecidos epiteliais e desenvolve um papel importante na resposta alérgica, presente no perfil de resposta Th2, ligando sinais do ambiente externo ao sistema imune (Kita 2015).

Em um estudo utilizando modelo experimental com camundongos, as ILC2s provocaram inflamação eosinofílica acompanhada por hiperresponsividade das vias aéreas independente da imunidade adquirida. Porém, estudos recentes, mostraram que estas células também promovem polarização Th2 através da imunidade adquirida. Este subgrupo de células linfóides foi recentemente identificado como populações de células que produzem citocinas Th2, como IL-5 e IL-13 em resposta a citocinas derivadas de células epiteliais (Kabata, Moro et al. 2015).

A Figura 2 demonstra o papel das ILC2s no pulmão. IL-25 e IL-33 são produzidas e secretadas por vários tipos de células, incluindo células epiteliais, macrófagos alveolares e células dendríticas (DCs) em resposta a alérgenos, vírus e outros estímulos, como parasitas dentro do pulmão. Estas citocinas ativam e induzem ILC2s a produzirem IL-5 e IL-13. A primeira causa proliferação e maior sobrevivência de eosinófilos. A segunda, diferenciação de células caliciformes com aumento da produção de muco, hipercontractilidade do músculo liso e fibrose das vias aéreas. A interação cruzada entre ILC2 com ILC22, células Th2 e células B resulta em produção de IgE específica contra o aeroalérgeno, hiperresponsividade das vias aéreas e manutenção da interface entre a resposta imune inata e adaptativa na asma atópica (Marashian, Mortaz et al. 2015).

**Figura 2:** O papel das ILC2 no pulmão. IL-25 e IL-33 são produzidas por células epiteliais, macrófagos alveolares e células dendríticas, em resposta a alérgenos, vírus e parasitas dentro do pulmão. Estas citocinas ativam ILC2 que produzem grandes quantidades de IL-5 e IL-13. Estas citocinas causam proliferação e a sobrevivência de eosinófilos, a diferenciação de células caliciformes e a produção de muco, a hiperproliferação celular epitelial, uma maior contração do músculo liso e fibrose das vias aéreas. No geral, isto resulta em hiperresponsividade e comprometimento das vias aéreas. Além disso, existe conversa cruzada entre ILC2 e outras subpopulações de linfócitos, incluindo ILC22 produtoras de IL-22, células Th2 e células B e células para melhorar e manter a interface entre a resposta imunológica/inflamatória inata e adaptativa na asma.



**Fonte:** Adaptado de Marashian S. M. et al. "Role of Innate Lymphoid Cells in Lung Disease". Iran J Allergy Asthma Immunol, 2015.

Durante anos considerou-se que a asma atópica desenvolvida na infância era proveniente de uma resposta imune adaptativa que se instalava logo após a fase de sensibilização prévia a alérgenos. Porém, as células epiteliais das vias aéreas que constituem a barreira da linha da frente, inicialmente expostas a substâncias inaladas, colaboram de maneira ativa com células dendríticas pulmonares para montar uma resposta Th2 (Pulendran and Artis 2012; Kita 2015).

Estudos experimentais de inflamação alérgica das vias respiratórias induzida por fungo, em um modelo experimental com camundongos, ativam ILC2s que, de forma muito rápida, produzem grande quantidade de citocinas Th2, resultando em aumento da produção de muco, hiperreatividade e eosinofilia (Kita 2015).

## Eosinófilos

Eosinófilos são células inflamatórias dominantes nas vias aéreas asmáticas. Quando em números elevados, constituem a principal característica patológica da asma e estão relacionados à produção e liberação de proteínas tóxicas e mediadores inflamatórios, que ativam e recrutam mais eosinófilos para o sítio inflamatório, desempenhando assim, um papel essencial na patogênese da asma (Lin, Yin et al. 2015).

A inflamação com predomínio de eosinófilos conduzida pela sensibilização alérgica e mediada pela resposta imune Th2 é uma das principais marcas da inflamação das vias aéreas na asma atópica (Eltboli and Brightling 2013). Além disso, eosinófilos também sintetizam e secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-4, IL-5, IL-13 (Davoine and Lacy 2014).

Os eosinófilos possuem quatro proteínas básicas específicas, são elas: proteína básica principal, proteína catiônica de eosinófilos, peroxidase de eosinófilos e neurotoxina derivada de eosinófilos, ambas armazenadas em grânulos secundários (Navarro, Aleu et al. 2008). Em combinação estes grânulos são citotóxicos e perturbam a barreira epitelial pulmonar protetora, permitindo uma regulação positiva da resposta inflamatória.

## Mastócitos

Os mastócitos, células do sistema imunológico provenientes da linhagem mieloide, encontram-se nas mucosas e tecidos epiteliais de todo o corpo, exceto no sistema nervoso central. De um modo geral, estas células localizam-se estrategicamente na junção entre o meio externo, entrada de antígenos, e o hospedeiro, como o epitélio respiratório (Krystel-Whittemore, Dileepan et al. 2015).

Os mastócitos são conhecidos pelo seu principal mecanismo de ação, reações alérgicas mediadas por IgE através do receptor de alta ligação (FceRI) para esta molécula (Rasmussen, Jensen et al. 2002). Este processo, em parte, é auxiliado por células B, que durante o processo de mudança para células plasmáticas secretoras de IgE, também expressam IgE ligada à membrana, o que auxilia no processamento do antígeno e na transdução do sinal. Por outro lado, formas de IgE livre, favorece a

ligação desta molécula ao FcεRI em mastócitos e os sensibiliza para o alérgeno. Uma segunda exposição ao alérgeno induz a degranulação e liberação de mediadores como histamina e leucotrienos, provocando edema local e broncoconstrição (Stone, Prussin et al. 2010; Galli and Tsai 2012). Mastócitos ativados por antígenos inalados que migram para trato respiratório inferior desempenham um papel central na imunopatogênese da asma atópica, pois a inflamação local causa obstrução das vias aéreas e diminuição do FEV1, uma das principais consequências da asma alérgica (Strauss-Albee, Horowitz et al. 2014).

### Células dendríticas

Na fase aguda da inflamação, as células dendríticas (CDs) pulmonares tem seu papel pouco compreendido em relação à sensibilização alérgica. No entanto, sabe-se que estas células atuam na resolução da inflamação removendo restos apoptóticos, promovendo a diminuição citocinas inflamatórias e o aumento da expansão de células T regulatórias e da produção de interleucina-10 (IL-10), bem como da produção de mediadores lipídicos protetores como resolvinas (Serhan and Savill 2005). A resolvina E1 inibe a motilidade de CDs, afetando a capacidade de ativação de células T (Sawada, Honda et al. 2015).

O subconjunto de CDs CD103<sup>+</sup>, na resolução da inflamação no pulmão asmático, desenvolve bem a função de remover células que sofreram apoptose. Além de realizar, de forma eficiente, a apresentação cruzada de antígenos nos nódulos linfáticos (Desch, Randolph et al. 2011). Recentemente, um estudo experimental, comprovou que a depleção da molécula CD103<sup>+</sup> reduziu a capacidade de camundongos em resolver inflamação pulmonar em modelos de asma alérgica (Bernatchez, Gold et al. 2015).

No pulmão asmático, a resolução do processo inflamatório, de alguma forma, torna-se prejudicada. Os mecanismos, embora mal compreendido, podem incluir a diminuição da depuração de células apoptóticas (Felton, Lucas et al. 2014) e da secreção de resolvina E1 (Haworth, Cernadas et al. 2008). A incapacidade de realizar essas tarefas, associada a uma resposta inflamatória Th2 constante após contatos repetidos com o alérgeno, conduzir a um estado inflamatório crônico (van Rijt, Vos et al. 2011), resultando em remodelação das vias aéreas.

As CDs são conhecidas por seu papel crítico tanto na sensibilização alérgica quanto na fase efetora da asma atópica. Alguns estudos mostraram que o papel das CDs se resume basicamente à captação do alérgeno, produção de citocinas e quimiocinas e, o mais importante, a sua capacidade em induzir a diferenciação de células T naive para os subtipos Th1, Th2, Th17 e Treg (Lambrecht and Hammad 2015; Froidure, Shen et al. 2016).

Ambos, os subtipos de CDs, CD103<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>, compõem a principal população das vias pulmonares. Estas se mostraram eficientes na captura de alérgenos tanto *ex vivo* quanto *in vivo*, sendo consideradas essenciais na resposta Th2 induzida por alérgeno (Furuhashi, Suda et al. 2012).

Num modelo de asma mediada por um ácaro presente na poeira doméstica (Norimoto, Hirose et al. 2014), quando a integridade da barreira epitelial é violada, prontamente são liberados alguns mediadores inflamatório como citocinas TSLP, IL-25 e IL-33. Por conseguinte, CDs CD11b<sup>+</sup> recrutadas para o pulmão por CSF-2 (Unkel, Hoegner et al. 2012) promovem diferenciação Th2 induzidas pelo contato com *Blomia tropicalis* (Zhou, Ho et al. 2014).

Um estudo recente mostrou que OX40L foi expresso na superfície de CDs CD11b<sup>+</sup>, mas não em CDs CD103<sup>+</sup> em um modelo experimental de indução viral no epitélio respiratório (Han, Dakhama et al. 2012). Em outro estudo, o TSLP, um sinalizador de dano epitelial aéreo, aumentou a expressão de OX40L na superfície de CDs CD11c<sup>+</sup> (Ito, Wang et al. 2005), intensificando a diferenciação Th2 (Liu 2007).

### **Papel da rota IL-33/IL1RL1 na imunopatologia da asma**

Além das citocinas Th2, uma citocina não relacionada, mas com potente poder de polarização da resposta Th2, a Interleucina-33 (IL-33), vem sendo associada com a asma (Li, Li et al. 2014). IL-33, da família IL-1, é constitutivamente presente em células endoteliais (Baekkevold, Roussigne et al. 2003), células epiteliais e queratinócitos (Moussion, Ortega et al. 2008). Esta é provavelmente liberada após estresse mecânico celular (Kakkar, Hei et al. 2012), lesão ou necrose (Cayrol and Girard 2009; Luthi, Cullen et al. 2009).



IL-33 desenvolve papel importante na fisiopatologia de doenças alérgicas e devido ao seu poder de polarização da resposta imune Th2, tem sido associada, entre outras doenças, com infecções helmínticas e asma alérgica (Oboki, Ohno et al. 2010; Li, Li et al. 2014).

Asma atópica é uma doença complexa causada por complicada interação entre vários fatores genéticos e alérgenos ambientais que afeta o trato respiratório por inflamação crônica (Wang, Liu et al. 2012). *IL33* codifica uma proteína que é liberada quando as células epiteliais das vias respiratórias são danificadas enquanto *IL1RIL1* codifica o receptor da IL-33.

A IL-33 atua ativando mastócitos, além de promover a produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 por meio de várias células hematopoiéticas (Lunderius-Andersson, Enoksson et al. 2012). Ela também é capaz de promover inflamação estéril (Russell and Walsh 2012) e ativar eosinófilos (Cherry, Yoon et al. 2008; Suzukawa, Koketsu et al. 2008) basófilos (Suzukawa, Likura et al. 2008) e as células dendríticas (Rank, Kobayashi et al. 2009).

Estudos funcionais indicam um papel importante para IL-33 no desenvolvimento de inflamação Th2, tanto em seres humanos quanto modelos experimentais de doença respiratória alérgica (Lingel, Weiss et al. 2009; Liew, Pitman et al. 2010; Grotenboer, Ketelaar et al. 2013). A liberação de IL-33 induz uma contração muito rápida das vias aéreas. Este evento é seguido por um aumento da produção de IL-13, produzida por células Th2 e células linfoides inatas (Barlow, Peel et al. 2013).

IL-33 induz a produção e liberação de IL-5 e IL-13 a partir de ILC2s (Nabe 2014). Por conseguinte, estas citocinas aumentam a secreção de muco e eosinofilia, respectivamente. Portanto, a via de sinalização IL-33/ST2 tem sido implicada na patogênese de doenças que envolvem a inflamação das vias respiratórias tais como a asma atópica (Schmitz, Owyang et al. 2005; Kurowska-Stolarska, Stolarski et al. 2009; Oboki, Ohno et al. 2010).

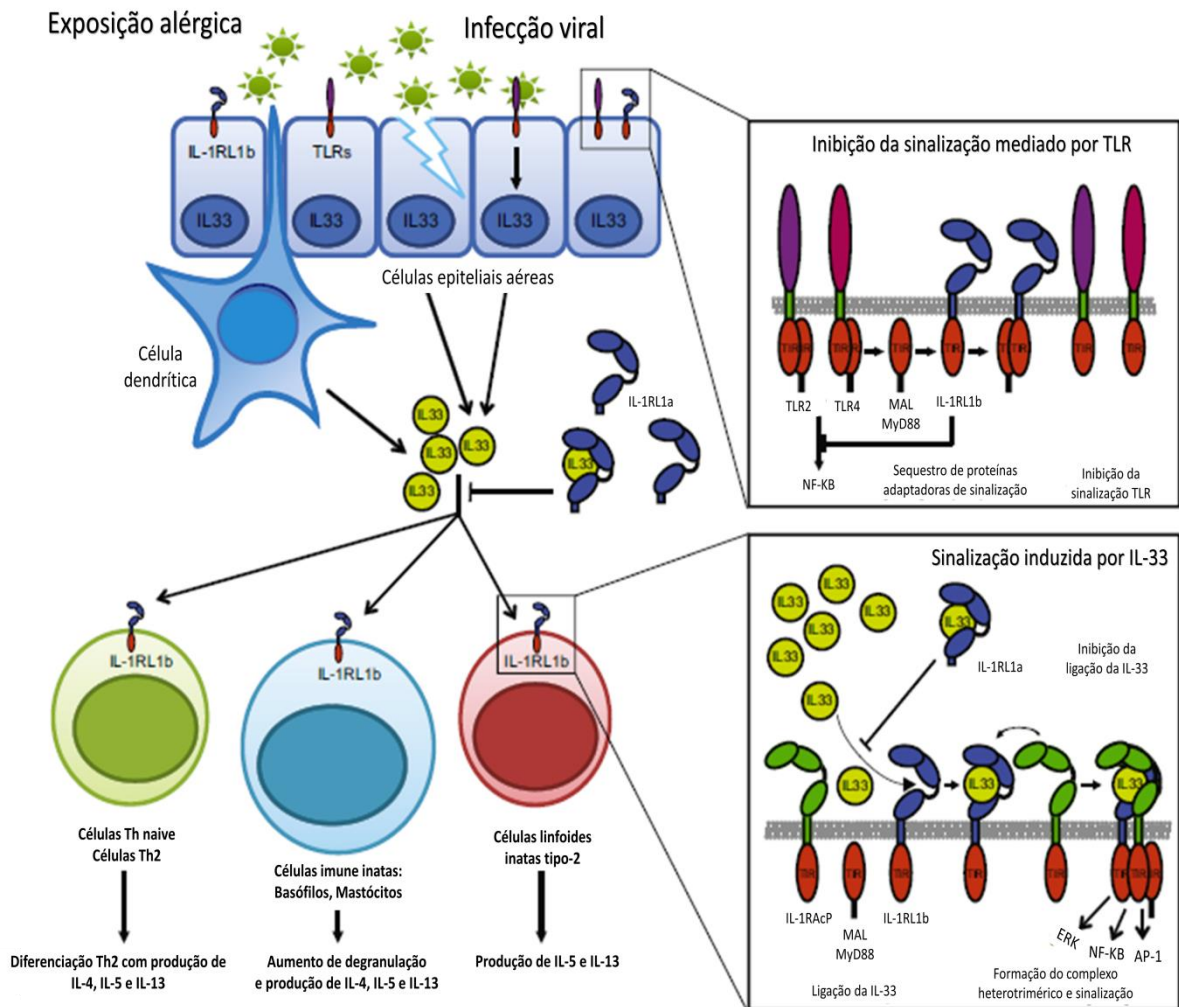
Particularmente, a citocina derivada do epitélio aéreo IL-33, favorece a ligação entre a exposição à alérgenos do ambiente e a resposta imune do tipo 2 (Wang and Liu 2009; Ziegler, Pitt et al. 2010; Ziegler and Artis 2010). Alguns experimentos já comprovaram essa associação por diversas vias de administração. A injeção intraperitoneal de IL-33 em camundongos favoreceu o aumento dos níveis séricos

de IgE, citocinas Th2 e promoveu eosinofilia das vias aéreas (Kondo, Yoshimoto et al. 2008). A inalação de IL-33 induziu inflamação pulmonar Th2, mesmo em animais com células T e B deficientes (Oboki, Ohno et al. 2010).

A IL-33 é capaz de induzir a produção de IgE mesmo na ausência de IL-4 por meio de mastócitos humanos e tem a capacidade de potencializar a produção de citocinas do tipo Th2 juntamente com a citocina de células epiteliais linfopoiética estromal tímica (TSLP) através dos mastócitos (Haraldsen, Balogh et al. 2009). Além disso, a IL-33 pode também ativar células B1 *in vivo*, aumentando a produção de IL-5 e IL-13 por estas células (Schmitz, Owyang et al. 2005; Miller, Xu et al. 2008; Komai-Koma, Gilchrist et al. 2011).

O efeito biológico da IL-33 é consequência da sua interação com o receptor órfão, ST2L (Chackerian, Oldham et al. 2007). Esta ligação recruta o receptor acessório IL-1RAcP e, em seguida, o complexo IL-33/ST2/IL-1RAcP (Liu, Hammel et al. 2013). Esta tríade, por sua vez, recruta proteínas adaptadoras de sinalização como Mal e MyD88, e subsequentemente iniciam uma cascata de sinalização que culmina na ativação de quinases e fatores de transcrição como NF-κB e proteína ativadora 1 (AP-1). Além disso, a sinalização induzida pela IL-33 e a interação entre o receptor IL-1RL1b com as proteínas adaptadoras MyD88 e Mal, também desempenha um papel na inibição da sinalização do receptor semelhante a Toll, como mostrado na Figura 3.

**Figura 3:** Ativação biológica da via de sinalização IL-33/IL1RL1. O dano ao epitélio aéreo induz a liberação de IL-33. IL-33 se liga ao complexo de receptores formados por IL-1RL1b e IL-1RAcP e recruta moléculas adaptadoras de sinalização Mal ou MyD88, que conduz à ativação a jusante da via. IL-1RL1a pode neutralizar a IL-33. Em adição ao papel da IL-33 na transdução do sinal, IL-1RL1b pode inibir a sinalização TLR através do sequestro dependente do domínio TIR das proteínas adaptadoras MyD88 e Mal.



**Fonte:** Adaptado de Groutenboer, N. S. et al. "Decoding asthma: translating genetic variation in *IL33* and *IL1RL1* into disease pathophysiology". *J Allergy Clin Immunol*, 2013.

A partir de sinais dos receptores da superfície celular, como receptores semelhantes à Toll, por exemplo, fosforilam quinases associadas ao receptor. Estas quinases fosforiladas, por sua vez, fosforilam quinases intracelulares específicas (quinase inibidora de NF-kB - IκK). A fosforilação de IκKs resulta em fosforilação do inibidor citoplasmático de NF-kB (I-κBα) e na consequente marcação deste para ser degradado no proteossoma. Isto liberta NF-kB, permitindo a sua translocação nuclear e a sua ligação a elementos de respostas específicas dentro das regiões reguladoras de genes responsivos no DNA, aumentando a produção de citocinas e mediadores inflamatórios (Traenckner, Wilk et al. 1994; Ghosh and Karin 2002).

A ativação da rota de sinalização IL-33/IL1RL1 acaba resultando na produção de citocinas pró-inflamatória com o desenvolvimento ou exacerbação da asma atópica (Hayakawa, Hayakawa et al. 2007). Por outro lado, o ST2 solúvel (sST2) é a forma livre do receptor ST2L que se liga à IL-33, neutralizando, ou impedindo a ação do

seu efeito biológico, impedindo sua ligação ao ST2L (Grotenboer, Ketelaar et al. 2013).

ST2, ou IL1RL1, tem sido considerado um fator importante na resposta imune Th2 (Tago, Noda et al. 2001; Hayakawa, Hayakawa et al. 2007). Estudos realizados ao longo da última década indicam que o receptor ST2L atua como um marcador seletivo para as células Th2 em humanos (Trajkovic, Sweet et al. 2004). No entanto, estudos recentes têm mostrado que este também é expresso em mastócitos, eosinófilos e basófilos (Allakhverdi, Smith et al. 2007; Ho, Ohno et al. 2007; Cherry, Yoon et al. 2008; Suzukawa, Koketsu et al. 2008; Suzukawa, Likura et al. 2008). Portanto, a interação exacerbada da rota IL-33/ST2, aumenta a produção de citocinas do perfil Th2 e contribui para o desenvolvimento de doenças alérgicas.

### **Influência de fatores genéticos na asma**

Os processos patológicos da asma parecem estar sob a influência da combinação de fatores genéticos e ambientais, mas o mecanismo detalhado ainda não é exatamente compreendido (Lasso-Pirot, Delgado-Villalta et al. 2015; Wang, Hu et al. 2016). Estudos genéticos sobre a asma revelaram um grande número de genes candidatos que estão potencialmente envolvidos com a resposta do sistema imune relacionada à patogênese da asma (Renkonen, Joenvaara et al. 2010).

Graças ao crescente conhecimento sobre a genética da asma e a chegada de novas tecnologias de genotipagem tornou-se possível sequenciar, detalhadamente, o genoma humano na busca de variantes associadas à asma. Devido ao crescente número de pesquisas nessa área, muitas variantes raras estão sendo associadas ao risco desta afecção (Thomsen 2015).

Dentro do contexto de variantes genéticas, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são os tipos mais frequentes de alterações genéticas entre os indivíduos. Um SNP localizado dentro da sequência de codificação de um determinado gene, pode levar a uma substituição de um único aminoácido, que por sua vez, pode alterar a função da proteína transcrita por esse gene. Esta mudança na sequência da proteína pode ser funcionalmente relevante, pois, em alguns casos a função da proteína é alterada. SNPs, portanto, podem conferir aos indivíduos, maior ou menor

susceptibilidade de risco ou proteção a uma variedade de doenças humanas (Koberle, Koch et al. 2016).

Tem sido observado que somente alguns indivíduos, dos que estão expostos a agentes pulmonares desencadeantes, passam a desenvolver a asma. Uma melhor compreensão de variantes genéticas pode ajudar a explicar essa variabilidade entre os indivíduos. Estudos realizados em todo o mundo mostram interações importantes entre a genética, o ambiente e a asma (Gaffney and Christiani 2015).

Neste contexto, os estudos de ampla associação do genoma (GWAS) para doenças alérgicas apontam *IL33* e *IL1RL1* como genes importantes para a susceptibilidade à asma alérgica, ressaltando o papel central desta via na fisiopatologia desta doença (Moffatt, Gut et al. 2010; Saluja, Ketelaar et al. 2015). A via IL-33/ST2 tem sido amplamente replicada em diferentes populações (Allakhverdi, Smith et al. 2007) sendo associada com a incidência de asma (Smith 2010) e aumento de eosinófilos no sangue (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009).

Um estudo do tipo GWAS realizado com mais de 10.300 pacientes asmáticos e mais de 16.100 controles de diferentes continentes identificaram oito SNPs associados com asma, incluindo variantes em *IL33* e *IL1RL1*, reforçando o papel fundamental destes genes e sua associação com inflamação alérgica (Moffatt, Gut et al. 2010).

Parece que as variações genéticas em *IL33* e *IL1RL1* podem resultar em uma maior probabilidade para o desenvolvimento da asma (Torgerson, Ampleford et al. 2011). Porém, cada variação pode resultar num sinal independente com resultados funcionais distintos para a via IL-33/IL1RL1 que desempenha um papel central na fisiopatologia da asma (Grotenboer, Ketelaar et al. 2013).

Os achados na literatura corroboram que a IL-33 tem importante participação na inflamação pulmonar e o ST2 tem sido visto como um possível alvo terapêutico no tratamento da asma (Miller 2011).

## **Tratamento da asma**

Após o tratamento inicial com corticosteróides inalados, um aumento na dose desse fármaco ou a adição de outra terapia, incluindo b2-agonistas de longa duração, modificadores dos leucotrienos, ou teofilina, é recomendado para alcançar o controle

esperado da doença. Em pacientes com formas mais graves da doença, no qual, não foi possível controlar o quadro clínico, outros tipos de terapias também são recomendadas (McIvor 2015).

Tem sido observado em pacientes com asma grave um elevado nível de inflamação Th2 e pouca sensibilidade em relação às terapias disponíveis atualmente (Colley, Mercado et al. 2016).

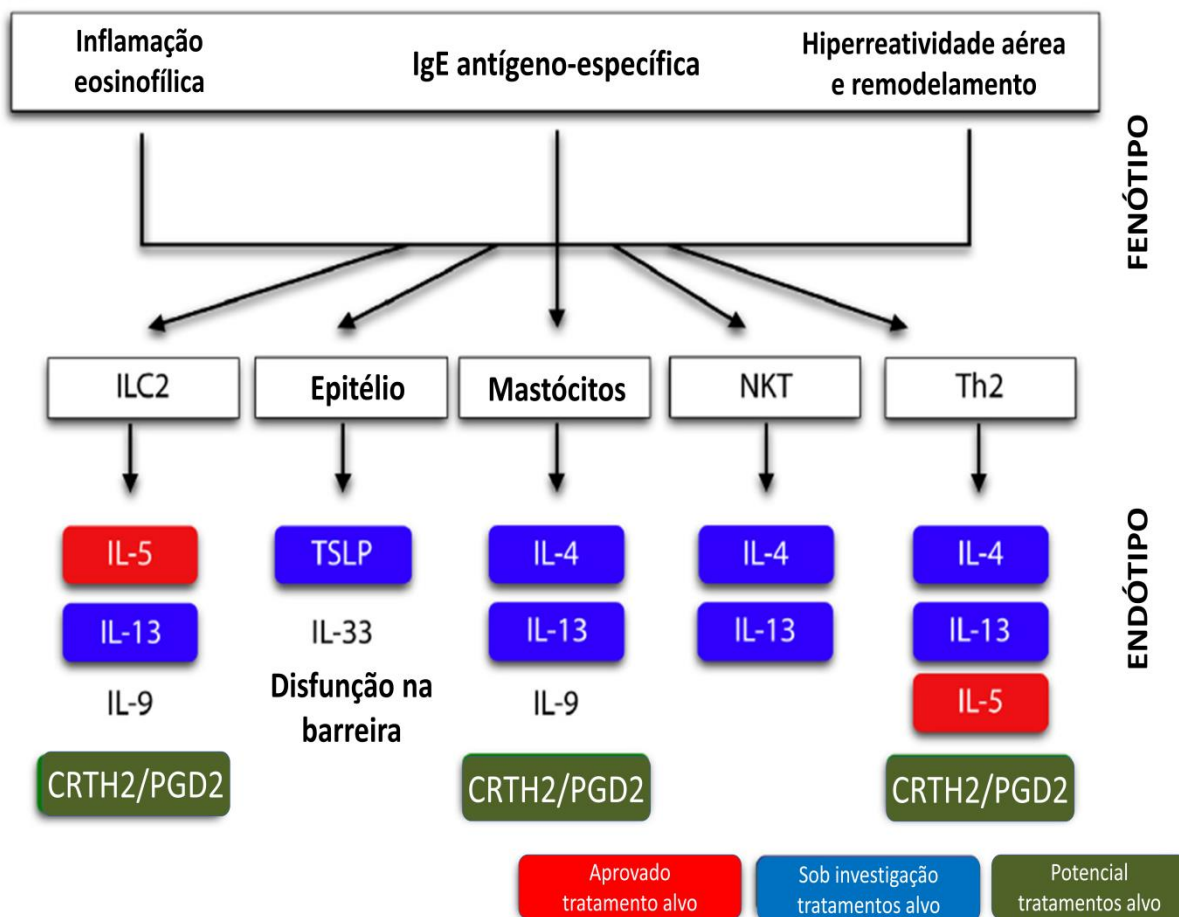
Cerca de 10% dos indivíduos que possuem asma assumem uma predisposição a fenótipos mais graves da doença e permanecem sem resposta ao tratamento, mesmo com doses elevadas de corticosteróides inalados e agonistas do receptor de longa ação B2-adrenérgico (Wenzel 2005). Este subgrupo, reuni uma maior proporção da morbimortalidade relacionada à asma, pois, é constante o número de entradas em emergências e pronto atendimentos para tratar estados de exacerbação do quadro clínico desta doença (Antonicelli, Bucca et al. 2004).

Vários tratamentos estão sendo estudados e estão em fases de testes para pacientes asmáticos em vários estágios do desenvolvimento clínico da resposta inflamatória Th2, com estratégias tais como: administração de anti-IL-4 e anti-IL-13 (Wenzel, Ford et al. 2013; Hanania, Noonan et al. 2015), anti-IL-5 (Corren, Weinstein et al. 2016) e anticorpos anti-IgE (Humbert, Busse et al. 2014).

Estratégias inovadoras para o tratamento da asma estão surgindo atualmente para pacientes com asma não controlada. O objetivo principal de novas formas terapêuticas é reduzir ou substituir a terapia com corticoide oral de longo prazo. Algumas opções terapêuticas já foram inseridas na prática e algumas ainda serão autorizadas para o tratamento da asma, enquanto outras ainda precisam provar sua praticidade clínica, segurança e eficácia (Lommatzsch and Stoll 2016), como mostrados na Figura 4.

**Figura 4:** Estratégias atuais e futuras para o tratamento da resposta imune Th2 na asma. Três fenótipos principais de asma dirigida por resposta imune do tipo 2 são descritas: inflamação eosinofílica; sensibilização alérgica, representada pela presença de IgE específica para o antígeno; e hiperreatividade das vias aéreas e remodelação. Ambas as respostas imunes inata e adquirida contribuem para os endotipos da resposta imune do tipo 2. Alvos terapêuticos para endotipos de asma envolvem a maioria das moléculas presentes na resposta imune do tipo 2: vermelho, tratamentos aprovados para asma; azul, sob investigação; verde, potenciais alvos terapêuticos.

## Resposta imune Th2 na asma



**Fonte:** Adaptado de Muraro A. et al. "Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis—PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology". J Allergy Clin Immunol, 2016.

Além dos tratamentos alvos já existentes e em fase de investigação para a asma, outras moléculas envolvidas na indução da resposta Th2 podem surgir como possíveis alvos terapêuticos. O sST2 proporciona uma nova perspectiva para tratar asma. Este receptor solúvel captura a IL-33, impedindo sua ligação ao ST2L, bloqueando seu efeito biológico e o desenvolvimento da resposta Th2 (He, Wu et al. 2014). Dessa forma, o entendimento de como esta rota está envolvida na ocorrência de asma em população brasileira, especialmente, investigando-se os aspectos genéticos que influenciam na ativação ou inibição desta rota é essencial para considerar esta rota um novo alvo terapêutico.

## HIPÓTESE E OBJETIVOS

### Hipótese

Variantes genéticas presentes nos genes *IL33* e *IL1RL1* podem influenciar no desenvolvimento de asma e atopia.

### Objetivo Geral

Avaliar a influência de polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* na asma e atopia.

### Objetivos Específicos

- Realizar a genotipagem de SNPs em *IL33* e *IL1RL1* em indivíduos asmáticos e não asmáticos;
- Avaliar a associação de polimorfismos presentes nos genes *IL33* e *IL1RL1* com asma e atopia;
- Determinar os níveis de IL-33 e sST2 no plasma e sobrenadante do escarro de indivíduos asmáticos e não asmáticos;
- Avaliar a associação dos níveis de IL-33 e sST2 com polimorfismos genéticos.



## MANUSCRITO 1: *IL33* and *IL1RL1* variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population

Authors: Gerson de Almeida Queiroz<sup>£</sup>, Ryan Santos Costa<sup>£</sup>, Neuza Maria Alcantara-Neves<sup>‡</sup>, Mauricio Lima Barreto<sup>†</sup>, Valdirene Leão Carneiro<sup>£</sup>, Camila Alexandrina Figueiredo<sup>£</sup>

**Running head:** *IL33/IL1RL1* asthma and atopy

### Abstract

Atopic asthma is a chronic inflammatory disease in airways resulting from genetic and environmental factors, characterized by production of the Th2 cytokines interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5) and interleukin-13 (IL-13). Interleukin-33 (IL-33) appears to be a potent inducer of Th2 immune response. This occurs when IL-33 binds and activates its receptor, the membrane ST2 (ST2L) in mast cells, dendritic cells, basophils, eosinophils, innate lymphoids and Th2 cells, leading to the release of these cytokines and intensifying allergic inflammation. Polymorphisms in the *IL33* and *IL1RL1* can act as protective or risk factors for asthma and/or allergy in humans. No study was conducted in order to replicate such findings in a European and African descendent mixed population. DNA was extracted from peripheral blood from 1,253 subjects and the samples were genotyped using Illumina 2.5 Human Omni Beadchip. We tested for possible associations between SNPs in the *IL33* and *ST2* with asthma and allergy markers such as specific IgE (sIgE), IL-5 and IL-13 production and skin prick test (SPT). Logistics regressions were performed using PLINK software 1.9. The analyses were adjusted for sex, age, helminth infection and ancestry markers. The G allele of *IL33* SNP rs12551256 was negatively associated with asthma (OR 0.71, 95% CI 0.53–0.94, p=0.017). In contrast, the A allele of *IL1RL1* rs1041973 was positively associated with IL-5 production (OR 1.36, 95% CI 1.09–1.84, p=0.044), sIgE levels (OR 1.40, 95% CI 1.07–1.84, p=0.013) and positive SPT (OR 1.48, 95% CI 1.08–2.03, p=0.014), for *B. tropicalis* mite. The same allele, in atopic subjects, was associated with decreased production of soluble ST2 (sST2) (p <0.05). Moreover, expression quantitative trait loci (eQTL) analysis suggests that rs1041973 and rs873022 regulate the expression of *IL1RL1* gene. Our findings demonstrate a robust association of genetic variants in *IL1RL1* and *IL33* SNPs with allergy markers and asthma.

**Key words:** Asthma; allergy; polymorphisms; *IL33/IL1RL1*.

**Submetido ao periódico:** *International Journal of Immunogenetics*

---

<sup>£</sup>Departamento de Biorregulação, Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (ICS), Bahia, Brasil. <sup>‡</sup>Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (ICS), Bahia, Brasil. <sup>†</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil. Correspondence to: Camila Figueiredo, Departamento de Biorregulação, Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular, Universidade Federal da Bahia (ICS), Universidade Federal da Bahia, Campus do Canela, CEP: 41110-100, Salvador-BA, Bahia, Brazil. Tel/fax: +55 71 3283 8948; e-mail: cavfigueiredo@gmail.com (CA Figueirêdo)

## Introduction

Atopic asthma is characterized by a chronic inflammatory disease caused by type 1 hypersensitivity reaction, initiated by IgE antibody-mediated mechanisms and inflammatory cells as a result of a Th2-type response, with increased production of cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13 (Nabe 2014). Moreover, it increases the mucus production, eosinophils recruitment, and airways hyper-responsiveness with reduction of airflow. This disease is a result of a complex interaction between environmental factors and genetic variants that confer susceptibility to patients (Zhu, Homer et al. 1999; Schmitz, Owyang et al. 2005; Akhabir and Sandford 2011; Martinez and Vercelli 2013).

Interleukin-33 (IL-33), a cytokine from IL-1 family, is constitutively present in endothelial cells (Baekkevold, Roussigne et al. 2003), epithelial cells, and keratinocytes (Moussion, Ortega et al. 2008). It is probably released after mechanical cellular stress (Kakkar, Hei et al. 2012), injury or necrosis (Cayrol and Girard 2009; Luthi, Cullen et al. 2009) and has got an important role in the pathophysiology of allergic diseases and, due to its powerful Th2-type immune response polarization, it has been associated with allergic asthma and helminth infections, among other diseases (Oboki, Ohno et al. 2010; Li, Li et al. 2014). IL-33 also acts as an alarm in mast cells, despite promoting the production of cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 by mean of various hematopoietic cells (Lunderius-Andersson, Enoksson et al. 2012). It is also capable of promoting sterile inflammation (Russell and Walsh 2012), and activates eosinophils (Cherry, Yoon et al. 2008; Suzukawa, Koketsu et al. 2008) basophils (Suzukawa, Likura et al. 2008) and dendritic cells (Rank, Kobayashi et al. 2009).

The biological effect of IL-33 is consequence of its interaction with the orphan receptor, ST2L (Chackerian, Oldham et al. 2007). This binding recruits the receptor accessory IL-1RAcP and then, the IL-33-ST2-IL-1RAcP complex triggering subsequent signaling pathways (Liu, Hammel et al. 2013) and resulting in a pro-inflammatory production of cytokines with the development or exacerbation of atopic asthma (Hayakawa, Hayakawa et al. 2007). On the other hand, the sST2 (soluble ST2) is the free form of the ST2 receptor that acts as a decoy receptor for IL-33. ST2, or IL1RL1, has been considered as an important factor in the Th2-type immune response (Tago, Noda et al. 2001; Hayakawa, Hayakawa et al. 2007).

Studies conducted over the last decade indicated that ST2 receptors act as selective markers for human Th2 cells (Trajkovic, Sweet et al. 2004). However, recent studies have shown that these receptors are also expressed on mast cells, eosinophils and basophils (Allakhverdi, Smith et al. 2007; Ho, Ohno et al. 2007; Cherry, Yoon et al. 2008; Suzukawa, Koketsu et al. 2008; Suzukawa, Likura et al. 2008). It is known that the stimulation of IL-33/IL1RL1 pathway, contributes for the development of allergic diseases. In this context, genome-wide association studies (GWAS) for allergic diseases have pointed out *IL33* and *IL1RL1* as important genes for susceptibility to allergic asthma, underscoring the pivotal role of this pathway in the pathophysiology of this disease (Moffatt, Gut et al. 2010; Saluja, Ketelaar et al. 2015). Studies about the IL-33/ST2 route have been widely replicated in different populations (Allakhverdi, Smith et al. 2007) showing its association with asthma (Smith 2010) and increased blood eosinophils (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009).

However, within this heterogeneous complex context of allergic asthma and the strong association of genetic factors related to the disease and its severity, as evidenced by the GWAS conducted so far in other non-Latino American populations, our goal was to investigate the impact of polymorphisms in *IL33* and *IL1RL1* associated with asthma and markers of allergy, never explored before in a Brazilian population.

## **Materials and Methods**

### **Population and study design**

Data were collected in the city of Salvador in northeastern Brazil. Our study design has been described in several other works (Barreto, Cunha et al. 2006; Figueiredo, Barreto et al. 2010; Figueiredo, Alcantara-Neves et al. 2011; Alcantara-Neves, de et al. 2014). Briefly, a total of 1,253 unrelated children aged 4-11 years enrolled in SCAALA Program (Social Change in asthma and allergies in Latin America), a cohort of children 5 -11 old, originally recruited in their first infancy, living in many poor neighborhoods in the city of Salvador, were included in the present study. A standard questionnaire to collect data related to housing, sanitation and socioeconomic status, answered by the parents or guardians, was applied. The asthma status was collected using an ISAAC phase II questionnaire translated into Portuguese. The study was

approved by the Ethics Committee of the Public Health Institute (register 003-05/CEP-ISC) of the Federal University of Bahia, Brazil.

### **Asthma Definition**

Asthma was defined according to the ISAAC studies as the occurrence of wheezing in the last 12 months. In this study, we consider asthmatic children those who had wheezing in the past 12 months and at least one of the following symptoms: sleep disturbed due to wheezing, four or more episodes of wheezing, wheezing during the practice of physical activity, both in the last 12 months, asthma diagnosed by physician once in life. All other children were classified as non-asthmatics.

### **Blood collection and skin prick tests (SPT)**

The children were evaluated by a medical team, in a mobile clinic, where blood was collected and skin prick testing for relevant aeroallergens was done. Heparinized blood was collected and the plasma was prepared and used for measurement of following four allergen-specific IgE (sIgE): *D. pteronyssinus*, *B. tropicalis*, *B. germanica*, *P. americana*; and whole blood cultures were done for measurement of cytokines production in the cells' supernatants. SPTs were done on the right forearm of each child using extracts of *D. pteronyssinus*, *B. tropicalis*, *B. germanica*, *P. americana*, fungi, cat and dog danders (ALK-Abello, São Paulo, Brazil). Saline solution was used as control negative and 10 mg/mL histamine solution was used as positive control. After 15 minutes the reactions were read and the diameter size of 3 mm greater than the negative control was considered positive.

### **Specific IgE to aeroallergens**

To determine specific IgE levels, tests were conducted using ImmunoCAP assay (Phadia Diagnostics AB, Uppsala Sweden). Children who had specific sIgE levels greater than or equal to 0.7 kU/L and/or positive SPT, for at least one tested, aeroallergen was defined as atopic. The variable atopy in asthmatic patients was

created through the association between non-atopic asthma patients with atopic asthma.

### **Cell culture and IL-5, IL-13, IL-33 and sST2 measurements by ELISA**

The cells were cultured in a 1:4 dilution in RPMI medium (Gibco, Auckland, New Zealand) containing 10 mM glutamine (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Missouri, USA) and 100 ug/ml gentamicin (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Missouri, USA) within 6 hours of being collected in heparinized tubes. Cell cultures were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 ° C for 5 days for the detection of IL-5 and IL-13 stimulated with pokeweed mitogen (PWM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (2.5 ug/ml). The concentrations of each cytokine were measured by sandwich ELISA using commercial assays, following manufacturer's recommendations (BD PharMingen, San Diego, CA). The limits of detection in pg/ml were lower and higher, respectively, IL-5 (15.6/500) and IL-13 (62.5/4.000). Responsive children were considered those with concentration values within the detection range for both cytokines. IL-33 and sST2 were investigated in plasma by sandwich ELISA using commercial assay, following manufacturer's recommendations (R&D Systems, Minneapolis, Minn). The limits of detection in pg/ml were lower and higher, respectively, IL-33 (23.4/1.500) and sST2 (31.25/2.000). Data of the concentration of both cytokine were transformed with nature logarithm (Log).

### **Genotyping**

DNA was extracted from peripheral blood samples using the protocol Flexigene@ DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and we used for genotyping a commercial panel of Illumina BeadChip HumanOmni2.5-8 Kit ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)) through the Consortium Epigen-Brazil. The IL33 genetic information was extracted from 6215149 to 6257983 (location: NC\_000009.11) position at the chromosome 9. Also, the IL1RL1 genetic information was extracted from 102927962 to 102968497 (location: NC\_000002.11) position at the chromosome 2. For quality control, we have applied the following filters: genotyping call rate of less than 0.98; imbalance of Hardy-Weinberg equilibrium with p-value less than 10<sup>-4</sup> and p-value for the lower frequency allele (Minor Allele Frequency - MAF - low frequency allele) of less than 1% (Laurie,

Doheny et al. 2010). A total of 36 markers were analyzed for *IL33* and 37 markers for *IL1RL1*.

### ***In silico* expression analysis using GTEX browser**

*In silico* expression analyses were conducted for more consistent SNPs rs873022 and rs1041973 during the associations analyses using GTEX browser ([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)) in lung tissue according to the genotype of each SNP.

### **Statistical analysis**

The analysis for associations between polymorphisms in *IL33* and *IL1RL1* with asthma and positivity to SPT and sIgE, was performed using non-adjusted bivariate regression logistic model and a multivariate model adjusted by sex, age, helminth infection and individual ancestry, estimated as previously described (Lima-Costa, Rodrigues et al. 2015). This variable, consists of principal components (PC1 and PC2) categorizing individuals according to their ethnic characteristics. The dominant genetic model has been used in all analyses. Adaptive permutations were also employed to the bivariate and multivariate analysis. The adaptive permutations are better suited than traditional methods of correction for multiple testing, since it takes into account the dependency relationship between SNPs in linkage disequilibrium (LD). The LD plot was done using the software Haploview. We considered as significant associations, those with p values  $\leq 0.05$ . The statistical analysis for serum sST2 and IL-33 was performed using the software GraphPad 6, with t test for parametric data and Mann-Whitney test for nonparametric data.

### **Results**

Table 1 presented data of descriptive analysis of 946 non-asthmatics and 277 asthmatics participants. There were overall statistically significant differences for age ( $p < 0.0001$ ), specific IgE for at least one allergen ( $p < 0.0001$ ), sIgE for *B. tropicalis* ( $p < 0.0001$ ), *D. pteronyssinus* ( $p < 0.0001$ ) and *P. americana* ( $p = 0.038$ ); SPT for *B. tropicalis* ( $p = 0.015$ ) and *D. pteronyssinus* ( $p = 0.001$ ). The others phenotypes (sex,

SPT for fungi, *B. germanica*, cat and dog epithelia, did not show any statistically significant differences.

**Table 1.** Baseline subject demographic characteristics

Variables	Subject group (n)				P value
	Non-asthmatic (946)	%	Asthmatic (277)	%	
<b>Age</b>					
≤ 5 y	314	33,20	132	47,70	<b>&lt;0.0001**</b>
6-7 y	337	35,60	91	32,90	
≥ 8 y	295	31,20	54	19,50	
<b>Sex</b>					
Male	437	46,20	124	44,80	0.674
Female	509	53,80	153	55,20	
<b>Specific IgE for</b>					
At least one allergen	327	34,60	134	48,40	<b>&lt;0.0001**</b>
<i>B. tropicalis</i>	289	30,50	129	46,60	<b>&lt;0.0001**</b>
<i>D. pteronyssinus</i>	179	18,90	91	32,90	<b>&lt;0.0001**</b>
<i>P. americana</i>	120	12,70	49	17,70	<b>0.038*</b>
<b>Skin prick test for</b>					
<i>D. pteronyssinus</i>	132	14,00	62	22,40	<b>0.001*</b>
<i>B. tropicalis</i>	193	20,40	76	27,40	<b>0.015*</b>
<i>B. germanica</i>	71	7,50	31	11,20	0.059
Dog epithelium	7	0,74	6	2,20	0.061
Cat epithelium	6	0,63	3	1,10	0.463
Fungi	2	0,21	3	1,10	0.073
<b>Spontaneous cytokine production by peripheral blood cells</b>					
IL-5	583	61,60	188	67,90	0.103
IL-13	313	33,10	84	30,30	0.509
<b>Cytokine production by PWN stimulated peripheral blood cells</b>					
IL-5	583	61,60	188	67,90	0.103
IL-13	674	71,20	206	74,40	0.567

Data were analyzed using the chi-squared test. \*P<0.05. \*\*P<0.0001.

**Table 2.** Characterization of the studied SNPs in *IL33* and *IL1RL1*

CHR	SNP	A1	A2	MAF	FUNCTION
<b><i>IL33</i></b>					
9	rs12551256	G	A	0.32	Intron
9	rs7037276	C	T	0.06	intron variant, upstream variant 2KB
9	rs16924161	C	T	0.08	Intron
<b><i>IL1RL1</i></b>					
2	rs1041973	A	C	0.40	Missense
2	rs13016771	A	G	0.19	Intron
2	rs12999517	C	T	0.19	Intron
2	rs873022	T	G	0.14	Intron

CHR, chromosome; SNP, single nucleotide polymorphism; A1, minor allele; A2, allele wild; MAF, minor allele frequency.

Table 2 shows the description of seven SNPs examined in our population, three for *IL33* and four for *IL1RL1*. All SNPs presented Minor Allele Frequency (MAF) higher than 5%.

**Table 3.** Significant associations between SNPs on *IL33* with asthma and markers of atopy.

GENE	CHR	SNP	A1	Model	OR	CI 95%	P value
<b>Asthma</b>							
<i>IL33</i>	9	rs12551256	G	DOM	0.71	0.53–0.94	0.017
<b>Spontaneous IL-13 production by blood cells</b>							
<i>IL33</i>	9	rs7037276	C	DOM	1.48	1.02–2.15	0.040
<b>Atopy in asthmatic patients</b>							
<i>IL33</i>	9	rs7037276	C	DOM	2.56	1.11–5.91	0.027
<b>Anti-<i>B. tropicalis</i> IgE</b>							
<i>IL33</i>	9	rs16924161	C	DOM	1.45	1.04–2.03	0.028
<b>SPT for <i>B. tropicalis</i></b>							
<i>IL33</i>	9	rs16924161	C	DOM	1.55	1.07–2.24	0.020

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

Table 3 summarizes the significant associations between *IL33* SNPs and asthma, IL-13 production, specific IgE and SPT. The G allele of rs12551256 was negatively associated with asthma (OR 0.71, 95% CI 0.53–0.94,  $p=0.017$ ). The C allele of rs7037276 was positively associated with IL-13 (OR 1.48, 95% CI 1.02–2.15,  $p=0.040$ ) spontaneous production and atopy asthma (OR 2.56, 95% CI 1.11–5.91,  $p=0.027$ ). The C allele of rs16924161 was positively associated with anti-*B. tropicalis* IgE (OR 1.45, 95% CI 1.04–2.03,  $p=0.028$ ) and positively associated with SPT for *B. tropicalis* (OR 1.55, 95% CI 1.07–2.24,  $p=0.020$ ).

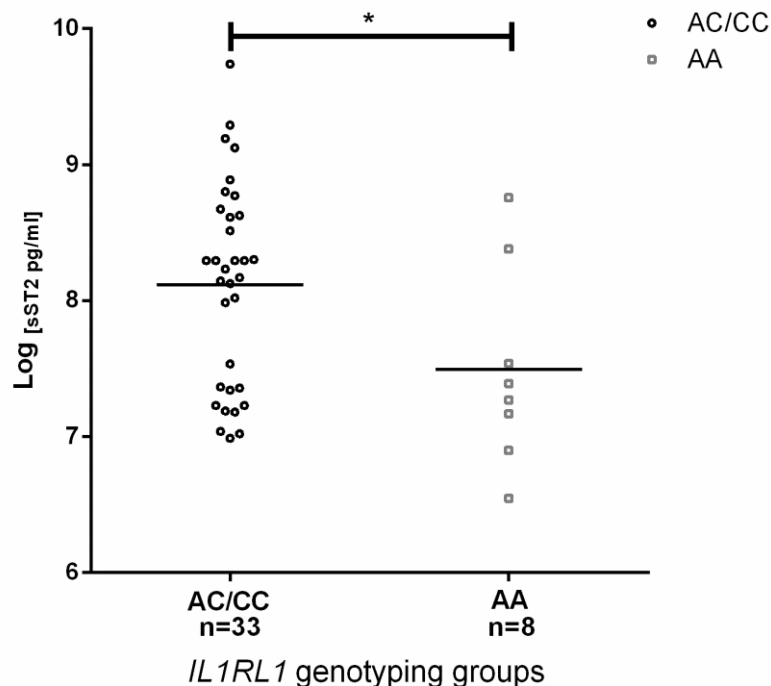
**Table 4.** Significant associations between SNPs on *IL1RL1* and markers of atopy.

GENE	CHR	SNP	A1	Model	OR	CI 95%	P value
<b>IL-5 production in PWM-stimulated blood cell cultures</b>							
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	DOM	1.36	1.09–1.84	0.044
<b>Specific IgE for at least one aeroallergen</b>							
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	DOM	1.32	1.02–1.72	0.037
<i>IL1RL1</i>	2	rs873022	T	DOM	0.66	0.49–0.89	0.006
<b>Anti-<i>B. tropicalis</i> IgE</b>							
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	DOM	1.40	1.07–1.84	0.013
<i>IL1RL1</i>	2	rs12999517	C	DOM	1.36	1.04–1.77	0.023
<i>IL1RL1</i>	2	rs13016771	A	DOM	1.35	1.04–1.76	0.025
<i>IL1RL1</i>	2	rs873022	T	DOM	0.72	0.54–0.98	0.035
<b>SPT for <i>B. tropicalis</i></b>							
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	DOM	1.48	1.08–2.03	0.014
<i>IL1RL1</i>	2	rs12999517	C	DOM	1.39	1.04–1.88	0.028
<i>IL1RL1</i>	2	rs13016771	A	DOM	1.41	1.05–1.90	0.024

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

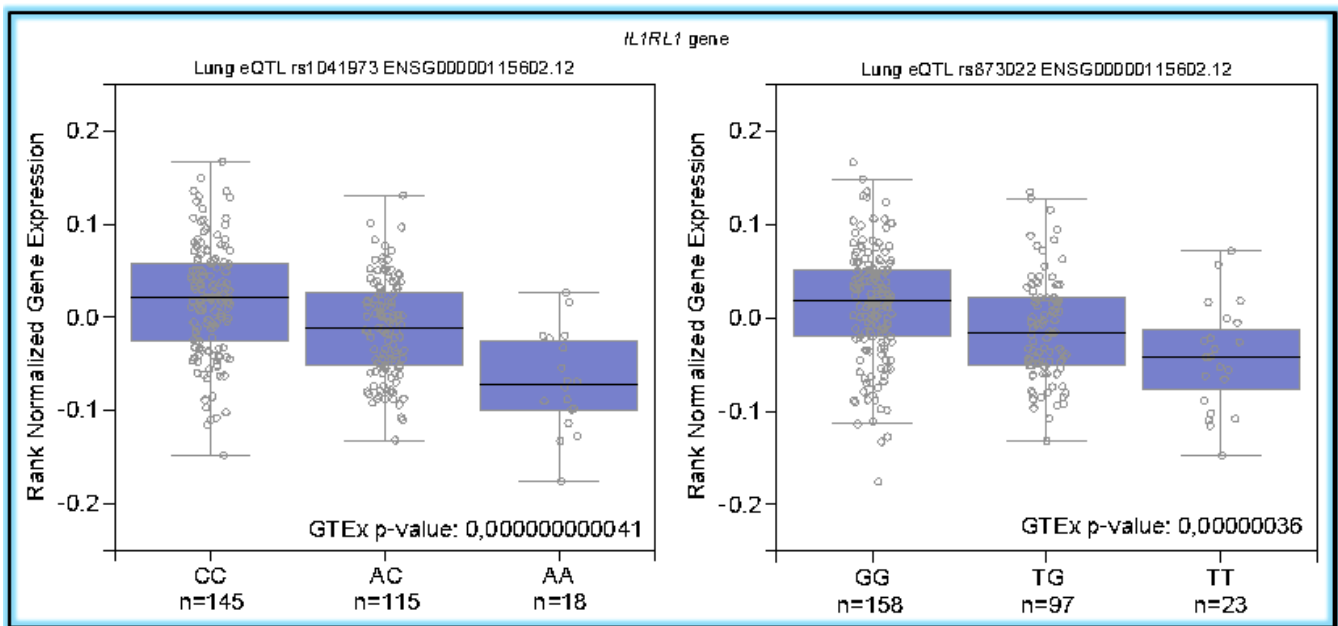


Table 4 shows the association between *IL1RL1* SNPs and markers of atopy. The A allele of rs1041973 was positively associated with IL-5 production (OR 1.36, 95% CI 1.09–1.84,  $p=0.044$ ), when peripheral blood cells were stimulated with pokeweed mitogen. The same marker, rs1041973, was positively associated with specific IgE production for at least one aeroallergen (OR 1.32, 95% CI 1.02–1.72,  $p=0.037$ ), and with sIgE levels (OR 1.40, 95% CI 1.07–1.84,  $p=0.013$ ) and SPT positivity (OR 1.48, 95% CI 1.08–2.03,  $p=0.014$ ), both for *B. tropicalis* mite. The T allele of SNP rs873022 was the only one that showed a negative association with IgE for at least one aeroallergen (OR 0.66, 95% CI 0.49–0.89,  $p=0.006$ ) and the same allele also was associated with less production of sIgE levels for *B. tropicalis* (OR 0.72, 95% CI 0.54–0.98,  $p=0.035$ ). The C allele of rs12999517 was positively associated with sIgE levels (OR 1.36, 95% CI 1.04–1.77,  $p=0.023$ ) and positive SPT (OR 1.39, 95% CI 1.04–1.88,  $p=0.028$ ), both for *B. tropicalis* mite. Moreover, the A allele of rs13016771 was also associated with an increased production of sIgE levels (OR 1.35, 95% CI 1.04–1.76,  $p=0.025$ ) and positive skin test (OR 1.41, 95% CI 1.05–1.90,  $p=0.024$ ), against the same mite.



**Figure 1.** Plasma levels of sST2 in atopic subject with A allele of rs1041973 in recessive model. Horizontal bars indicate mean values of the *IL1RL1* genotyping groups AC/CC: 8.117 and AA: 7.494, and symbols represent individual variants. Data were analyzed by parametric unpaired t test. \* $p$ -value < 0.05.

Soluble serum ST2 levels from atopic subject with genotype AA of *IL1RL1* SNP rs1041973 has presented a decreased production compared with individuals AC and CC for the same polymorphism (Figure 1). Data showed different statistically significance with p value <0.05. The IL-33 serum levels from asthmatic individuals with G allele of rs12551256 has not showed different statistically significance (Data not shown).



**Figure 2.** Expression of *IL1RL1*, flanking the rs1041973 and rs873022 polymorphisms, in chromosome 2.

*In silico* expression of *IL1RL1* in human lungs considering rs1041973 and rs873022 SNPs, according to the genotype, is shown in Figure 2. Levels of ST2 expression showed to be lower in subject with the A and T alleles with GTEx p-value: 0.000000000041 and 0.000000036, respectively.

## Discussion

Atopic asthma is a complex disease caused by complicated interactions between various genetic factors and environmental allergens that affects the respiratory tract by chronic inflammation (Wang, Liu et al. 2012). *IL33* encodes a protein that is released when airways epithelial cells are damaged, while *IL1RL1* encodes the receptor for IL-33. Functional studies indicate an important role for IL-33 in the development of Th2 inflammation, both in humans and mice with allergic airway

diseases (Lingel, Weiss et al. 2009; Liew, Pitman et al. 2010; Grotenboer, Ketelaar et al. 2013). The release of IL-33 induces a very fast contraction of the airway muscle cells. This event is followed by increased production of IL-13, produced by Th2 cells and innate lymphoid cells (Barlow, Peel et al. 2013). These latter, in presence IL-33, also induces the production and release of IL-5 and IL-13 (Nabe 2014). Consequently, these cytokines increase eosinophilia and mucus secretion, respectively. Therefore, IL-33/ST2 signaling has been implicated in the pathogenesis of diseases involving airway inflammation such as atopic asthma (Schmitz, Owyang et al. 2005; Kurowska-Stolarska, Stolarski et al. 2009; Oboki, Ohno et al. 2010).

A genome-wide association study (GWAS) conducted in more than 10.300 asthmatic patients and over 16.100 controls from different continents have identified eight SNPs associated with asthma, including those on *IL-33* and *IL1RL1*, reinforcing the critical role of these genes and their association with allergic inflammation (Moffatt, Gut et al. 2010).

It seems that genetic variations on *IL-33* and *IL1RL1* may result in a greater likelihood for asthma development (Torgerson, Ampleford et al. 2011). Each variation can result in a signal independent with distinct functional outcomes for this pathway that plays a central role in the physiopathology of asthma (Grotenboer, Ketelaar et al. 2013).

The missense rs1041973, in which *alanine* is exchanged for *glutamate* in position 78, located in the surface of sST2 and extracellular ST2L domain, probably does not disrupt the IL-33 binding site. This same variant was not associated with increased sST2 expression in a cell culture model of wild and mutants stable clones, of a human basophil cell line KU812 (Ho, Chen et al. 2013). The human leukemia cell line KU812 has been described as an immature prebasophilic cell line, exhibiting a potential to differentiate into mature basophils, that may be used in research on diseases which involve this cell type (Hara, Yamada et al. 1998; Zhu, Tao et al. 2013; Kim, Na et al. 2016). In the same study, on the other hand, other intracellular missenses variants were associated with increased sST2 expression (p-value: <0.05), indicating that the signal transduction via the ST2L intracellular domain plays an important role in regulating sST2 (Ho, Chen et al. 2013).

In our population, the A allele of rs1041973 was associated with increased IL-5 production stimulated by pokeweed mitogen, production of specific IgE for at least

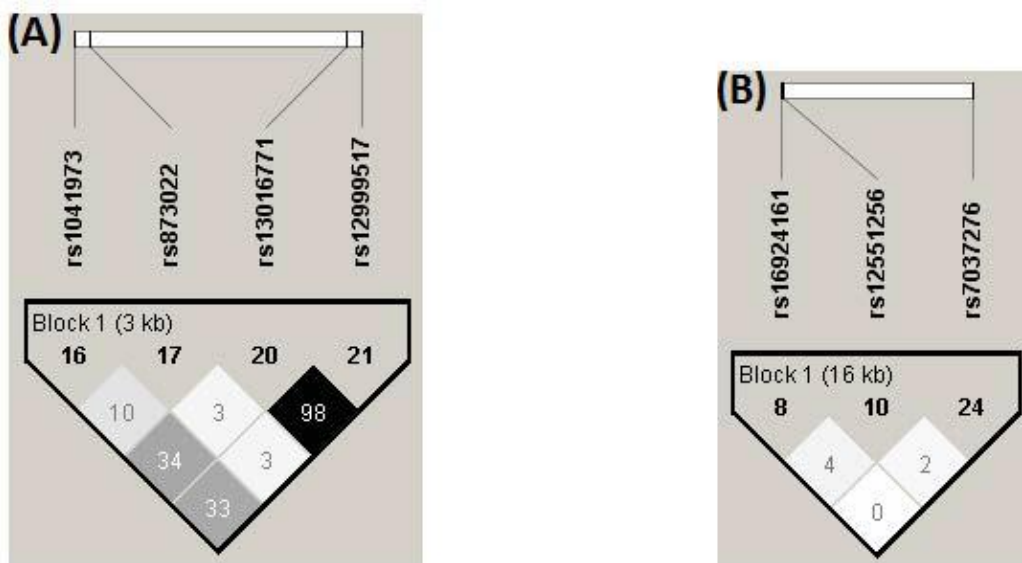
one aeroallergen, high levels of sIgE and positive skin test for *B. tropicalis*, both Th2 inflammation markers. These data suggest a greater activation of the IL-33/ST2 route. Perhaps, explained by decrease in production of plasmatic levels of sST2 in atopic individuals with A allele of rs1041973 (Figure 1). This result is consistent with data of expression in the lung of individuals, in other studies, shown by portal Gtex (Figure 2).

Interestingly, the same *IL1RL1* SNP was associated with decreased serum sST2 levels and less asthma prevalence from birth to 8 years, in a prospective cohort study where 15 SNPs on *IL1RL1* were evaluated (Savenije, Kerkhof et al. 2011).

The functional impact of A allele of rs1041973 in the mRNA expression and sST2 levels, as well as other markers related with Th2 inflammation, reinforced the key role of rs1041973 polymorphism in increasing markers of allergy and inflammation, associated to Th2-type cytokines, and consequently in worsening atopic asthma. The A allele of rs1041973 was positively associated with asthma (P=0.04) in a case-control study from American children of the Childhood Asthma Management Program (Melen, Himes et al. 2010). The same *IL1RL1* SNP was negatively associated with asthma (P=0.00035), representing a protector factor for asthma in a gene candidate study in children from Mexico City (Wu, Romieu et al. 2010). In another case-control study, performed in asthmatic patients, the A allele of rs1041973 was associated with increased expression of ST2L in the membrane of epithelial cells of patients with severe allergic asthma. Furthermore, increased expression of ST2L has shown to be related to the degree of severity in each phenotype of atopic asthma (Traister, Uvalle et al. 2015).

The C allele of polymorphism rs12999517 was associated with increased sIgE levels for *B. tropicalis* and positive skin test to the same allergen. The C allele of rs12999517 was also associated, in another recent study, with a score created for asthmatic individuals, composed by number of Th2-associated factors, such as number of eosinophils in the blood, eotaxin-3 mRNA, CXCL1 mRNA and exhaled nitric oxide (Traister, Uvalle et al. 2015). Moreover, the same *IL1RL1* SNP was significantly correlated with the expression levels of *IL1RL1* from bronchial alveolar lavage cells, in a case-control study with non-Hispanic white, African and American population (Li, Hastie et al. 2015).

The A allele of rs13016771 was associated with increased sIgE levels and positive SPT for *B. tropicalis*. On the other hand, the T allele of rs873022 was negatively associated with specific IgE for at least one aeroallergen and sIgE levels for *B. tropicalis*. Interestingly, the same allele has led to a lower mRNA expression for ST2 (see Figure 2). From our knowledge, those two SNPs were never described in the literature as being associated to asthma. However, they were associated with these phenotypes in our population and are in LD with the other *IL1RL1* SNPs (Figure 3A), such as rs1041973 and rs12999517 that were positively associated with allergy markers (see Table 4). In addition, all *IL1RL1* SNPs associated are shown in Table 1S, in supplementary results.



**Figure 3.** LD plots of SNPs of *IL1RL1* and *IL33* genes, analyzed in asthmatics patients and control in Brazilian derived cohort. The LD plots were generated by Haploview 4.2 program using the PLINK 1.07 data set. The top horizontal bar illustrates the location of SNPs on a physical scale. The color of squares illustrates the strength of pairwise  $r^2$  values on a scale where black indicates perfect LD ( $r^2=1$ ), shades of gray indicates imperfect LD ( $0 < r^2 < 1$ ) and white indicates perfect equilibrium ( $r^2=0$ ). The  $r^2$  LD value is also indicated within each square. (A) LD in 4 SNPs of *IL1RL1*, in chromosome 2; (B) LD in 3 SNPs of *IL-33* in chromosome 9.

The G allele of *IL33* SNP rs12551256, in our study, was negatively associated with asthma. Interestingly, the G allele of rs12551256 was negatively associated with asthma in a population of non-Hispanic white (Grotenboer, Ketelaar et al. 2013). Moreover, the same *IL33* SNP was positively associated with asthma ( $P=0.03$ ) in children of the Childhood Asthma Management Program in a case-control study (Melen, Himes et al. 2010).

The C allele of rs7037276 was positively associated with spontaneous production of IL-13 and atopy in asthmatic patients in our population. These associations are strongly related and suggest that individuals with this polymorphism may have increased production of Th2-cytokines. It is well known that IL-13 is a cytokine that plays an important role in the pathophysiology of asthma, increasing mucus production and collagen synthesis, resulting in more severe asthma symptoms (Rayees, Malik et al. 2014; Al-Sawalha, Pokkunuri et al. 2015; Gour and Wills-Karp 2015; Mishina, Shinkai et al. 2015; Xie, Luo et al. 2015). A meta-analysis evaluating the IL33/ST2 route has showed that the rs7037276 polymorphism was associated with intermediate-onset wheeze, after applying multiple testing correction (Savenije, Mahachie John et al. 2014).

Finally, in our study, the C allele of rs16924161, although not described in the literature, was positively associated with sIgE levels and positive skin test, both, for *B. tropicalis* mite. This SNP is in weak LD with the other *IL-33* SNP (Figure 3B), such as rs12551256 that was negatively associated with asthma (see Table 3). Moreover, all *IL-33* SNPs associated are shown in Table 2S, in supplementary results.

In summary, our findings demonstrate a robust association of genetic variants in *IL1RL1* and *IL33* SNPs with allergy markers and asthma. These data reinforce a key role for IL33/ST2 in allergic inflammation. We suggest that detailed functional studies should be carried out to investigate and better understand the role for these SNPs in allergic diseases in other mixed population.

### **Acknowledgements**

This study is part of SCAALA (Social Change of Asthma and Allergy in Latin America) Program, funded by the Wellcome Trust (Grant no. 072405/Z/03/Z), as well as Brazilian funding agencies, CNPq, CAPES and FAPESB.

## References

- Akhabir, L. and A. J. Sandford (2011). "Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma." Respirology **16**(3): 396-406.
- Al-Sawalha, N., I. Pokkunuri, et al. (2015). "Epinephrine Activation of the beta2-Adrenoceptor Is Required for IL-13-Induced Mucin Production in Human Bronchial Epithelial Cells." PLoS One **10**(7): e0132559.
- Alcantara-Neves, N. M., S. G. B. G. de, et al. (2014). "Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America." BMC Res Notes **7**: 817.
- Allakhverdi, Z., D. E. Smith, et al. (2007). "Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells." Journal of Immunology **179**(4): 2051-2054.
- Baekkevold, E. S., M. Roussigne, et al. (2003). "Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules." American Journal of Pathology **163**(1): 69-79.
- Barlow, J. L., S. Peel, et al. (2013). "IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction." Journal of Allergy and Clinical Immunology **132**(4): 933-941.
- Barreto, M. L., S. S. Cunha, et al. (2006). "Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study)." BMC Pulm Med **6**: 15.
- Cayrol, C. and J. P. Girard (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(22): 9021-9026.
- Chackerian, A. A., E. R. Oldham, et al. (2007). "IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex." Journal of Immunology **179**(4): 2551-2555.
- Cherry, W. B., J. Yoon, et al. (2008). "A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils." Journal of Allergy and Clinical Immunology **121**(6): 1484-1490.
- Figueiredo, C. A., N. M. Alcantara-Neves, et al. (2011). "Evidence for a modulatory effect of IL-10 on both Th1 and Th2 cytokine production: The role of the environment." Clinical Immunology **139**(1): 57-64.
- Figueiredo, C. A., M. L. Barreto, et al. (2010). "Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network." Infect Immun **78**(7): 3160-3167.

- Gour, N. and M. Wills-Karp (2015). "IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease." Cytokine **75**(1): 68-78.
- Grotenboer, N. S., M. E. Ketelaar, et al. (2013). "Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology." J Allergy Clin Immunol **131**(3): 856-865.
- Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." Nature Genetics **41**(3): 342-347.
- Hara, T., K. Yamada, et al. (1998). "Basophilic differentiation of the human leukemia cell line KU812 upon treatment with interleukin-4." Biochemical and Biophysical Research Communications **247**(3): 542-548.
- Hayakawa, H., M. Hayakawa, et al. (2007). "Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation." J Biol Chem **282**(36): 26369-26380.
- Ho, J. E., W. Y. Chen, et al. (2013). "Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling." Journal of Clinical Investigation **123**(10): 4208-4218.
- Ho, L. H., T. Ohno, et al. (2007). "IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcepsilonRI signals." J Leukoc Biol **82**(6): 1481-1490.
- Kakkar, R., H. Hei, et al. (2012). "Interleukin 33 as a Mechanically Responsive Cytokine Secreted by Living Cells." Journal of Biological Chemistry **287**(9): 6941-6948.
- Kim, D. S., Y. J. Na, et al. (2016). "Use of deferasirox, an iron chelator, to overcome imatinib resistance of chronic myeloid leukemia cells." Korean Journal of Internal Medicine **31**(2): 357-366.
- Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, et al. (2009). "IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation." Journal of Immunology **183**(10): 6469-6477.
- Laurie, C. C., K. F. Doheny, et al. (2010). "Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies." Genet Epidemiol **34**(6): 591-602.
- Li, C. W., H. Q. Li, et al. (2014). "Interleukin-33 Increases Antibacterial Defense by Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin." Plos Pathogens **10**(2).
- Li, X., A. T. Hastie, et al. (2015). "eQTL of bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage deciphers GWAS-identified asthma genes." Allergy **70**(10): 1309-1318.
- Liew, F. Y., N. I. Pitman, et al. (2010). "Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family." Nat Rev Immunol **10**(2): 103-110.



- Lima-Costa, M. F., L. C. Rodrigues, et al. (2015). "Genomic ancestry and ethnorracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative)." Scientific Reports **5**.
- Lingel, A., T. M. Weiss, et al. (2009). "Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes." Structure **17**(10): 1398-1410.
- Liu, X., M. Hammel, et al. (2013). "Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(37): 14918-14923.
- Lunderius-Andersson, C., M. Enoksson, et al. (2012). "Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33." Frontiers in Immunology **3**.
- Luthi, A. U., S. P. Cullen, et al. (2009). "Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases." Immunity **31**(1): 84-98.
- Martinez, F. D. and D. Vercelli (2013). "Asthma." Lancet **382**(9901): 1360-1372.
- Melen, E., B. E. Himes, et al. (2010). "Analyses of shared genetic factors between asthma and obesity in children." J Allergy Clin Immunol **126**(3): 631-637 e631-638.
- Mishina, K., M. Shinkai, et al. (2015). "HO-1 inhibits IL-13-induced goblet cell hyperplasia associated with CLCA1 suppression in normal human bronchial epithelial cells." Int Immunopharmacol **29**(2): 448-453.
- Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma." N Engl J Med **363**(13): 1211-1221.
- Moussion, C., N. Ortega, et al. (2008). "The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel 'Alarmin'?" PLoS One **3**(10).
- Nabe, T. (2014). "Interleukin (IL)-33: new therapeutic target for atopic diseases." J Pharmacol Sci **126**(2): 85-91.
- Oboki, K., T. Ohno, et al. (2010). "IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases." Allergol Int **59**(2): 143-160.
- Rank, M. A., T. Kobayashi, et al. (2009). "IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 1047-1054.
- Rayees, S., F. Malik, et al. (2014). "Linking GATA-3 and interleukin-13: implications in asthma." Inflamm Res **63**(4): 255-265.
- Russell, S. E. and P. T. Walsh (2012). "Sterile inflammation - do innate lymphoid cell subsets play a role?" Frontiers in Immunology **3**.

- Saluja, R., M. E. Ketelaar, et al. (2015). "The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders." Molecular Immunology **63**(1): 80-85.
- Savenije, O. E., M. Kerkhof, et al. (2011). "Interleukin-1 receptor-like 1 polymorphisms are associated with serum IL1RL1-a, eosinophils, and asthma in childhood." J Allergy Clin Immunol **127**(3): 750-756 e751-755.
- Savenije, O. E., J. M. Mahachie John, et al. (2014). "Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood." J Allergy Clin Immunol **134**(1): 170-177.
- Schmitz, J., A. Owyang, et al. (2005). "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines." Immunity **23**(5): 479-490.
- Smith, D. E. (2010). "IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma." Clinical and Experimental Allergy **40**(2): 200-208.
- Suzukawa, M., R. Koketsu, et al. (2008). "Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils." Laboratory Investigation **88**(11): 1245-1253.
- Suzukawa, M., M. Likura, et al. (2008). "An IL-1 Cytokine Member, IL-33, Induces Human Basophil Activation via Its ST2 Receptor." Journal of Immunology **181**(9): 5981-5989.
- Tago, K., T. Noda, et al. (2001). "Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V." Biochemical and Biophysical Research Communications **285**(5): 1377-1383.
- Torgerson, D. G., E. J. Ampleford, et al. (2011). "Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations." Nature Genetics **43**(9): 887-892.
- Traister, R. S., C. E. Uvalle, et al. (2015). "Phenotypic and genotypic association of epithelial IL1RL1 to human TH2-like asthma." J Allergy Clin Immunol **135**(1): 92-99.
- Trajkovic, V., M. J. Sweet, et al. (2004). "T1/ST2 - an IL-1 receptor-like modulator of immune responses." Cytokine & Growth Factor Reviews **15**(2-3): 87-95.
- Wang, C. H., B. J. Liu, et al. (2012). "The Association Forecasting of 13 Variants Within Seven Asthma Susceptibility Genes on 3 Serum IgE Groups in Taiwanese Population by Integrating of Adaptive Neuro-fuzzy Inference System (ANFIS) and Classification Analysis Methods." Journal of Medical Systems **36**(1): 175-185.
- Wu, H., I. Romieu, et al. (2010). "Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans." Journal of Allergy and Clinical Immunology **125**(2): 321-327.

- Xie, T., G. Luo, et al. (2015). "Rho-kinase inhibitor fasudil reduces allergic airway inflammation and mucus hypersecretion by regulating STAT6 and NFkappaB." Clin Exp Allergy **45**(12): 1812-1822.
- Zhu, X. Y., K. Tao, et al. (2013). "A new recombinant immunotoxin hscFv-ETA' demonstrates specific cytotoxicity against chronic myeloid leukemia cells in vitro." Immunology Letters **154**(1-2): 18-24.
- Zhu, Z., R. J. Homer, et al. (1999). "Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production." Journal of Clinical Investigation **103**(6): 779-788.

## SUPPLEMENTARY RESULTS

**Table 1S.** All *IL1RL1* SNPs associated in additive, dominant and recessive models.

GENE	CHR	SNP	MAF	OR (CI 95%) *P value		
				Additive model	Dominant model	Recessive model
<b>Asthma</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs1997467	G	n/a	<b>1.63 (1.16–2.28) 0.005</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs950880	A	n/a	<b>1.35 (1.01–1.81) 0.049</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs12712135	A	n/a	<b>0.51 (0.33–0.78) 0.002</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs11685424	G	n/a	<b>0.58 (0.38–0.87) 0.008</b>	n/a
<b>IL-13 production PWM-stimulated</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs12712142	A	n/a	<b>0.68 (0.49–0.95) 0.023</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs1420101	A	n/a	<b>0.71 (0.51–0.98) 0.038</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs1420103	A	<b>1.39 (1.01–1.90) 0.040</b>	n/a	<b>3.61 (1.01–13.0) 0.049</b>
<i>IL1RL1</i>	2	rs73002411	T	n/a	n/a	<b>0.27 (0.07–0.97) 0.045</b>
<i>IL1RL1</i>	2	rs73002422	A	n/a	n/a	<b>0.27 (0.07–0.97) 0.045</b>
<b>Spontaneous IL-5 production</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs73002411	T	<b>0.41 (0.17–0.95) 0.037</b>	<b>0.40 (0.17–0.96) 0.041</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs73002422	A	<b>0.41 (0.17–0.95) 0.037</b>	<b>0.40 (0.17–0.96) 0.041</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs12999517	C	<b>0.52 (0.28–0.97) 0.039</b>	<b>0.41 (0.20–0.84) 0.014</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs13016771	A	<b>0.52 (0.28–0.97) 0.041</b>	<b>0.42 (0.21–0.84) 0.015</b>	n/a
<b>IL-5 production PMW-stimulated</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs1921622	A	n/a	<b>0.73 (0.54–0.98) 0.037</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	n/a	<b>1.36 (1.01–1.84) 0.044</b>	n/a
<b>Specific IgE for at least one aeroallergen</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs12999517	C	n/a	<b>1.32 (1.02–1.70) 0.037</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	n/a	<b>1.32 (1.02–1.72) 0.037</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs873022	T	<b>0.69 (0.53–0.91) 0.009</b>	<b>0.66 (0.49–0.89) 0.006</b>	n/a
<b>anti-<i>B tropicalis</i> IgE</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs77378267	A	<b>1.52 (1.05–2.20) 0.027</b>	<b>1.58 (1.08–2.32) 0.019</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs73004227	T	<b>1.52 (1.05–2.20) 0.027</b>	<b>1.58 (1.09–2.32) 0.019</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs73004235	A	<b>1.52 (1.05–2.20) 0.027</b>	<b>1.58 (1.10–2.32) 0.019</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs73004242	T	<b>1.52 (1.05–2.20) 0.027</b>	<b>1.58 (1.11–2.32) 0.019</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs12999517	C	<b>1.30 (1.03–1.63) 0.028</b>	<b>1.36 (1.04–1.77) 0.023</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs13016771	A	<b>1.29 (1.02–1.63) 0.030</b>	<b>1.35 (1.04–1.76) 0.025</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs73002411	T	<b>1.35 (1.03–1.79) 0.031</b>	<b>1.42 (1.05–1.91) 0.023</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs73002422	A	<b>1.35 (1.03–1.79) 0.031</b>	<b>1.42 (1.05–1.91) 0.023</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs873022	T	<b>0.76 (0.57–0.99) 0.048</b>	<b>0.72 (0.54–0.98) 0.035</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	n/a	<b>1.40 (1.07–1.84) 0.014</b>	n/a
<b>anti-<i>D pteronyssinus</i> IgE</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs1921622	A	n/a	n/a	<b>0.57 (0.33–0.99) 0.048</b>
<b>anti-<i>P americana</i> IgE</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs6719130	T	n/a	<b>0.46 (0.22–0.96) 0.040</b>	n/a
<b>SPT for <i>B tropicalis</i></b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13016771	A	<b>1.40 (1.08–1.82) 0.001</b>	<b>1.41 (1.05–1.90) 0.024</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs12999517	C	<b>1.39 (1.08–1.80) 0.012</b>	<b>1.39 (1.04–1.88) 0.028</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs1041973	A	<b>1.26 (1.03–1.56) 0.027</b>	<b>1.48 (1.08–2.03) 0.014</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs6719130	T	<b>0.65 (0.43–0.96) 0.032</b>	n/a	n/a
<b>SPT for <i>D pteronyssinus</i></b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs17696376	T	<b>1.54 (1.06–2.25) 0.024</b>	<b>1.66 (1.12–2.47) 0.011</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs1921622	A	n/a	n/a	<b>0.36 (0.16–0.79) 0.011</b>
<b>SPT for fungi</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs17639215	A	<b>6.80 (1.93–24.0) 0.003</b>	<b>16.5 (2.78–97.1) 0.002</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs6719130	T	<b>5.19 (1.51–17.8) 0.009</b>	<b>13.2 (2.19–79.7) 0.005</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs12712135	A	<b>4.74 (1.16–19.3) 0.030</b>	n/a	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs11685424	G	<b>4.49 (1.11–18.2) 0.036</b>	n/a	n/a
<b>SPT for dog epithelium</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs6719130	T	<b>3.21 (1.17–8.79) 0.023</b>	<b>4.41 (1.36–14.3) 0.013</b>	n/a
<i>IL1RL1</i>	2	rs17639215	A	<b>3.19 (1.07–9.46) 0.036</b>	<b>4.09 (1.20–13.1) 0.025</b>	n/a
<b>SPT for cat epithelium</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs17695648	G	n/a	n/a	<b>44.5 (3.76–525.5) 0.003</b>
<i>IL1RL1</i>	2	rs1946131	T	n/a	n/a	<b>13.3 (1.42–124.3) 0.023</b>
<b>SPT for <i>P americana</i></b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs6719130	T	<b>0.57 (0.34–0.98) 0.040</b>	<b>0.54 (0.30–0.97) 0.038</b>	n/a

OR, odds ratio; CI, confidence interval. \*P < 0.05.

**Table 2S.** All *IL33* SNPs associated in additive, dominant and recessive models.

GENE	CHR	SNP	MAF	OR (CI 95%) *P value		
				Additive model	Dominant model	Recessive model
<b>Asthma</b>						
<i>IL33</i>	9	rs8172	A	n/a	n/a	<b>1.87 (1.27–2.76) 0.001</b>
<i>IL33</i>	9	rs55726619	C	n/a	n/a	<b>3.49 (1.04–11.7) 0.043</b>
<i>IL33</i>	9	rs73398552	C	n/a	n/a	<b>3.44 (1.03–11.5) 0.045</b>
<i>IL33</i>	9	rs1891385	C	n/a	<b>0.64 (0.42–0.99) 0.049</b>	n/a
<i>IL33</i>	9	rs12551256	G	<b>0.72 (0.58–0.90) 0.004</b>	<b>0.71 (0.53–0.94) 0.017</b>	<b>0.54 (0.32–0.91) 0.021</b>
<b>Atopy in asthmatic patients</b>						
<i>IL33</i>	9	rs1048274	A	<b>0.60 (0.41–0.86) 0.006</b>	<b>0.59 (0.35–0.99) 0.046</b>	<b>0.35 (0.16–0.76) 0.008</b>
<i>IL33</i>	9	rs1330383	A	<b>0.60 (0.41–0.88) 0.009</b>	n/a	<b>0.33 (0.15–0.76) 0.009</b>
<i>IL33</i>	9	rs10975519	T	<b>0.61 (0.42–0.88) 0.009</b>	n/a	<b>0.36 (0.16–0.80) 0.012</b>
<i>IL33</i>	9	rs10975514	A	<b>0.60 (0.41–0.88) 0.010</b>	n/a	<b>0.36 (0.16–0.82) 0.015</b>
<i>IL33</i>	9	rs7037276	C	<b>2.57 (1.14–5.79) 0.023</b>	<b>2.56 (1.11–5.91) 0.027</b>	n/a
<i>IL33</i>	9	rs10975516	A	<b>0.66 (0.46–0.95) 0.024</b>	n/a	<b>0.42 (0.23–0.78) 0.006</b>
<i>IL33</i>	9	rs76864631	A	<b>0.52 (0.28–0.96) 0.037</b>	<b>0.49 (0.25–0.96) 0.038</b>	n/a
<i>IL33</i>	9	rs10435816	G	n/a	<b>0.58 (0.33–0.99) 0.047</b>	n/a
<b>Spontaneous IL-5 production</b>						
<i>IL33</i>	9	rs1332290	C	<b>1.54 (1.05–2.26) 0.027</b>	n/a	n/a
<b>Spontaneous IL-13 production</b>						
<i>IL33</i>	9	rs7037276	C	<b>1.50 (1.04–2.17) 0.031</b>	<b>1.48 (1.02–2.15) 0.040</b>	n/a
<b>SPT to <i>B tropicalis</i></b>						
<i>IL33</i>	9	rs2066362	T	n/a	n/a	<b>0.59 (0.35–0.99) 0.047</b>
<i>IL33</i>	9	rs16924161	C	<b>1.49 (1.04–2.11) 0.027</b>	<b>1.55 (1.07–2.24) 0.020</b>	n/a
<b>Specific IgE for at least one aeroallergen</b>						
<i>IL33</i>	9	rs12551268	A	n/a	na	<b>1.69 (1.16–2.46) 0.007</b>
<b>anti-<i>B tropicalis</i> IgE</b>						
<i>IL33</i>	9	rs16924161	C	<b>1.42 (1.03–1.96) 0.030</b>	<b>1.45 (1.04–2.03) 0.028</b>	n/a
<i>IL33</i>	9	rs12551268	A	n/a	n/a	<b>1.57 (1.07–2.29) 0.021</b>
<b>anti-<i>D pteronyssinus</i> IgE</b>						
<i>IL33</i>	9	rs58924681	C	n/a	<b>1.46 (1.02–2.09) 0.039</b>	n/a
<b>SPT for <i>D pteronyssinus</i></b>						
<i>IL33</i>	9	rs1048274	A	n/a	n/a	<b>0.47 (0.27–0.81) 0.007</b>
<i>IL33</i>	9	rs10975519	T	n/a	n/a	<b>0.48 (0.28–0.83) 0.008</b>
<i>IL33</i>	9	rs1330383	A	n/a	n/a	<b>0.51 (0.29–0.87) 0.014</b>
<i>IL33</i>	9	rs10975514	A	n/a	n/a	<b>0.53 (0.31–0.90) 0.018</b>
<b>SPT for fungi</b>						
<i>IL33</i>	9	rs4742170	C	<b>5.51 (1.17–25.9) 0.031</b>	n/a	<b>6.74 (1.19–38.2) 0.031</b>
<i>IL33</i>	9	rs10975501	A	n/a	<b>5.96 (1.07–33.3) 0.042</b>	n/a
<i>IL33</i>	9	rs7022391	T	n/a	<b>5.76 (1.03–32.3) 0.046</b>	n/a
<b>SPT for <i>P americana</i></b>						
<i>IL33</i>	9	rs4742170	C	<b>0.77 (0.61–0.98) 0.034</b>	n/a	<b>0.61 (0.39–0.95) 0.029</b>
<b>SPT for cat epithelium</b>						
<i>IL33</i>	9	rs12350670	C	<b>2.90 (1.09–7.69) 0.032</b>	<b>4.90 (1.36–17.6) 0.015</b>	n/a
<i>IL33</i>	9	rs12551268	A	<b>2.57 (1.07–6.18) 0.035</b>	<b>8.14 (1.02–64.6) 0.047</b>	n/a
<b>SPT for <i>B germanica</i></b>						
<i>IL33</i>	9	rs58924681	C	n/a	<b>1.66 (1.05–2.75) 0.048</b>	n/a
<i>IL33</i>	9	rs16924161	C	n/a	n/a	<b>8.34 (1.23–56.5) 0.030</b>
<i>IL33</i>	9	rs1891385	C	n/a	n/a	<b>9.51 (1.22–74.2) 0.032</b>

OR, odds ratio; CI, confidence interval. \*P < 0.05.

## MANUSCRITO 2: Polimorfismos na rota IL-33/IL1RL1 estão associados com gravidade de asma, função pulmonar e atopia em estudo do tipo caso-controle em adultos

Autores: Gerson de Almeida Queiroz<sup>£</sup>, Talita dos Santos de Jesus<sup>£</sup>, Ryan Santos Costa<sup>£</sup>, Valdirene Leão Carneiro<sup>£</sup>, Anaque de Oliveira Pires<sup>£</sup>, Hugo Bernardino da Silva<sup>£</sup>, Raimon Rios da Silva<sup>£</sup>, Hellen Freitas Fonseca<sup>£</sup>, Álvaro Augusto Souza da Cruz Filho<sup>†</sup>, Camila Alexandrina Figueiredo<sup>£</sup>

### Resumo

A Interleucina-33 (IL-33), da família IL-1, é liberada após lesão das células epiteliais aéreas e atua como sinal contra aeroalérgenos. A ligação de IL-33 ao seu receptor de membrana (ST2L) resulta na ativação de várias células inflamatórias das respostas inata e adaptativa e na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13, resultando em inflamação Th2. Por isso, IL-33 é capaz de polarizar a resposta Th2 em doenças atópicas como a asma, que consiste em uma inflamação respiratória crônica e complexa que resulta da interação de fatores ambientais e genéticos. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em *IL33* e *IL1RL1* podem atenuar ou agravar essas doenças em humanos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação de polimorfismos na rota IL-33/IL1RL1 em adultos asmáticos. Para isso, foi extraído DNA do sangue periférico de 1.445 indivíduos e as amostras foram genotipadas por TaqMan®. Nós testamos possíveis associações entre SNPs *IL33* e *IL1RL1* com asma, função pulmonar e teste cutâneo (SPT). Regressões logística ou linear ajustadas por sexo, idade e cor da pele foram realizadas pelo software Plink 1.9. O alelo A do SNP *IL1RL1* rs1420101 foi positivamente associado com asma (OR 2.07, P=0.018) e negativamente com volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV1) (BETA -2.37, P=0.043). Este mesmo alelo foi também associado com menor produção de ST2 solúvel (sST2) (P<0.001). O alelo C do SNP *IL33* rs2381416 foi positivamente associado com positividade ao SPT para *A. flavus* (OR 2.07, P=0.033), epitélio de cão (OR 1.52, P=0.009). Dessa forma, nossos dados mostraram uma forte associação de variantes em *IL1RL1* e *IL33* com asma, marcadores de alergia e produção de sST2.

**Key words:** Asma; atopia; polimorfismos; *IL33/IL1RL1*.

<sup>£</sup>Departamento de Biorregulação, Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (ICS), Bahia, Brasil. <sup>†</sup>Programa para o Controle da Asma na Bahia (ProAR), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia, Brasil. Autor correspondente: Camila Figueiredo, Departamento de Biorregulação, Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular, Universidade Federal da Bahia (ICS), Universidade Federal da Bahia, Campus do Canela, CEP: 41110-100, Salvador-BA, Bahia, Brasil. Tel/fax: +55 71 3283 8948; e-mail: cavfigueiredo@gmail.com (CA Figueirêdo)

## Introdução

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que acarreta um grande fardo global sobre os indivíduos e os sistemas de saúde (Busse, Dahl et al. 2016). Cerca de 334 milhões de pessoas sofrem de asma em todo o mundo (Asher and Pearce 2014) e a estimativa, para o ano 2025, é que 400 milhões de pessoas sejam afetadas por esta doença (Masoli, Fabian et al. 2004).

A asma é uma síndrome multifatorial e heterogênea que se caracteriza pela presença de sintomas como tosse, falta de ar, sibilos e aperto no peito (Zhang, He et al. 2016). O diagnóstico da asma é caracterizado por um grupo de condições como inflamação das vias aéreas e broncoespasmo (Lu, Mak et al. 2012). Esta doença tem sido classicamente identificada pelo aumento da hiperreatividade das vias aéreas, que resulta em limitação ao fluxo de ar. A heterogeneidade da asma tem revelado uma variedade de subtipos e fenótipos da doença (Wenzel 2012).

IL-33, um membro da família das citocinas IL-1, é constitutivamente expressa no núcleo de células epiteliais e liberada para o espaço extracelular logo após o dano tecidual. Existem duas formas principais para o receptor da IL-33. Uma solúvel (sST2) e outra transmembrana (ST2L), resultantes de *splicing* alternativo do *IL1RL1*, sob o controle de dois promotores diferentes. O sST2 atua se ligando à IL-33, neutralizando a sua ação. Por outro lado, o ST2L é considerado um componente funcional para o efeito biológico da IL-33 (Smith 2010; Ohno, Morita et al. 2012). Esta possui um papel extensivo na regulação da resposta imune adaptativa através da ativação de células T CD4<sup>+</sup> Th2. Além disso, a IL-33 é capaz de ativar células dendríticas e promover o prolongamento da resposta inflamatória por meio do recrutamento de células associadas à inflamação como eosinófilos, basófilos e neutrófilos, que juntas aumentam a liberação de citocinas como IL-4, IL-5 e IL13 (Lott, Sumpter et al. 2015).

A resposta imune caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13, desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da asma atópica (Koyasu and Moro 2011). A eosinofilia tem sido frequentemente associada com doenças atópicas predominantemente dirigidas pela resposta Th2 (Amin, Janson et al. 2016), estando associada com formas mais graves da asma. Estes granulócitos desempenham papel crucial na defesa do hospedeiro contra agentes

patogênicos, resultando em dano para células patogênicas e do hospedeiro (Carr, Berdnikovs et al. 2016).

Estudos genéticos e funcionais demonstram um papel importante para o gene *IL1RL1* na iniciação e progressão de fenótipos atópicos (Kakkar and Lee 2008; Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009; Moffatt, Gut et al. 2010; Saluja, Ketelaar et al. 2015). Em um estudo do tipo caso controle com crianças asmáticas entre 2 e 6 anos de idade, o gene *IL1RL1* foi associado com maior susceptibilidade à asma (Bonnelykke, Sleiman et al. 2014). Em outro estudo de associação genética detalhado do *IL1RL1*, polimorfismos foram fortemente associados com dermatite atópica (Shimizu, Matsuda et al. 2005).

Dentro deste cenário complexo das doenças alérgicas, conduzidas pelo envolvimento de fatores ambientais e genéticos e a ação de citocinas associadas à inflamação Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13, polarizadas pela IL-33 e a consequente ativação da via IL-33/*IL1RL1*, nosso objetivo foi investigar polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* associados à asma e marcadores de alergia em uma população de adultos miscigenados do Brasil.

## **MATERIAIS E METODOS**

### **População de estudo**

Foram estudados 1.445 sujeitos, de ambos os gêneros com idade  $\geq 18$  anos, residentes em Salvador, subdivididos em dois grupos, caso e controle. O primeiro, com  $n=990$  recrutados consecutivamente entre os pacientes acompanhados pelo Programa de Controle da Asma e da Rinite Alérgica na Bahia (ProAR) por ao menos um ano, que tiveram o diagnóstico confirmado de asma leve/intermitente ou grave, segundo a classificação da Iniciativa Global contra a Asma (GINA 2006). O segundo, com  $n=455$  indivíduos sem qualquer história de asma, pareado aos casos por gênero, idade, nível socioeconômico e local de residência. Todos participantes foram submetidos aos mesmos procedimentos para obtenção de informações clínicas, do ambiente e amostras biológicas. Em ambos os grupos, foram excluídos indivíduos/pacientes com diagnóstico de enfermidade respiratória crônica acometendo as vias aéreas inferiores ou pulmões, tais como tuberculose ativa ou seqüela extensa de tuberculose, fibrose cística, câncer de pulmão ou doença



pulmonar obstrutiva crônica. Foram excluídos também parentes consanguíneos presentes em ambos os grupos. Esta pesquisa foi realizada a partir do projeto já aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira (parecer nº 095/2012), intitulado “Fatores de risco, biomarcadores e endofenótipos de asma grave” coordenado pelo Prof. Álvaro Cruz, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia.

### **Coleta de sangue e teste cutâneo**

Os indivíduos foram avaliados nas instalações físicas do ProAR, onde foi realizado SPT para aeroalérgenos relevantes e coleta de sangue (em tubos contendo EDTA para extração de DNA e dosagem de citocinas). O SPT foi realizado no antebraço direito dos indivíduos usando extratos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. herbarum*, *A. alternata*, *P. notatum*, *B. germanica*, *P. americana*, *C. dactylon*, epitélio de cão e gato (ALK-Abello, São Paulo, Brasil). Solução salina foi usado como controle negativo e 10 mg/mL de solução de histamina foi utilizado como controle positivo. Após 15 minutos, as reações foram lidas e o tamanho de diâmetro 3mm maior do que o controle negativo foi considerado positivo. Indivíduos com SPT positivo para, pelo menos, um aeroalérgenos testado foram classificados como atópicos.

### **Indução do sputum**

A indução do sputum foi realizada conforme recomendações recentes de pesquisadores com ampla experiência com esta técnica (Moritz, Steidle et al. 2008; Staticescu, Chereches-Panta et al. 2014; Zou, Fang et al. 2014). O sputum foi obtido por nebulização com solução salina hipertônica (3-5%) logo após um tratamento inalatório com 200mg de salbutamol. Uma solução contendo (DTE-Dithioerythritol, Hepes, NaCl e água destilada) foi adicionada ao sputum expectorado e, após ser homogeneizada, foi filtrada através de um filtro de 100µm para remover o muco solubilizado e centrifugada a 4°C a 400 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi obtido e aliquoteado em criotubos de 2mL imediatamente imersos durante 5 minutos em isopropanol refrigerado a -80°C e armazenados a mesma temperatura.

## **Genotipagem**

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico usando o protocolo do kit de DNA Flexigene® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Foram genotipados quatro SNPs: variantes no *IL-33* (rs2381416 e rs1342326) e variantes no *IL1RL1* (rs1420101 e rs13424006) por PCR em tempo real em equipamento de alta tecnologia da *Applied Biosystems* (QuantStudio) conforme previamente descrito (Roussel, Farias et al. 2013) em amostras de indivíduos asmáticos e não asmáticos. Para controle de qualidade, foram aplicados os seguintes filtros: taxa de genotipagem inferior a 0,98; desequilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de  $p < 0.05$  e p-valor para o alelo de menor frequência (MAF - alelo de menor frequência) menor que 1%. 3 SNPs, de um total de 4 SNPs, passaram pelos critérios selecionados.

## **Cálculo amostral para dosagem de citocinas**

O cálculo levou em consideração os dados relativos à mediana e desvio padrão da produção de IL-33 (Hamzaoui, Berraies et al. 2013). Os mesmos obtiveram níveis de IL-33 que não seguiram distribuição normal. Por isso, foi escolhido o teste U de Mann-Whitney do tipo bicaudal com poder de 90%, ou seja, o tamanho da amostra possibilitou uma probabilidade de 90% de chance de detectar uma diferença estatisticamente significativa quando essa diferença, de fato, existir na população. Através do cálculo amostral chegou-se ao total de 99 indivíduos que foram alocados em três grupos: controle (n=33), asma leve/moderada (n=33) e asma grave (n=33). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **Dosagem de citocinas por ELISA**

IL-33 e sST2 foram investigados no plasma e sobrenadante do sputum induzido de indivíduos asmáticos e não asmáticos por ELISA sanduíche, seguindo as orientações do fabricante (R&D Systems). Os limites de detecção em pg/mL foram inferiores e superiores, respectivamente, IL-33 (23,4/1500) e sST2 (31,25/2000).

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

A análise de expressão *in silico* foi conduzida com os SNPs mais associados aos fenótipos estudados, rs1420101 e rs13424006, usando o navegador do portal de expressão Gtex ([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)) no tecido pulmonar e no sangue total de acordo com o genótipo.

## **Análise estatística**

Inicialmente foi realizada a análise da normalidade da variável nível de produção de IL-33 e sST2 pelo teste Kolmogorov-smirnov. Considerando a distribuição não normal dos dados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's para comparações múltiplas entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc. San Diego, CA). O valor de  $p < 0.05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

As análises de associação entre polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* com asma e positividade ao SPT para *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, *A. flavus*, epitélio de cão e gato e para pelo menos um dos aeroalérgenos foram realizadas por regressão logística, por se tratar de variáveis categóricas e por regressão linear para variável FEV1, por se tratar de dados contínuos, ambas realizadas pelo software Plink 1.9 e ajustadas por sexo, idade e cor da pele. Associações com valor de  $P < 0.05$ , foram consideradas estatisticamente significantes. Os três modelos genéticos foram utilizados em todas as análises.

## Resultados

**Tabela 1.** Descrição demográfica da população.

Variável	Sujeitos (1.445)		Valor de P
	Controle (%) (455)	Asmático (%) (990)	
<b>Faixa etária</b>			
Idade (média ± DP)	43,97 ± 12,56	44,76 ± 15,16	0.30
<b>Sexo</b>			
Feminino	391 (85,9)	790 (79,8)	<b>0.005*</b>
Masculino	64 (14,1)	200 (20,2)	<b>0.005*</b>
<b>Fenótipo de Asma</b>			
Intermitente	0	470 (32,5)	–
Grave reversível	0	449 (31,1)	–
Grave não reversível	0	71 (4,9)	–
<b>Estado da asma</b>			
Controlada	0	192 (13,3)	–
Parcialmente controlada	0	544 (37,6)	–
Não controlada	0	234 (16,2)	–
<b>Variáveis de asma</b>			
Asma	0	990 (68,5)	–
Asma Grave	0	520 (52,5)	–
Asma atópica	0	605 (41,9)	–
<b>Função pulmonar</b>			
FEV1 (%)	35 (7,7)	417 (92,3)	<b>0.000**</b>
<b>Teste cutâneo positivo</b>			
Pelo menos um dos aeroalérgenos	135 (29,7)	605 (62,3)	<b>0.000**</b>
<i>D. pteronyssinus</i>	78 (17,1)	423 (43,6)	<b>0.000**</b>
<i>B. tropicalis</i>	52 (11,4)	394 (40,6)	<b>0.000**</b>
Epitélio de cão	5 (1,1)	81 (8,3)	<b>0.000**</b>
Epitélio de gato	11 (2,4)	107 (11)	<b>0.000**</b>
<i>A. flavus</i>	7 (1,5)	58 (6)	<b>0.000**</b>

Os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher. DP, desvio padrão; FEV1, Volume expiratório forçado no primeiro segundo. \*P<0.05. \*\*P<0.001.

A Tabela 1 apresenta os dados descritivos da análise de 455 sujeitos controles e 990 asmáticos participantes. Nossa população é predominantemente composta por mulheres com idade entre 30 e 60 anos. A maioria dos indivíduos asmáticos possui fenótipos de asma leve/intermitente e grave reversível. Apenas uma pequena parcela dos indivíduos com asma grave não responde ao tratamento. Logo, a maioria dos sujeitos asmáticos possui asma controlada ou parcialmente controlada. Houve diferença estatisticamente significativa para o sexo (P<0.05), TC para *D. pteronyssinus* (P<0.001), *D. farinae* (P<0.001), *B. tropicalis* (P<0.001), *A. flavus* (P<0.001), epitélio de cão e gato (P<0.001) e para pelo menos um dos aeroalérgenos testados (P<0.001), mais frequente entre os indivíduos asmáticos.

**Tabela 2.** Informações gerais dos polimorfismos.

CHR	SNP	A1	A2	MAF	FUNÇÃO
<b><i>IL33</i></b>					
9	rs2381416	C	A	0.46	Indefinido
9	rs1342326	G	T	0.45	Indefinido
<b><i>IL1RL1</i></b>					
2	rs1420101	A	G	0.35	Intron variante, transcrito variante nc
2	rs13424006	A	G	0.46	Intron variante

CHR, cromossomo; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; A1, menor alelo; A2, alelo selvagem; MAF, frequência do menor alelo, nc; não codificante.

A tabela 2 descreve o gene, o alelo polimórfico (A1), o alelo selvagem (A2) e a identificação dos quatro SNPs estudados em nossa população. O SNP rs2381416 do gene *IL33* com função ainda não esclarecida e dois SNPs do *IL1RL1* intrônicos, todos com frequência do menor alelo (MAF) acima de 30%. O SNP rs1342326 do gene *IL33* não passou no teste Hardy-Weinberg, um teste de qualidade, e por isso, foi excluído das nossas análises.

**Tabela 3.** Associação do *IL33* SNP rs2381416 com positividade ao SPT para fungo e epitélio de cão e gato por regressão logística ajustada por idade, sexo e cor da pele.

GENE	CHR	SNP	A1	OR (IC 95%) valor de P		
				Modelo aditivo	Modelo Dominante	Modelo Recessivo
<b>SPT para <i>A. flavus</i></b>						
<i>IL33</i>	9	rs2381416	C	n/s	n/s	<b>2.07 (1.05–3.37) 0.033</b>
<b>SPT para epitélio de cão</b>						
<i>IL33</i>	9	rs2381416	C	n/s	n/s	<b>1.52 (1.19–3.47) 0.009</b>
<b>SPT para epitélio de gato</b>						
<i>IL33</i>	9	rs2381416	C	n/s	n/s	<b>1.52 (1.04–2.63) 0.048</b>

CHR, cromossomo; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; A1, menor alelo; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; SPT, teste cutâneo.

Tabela 3 resume as associações significantes do *IL33* SNP rs2381416 com positividade ao SPT para *A. flavus*, epitélio de cão e gato, ambos no modelo recessivo. O alelo C do polimorfismo rs2381416 foi positivamente associado com SPT para *A. flavus* (OR 2.07, IC 95% 1.05–3.37, P=0.033), epitélio de cão (OR 1.52, IC 95% 1.19–3.47, P=0.009) e gato (OR 1.52, IC 95% 1.04–2.63, P=0.048).

**Tabela 4.** Associação do *IL1RL1* SNP rs1420101 com asma atópica e não atópica por regressão logística e linear para FEV1 ajustadas por idade, sexo e cor da pele.

GENE	CHR	SNP	A1	OR/BETA (IC 95%) valor de P		
				Modelo aditivo	Modelo Dominante	Modelo Recessivo
<b>Asma não atópica</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs1420101	A	n/s	n/s	<b>2.07 (1.13–3.78) 0.018</b>
<b>Asma atópica</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs1420101	A	<b>1.29 (1.05–1.66) 0.046</b>	n/s	n/s
<b>FEV1</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs1420101	A	n/s	<b>-2.37 (-4.67; -0.07) 0.043</b>	n/s

CHR, cromossomo; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; A1, menor alelo; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; FEV1, volume expiratório forçado no primeiro segundo.

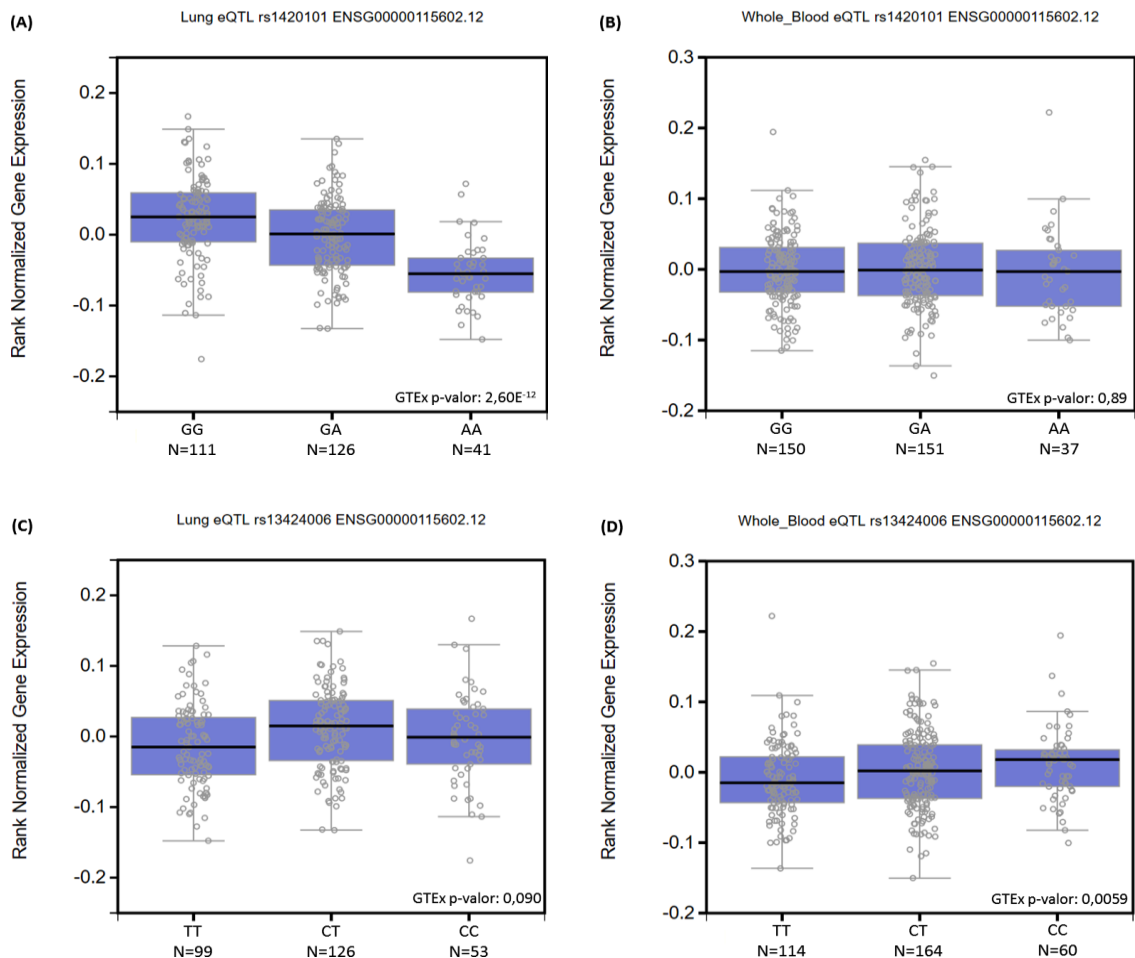
A Tabela 4 demonstra os resultados significantes da associação entre o SNP *IL1RL1* rs1420101 e as variáveis, asma atópica, asma não atópica e o volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV1), quando comparados com indivíduos controles. O alelo A do rs1420101 foi positivamente associado com asma não atópica (OR 2.07, IC 95% 1.13–3.38, P=0.018) no modelo recessivo. Este mesmo alelo foi também associado positivamente com asma atópica (OR 1.29, IC 95% 1.05–1.66, P=0.046), no modelo aditivo. Adicionalmente, no modelo dominante, o alelo A de rs1420101 foi negativamente associado FEV1 (BETA -2.37, IC 95% -4.67; -0.07, P=0.043). Este mesmo alelo não foi associado com asma quando comparado com controles sadios (dados não mostrados).

**Tabela 5.** Associação do *IL1RL1* SNP rs13424006 com asma e positividade ao SPT para *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, epitélio de gato e para pelo menos um aeroalérgeno por regressão logística ajustada por idade, sexo e cor da pele.

GENE	CHR	SNP	A1	OR (IC 95%) valor de P		
				Modelo aditivo	Modelo Dominante	Modelo Recessivo
<b>Asma</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13424006	T	<b>1.28 (1.06–1.55) 0.010</b>	n/s	<b>1.55 (1.11–2.18) 0.010</b>
<b>Asma grave</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13424006	T	n/s	n/s	<b>1.56 (1.04–2.32) 0.030</b>
<b>Asma atópica</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13424006	T	<b>1.56 (1.22–1.98) 0.0003</b>	<b>1.66 (1.16–2.37) 0.006</b>	<b>1.98 (1.29–3.04) 0.002</b>
<b>SPT para <i>B. tropicalis</i></b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13424006	T	<b>1.39 (1.14–1.70) 0.001</b>	<b>1.48 (1.09–2.02) 0.013</b>	<b>1.61 (1.16–2.24) 0.004</b>
<b>SPT para <i>D. pteronyssinus</i></b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13424006	T	<b>1.32 (1.09–1.60) 0.004</b>	<b>1.52 (1.13–2.05) 0.006</b>	n/s
<b>SPT para epitélio de gato</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13424006	T	n/s	<b>1.83 (1.05–3.19) 0.038</b>	n/s
<b>SPT para pelo menos um aeroalérgeno</b>						
<i>IL1RL1</i>	2	rs13424006	T	<b>1.34 (1.12–1.61) 0.001</b>	<b>1.34 (1.02–1.77) 0.036</b>	<b>1.65 (1.20–2.27) 0.002</b>

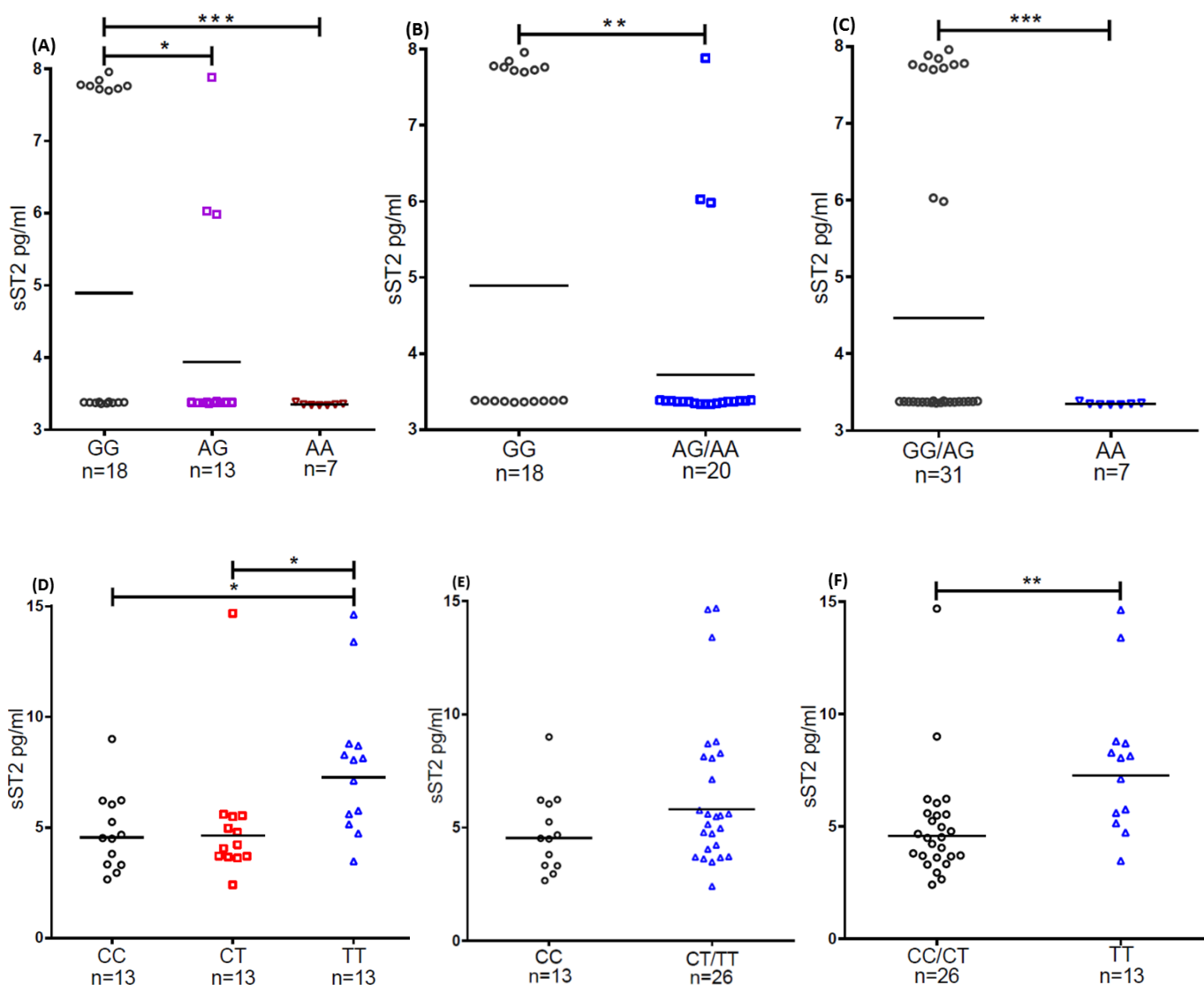
CHR, cromossomo; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; A1, menor alelo; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; SPT, teste cutâneo.

Tabela 5 sumariza os resultados estatisticamente significantes encontrados na nossa população pela associação entre o *IL1RL1* SNP rs13424006 com asma, asma grave, asma atópica e positividade ao SPT para *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, epitélio de gato e para pelo menos um dos aeroalérgenos testados, quando comparado com indivíduos controles. O alelo T do rs13424006 teve uma associação positiva com asma (OR 1.28, IC 95% 1.06–1.55, P=0.010) e (OR 1.55, IC 95% 1.11–2.18, P=0.010), no modelo aditivo e recessivo, respectivamente. Este mesmo alelo foi também associado como o fenótipo de asma grave (OR 1.56, IC 95% 1.04–2.32, P=0.030). Além disso, o alelo T deste mesmo polimorfismo foi associado positivamente, em todos os três modelos genéticos, com asma atópica (P=0.0003, modelo aditivo) e SPT para *B. tropicalis* (P=0,001, modelo aditivo). Este mesmo alelo foi associado positivamente com SPT para *D. pteronyssinus* (OR 1.32, IC 95% 1.09–1.60, P=0.004) e (OR 1.52, IC 95% 1.13–2.05, P=0.006), no modelo aditivo e dominante, respectivamente. O alelo T do rs13424006 mostrou uma associação positiva para SPT para epitélio de gato (OR 1.83, IC 95% 1.05–3.19, P=0.038), no modelo dominante.



**Figura 1.** Expressão dos SNPs *IL1RL1* rs1420101 e rs13424006 no tecido pulmonar e no sangue total.

A análise da expressão *in silico* de *IL1RL1* em indivíduos com diferentes genótipos para rs1420101 e 13424006, são mostrados na Figura 1. Aqueles com o alelo A de rs1420101 mostraram uma menor expressão de *IL1RL1* no tecido pulmonar (GTEX p-valor:  $2,60E^{-12}$ ). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de ST2 em células do sangue total para este mesmo alelo (GTEX p-valor: 0,89). O alelo T do SNP rs13424006 também foi associado com a expressão diminuída de ST2 no sangue total (GTEX p-valor: 0,0059), e apesar de se observar uma tendência para uma menor expressão de *IL1RL1* no tecido pulmonar para este mesmo alelo, não houve diferença estatisticamente significativa (GTEX p-valor: 0,090).



**Figura 2.** (ABC) Níveis plasmáticos de sST2 em sujeitos controles por grupos de genótipo do rs1420101 nos modelos aditivo, dominante e recessivo, respectivamente. Níveis plasmáticos de sST2 em indivíduos controles com o SNP rs13424006 (DEF), nos três modelos genéticos. As barras horizontais indicam a média geométrica para cada grupo de genótipos, e cada indivíduo é representado por um símbolo. Todos os dados apresentaram distribuição não normal e foram analisados pelos testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para análise com três e dois grupos de genótipos, respectivamente. \* P<0.05. \*\*P<0.01. \*\*\*P<0.001.



Os níveis plasmáticos de sST2 estavam reduzidos em indivíduos controle com o genótipo AA do *IL1RL1* SNP rs1420101 comparado com indivíduos GG ( $P < 0.001$ ) e entre indivíduos AG comparados com GG ( $P < 0.05$ ), no modelo aditivo. Houve diferença estatisticamente significativa também nos modelos dominante entre os indivíduos com o genótipo AG/AA em comparação com GG ( $P < 0.01$ ) e entre os sujeitos com genótipo AA comparado com GG/AG ( $P < 0.001$ ), modelo recessivo, mostrados na figura 1 ABC, respectivamente. Os indivíduos controle com o genótipo TT para o polimorfismo rs13424006, no modelo aditivo, mostraram uma maior produção dos níveis plasmáticos de sST2 comparado com os sujeitos CT ( $P < 0.05$ ) e àqueles com o genótipo CC ( $P < 0.05$ ). No modelo dominante, apesar de uma tendência para maior produção nos indivíduos com um ou dois alelos polimórficos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os controles com genótipo CT/TT comparado com os que apresentavam apenas o genótipo CC ( $P = 0.147$ ). Já no modelo recessivo, indivíduos com o genótipo TT produziram mais sST2 do que aqueles com os genótipos CC/CT ( $P < 0.01$ ). Não houve detecção de sST2 no sobrenadante do escarro para estes SNPs (dados não mostrados). Assim como não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-33 no plasma de indivíduos controle com alelo C de rs2381416, nem foi detectado IL-33 no sobrenadante do escarro desses indivíduos (dados não mostrados).

## Discussão

Neste trabalho demonstramos que polimorfismos nos genes *IL33* e *IL1RL1* estão associados com asma, bem como, sua gravidade e marcadores alérgicos em uma população miscigenada da América Latina. Polimorfismos em *IL33/IL1RL1* são os mais replicados em todo o mundo em estudos do tipo GWAS associados com asma (Moffatt, Gut et al. 2010; Torgerson, Ampleford et al. 2011). Além disso, esta rota está diretamente ligada à imunopatologia das doenças alérgicas, intensificando a inflamação Th2 tipicamente presente nessas condições (Lingel, Weiss et al. 2009).

Em nosso estudo, o alelo A do SNP *IL1RL1* rs1420101, polimorfismo intrônico, localizado no RNAm das variante 1 e 2, ST2L e sST2, respectivamente, foi associado de forma positiva com asma atópica e não atópica e com valores mais baixos da porcentagem do FEV1, ou seja, com um menor volume expiratório, comumente encontrado em indivíduos com fenótipo de asma grave. Em parte, estes

dados podem ser explicados pela redução da expressão de *IL1RL1* no pulmão de indivíduos com o alelo A do rs1420101 (GTEx p-valor:  $2.60E^{-12}$ ), disponível no banco de dados de expressão (GTEx). Este último, corrobora com a diminuição na produção plasmática de sST2 em indivíduos saudáveis para este mesmo alelo em nossa população. A diminuição da produção de sST2 pode estar contribuindo para um aumento da IL-33 livre, e conseqüentemente, uma maior ativação da rota IL-33/IL1RL1, favorecendo o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas e asma pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias resultantes da ativação da via.

Em um estudo do tipo caso controle com 7.996 casos e 44.890 controles, de nove populações europeias e uma do leste asiático, o alelo A do polimorfismo *IL1RL1* rs1420101 foi positivamente associado com asma (OR 1.16, IC 95% 1.11–1.21,  $P=5.5 \times 10^{-12}$ ), asma atópica (OR 1.18, IC 95% 1.12–1.24,  $P=5.9 \times 10^{-10}$ ) e asma não atópica (OR 1.11, IC 95% 1.04–1.19,  $P=0.0017$ ). Além disso, análises posteriores na população islandesa com  $n=14.000$  indivíduos, para este mesmo alelo, também encontrou associação com o aumento do número de eosinófilos no sangue ( $P=6.4 \times 10^{-14}$ ) e produção de IgE ( $P=3.2 \times 10^{-5}$ ) (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009).

Curiosamente, em outro estudo, do tipo coorte prospectivo onde foram avaliados 15 SNPs em *IL1RL1*, o alelo A de rs1420101 não foi associado com asma em crianças desde o nascimento até 8 anos de idade (Savenije, Kerkhof et al. 2011). Este mesmo alelo foi também associado com a produção sST2 no lavado bronco alveolar de 46 indivíduos asmáticos, em um estudo caso controle, dicotomizados em grupos de altos e baixos produtores da proteína (Traister, Uvalle et al. 2015).

O SNP *IL1RL1* rs13424006, em nossa população, teve o alelo T associado positivamente com asma, asma grave, asma atópica e SPT para *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, epitélio de gato e para pelo menos um dos aeroalérgenos. O alelo T deste mesmo SNP mostrou uma redução estatisticamente significativa da expressão de ST2 em células do sangue total (GTEx). Por outro lado, os níveis plasmáticos de sST2 se mostrou mais elevado nos indivíduos com o alelo T para este mesmo SNP. A associação positiva do alelo T do SNP rs13424006 com fenótipos de asma e marcadores de alergia pode estar ligada a uma maior ativação da via IL-33/IL1RL1, e conseqüentemente, uma maior liberação de IL-4, IL-5 e IL-13. Talvez, a ampliação

da inflamação Th2 seja o motivo do aumento da produção de sST2 para o alelo T do rs13424006 em nossa população. Adicionalmente, nós hipotetizamos que isso também pode, em parte, ser explicado pelo fato do polimorfismo estar localizado apenas na variante 1 (ST2L) e a expressão do ST2L não estar influenciando a do sST2, uma vez que este SNP encontra-se ausente nesta variante 2 (sST2).

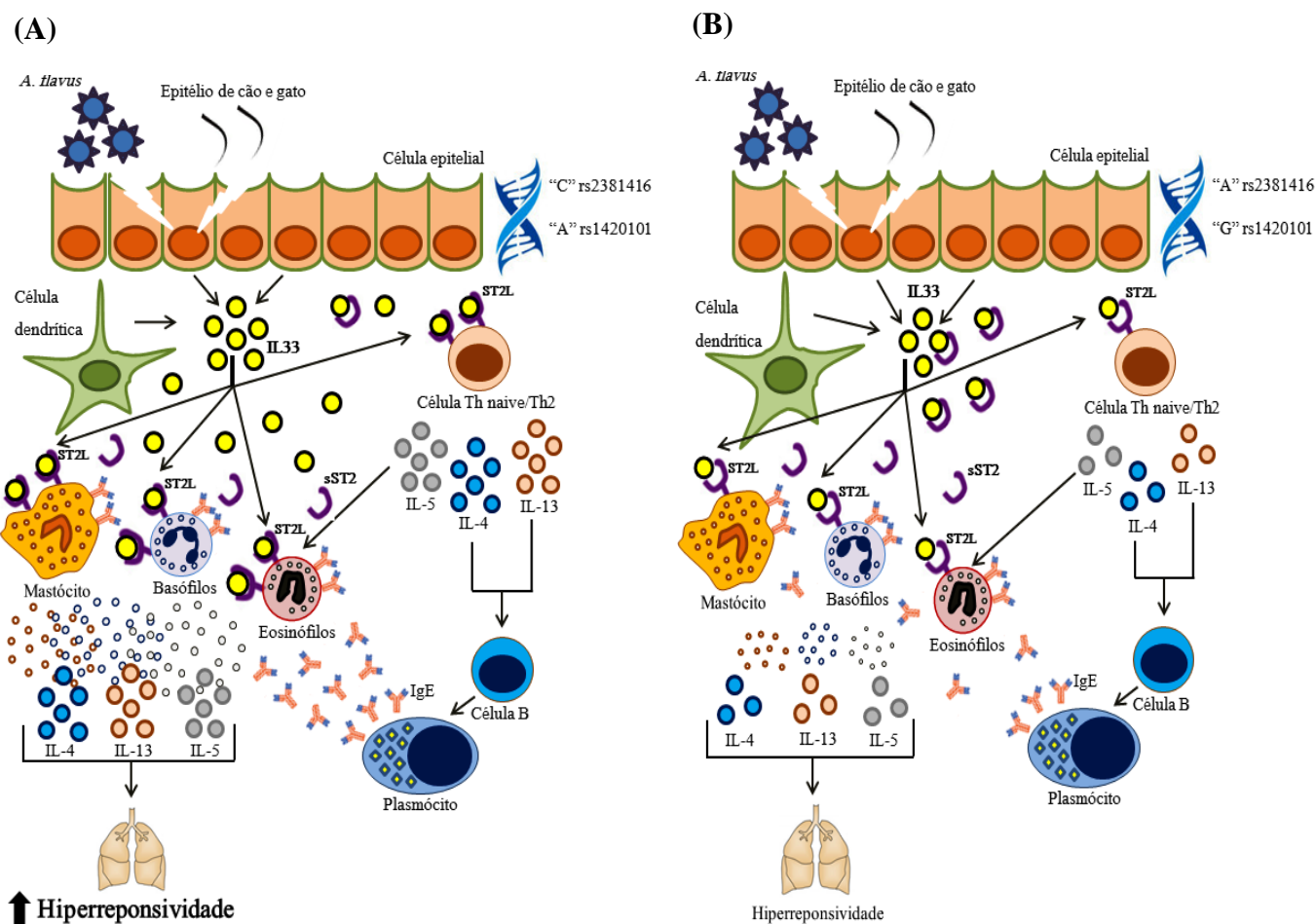
Um estudo de meta-análise avaliando a rota IL-33/IL1RL1 mostrou que o polimorfismo rs13424006 foi associado positivamente com níveis de sST2 no plasma de crianças holandesas aos 4 (Média geométrica 1.06, IC 95% 1.02-1.10, para média) e aos 8 anos de idade (Média geométrica 1.10, IC 95% 1.05-1.15, para média) após a aplicação de vários testes de correção em uma coorte prospectiva com 3.963 crianças nascidas de mães holandesas alérgicas e não alérgicas, posteriormente definidas como asmáticas (Savenije, Mahachie John et al. 2014).

Em outro estudo com crianças asmáticas, de duas coortes prospectivas, de 0 a 8 anos de idade do Reino Unido e da Holanda, foram avaliados oito genes pertencentes à rota IL-33/IL1RL1, num total de 104 SNPs. Dentre estes, o alelo C do *IL1RL1* SNP rs13424006, polimórfico para estas populações, foi associado com uma menor incidência de sibilo de início tardio (OR 0.74, IC 95% 0.63-0.87,  $P < 0.001$ ) e negativamente associado com asma (OR 0.85, IC 95% 0.75-0.96,  $P < 0.011$ ), apenas nas crianças da coorte do Reino Unido (Savenije, Mahachie John et al. 2014), corroborando assim com os nossos dados que demonstram o alelo T do rs13424006 como alelo de risco para asma e atopia.

Com relação às associações do alelo C do SNP *IL33* rs2381416, com positividade ao SPT para *A. flavus*, epitélio de cão e gato nossos achados corroboram com outros estudos em humanos e utilizando modelos experimentais de indução de asma com fungos e outros aeroalérgenos (Jackson, Makrinioti et al. 2014; Kita 2015; Zeng, Wu et al. 2015). Adicionalmente, este mesmo alelo foi positivamente associado com asma (OR 1.10, IC 95% 1.01–1.20,  $P = 0.04$ ) em coorte na Suécia com 10.075 gêmeos asmáticos, entre 9-12 anos de idade (Ullemar, Magnusson et al. 2016) e num estudo de meta-análise em uma população mista Norte-Americana (Grotenboer, Ketelaar et al. 2013).

Assim, conforme apresentado na figura 3, hipotetizamos que os indivíduos que carregam o alelo C do *IL33* SNP rs2381416 e o alelo A do *IL1RL1* SNP rs1420101, polimórficos para estes SNPs (Figura 3A), estão mais predispostos a produzirem IL-

33, e conseqüentemente, mais citocinas e mediadores inflamatórios do perfil Th2, apresentando um fenótipo clínico mais severo de asma quando comparado com aqueles indivíduos que possuem apenas o alelo A do rs2381416 e o alelo G do rs1420101, considerados selvagens para estes dois polimorfismos (Figura 3B).



**Figura 3.** Impacto funcional de SNPs *IL1RL1* e *IL33*. Lesão ou dano nas células epiteliais das vias aéreas resulta em liberação de IL-33. O contato de células dendríticas com aeroalérgenos também resulta em liberação de IL-33. Esta citocina ativa células da resposta imune inata e adaptativa ao se liga ao seu receptor ST2L na membrana dessas células, que passam a produzir e liberar citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Além disso, IL-33 colabora para degranulação de compostos inflamatórios liberados por granulócitos ativados pela reação cruzada de duas ou mais moléculas de IgE com o alérgeno. Esta IgE, que por sua vez, foi liberada por células B ativadas pelas citocinas IL-4 e IL-13 liberadas por células Th2 ativadas pela IL-33. A IL-5, também produzida por células Th2, ativa e recruta eosinófilos para o local da inflamação. Por outro lado, o sST2 se liga a IL-33 neutralizando seu efeito, por impedir sua ligação ao ST2L. Todo esse cenário inflamatório resulta em hiperresponsividade, broncoconstrição e redução do fluxo de ar nas vias aéreas, sintomas clássicos da asma atópica. **(A)** Indivíduos com os alelos polimórficos "C" e "A" para os SNPs rs2381416 e rs1420101, respectivamente, com maior predisposição para produção de IL-33, atrelada a uma menor produção de sST2, deixando uma quantidade maior de IL-33 livre para se ligar ao ST2L, resultando em mais mediadores inflamatórios e uma hiperresponsividade mais acentuada. **(B)** Indivíduos com os alelos selvagens "A" e "G" para os SNPs rs2381416 e rs1420101, respectivamente, com menor predisposição para produção de IL-33, atrelada a uma maior produção de sST2, deixando uma quantidade menor de IL-33 livre para se ligar ao ST2L, resultando em menos mediadores inflamatórios e uma hiperresponsividade menos acentuada.

## **Conclusão**

Em resumo, os nossos resultados demonstram uma forte associação de variantes genéticas em *IL1RL1* e *IL33* com asma e marcadores de alergia. A produção de sST2 variou de acordo com a presença dos polimorfismos no gene *IL1RL1*, em nossa população. Estes dados reforçam um papel chave para *IL33/IL1RL1* na inflamação alérgica. Sugerimos que mais estudos com variantes envolvidas na ativação da rota IL-33/IL1RL1 sejam realizados para elucidar os impactos funcionais desses SNPs em doenças alérgicas.

## Referências

- Agache, I. and C. A. Akdis (2016). "Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine." Allergol Int **65**(3): 243-252.
- Akhabir, L. and A. J. Sandford (2011). "Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma." Respirology **16**(3): 396-406.
- Akinbami, L. J., J. E. Moorman, et al. (2012). "Trends in asthma prevalence, health care use, and mortality in the United States, 2001-2010." NCHS Data Brief(94): 1-8.
- Al-Sawalha, N., I. Pokkunuri, et al. (2015). "Epinephrine Activation of the beta2-Adrenoceptor Is Required for IL-13-Induced Mucin Production in Human Bronchial Epithelial Cells." PLoS One **10**(7): e0132559.
- Alcantara-Neves, N. M., S. G. B. G. de, et al. (2014). "Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America." BMC Res Notes **7**: 817.
- Allakhverdi, Z., D. E. Smith, et al. (2007). "Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells." Journal of Immunology **179**(4): 2051-2054.
- Amin, K., C. Janson, et al. (2016). "Role of Eosinophil Granulocytes in Allergic Airway Inflammation Endotypes." Scand J Immunol **84**(2): 75-85.
- Antonicelli, L., C. Bucca, et al. (2004). "Asthma severity and medical resource utilisation." Eur Respir J **23**(5): 723-729.
- Asher, I. and N. Pearce (2014). "Global burden of asthma among children." Int J Tuberc Lung Dis **18**(11): 1269-1278.
- Baekkevold, E. S., M. Roussigne, et al. (2003). "Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules." American Journal of Pathology **163**(1): 69-79.
- Barlow, J. L., S. Peel, et al. (2013). "IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction." Journal of Allergy and Clinical Immunology **132**(4): 933-941.
- Barreto, M. L., S. S. Cunha, et al. (2006). "Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study)." BMC Pulm Med **6**: 15.
- Barreto, M. L., R. C. Ribeiro-Silva et al. (2014). "Prevalência de sintomas de asma entre escolares do Brasil: Pesquisa Nacional em Saúde do Escolar (PeNSE 2012)." REV BRAS EPIDEMIOL 106-115.

- Bernatchez, E., M. J. Gold, et al. (2015). "Pulmonary CD103 expression regulates airway inflammation in asthma." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **308**(8): L816-826.
- Bonnelykke, K., P. Sleiman, et al. (2014). "A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations." Nat Genet **46**(1): 51-55.
- Bostantzoglou, C., V. Delimpoura, et al. (2015). "Clinical asthma phenotypes in the real world: opportunities and challenges." Breathe (Sheff) **11**(3): 186-193.
- Busse, W. W., R. Dahl, et al. (2016). "Long-acting muscarinic antagonists: a potential add-on therapy in the treatment of asthma?" Eur Respir Rev **25**(139): 54-64.
- Carr, T. F., S. Berdnikovs, et al. (2016). "Eosinophilic bioactivities in severe asthma." World Allergy Organ J **9**: 21.
- Carsin, A., J. Mazonq, et al. (2016). "Bronchial epithelium in children: a key player in asthma." Eur Respir Rev **25**(140): 158-169.
- Cayrol, C. and J. P. Girard (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(22): 9021-9026.
- Chackerian, A. A., E. R. Oldham, et al. (2007). "IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex." Journal of Immunology **179**(4): 2551-2555.
- Cherry, W. B., J. Yoon, et al. (2008). "A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils." Journal of Allergy and Clinical Immunology **121**(6): 1484-1490.
- Chogtu, B., D. Bhattacharjee, et al. (2016). "Epigenetics: The New Frontier in the Landscape of Asthma." Scientifica (Cairo) **2016**: 4638949.
- Colley, T., N. Mercado, et al. (2016). "Defective sirtuin-1 increases IL-4 expression through acetylation of GATA-3 in patients with severe asthma." J Allergy Clin Immunol **137**(5): 1595-1597 e1597.
- Corren, J., S. Weinstein, et al. (2016). "Phase 3 Study of Reslizumab in Patients with Poorly Controlled Asthma: Effects Across a Broad Range of Eosinophil Counts." Chest.
- D'Amato, G., C. Vitale, et al. (2015). "Effects on asthma and respiratory allergy of Climate change and air pollution." Multidiscip Respir Med **10**: 39.
- D'Innocenzo, S., S. M. A. Matos, et al. (2014). "Padrão alimentar, asma e sibilos atópicos e não atópicos em crianças e adolescentes: estudo SCAALA, Salvador, Bahia, Brasil." Cad. Saúde Pública **30**: 1849-1860.
- Daley, D., J. E. Park, et al. (2012). "Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes." J Allergy Clin Immunol **130**(6): 1284-1293.
- Davoine, F. and P. Lacy (2014). "Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity." Front Immunol **5**: 570.

- Desch, A. N., G. J. Randolph, et al. (2011). "CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen." J Exp Med **208**(9): 1789-1797.
- Dong, Z., L. Xiong, et al. (2016). "Holding the Inflammatory System in Check: TLRs and Their Targeted Therapy in Asthma." Mediators Inflamm **2016**: 2180417.
- Dougherty, R. H. and J. V. Fahy (2009). "Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype." Clin Exp Allergy **39**(2): 193-202.
- Eltboli, O. and C. E. Brightling (2013). "Eosinophils as diagnostic tools in chronic lung disease." Expert Rev Respir Med **7**(1): 33-42.
- Faiz, A., C. Donovan, et al. (2016). "Latrophilin receptors: novel bronchodilator targets in asthma." Thorax.
- Felton, J. M., C. D. Lucas, et al. (2014). "Eosinophils in the lung - modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation." Front Immunol **5**: 302.
- Figueiredo, C. A., N. M. Alcantara-Neves, et al. (2011). "Evidence for a modulatory effect of IL-10 on both Th1 and Th2 cytokine production: The role of the environment." Clinical Immunology **139**(1): 57-64.
- Figueiredo, C. A., M. L. Barreto, et al. (2010). "Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network." Infect Immun **78**(7): 3160-3167.
- Franco, R., H. F. Nascimento, et al. (2009). "The economic impact of severe asthma to low-income families." Allergy **64**(3): 478-483.
- Froidure, A., C. Shen, et al. (2016). "Dendritic cells revisited in human allergic rhinitis and asthma." Allergy **71**(2): 137-148.
- Furuhashi, K., T. Suda, et al. (2012). "Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses." Am J Respir Cell Mol Biol **46**(2): 165-172.
- Gaffney, A. and D. C. Christiani (2015). "Gene-environment interaction from international cohorts: impact on development and evolution of occupational and environmental lung and airway disease." Semin Respir Crit Care Med **36**(3): 347-357.
- Galli, S. J. and M. Tsai (2012). "IgE and mast cells in allergic disease." Nat Med **18**(5): 693-704.
- Garcia-Marcos, L. (2016). "Markers of asthma: The quest of the Holy Grail." Allergol Immunopathol (Madr) **44**(3): 189-190.
- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109** **Suppl**: S81-96.
- GINA (2006). "National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute."



- Gour, N. and M. Wills-Karp (2015). "IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease." Cytokine **75**(1): 68-78.
- Grotenboer, N. S., M. E. Ketelaar, et al. (2013). "Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology." J Allergy Clin Immunol **131**(3): 856-865.
- Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." Nature Genetics **41**(3): 342-347.
- Hamzaoui, A., A. Berraies, et al. (2013). "Induced sputum levels of IL-33 and soluble ST2 in young asthmatic children." J Asthma **50**(8): 803-809.
- Han, J., A. Dakhama, et al. (2012). "Responsiveness to respiratory syncytial virus in neonates is mediated through thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand." J Allergy Clin Immunol **130**(5): 1175-1186 e1179.
- Hanania, N. A., M. Noonan, et al. (2015). "Lebrikizumab in moderate-to-severe asthma: pooled data from two randomised placebo-controlled studies." Thorax **70**(8): 748-756.
- Hara, T., K. Yamada, et al. (1998). "Basophilic differentiation of the human leukemia cell line KU812 upon treatment with interleukin-4." Biochemical and Biophysical Research Communications **247**(3): 542-548.
- Haraldsen, G., J. Balogh, et al. (2009). "Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin?" Trends Immunol **30**(5): 227-233.
- Haworth, O., M. Cernadas, et al. (2008). "Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation." Nat Immunol **9**(8): 873-879.
- Hayakawa, H., M. Hayakawa, et al. (2007). "Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation." J Biol Chem **282**(36): 26369-26380.
- He, X., W. Wu, et al. (2014). "Effect of interleukin-33 on Th1/Th2 cytokine ratio in peripheral lymphocytes in asthmatic mice." Chin Med J (Engl) **127**(8): 1517-1522.
- Ho, J. E., W. Y. Chen, et al. (2013). "Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling." Journal of Clinical Investigation **123**(10): 4208-4218.
- Ho, L. H., T. Ohno, et al. (2007). "IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcepsilonRI signals." J Leukoc Biol **82**(6): 1481-1490.
- Hofmann, A. M. and S. N. Abraham (2009). "New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens." Curr Opin Immunol **21**(6): 679-686.
- Howrylak, J. A., M. Moll, et al. (2016). "Gene expression profiling of asthma phenotypes demonstrates molecular signatures of atopy and asthma control." J Allergy Clin Immunol **137**(5): 1390-1397 e1396.

- Humbert, M., W. Busse, et al. (2014). "Omalizumab in asthma: an update on recent developments." J Allergy Clin Immunol Pract **2**(5): 525-536 e521.
- Ito, T., Y. H. Wang, et al. (2005). "TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand." J Exp Med **202**(9): 1213-1223.
- Jackson, D. J., H. Makrinioti, et al. (2014). "IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo." Am J Respir Crit Care Med **190**(12): 1373-1382.
- Kabata, H., K. Moro, et al. (2015). "Group 2 innate lymphoid cells and asthma." Allergol Int **64**(3): 227-234.
- Kakkar, R., H. Hei, et al. (2012). "Interleukin 33 as a Mechanically Responsive Cytokine Secreted by Living Cells." Journal of Biological Chemistry **287**(9): 6941-6948.
- Kakkar, R. and R. T. Lee (2008). "The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker." Nat Rev Drug Discov **7**(10): 827-840.
- Kim, D. S., Y. J. Na, et al. (2016). "Use of deferasirox, an iron chelator, to overcome imatinib resistance of chronic myeloid leukemia cells." Korean Journal of Internal Medicine **31**(2): 357-366.
- Kita, H. (2015). "ILC2s and fungal allergy." Allergol Int **64**(3): 219-226.
- Koberle, B., B. Koch, et al. (2016). "Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk." Arch Toxicol.
- Komai-Koma, M., D. S. Gilchrist, et al. (2011). "IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity." J Immunol **186**(4): 2584-2591.
- Kondo, Y., T. Yoshimoto, et al. (2008). "Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system." Int Immunol **20**(6): 791-800.
- Koyasu, S. and K. Moro (2011). "Type 2 innate immune responses and the natural helper cell." Immunology **132**(4): 475-481.
- Koziol-White, C. J. and R. A. Panettieri, Jr. (2011). "Airway smooth muscle and immunomodulation in acute exacerbations of airway disease." Immunol Rev **242**(1): 178-185.
- Krystal-Whittemore, M., K. N. Dileepan, et al. (2015). "Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell." Front Immunol **6**: 620.
- Kumar, R. K., C. Herbert, et al. (2016). "Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma." Respirology **21**(5): 842-849.
- Kurokawa, M., S. Matsukura, et al. (2011). "Expression and effects of IL-33 and ST2 in allergic bronchial asthma: IL-33 induces eotaxin production in lung fibroblasts." Int Arch Allergy Immunol **155 Suppl 1**: 12-20.

- Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, et al. (2009). "IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation." Journal of Immunology **183**(10): 6469-6477.
- Lai, C. K., R. Beasley, et al. (2009). "Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." Thorax **64**(6): 476-483.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2015). "The immunology of asthma." Nat Immunol **16**(1): 45-56.
- Lasso-Pirot, A., S. Delgado-Villalta, et al. (2015). "Early childhood wheezers: identifying asthma in later life." J Asthma Allergy **8**: 63-73.
- Laurie, C. C., K. F. Doheny, et al. (2010). "Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies." Genet Epidemiol **34**(6): 591-602.
- Lauzon, A. M. and J. G. Martin (2016). "Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor." F1000Res **5**.
- Li, C. W., H. Q. Li, et al. (2014). "Interleukin-33 Increases Antibacterial Defense by Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin." Plos Pathogens **10**(2).
- Li, M., S. R. Riddle, et al. (2011). "Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension." J Immunol **187**(5): 2711-2722.
- Li, X., A. T. Hastie, et al. (2015). "eQTL of bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage deciphers GWAS-identified asthma genes." Allergy **70**(10): 1309-1318.
- Li, X., G. A. Hawkins, et al. (2013). "Genome-wide association study identifies TH1 pathway genes associated with lung function in asthmatic patients." J Allergy Clin Immunol **132**(2): 313-320 e315.
- Liew, F. Y., N. I. Pitman, et al. (2010). "Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family." Nat Rev Immunol **10**(2): 103-110.
- Lima-Costa, M. F., L. C. Rodrigues, et al. (2015). "Genomic ancestry and ethnracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative)." Scientific Reports **5**.
- Lin, J., K. Yin, et al. (2015). "Chinese expert consensus on clinical use of non-invasive airway inflammation assessment in bronchial asthma." Ann Transl Med **3**(20): 302.
- Lin, J. H., J. Fang, et al. (2016). "Chinese expert consensus on the endoscopic management of foreign bodies in the upper gastrointestinal tract (2015, Shanghai, China)." J Dig Dis **17**(2): 65-78.
- Lingel, A., T. M. Weiss, et al. (2009). "Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes." Structure **17**(10): 1398-1410.

- Lipworth, B. J., M. A. Kaliner, et al. (2005). "Effect of ciclesonide and fluticasone on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in adults with mild-to-moderate persistent asthma." Ann Allergy Asthma Immunol **94**(4): 465-472.
- Liu, X., M. Hammel, et al. (2013). "Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(37): 14918-14923.
- Liu, Y. J. (2007). "Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation." J Allergy Clin Immunol **120**(2): 238-244; quiz 245-236.
- Lommatzsch, M. and P. Stoll (2016). "Novel strategies for the treatment of asthma." Allergo J Int **25**: 11-17.
- Lott, J. M., T. L. Sumpter, et al. (2015). "New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity." J Leukoc Biol **97**(6): 1037-1048.
- Lu, Y., K. K. Mak, et al. (2012). "Prevalence of anxiety and depressive symptoms in adolescents with asthma: a meta-analysis and meta-regression." Pediatr Allergy Immunol **23**(8): 707-715.
- Lunderius-Andersson, C., M. Enoksson, et al. (2012). "Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33." Frontiers in Immunology **3**.
- Luthi, A. U., S. P. Cullen, et al. (2009). "Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases." Immunity **31**(1): 84-98.
- MacGlashan, D., Jr. (2008). "IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils." Curr Opin Immunol **20**(6): 717-723.
- Marashian, S. M., E. Mortaz, et al. (2015). "Role of Innate Lymphoid Cells in Lung Disease." Iran J Allergy Asthma Immunol **14**(4): 346-360.
- Martinez, F. D. and D. Vercelli (2013). "Asthma." Lancet **382**(9901): 1360-1372.
- Masoli, M., D. Fabian, et al. (2004). "The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report." Allergy **59**(5): 469-478.
- McIvor, R. A. (2015). "Emerging therapeutic options for the treatment of patients with symptomatic asthma." Ann Allergy Asthma Immunol **115**(4): 265-271 e265.
- Melen, E., B. E. Himes, et al. (2010). "Analyses of shared genetic factors between asthma and obesity in children." J Allergy Clin Immunol **126**(3): 631-637 e631-638.
- Miller, A. M. (2011). "Role of IL-33 in inflammation and disease." J Inflamm (Lond) **8**(1): 22.
- Miller, A. M., D. Xu, et al. (2008). "IL-33 reduces the development of atherosclerosis." J Exp Med **205**(2): 339-346.

- Mishina, K., M. Shinkai, et al. (2015). "HO-1 inhibits IL-13-induced goblet cell hyperplasia associated with CLCA1 suppression in normal human bronchial epithelial cells." Int Immunopharmacol **29**(2): 448-453.
- Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma." N Engl J Med **363**(13): 1211-1221.
- Monticelli, L. A., G. F. Sonnenberg, et al. (2011). "Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus." Nat Immunol **12**(11): 1045-1054.
- Moore, W. C., A. T. Hastie, et al. (2014). "Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis." J Allergy Clin Immunol **133**(6): 1557-1563 e1555.
- Moore, W. C., D. A. Meyers, et al. (2010). "Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program." Am J Respir Crit Care Med **181**(4): 315-323.
- Moorman, J. E., L. J. Akinbami, et al. (2012). "National surveillance of asthma: United States, 2001-2010." Vital Health Stat **3**(35): 1-58.
- Moritz, P., L. J. Steidle, et al. (2008). "Determination of the inflammatory component of airway diseases by induced sputum cell counts: use in clinical practice." J Bras Pneumol **34**(11): 913-921.
- Mousson, C., N. Ortega, et al. (2008). "The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel 'Alarmin'?" PLoS One **3**(10).
- Muraro, A., R. F. Lemanske, Jr., et al. (2016). "Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology." J Allergy Clin Immunol **137**(5): 1347-1358.
- Murcia, R. Y., A. Vargas, et al. (2016). "The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids." PLoS One **11**(5): e0154755.
- Nabe, T. (2014). "Interleukin (IL)-33: new therapeutic target for atopic diseases." J Pharmacol Sci **126**(2): 85-91.
- Navarro, S., J. Aleu, et al. (2008). "The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane." Cell Mol Life Sci **65**(2): 324-337.
- Norimoto, A., K. Hirose, et al. (2014). "Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **51**(2): 201-209.
- Oboki, K., T. Ohno, et al. (2010). "IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases." Allergol Int **59**(2): 143-160.

- Ohno, T., H. Morita, et al. (2012). "Interleukin-33 in allergy." Allergy **67**(10): 1203-1214.
- Ordonez, C. L., T. E. Shaughnessy, et al. (2000). "Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance." Am J Respir Crit Care Med **161**(4 Pt 1): 1185-1190.
- Ozyigit, L. P., H. Morita, et al. (2015). "Innate lymphocyte cells in asthma phenotypes." Clin Transl Allergy **5**: 23.
- Pulendran, B. and D. Artis (2012). "New paradigms in type 2 immunity." Science **337**(6093): 431-435.
- Rank, M. A., T. Kobayashi, et al. (2009). "IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 1047-1054.
- Rasmussen, T., J. F. Jensen, et al. (2002). "On the mechanism of the copper-catalyzed cyclopropanation reaction." Chemistry **8**(1): 177-184.
- Rayees, S., F. Malik, et al. (2014). "Linking GATA-3 and interleukin-13: implications in asthma." Inflamm Res **63**(4): 255-265.
- Reijmerink, N. E., D. S. Postma, et al. (2008). "Association of IL1RL1, IL18R1, and IL18RAP gene cluster polymorphisms with asthma and atopy." J Allergy Clin Immunol **122**(3): 651-654 e658.
- Renkonen, J., S. Joenvaara, et al. (2010). "Network analysis of single nucleotide polymorphisms in asthma." J Asthma Allergy **3**: 177-186.
- Romantowski, J., M. Gawinowska, et al. (2015). "Asthma prevalence and risk factors analysis in Tricity university students' group." Pneumonol Alergol Pol **83**(5): 359-364.
- Rosenwasser, L. J. and J. Meng (2005). "Anti-CD23." Clin Rev Allergy Immunol **29**(1): 61-72.
- Roussel, L., R. Farias, et al. (2013). "IL-33 is expressed in epithelia from patients with cystic fibrosis and potentiates neutrophil recruitment." J Allergy Clin Immunol **131**(3): 913-916.
- Russell, S. E. and P. T. Walsh (2012). "Sterile inflammation - do innate lymphoid cell subsets play a role?" Frontiers in Immunology **3**.
- Sadatsafavi, M., R. Rousseau, et al. (2014). "The preventable burden of productivity loss due to suboptimal asthma control: a population-based study." Chest **145**(4): 787-793.
- Saluja, R., M. E. Ketelaar, et al. (2015). "The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders." Molecular Immunology **63**(1): 80-85.
- Samitas, K., V. Delimpoura, et al. (2015). "Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives." Eur Respir Rev **24**(138): 594-601.

- Samitas, K., J. Lotvall, et al. (2010). "B cells: from early development to regulating allergic diseases." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **58**(3): 209-225.
- Sarnowski, C., P. E. Sugier, et al. (2016). "Identification of a new locus at 16q12 associated with time to asthma onset." J Allergy Clin Immunol.
- Savenije, O. E., M. Kerkhof, et al. (2011). "Interleukin-1 receptor-like 1 polymorphisms are associated with serum IL1RL1-a, eosinophils, and asthma in childhood." J Allergy Clin Immunol **127**(3): 750-756 e751-755.
- Savenije, O. E., J. M. Mahachie John, et al. (2014). "Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood." J Allergy Clin Immunol **134**(1): 170-177.
- Sawada, Y., T. Honda, et al. (2015). "Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses." J Exp Med **212**(11): 1921-1930.
- Schmitz, J., A. Owyang, et al. (2005). "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines." Immunity **23**(5): 479-490.
- Schuliga, M. (2015). "NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease." Biomolecules **5**(3): 1266-1283.
- Serhan, C. N. and J. Savill (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." Nat Immunol **6**(12): 1191-1197.
- Shimizu, M., A. Matsuda, et al. (2005). "Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis." Hum Mol Genet **14**(19): 2919-2927.
- Smith, D. E. (2010). "IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma." Clinical and Experimental Allergy **40**(2): 200-208.
- Stanford, R. H., A. W. Gilsenan, et al. (2010). "Predictors of uncontrolled asthma in adult and pediatric patients: analysis of the Asthma Control Characteristics and Prevalence Survey Studies (ACCESS)." J Asthma **47**(3): 257-262.
- Staticescu, S., P. Chereches-Panta, et al. (2014). "The Value of Induced Sputum in the Diagnosis and Management of Children with Bronchial Asthma." Clujul Med **87**(3): 171-176.
- Stone, K. D., C. Prussin, et al. (2010). "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S73-80.
- Strauss-Albee, D. M., A. Horowitz, et al. (2014). "Coordinated regulation of NK receptor expression in the maturing human immune system." J Immunol **193**(10): 4871-4879.
- Strina, A., M. L. Barreto, et al. (2014). "Risk factors for non-atopic asthma/wheeze in children and adolescents: a systematic review." Emerg Themes Epidemiol **11**: 5.

- Sullivan, P. W., V. H. Ghushchyan, et al. (2011). "The burden of adult asthma in the United States: evidence from the Medical Expenditure Panel Survey." J Allergy Clin Immunol **127**(2): 363-369 e361-363.
- Suzukawa, M., R. Koketsu, et al. (2008). "Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils." Laboratory Investigation **88**(11): 1245-1253.
- Suzukawa, M., M. Likura, et al. (2008). "An IL-1 Cytokine Member, IL-33, Induces Human Basophil Activation via Its ST2 Receptor." Journal of Immunology **181**(9): 5981-5989.
- Tago, K., T. Noda, et al. (2001). "Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V." Biochemical and Biophysical Research Communications **285**(5): 1377-1383.
- Thomsen, S. F. (2015). "Genetics of asthma: an introduction for the clinician." Eur Clin Respir J **2**.
- Torgerson, D. G., E. J. Ampleford, et al. (2011). "Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations." Nature Genetics **43**(9): 887-892.
- Traenckner, E. B., S. Wilk, et al. (1994). "A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B." EMBO J **13**(22): 5433-5441.
- Traister, R. S., C. E. Uvalle, et al. (2015). "Phenotypic and genotypic association of epithelial IL1RL1 to human TH2-like asthma." J Allergy Clin Immunol **135**(1): 92-99.
- Trajkovic, V., M. J. Sweet, et al. (2004). "T1/ST2 - an IL-1 receptor-like modulator of immune responses." Cytokine & Growth Factor Reviews **15**(2-3): 87-95.
- Ullemar, V., P. K. Magnusson, et al. (2016). "Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins." Allergy **71**(2): 230-238.
- Unkel, B., K. Hoegner, et al. (2012). "Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia." J Clin Invest **122**(10): 3652-3664.
- Valet, R. S., T. Gebretsadik, et al. (2011). "High asthma prevalence and increased morbidity among rural children in a Medicaid cohort." Ann Allergy Asthma Immunol **106**(6): 467-473.
- van Rijt, L. S., N. Vos, et al. (2011). "Persistent activation of dendritic cells after resolution of allergic airway inflammation breaks tolerance to inhaled allergens in mice." Am J Respir Crit Care Med **184**(3): 303-311.
- Wang, C. H., B. J. Liu, et al. (2012). "The Association Forecasting of 13 Variants Within Seven Asthma Susceptibility Genes on 3 Serum IgE Groups in Taiwanese Population by Integrating of Adaptive Neuro-fuzzy Inference System (ANFIS) and Classification Analysis Methods." Journal of Medical Systems **36**(1): 175-185.



- Wang, W. (2016). "Progress in the impact of polluted meteorological conditions on the incidence of asthma." J Thorac Dis **8**(1): E57-61.
- Wang, Y., H. Hu, et al. (2016). "The IL6R gene polymorphisms are associated with sIL-6R, IgE and lung function in Chinese patients with asthma." Gene **585**(1): 51-57.
- Wang, Y. H. and Y. J. Liu (2009). "Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses." Clin Exp Allergy **39**(6): 798-806.
- Wenzel, S. (2005). "Severe asthma in adults." Am J Respir Crit Care Med **172**(2): 149-160.
- Wenzel, S., L. Ford, et al. (2013). "Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels." N Engl J Med **368**(26): 2455-2466.
- Wenzel, S. E. (2012). "Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches." Nat Med **18**(5): 716-725.
- Wesolowska-Andersen, A. and M. A. Seibold (2015). "Airway molecular endotypes of asthma: dissecting the heterogeneity." Curr Opin Allergy Clin Immunol **15**(2): 163-168.
- Wu, H., I. Romieu, et al. (2010). "Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans." Journal of Allergy and Clinical Immunology **125**(2): 321-327.
- Xie, T., G. Luo, et al. (2015). "Rho-kinase inhibitor fasudil reduces allergic airway inflammation and mucus hypersecretion by regulating STAT6 and NFkappaB." Clin Exp Allergy **45**(12): 1812-1822.
- Yang, X., Y. Jiang, et al. (2016). "Does IL-17 Respond to the Disordered Lung Microbiome and Contribute to the Neutrophilic Phenotype in Asthma?" Mediators Inflamm **2016**: 6470364.
- Yao, X., Y. Sun, et al. (2016). "Interleukin (IL)-25: Pleiotropic roles in asthma." Respirology **21**(4): 638-647.
- Zeng, S., J. Wu, et al. (2015). "IL-33 Receptor (ST2) Signalling is Important for Regulation of Th2-Mediated Airway Inflammation in a Murine Model of Acute Respiratory Syncytial Virus Infection." Scand J Immunol **81**(6): 494-501.
- Zhang, L., L. He, et al. (2016). "Risk Factors Associated with Irreversible Airway Obstruction in Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis." Biomed Res Int **2016**: 9868704.
- Zhou, Q., A. W. Ho, et al. (2014). "GM-CSF-licensed CD11b+ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*." J Immunol **193**(2): 496-509.
- Zhu, X. Y., K. Tao, et al. (2013). "A new recombinant immunotoxin hscFv-ETA' demonstrates specific cytotoxicity against chronic myeloid leukemia cells in vitro." Immunology Letters **154**(1-2): 18-24.

- Zhu, Z., R. J. Homer, et al. (1999). "Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production." Journal of Clinical Investigation **103**(6): 779-788.
- Ziegler, K. M., H. A. Pitt, et al. (2010). "Choledochoceles: are they choledochal cysts?" Ann Surg **252**(4): 683-690.
- Ziegler, S. F. and D. Artis (2010). "Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity." Nat Immunol **11**(4): 289-293.
- Zou, H., Q. H. Fang, et al. (2014). "Analysis of growth factors in serum and induced sputum from patients with asthma." Exp Ther Med **8**(2): 573-578.

## CONCLUSÃO GERAL

- Polimorfismos nos genes *IL33* e *IL1RL1* foram associados com o desenvolvimento de doenças complexas como asma e atopia em nossa população;
- O alelo G da variante rs12551256 no gene *IL33* foi negativamente associado com asma. O alelo A da variante rs1041973 no gene *IL1RL1* foi positivamente associado com produção de IL-5 estimulada com PWM, níveis de IgE específico e positividade ao SPT, ambos ao ácaro *B. tropicalis*, bem como, uma menor produção de sST2. Por outro lado, o alelo T do polimorfismo rs873022 no gene *IL1RL1* foi negativamente associado com produção de anti-*B. tropicalis* em crianças da coorte do SCAALA;
- O alelo C do polimorfismo rs2381416 no gene *IL33* foi positivamente associado com positividade ao SPT para *A. flavus*, epitélio de cão e gato. O alelo A da variante rs1420101 presente no gene *IL1RL1* foi positivamente associada com asma e negativamente com valores do FEV1 e menor produção de sST2. O alelo T do SNP *IL1RL1* rs13424006 foi associado positivamente com asma e positividade ao SPT para *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e epitélio de gato. Além disso, este mesmo alelo foi associado a maiores níveis de sST2 em estudo caso-controle para asma grave (ProAR);
- Variantes genéticas presentes em *IL33* e *IL1RL1* podem promover um impacto no desenvolvimento de asma e alergias. Contudo, mais estudos devem ser realizados com o intuito de melhorar a compreensão de como estas variantes afetam a produção e função de IL-33 e IL1RL1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agache, I. and C. A. Akdis (2016). "Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine." Allergol Int **65**(3): 243-252.
- Akinbami, L. J., J. E. Moorman, et al. (2012). "Trends in asthma prevalence, health care use, and mortality in the United States, 2001-2010." NCHS Data Brief(94): 1-8.
- Allakhverdi, Z., D. E. Smith, et al. (2007). "Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells." Journal of Immunology **179**(4): 2051-2054.
- Antonicelli, L., C. Bucca, et al. (2004). "Asthma severity and medical resource utilisation." Eur Respir J **23**(5): 723-729.
- Baekkevold, E. S., M. Roussigne, et al. (2003). "Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules." American Journal of Pathology **163**(1): 69-79.
- Barlow, J. L., S. Peel, et al. (2013). "IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction." Journal of Allergy and Clinical Immunology **132**(4): 933-941.
- Barreto, M. L., R. C. Ribeiro-Silva et al. (2014). "Prevalência de sintomas de asma entre escolares do Brasil: Pesquisa Nacional em Saúde do Escolar (PeNSE 2012)." REV BRAS EPIDEMIOL 106-115.
- Bernatchez, E., M. J. Gold, et al. (2015). "Pulmonary CD103 expression regulates airway inflammation in asthma." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **308**(8): L816-826.
- Bostantzoglou, C., V. Delimpoura, et al. (2015). "Clinical asthma phenotypes in the real world: opportunities and challenges." Breathe (Sheff) **11**(3): 186-193.
- Carsin, A., J. Mazenq, et al. (2016). "Bronchial epithelium in children: a key player in asthma." Eur Respir Rev **25**(140): 158-169.
- Cayrol, C. and J. P. Girard (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(22): 9021-9026.
- Chackerian, A. A., E. R. Oldham, et al. (2007). "IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex." Journal of Immunology **179**(4): 2551-2555.
- Cherry, W. B., J. Yoon, et al. (2008). "A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils." Journal of Allergy and Clinical Immunology **121**(6): 1484-1490.

- Chogtu, B., D. Bhattacharjee, et al. (2016). "Epigenetics: The New Frontier in the Landscape of Asthma." Scientifica (Cairo) **2016**: 4638949.
- Colley, T., N. Mercado, et al. (2016). "Defective sirtuin-1 increases IL-4 expression through acetylation of GATA-3 in patients with severe asthma." J Allergy Clin Immunol **137**(5): 1595-1597 e1597.
- Corren, J., S. Weinstein, et al. (2016). "Phase 3 Study of Reslizumab in Patients with Poorly Controlled Asthma: Effects Across a Broad Range of Eosinophil Counts." Chest.
- D'Amato, G., C. Vitale, et al. (2015). "Effects on asthma and respiratory allergy of Climate change and air pollution." Multidiscip Respir Med **10**: 39.
- D'Innocenzo, S., S. M. A. Matos, et al. (2014). "Padrão alimentar, asma e sibilo atópico e não atópico em crianças e adolescentes: estudo SCAALA, Salvador, Bahia, Brasil." Cad. Saúde Pública **30**: 1849-1860.
- Daley, D., J. E. Park, et al. (2012). "Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes." J Allergy Clin Immunol **130**(6): 1284-1293.
- Davoine, F. and P. Lacy (2014). "Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity." Front Immunol **5**: 570.
- Desch, A. N., G. J. Randolph, et al. (2011). "CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen." J Exp Med **208**(9): 1789-1797.
- Dong, Z., L. Xiong, et al. (2016). "Holding the Inflammatory System in Check: TLRs and Their Targeted Therapy in Asthma." Mediators Inflamm **2016**: 2180417.
- Dougherty, R. H. and J. V. Fahy (2009). "Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype." Clin Exp Allergy **39**(2): 193-202.
- Eltboli, O. and C. E. Brightling (2013). "Eosinophils as diagnostic tools in chronic lung disease." Expert Rev Respir Med **7**(1): 33-42.
- Faiz, A., C. Donovan, et al. (2016). "Latrophilin receptors: novel bronchodilator targets in asthma." Thorax.
- Felton, J. M., C. D. Lucas, et al. (2014). "Eosinophils in the lung - modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation." Front Immunol **5**: 302.
- Franco, R., H. F. Nascimento, et al. (2009). "The economic impact of severe asthma to low-income families." Allergy **64**(3): 478-483.
- Froidure, A., C. Shen, et al. (2016). "Dendritic cells revisited in human allergic rhinitis and asthma." Allergy **71**(2): 137-148.

- Furuhashi, K., T. Suda, et al. (2012). "Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses." Am J Respir Cell Mol Biol **46**(2): 165-172.
- Gaffney, A. and D. C. Christiani (2015). "Gene-environment interaction from international cohorts: impact on development and evolution of occupational and environmental lung and airway disease." Semin Respir Crit Care Med **36**(3): 347-357.
- Galli, S. J. and M. Tsai (2012). "IgE and mast cells in allergic disease." Nat Med **18**(5): 693-704.
- Garcia-Marcos, L. (2016). "Markers of asthma: The quest of the Holy Grail." Allergol Immunopathol (Madr) **44**(3): 189-190.
- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109** **Suppl**: S81-96.
- Grotenboer, N. S., M. E. Ketelaar, et al. (2013). "Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology." J Allergy Clin Immunol **131**(3): 856-865.
- Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." Nature Genetics **41**(3): 342-347.
- Han, J., A. Dakhama, et al. (2012). "Responsiveness to respiratory syncytial virus in neonates is mediated through thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand." J Allergy Clin Immunol **130**(5): 1175-1186 e1179.
- Hanania, N. A., M. Noonan, et al. (2015). "Lebrikizumab in moderate-to-severe asthma: pooled data from two randomised placebo-controlled studies." Thorax **70**(8): 748-756.
- Haraldsen, G., J. Balogh, et al. (2009). "Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin?" Trends Immunol **30**(5): 227-233.
- Haworth, O., M. Cernadas, et al. (2008). "Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation." Nat Immunol **9**(8): 873-879.
- Hayakawa, H., M. Hayakawa, et al. (2007). "Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation." J Biol Chem **282**(36): 26369-26380.
- He, X., W. Wu, et al. (2014). "Effect of interleukin-33 on Th1/Th2 cytokine ratio in peripheral lymphocytes in asthmatic mice." Chin Med J (Engl) **127**(8): 1517-1522.
- Ho, L. H., T. Ohno, et al. (2007). "IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcepsilonRI signals." J Leukoc Biol **82**(6): 1481-1490.

- Hofmann, A. M. and S. N. Abraham (2009). "New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens." Curr Opin Immunol **21**(6): 679-686.
- Howrylak, J. A., M. Moll, et al. (2016). "Gene expression profiling of asthma phenotypes demonstrates molecular signatures of atopy and asthma control." J Allergy Clin Immunol **137**(5): 1390-1397 e1396.
- Humbert, M., W. Busse, et al. (2014). "Omalizumab in asthma: an update on recent developments." J Allergy Clin Immunol Pract **2**(5): 525-536 e521.
- Ito, T., Y. H. Wang, et al. (2005). "TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand." J Exp Med **202**(9): 1213-1223.
- Kabata, H., K. Moro, et al. (2015). "Group 2 innate lymphoid cells and asthma." Allergol Int **64**(3): 227-234.
- Kakkar, R., H. Hei, et al. (2012). "Interleukin 33 as a Mechanically Responsive Cytokine Secreted by Living Cells." Journal of Biological Chemistry **287**(9): 6941-6948.
- Kita, H. (2015). "ILC2s and fungal allergy." Allergol Int **64**(3): 219-226.
- Koberle, B., B. Koch, et al. (2016). "Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk." Arch Toxicol.
- Komai-Koma, M., D. S. Gilchrist, et al. (2011). "IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity." J Immunol **186**(4): 2584-2591.
- Kondo, Y., T. Yoshimoto, et al. (2008). "Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system." Int Immunol **20**(6): 791-800.
- Koziol-White, C. J. and R. A. Panettieri, Jr. (2011). "Airway smooth muscle and immunomodulation in acute exacerbations of airway disease." Immunol Rev **242**(1): 178-185.
- Krystel-Whittemore, M., K. N. Dileepan, et al. (2015). "Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell." Front Immunol **6**: 620.
- Kumar, R. K., C. Herbert, et al. (2016). "Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma." Respirology **21**(5): 842-849.
- Kurokawa, M., S. Matsukura, et al. (2011). "Expression and effects of IL-33 and ST2 in allergic bronchial asthma: IL-33 induces eotaxin production in lung fibroblasts." Int Arch Allergy Immunol **155 Suppl 1**: 12-20.
- Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, et al. (2009). "IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation." Journal of Immunology **183**(10): 6469-6477.

- Lai, C. K., R. Beasley, et al. (2009). "Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." Thorax **64**(6): 476-483.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2015). "The immunology of asthma." Nat Immunol **16**(1): 45-56.
- Lasso-Pirot, A., S. Delgado-Villalta, et al. (2015). "Early childhood wheezers: identifying asthma in later life." J Asthma Allergy **8**: 63-73.
- Lauzon, A. M. and J. G. Martin (2016). "Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor." F1000Res **5**.
- Li, C. W., H. Q. Li, et al. (2014). "Interleukin-33 Increases Antibacterial Defense by Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin." Plos Pathogens **10**(2).
- Li, M., S. R. Riddle, et al. (2011). "Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension." J Immunol **187**(5): 2711-2722.
- Li, X., G. A. Hawkins, et al. (2013). "Genome-wide association study identifies TH1 pathway genes associated with lung function in asthmatic patients." J Allergy Clin Immunol **132**(2): 313-320 e315.
- Liew, F. Y., N. I. Pitman, et al. (2010). "Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family." Nat Rev Immunol **10**(2): 103-110.
- Lin, J., K. Yin, et al. (2015). "Chinese expert consensus on clinical use of non-invasive airway inflammation assessment in bronchial asthma." Ann Transl Med **3**(20): 302.
- Lin, J. H., J. Fang, et al. (2016). "Chinese expert consensus on the endoscopic management of foreign bodies in the upper gastrointestinal tract (2015, Shanghai, China)." J Dig Dis **17**(2): 65-78.
- Lingel, A., T. M. Weiss, et al. (2009). "Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes." Structure **17**(10): 1398-1410.
- Lipworth, B. J., M. A. Kaliner, et al. (2005). "Effect of ciclesonide and fluticasone on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in adults with mild-to-moderate persistent asthma." Ann Allergy Asthma Immunol **94**(4): 465-472.
- Liu, X., M. Hammel, et al. (2013). "Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(37): 14918-14923.
- Liu, Y. J. (2007). "Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation." J Allergy Clin Immunol **120**(2): 238-244; quiz 245-236.



- Lommatzsch, M. and P. Stoll (2016). "Novel strategies for the treatment of asthma." Allergo J Int **25**: 11-17.
- Lunderius-Andersson, C., M. Enoksson, et al. (2012). "Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33." Frontiers in Immunology **3**.
- Luthi, A. U., S. P. Cullen, et al. (2009). "Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases." Immunity **31**(1): 84-98.
- MacGlashan, D., Jr. (2008). "IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils." Curr Opin Immunol **20**(6): 717-723.
- Marashian, S. M., E. Mortaz, et al. (2015). "Role of Innate Lymphoid Cells in Lung Disease." Iran J Allergy Asthma Immunol **14**(4): 346-360.
- Masoli, M., D. Fabian, et al. (2004). "The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report." Allergy **59**(5): 469-478.
- McIvor, R. A. (2015). "Emerging therapeutic options for the treatment of patients with symptomatic asthma." Ann Allergy Asthma Immunol **115**(4): 265-271 e265.
- Miller, A. M. (2011). "Role of IL-33 in inflammation and disease." J Inflamm (Lond) **8**(1): 22.
- Miller, A. M., D. Xu, et al. (2008). "IL-33 reduces the development of atherosclerosis." J Exp Med **205**(2): 339-346.
- Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma." N Engl J Med **363**(13): 1211-1221.
- Monticelli, L. A., G. F. Sonnenberg, et al. (2011). "Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus." Nat Immunol **12**(11): 1045-1054.
- Moore, W. C., A. T. Hastie, et al. (2014). "Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis." J Allergy Clin Immunol **133**(6): 1557-1563 e1555.
- Moore, W. C., D. A. Meyers, et al. (2010). "Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program." Am J Respir Crit Care Med **181**(4): 315-323.
- Moorman, J. E., L. J. Akinbami, et al. (2012). "National surveillance of asthma: United States, 2001-2010." Vital Health Stat **3**(35): 1-58.
- Moussion, C., N. Ortega, et al. (2008). "The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel 'Alarmin'?" PLoS One **3**(10).
- Muraro, A., R. F. Lemanske, Jr., et al. (2016). "Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis-PRACTALL

- document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology." J Allergy Clin Immunol **137**(5): 1347-1358.
- Murcia, R. Y., A. Vargas, et al. (2016). "The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids." PLoS One **11**(5): e0154755.
- Nabe, T. (2014). "Interleukin (IL)-33: new therapeutic target for atopic diseases." J Pharmacol Sci **126**(2): 85-91.
- Navarro, S., J. Aleu, et al. (2008). "The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane." Cell Mol Life Sci **65**(2): 324-337.
- Norimoto, A., K. Hirose, et al. (2014). "Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **51**(2): 201-209.
- Oboki, K., T. Ohno, et al. (2010). "IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases." Allergol Int **59**(2): 143-160.
- Ordonez, C. L., T. E. Shaughnessy, et al. (2000). "Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance." Am J Respir Crit Care Med **161**(4 Pt 1): 1185-1190.
- Ozyigit, L. P., H. Morita, et al. (2015). "Innate lymphocyte cells in asthma phenotypes." Clin Transl Allergy **5**: 23.
- Pulendran, B. and D. Artis (2012). "New paradigms in type 2 immunity." Science **337**(6093): 431-435.
- Rank, M. A., T. Kobayashi, et al. (2009). "IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 1047-1054.
- Rasmussen, T., J. F. Jensen, et al. (2002). "On the mechanism of the copper-catalyzed cyclopropanation reaction." Chemistry **8**(1): 177-184.
- Reijmerink, N. E., D. S. Postma, et al. (2008). "Association of IL1RL1, IL18R1, and IL18RAP gene cluster polymorphisms with asthma and atopy." J Allergy Clin Immunol **122**(3): 651-654 e658.
- Renkonen, J., S. Joenvaara, et al. (2010). "Network analysis of single nucleotide polymorphisms in asthma." J Asthma Allergy **3**: 177-186.
- Romantowski, J., M. Gawinowska, et al. (2015). "Asthma prevalence and risk factors analysis in Tricity university students' group." Pneumonol Alergol Pol **83**(5): 359-364.
- Rosenwasser, L. J. and J. Meng (2005). "Anti-CD23." Clin Rev Allergy Immunol **29**(1): 61-72.

- Russell, S. E. and P. T. Walsh (2012). "Sterile inflammation - do innate lymphoid cell subsets play a role?" Frontiers in Immunology **3**.
- Sadatsafavi, M., R. Rousseau, et al. (2014). "The preventable burden of productivity loss due to suboptimal asthma control: a population-based study." Chest **145**(4): 787-793.
- Saluja, R., M. E. Ketelaar, et al. (2015). "The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders." Molecular Immunology **63**(1): 80-85.
- Samitas, K., V. Delimpoura, et al. (2015). "Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives." Eur Respir Rev **24**(138): 594-601.
- Samitas, K., J. Lotvall, et al. (2010). "B cells: from early development to regulating allergic diseases." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **58**(3): 209-225.
- Sarnowski, C., P. E. Sugier, et al. (2016). "Identification of a new locus at 16q12 associated with time to asthma onset." J Allergy Clin Immunol.
- Savenije, O. E., J. M. Mahachie John, et al. (2014). "Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood." J Allergy Clin Immunol **134**(1): 170-177.
- Sawada, Y., T. Honda, et al. (2015). "Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses." J Exp Med **212**(11): 1921-1930.
- Schmitz, J., A. Owyang, et al. (2005). "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines." Immunity **23**(5): 479-490.
- Schuliga, M. (2015). "NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease." Biomolecules **5**(3): 1266-1283.
- Serhan, C. N. and J. Savill (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." Nat Immunol **6**(12): 1191-1197.
- Smith, D. E. (2010). "IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma." Clinical and Experimental Allergy **40**(2): 200-208.
- Stanford, R. H., A. W. Gilsenan, et al. (2010). "Predictors of uncontrolled asthma in adult and pediatric patients: analysis of the Asthma Control Characteristics and Prevalence Survey Studies (ACCESS)." J Asthma **47**(3): 257-262.
- Stone, K. D., C. Prussin, et al. (2010). "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S73-80.
- Strauss-Albee, D. M., A. Horowitz, et al. (2014). "Coordinated regulation of NK receptor expression in the maturing human immune system." J Immunol **193**(10): 4871-4879.

- Strina, A., M. L. Barreto, et al. (2014). "Risk factors for non-atopic asthma/wheeze in children and adolescents: a systematic review." Emerg Themes Epidemiol **11**: 5.
- Sullivan, P. W., V. H. Ghushchyan, et al. (2011). "The burden of adult asthma in the United States: evidence from the Medical Expenditure Panel Survey." J Allergy Clin Immunol **127**(2): 363-369 e361-363.
- Suzukawa, M., R. Koketsu, et al. (2008). "Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils." Laboratory Investigation **88**(11): 1245-1253.
- Suzukawa, M., M. Likura, et al. (2008). "An IL-1 Cytokine Member, IL-33, Induces Human Basophil Activation via Its ST2 Receptor." Journal of Immunology **181**(9): 5981-5989.
- Tago, K., T. Noda, et al. (2001). "Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V." Biochemical and Biophysical Research Communications **285**(5): 1377-1383.
- Thomsen, S. F. (2015). "Genetics of asthma: an introduction for the clinician." Eur Clin Respir J **2**.
- To, T., S. Stanojevic, et al. (2012). "Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey." BMC Public Health **12**: 204.
- Torgerson, D. G., E. J. Ampleford, et al. (2011). "Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations." Nature Genetics **43**(9): 887-892.
- Traenckner, E. B., S. Wilk, et al. (1994). "A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B." EMBO J **13**(22): 5433-5441.
- Trajkovic, V., M. J. Sweet, et al. (2004). "T1/ST2 - an IL-1 receptor-like modulator of immune responses." Cytokine & Growth Factor Reviews **15**(2-3): 87-95.
- Unkel, B., K. Hoegner, et al. (2012). "Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia." J Clin Invest **122**(10): 3652-3664.
- Valet, R. S., T. Gebretsadik, et al. (2011). "High asthma prevalence and increased morbidity among rural children in a Medicaid cohort." Ann Allergy Asthma Immunol **106**(6): 467-473.
- van Rijt, L. S., N. Vos, et al. (2011). "Persistent activation of dendritic cells after resolution of allergic airway inflammation breaks tolerance to inhaled allergens in mice." Am J Respir Crit Care Med **184**(3): 303-311.
- Wang, C. H., B. J. Liu, et al. (2012). "The Association Forecasting of 13 Variants Within Seven Asthma Susceptibility Genes on 3 Serum IgE Groups in Taiwanese Population by Integrating of Adaptive Neuro-fuzzy Inference

System (ANFIS) and Classification Analysis Methods." Journal of Medical Systems **36**(1): 175-185.

Wang, W. (2016). "Progress in the impact of polluted meteorological conditions on the incidence of asthma." J Thorac Dis **8**(1): E57-61.

Wang, Y., H. Hu, et al. (2016). "The IL6R gene polymorphisms are associated with sIL-6R, IgE and lung function in Chinese patients with asthma." Gene **585**(1): 51-57.

Wang, Y. H. and Y. J. Liu (2009). "Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses." Clin Exp Allergy **39**(6): 798-806.

Wenzel, S. (2005). "Severe asthma in adults." Am J Respir Crit Care Med **172**(2): 149-160.

Wenzel, S., L. Ford, et al. (2013). "Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels." N Engl J Med **368**(26): 2455-2466.

Wesolowska-Andersen, A. and M. A. Seibold (2015). "Airway molecular endotypes of asthma: dissecting the heterogeneity." Curr Opin Allergy Clin Immunol **15**(2): 163-168.

Yang, X., Y. Jiang, et al. (2016). "Does IL-17 Respond to the Disordered Lung Microbiome and Contribute to the Neutrophilic Phenotype in Asthma?" Mediators Inflamm **2016**: 6470364.

Yao, X., Y. Sun, et al. (2016). "Interleukin (IL)-25: Pleiotropic roles in asthma." Respirology **21**(4): 638-647.

Zhou, Q., A. W. Ho, et al. (2014). "GM-CSF-licensed CD11b+ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*." J Immunol **193**(2): 496-509.

Ziegler, K. M., H. A. Pitt, et al. (2010). "Choledochoceles: are they choledochal cysts?" Ann Surg **252**(4): 683-690.

Ziegler, S. F. and D. Artis (2010). "Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity." Nat Immunol **11**(4): 289-293.