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

ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *DAD1* E *OXA1L* COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO ADULTA

Salvador, BA
2023

ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *DAD1* E *OXA1L* COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO ADULTA

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

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alexandrina Figueiredo
Co-Orientador: Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa

Salvador, BA
2023

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

P667 Pires, Anaque de Oliveira
Associação de variantes genéticas nos genes DAD1 e OXA1L com asma e atopia em uma população adulta/Anaque de Oliveira Pires. – Salvador, 2023.
80 f.: il.

Orientadora: Profª. Drª. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo;
Coorientador: Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.
Inclui referências.

1. Asma. 2. Atopia. 3. Polimorfismos. 4. DAD1. 5. OXA1L. I. Figueiredo, Camila Alexandrina Viana de. II. Costa, Ryan dos Santos. III. Universidade
. Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.248:575

Ao amor da minha vida. Minha filha Laura que mesmo ainda tão pequena e sem entender nada sobre isso, se tornou um dos principais motivos e incentivos para a conclusão deste importante projeto.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, meu alicerce, meu criador e mantenedor. O doador da vida e graça ilimitada. Aquele que me persegue com sua bondade todos os dias da minha vida (Salmos 23:6). Obrigado Senhor por tua condução. Pela força concedida nos momentos mais necessários. Por te conhecer de maneira singular e ter a certeza ABSOLUTA, de forma tão RACIONAL, que és o criador de tudo. Um Deus que se revela a aqueles que se permitem buscá-lo através da natureza, da ciência e de sua palavra escrita, a Bíblia Sagrada. Um Deus que breve irá voltar com toda honra poder e glória nas nuvens do céu, para buscar a todos os que desejam morar com Ele no lugar que têm preparado para seus filhos. Obrigado!

A toda minha família, minha mãe Adaildes, meu pai Everaldo e minha irmã Etiene, por tudo que fizeram e fazem por mim. Por terem deixado de viver em muitos momentos seus próprios sonhos para viver e apoiar-me nos meus. Por terem me educado com base em princípios que norteiam minha vida e se fazem essenciais para mim. Obrigado por cada momento de compreensão, de apoio, de motivação que vocês me proporcionaram durante toda a minha vida. Obrigado por sempre orarem por mim. Obrigado por serem abertos a ouvir e aconselhar. Gratidão!

A minha esposa linda Maiza! Obrigado meu bem por estar presente em todo esse percurso. Por ter me presenteado com a coisa mais significativa das nossas vidas que é nossa filhinha. Por suportar todo o peso, por termos superado tantos desafios que se impunham e nos faziam pensar em desistir. O seu cuidado, amor e incentivo foram essenciais para chegar até aqui! Admiro a mulher incrível que você é, e sou feliz e realizado ao seu lado!

Ao meu pinguinho de gente, a dona do sorriso banguelo mais lindo do mundo, aquela que me faz deixar de sentir todo o cansaço e só sentir gratidão ao chegar em casa e ouvir sua voz e ver sua expressão de amor. Obrigado filha. É imensurável o que sinto por você. Concluir este ciclo também é por você!

A minha querida amiga e terapeuta Caroline Lemos, por tantas conversas, conselhos e condução emocional neste processo tão desafiador, Obrigado Carol Você foi um instrumento de Deus em minha vida.

A minha orientadora, Profª Drª. Camila Figueiredo, por ser esse ser humano incrível e singular. Por ser alguém tão competente e admirável. Sensata e ao mesmo tempo tão compreensiva e sensível. És uma mulher, líder, pesquisadora e docente inspiradora. Ter sido seu orientando foi uma das mais belas e proveitosas experiências que a vida me proporcionou. Contigo aprendi muitos valores que levarei pro resto da minha vida!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ryan Costa, por tantas lições aprendidas. Por ter a alma de um pesquisador. Por ser extremamente capaz! Conhecer e conviver com você acrescentou muito a minha vida pessoal, acadêmica e profissional. Obrigado pela sua vasta paciência e compreensão em tantos momentos. Você para mim é um exemplo.

A todos os meus queridos amigos do IMUNOBIO pelo carinho, pelo companheirismo e pela convivência tão agradável que tivemos ao longo desses anos. A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho. Héllen, Norma, Tamires, Cintia, Jéssica. Todas vocês hoje são doutoras, e muito me orgulham e inspiram. Obrigado pelos momentos de parceria e tantos risos.

Minha gratidão a Maria, Milca, Hátila, Nani e Raisa por terem me auxiliado em tantos momentos desde o mestrado até os dias de hoje tempo para me auxiliar em tantas coisas. Mas em especial preciso agradecer a Louise. Amiga, você foi tão importante e necessária. Sem todo o seu apoio não conseguiria concluir este trabalho. Que papai do céu esteja sempre ao seu lado. Continue sendo essa pessoa maravilhosa.

Raimon, Hugo e Gerson, o que falar de vocês? Vocês são mais que amigos para mim, são como irmãos. Compartilhamos dos mesmos princípios e sempre fomos muito unidos em tudo que fizemos. Tantos anos se passaram, vocês também já são doutores e hoje fico feliz em também concluir este ciclo, mas estando muito ciente de todo apoio e incentivo dado por vocês. Obrigado pela amizade e força. Sou um grande admirador da capacidade, dedicação e sabedoria que vocês possuem.

Às professoras Dra. Valdirene Leão e Dra. Neuza Alcântara, pelas oportunidades, aprendizado e apoio técnico para realização deste trabalho. Admiro muito vocês.

Aos meus colegas do LAA pela amizade, acolhimento e por tantas vezes serem úteis e dispostos a ajudar de muitas formas, em especial, Marcinha, Fabian, Leonardo, Samara, Emilia, Alana, Flávia e outros.

À Drª. Marta Machado, pelo carinho, incentivo, confiança e amizade. Você me proporcionou uma porta para relevantes conquistas através da monitoria ainda na graduação, seguida pela iniciação cientifica. Desejo que saiba que você foi e é uma grande inspiração para mim. Fui seu imitador e expresso aqui minha imensa gratidão e carinho por você.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, em especial aos professores tão queridos, Albert, Soraya, Maria de Fátima. As minhas tão queridas amigas Dilcéia, Jucy e Aline, vocês são excelentes em tudo que fazem e vou levar comigo sempre cada sorriso e cada abraço de cada uma de vocês durantes esses anos. Obrigado por tanta disposição e paciência em ajudar.

Ao ProAr, representado pelo Dr. Álvaro Cruz a quem muito estimo. E em especial aos incríveis profissionais e amigos queridos deste lugar que tornam tudo mais leve. Obrigado Gabriela, Cinthia, Jamille e demais que muito me ensinaram.

Obrigado aos indivíduos participantes deste estudo que confiaram e permitiram o uso de seus dados para a realização deste trabalho e contribuíram no avanço da ciência.

À FAPESB, CAPES e CNPq, que foram as agências de fomento que viabilizaram a realização deste projeto e pelas bolsas de estudo concedidas ao longo do mestrado e doutorado.

A todos os meus colegas de trabalho nas instituições por onde já passei por todo o incentivo e apoio. Em especial aos amigos da Faculdade Adventista da Amazônia onde hoje estou. Vocês são mais que especiais.

A todos vocês, sou imensamente grato e compartilho a felicidade de concluir essa importante etapa.

Muito obrigado!

Viver é como andar de bicicleta. Para manter o equilíbrio é preciso se manter em movimento.

Albert Einstein

RESUMO

A asma é uma doença imunomediada altamente complexa, caracterizada por uma obstrução reversível e intermitente das vias aéreas que apesar de ter uma prevalência maior na infância, tem apresentado uma alta incidência e mortalidade em adultos. Nos últimos anos, diversos estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificaram um número expressivo de variantes genéticas responsáveis pela suscetibilidade à asma. Essas variantes têm demonstrado desempenhar um papel importante na regulação da expressão gênica e na hereditariedade da asma, dentre as quais se destacam variantes nos genes *DAD1* e *OXA1L*. O gene *DAD1* é conhecido pelo seu papel na regulação da morte celular programada, e *OXA1L* é descrito pelo envolvimento na biogênese e fosforilação oxidativa mitocondrial. O presente estudo objetivou a identificação de novas variantes nos genes *DAD1* e *OXA1L* e a avaliação da associação com asma e marcadores de atopia em indivíduos adultos. O estudo contou com a participação de 1.084 indivíduos adultos divididos em asma leve a moderada, asma grave e controles saudáveis pertencentes a uma coorte de estudo caso-controle do Programa para Controle da Asma na Bahia-ProAR. Análises de associações entre variantes nos genes estudados e variáveis de asma ou atopia foram realizadas usando um modelo de regressão logística multivariada ajustado para sexo, idade, índice de massa corporal (IMC), tabagismo, volume expiratório forçado em 1 segundo (VEF1) e componente principal de ancestralidade (PC1) usando o software PLINK 1.9. Modelos genéticos aditivos, dominantes e recessivos foram utilizados para todas as variáveis analisadas. Neste estudo, foram identificadas novas variantes nos genes *DAD1* e *OXA1L* nunca antes descritas. O alelo C do rs200470407 em *OXA1L* foi negativamente associado com falta de controle para asma e aumento de IL-13. O alelo A do rs61972400 e o alelo C do rs76050305 em *DAD1* foram positivamente associados com obstrução das vias aéreas*,* além de estarem em total desequilíbrio de ligação. Análises de expressão gênica *in silico*, demonstraram que alguns dos polimorfismos em ambos os genes são capazes de afetar seus respectivos níveis de expressão gênica. Desta forma, nossos achados demonstram que variantes nos genes *DAD1* e *OXA1L* podem ter influência na asma e atopia em indivíduos adultos brasileiros.

Palavras-chave: Asma. Atopia. Polimorfismos. *DAD1* e *OXA1L*.

ABSTRACT

Asthma is a highly complex immune-mediated disease, characterized by a reversible and intermittent obstruction of the airways that, despite having a higher prevalence in childhood, has shown a high incidence and mortality in adults. In recent years, several genomic wide association studies (GWAS) have identified a significant number of genetic variants responsible for asthma susceptibility. These variants have been shown to play an important role in the regulation of gene expression and in the heritability of asthma, including variants in *DAD1* e *OXA1L* genes. The *DAD1* gene is known for its role in the regulation of programmed cell death, and *OXA1L* is described for its involvement in mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation. The present study aimed to identify new variants in the *DAD1* and *OXA1L* genes and to evaluate the association with asthma and atopy markers in adults. The study involved the participation of 1,084 adult individuals divided into mild to moderate asthma, severe asthma and healthy controls belonging to a case-control study cohort of the Programa para Controle da Asma na Bahia-ProAR. Analyzes of associations between variants in the studied genes and asthma or atopy were performed using a multivariate logistic regression model adjusted for sex, age, body mass index (BMI), smoking, forced expiratory volume in 1 second (FEV1) and ancestry (PC1) using PLINK 1.9 software. Additive, dominant and recessive genetic models were used for all analyzed variables. In this study, new variants in the *DAD1* and *OXA1L* genes that had never been described before were identified. The C allele of rs200470407 in *OXA1L* was negatively associated with lack of asthma control and increased IL-13. The A allele of rs61972400 and the C allele of rs76050305 in *DAD1* were positively associated with airway obstruction, in addition to being in total linkage disequilibrium. *In silico* gene expression analyzes demonstrated that some of the polymorphisms in both genes are able to affect their respective levels of gene expression. Thus, our findings demonstrate that variants in the *DAD1* and *OXA1L* genes may influence asthma and atopy in Brazilian adults.

Keywords: Asthma. Atopy. Polymorphisms. *DAD1* and *OXA1L*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfis e vias celulares que participam dos mecanismos imunológicos da asma alérgica e não alérgica..... 20

Figura 2: Semelhanças e diferenças na asma Th2 e não-Th2..... 22

Figura 3: Perfis da super ou baixa expressão de *DAD1* e influencia na a asma..... 27

Figura 4: Interação viável entre BAD e *DAD1* com a apoptose..... 30

Figura 5: Modelo de síntese de proteínas mitocondriais na membrana interna..... 33

Figura 6: Esquema do controle de qualidade mitocondrial em células epiteliais alveolares (AECs) fibróticas tipo II..... 35

Figura 7: Mitocôndrias e asma..... 36

MANUSCRITO

Figure 1: R^2 significance analysis of the LD plot performed with Haploview software of four SNPs in *OXA1L*..... 50

Figure 2: Number of eosinophils per mm^3 in the blood and dosage of IL-13 in the plasma of asthmatic individuals according to genotypes of SNPs in *OXA1L* and *DAD1*..... 53

Figure 3: Total IgE dosage in the serum of asthmatic individuals according to SNPs genotypes in *OXA1L* and *DAD1*..... 54

Figure 4: Multi-tissue eQTL comparison heatmap..... 55

Figure 5: *DAD1* and *OXA1L* expression profile in lung tissues..... 56

Figure 6: Human tissue expression *in silico* by genotypes of rs5742761 in the *DAD1* gene..... 56

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1: Clinical characteristics and markers of atopy in the studied population separated by asthmatics or non-asthmatics and by mild or severe asthma……... 48

Table 2: Characterization of the significant SNPs associated with asthma and atopy in the *DAD1* and *OXA1L* genes……. 49

Table 3: Significant associations between *OXA1L* SNPs, asthma, and atopy markers using logistic regression adjusted for ancestry markers and other covariates……. 51

Table 4: Significant associations between *DAD1* SNPs, asthma, and atopy markers using logistic regression adjusted for ancestry markers and other covariates……. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AECs: Células Epiteliais Alveolares
ALFA: Agregador de frequência alélica
ATP: Adenosina Tri Fosfato
BSMCs: Células do Músculo Liso Brônquico
CI%: Intervalo de Confiança
CI: Corticosteroide inalatório
CL: Cardiolipina
CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA: Ácido Desoxiribonucleico
ER: Retículo Endoplasmático
GBD: Estudo Carga Global de Doenças
GEO: Omnibus de Expressão Gênica
GTEx: Expressão Genótipo-Tecido
GWAS: Estudos de Associação Genômica Ampla
IgE: Immunoglobulina E
IL: Interleucina
ILC: Células Linfóides Inatas
IMC: Índice de Massa Corporal
LD: Desequilíbrio de Ligação
LTB4: Receptor de Leucotrieno Beta 4
MCO: Maternidade Climério de Oliveira
MLVA: Músculo Liso das Vias Aéreas
OMS: Organização Mundial da Saúde
OR: Razão de Chance
OST: Oligossacariltransferase
PC1: Componente Principal de Ancestralidade
PolyPhen-2: Fenotipagem de Polimorfismo v2
ProAR: Programa para Controle da Asma na Bahia
SBPT: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SIFT: Classificando Intolerantes de Tolerantes
SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SPT: Teste cutâneo
SUS: Sistema Único de Saúde
Th: Células T Helper
TRA: Receptor Alfa de Célula T
TSLP: Linfopoietina Estromal Tímica
UTR: Região não Traduzida
VEF1: Volume Expiratório Forçado em 1 Segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 15

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 17
2.1 Epidemiologia da asma..... 17
2.2 Imunopatologia e fenótipos de asma..... 18
2.3 Influência dos fatores genéticos na asma..... 23

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS..... 39
3.1 Hipótese..... 39
3.2 Objetivo geral..... 39
3.3 Objetivos específicos..... 39

4. Manuscrito: *DAD1* and *OXA1L* variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population..... 40
4.1 Introdução..... 42
4.2 Materiais e métodos..... 43
4.3 Resultados..... 47
4.4 Discussão..... 57
4.5 Referencias..... 63

5. CONCLUSÃO GERAL..... 67

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

1 INTRODUÇÃO GERAL

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas mais comum da atualidade, acometendo crianças e adultos em todo o mundo, com diversos fenótipos e mecanismos patogenéticos distintos ainda pouco compreendidos.

Um de seus fenótipos mais frequentes incluem a presença de atopia, que é definida como a tendência de desenvolver uma resposta imune aumentada a alérgenos via produção de IgE e encontrada em alta prevalência em crianças e adultos acometidos por asma em todo o mundo (Di Cicco et al., 2020).

A asma é um dos problemas de saúde respiratória mais recorrentes no Brasil. Estima-se que 23,2% da população seja acometida pela doença, e a incidência varia de 19,8% a 24,9% entre as regiões do país. Em 2021, foram realizados 1,3 milhões de atendimentos, o que corresponde a, aproximadamente, 231 mil consultas, 18% a mais em relação aos atendimentos do ano anterior (Marques et al., 2022).

Por muitos anos, o debate acerca da asma voltava-se principalmente para a influência ambiental no seu desenvolvimento. Entretanto, atualmente sabe-se que a asma é provocada por uma combinação complexa de fatores ambientais e genéticos.

À medida que a tecnologia no sequenciamento do genoma progrediu, esforços científicos têm sido feitos para explicar e prever a complexidade e a heterogeneidade da asma. Assim, os estudos amplos de associação genômica (GWAS) rapidamente se tornaram um método de estudo muito explorado. Vários marcadores genéticos e *loci* associados à suscetibilidade à asma e atopia foram identificados durante as últimas décadas (Alizadeh et al., 2017).

Contudo, nenhum estudo ainda havia sido realizado com populações Latino-Americanas com alto grau de miscigenação, como é visto na população brasileira. Assim, apenas no ano de 2015, foi publicado um trabalho do tipo GWAS que associou variantes genéticas com sintomas de asma na infância em uma população brasileira (Costa et al., 2015). Dentre os polimorfismos identificados, o rs1999071, localizado na região intergênica entre os genes *DAD1* e *OXA1L*, ambos na região 14q11 do cromossomo 14, foi o que apresentou uma associação mais significante.

O gene *DAD1* é conhecido por sua influência na atividade antiapoptótica e se mostra muito relevante para a regulação da homeostase e proliferação celular de diversos tecidos (Nakashima et al., 1993). Dentre os múltiplos mecanismos de controle da reposta inflamatória, a apoptose é um dos meios de grande importância

na promoção da homeostasia do sistema imunológico, além de estar envolvida no desenvolvimento normal de organismos multicelulares (Riera Romo, 2021). Estudos prévios já evidenciaram que o aumento da expressão do gene *DAD1* no timo e no sistema imune periférico, acarreta uma maior proliferação dos linfócitos T periféricos em modelo murino (N. A. Hong et al., 1999).

O gene *OXA1L* por sua vez, codifica uma proteína chamada Oxa1, que se mostra essencial na biogênese e no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial (Herrmann & Neupert, 2003; Hildenbeutel et al., 2008). Dada a relevância da mitocôndria em vários processos celulares, disfunções mitocondriais podem estar envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças e essas disfunções podem ser causadas por polimorfismos do genoma mitocondrial e mecanismos de reparo inadequados (Dankowski et al., 2016; Wallace & Chalkia, 2013).

Do mesmo modo, essas organelas se mostram relevantes para a remodelação brônquica na asma, e mitocôndrias disfuncionais são evidentes nas células do músculo liso das vias respiratórias e no epitélio dos pulmões de pacientes asmáticos (Jaffer et al., 2015; Leishangthem et al., 2013; Li & Shang, 2014).

Os genes *DAD1* e *OXA1L* nunca foram associados com asma e atopia anteriormente. A partir dos resultados de (Costa et al., 2015), nosso grupo de estudo foi o pioneiro na investigação da associação de variantes genéticas nos genes *DAD1* e *OXA1L* com asma e atopia em uma população brasileira de crianças asmáticas. Os resultados apontaram polimorfismos em ambos os genes envolvidos como fatores de risco e proteção para a asma e atopia, além de evidenciar o aumento da expressão destes genes em pacientes asmáticos (Pires et al., 2018).

Uma vez que a asma e atopia podem ser prevalentes em adultos, além do importante papel que os genes *DAD1* e *OXA1L* representam, a ausência de trabalhos que associem polimorfismos em *DAD1* e *OXA1L* com asma e atopia, reforçam a necessidade de novas investigações acerca do envolvimento destes nessa doença, bem como, a melhor compreensão da asma em adultos.

Assim, o presente estudo objetiva a identificação de novos polimorfismos em *DAD1* e *OXA1L* e a avaliação da associação com asma, marcadores de função pulmonar e marcadores de atopia em indivíduos adultos. Uma vez que a asma é uma doença multifatorial, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos em asma e atopia, se mostram como de alta prioridade, fomentando dados para um melhor manejo futuro dessas condições.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA

A asma é uma doença já conhecida, mas que tem se tornado um grave problema de saúde global que afeta crianças e adultos. Trata-se de uma doença inflamatória crônica multifatorial e comum das vias aéreas que tem impacto direto na saúde e qualidade de vida de milhões de indivíduos em todo o mundo, podendo até levar a morte (Boulet et al., 2019).

O estudo Carga Global de Doenças (GBD) estima que aproximadamente 339 milhões de pessoas no mundo tenham asma e que os prejuízos causados pela doença sejam altos devido aos efeitos físicos, psicológicos e sociais. Além disso, a projeção é de que esse número aumentaria para 400 milhões até 2025, à medida que os países se tornassem mais urbanizados (GBD, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a asma afeta em média 7% da população mundial, e estima-se que a taxa de mortes por asma até o ano de 2030 aumentará (OMS, 2023)

Os dados dos sistemas de vigilância nacional e estadual dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (EUA), mostram que a prevalência nos EUA de asma é de cerca de 7,7% na população geral, com estimativas mais altas para adultos do sexo feminino (9,1%) do que para adultos do sexo masculino (6,2%) (CDCP EUA, 2021). No ano de 2015 nos EUA, o custo total da doença, tanto em custos diretos de despesas médicas e custos indiretos causados por perda de produtividade, é estimado em ultrapassar 18 bilhões USD por ano (Lambrecht et al., 2019)**.**

Indivíduos que vivem abaixo da linha da pobreza tem uma prevalência de cerca de (11,8%) e aqueles que relatam ser uma minoria étnica ou racial, especialmente raça negra (10,2%). Apesar de uma ampla gama de opções de tratamento, quase metade dos adultos com asma relatam ter tido um ou mais ataques, comparado com anos anteriores, destacando a importância do manejo dos sintomas e do controle da doença (Mazurek & Syamlal, 2018).

No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT), a asma está presente em torno de 20 milhões de brasileiros, é responsável

por aproximadamente 350.000 internações anualmente e é a terceira causa de hospitalização no Sistema Único de Saúde (SUS) (Boulet et al., 2019).

As crises e exarcebações dos sintomas da asma são principais pontos de atuação dos profissionais da saúde para manter os pacientes estáveis e evitar a alta mortalidade pela doença (Marques et al., 2022). Ainda assim, essas crises acabam ocasionando um alto índice de abstenção no trabalho e escola, afetando também a economia como um todo. Aproximadamente 250.000 pessoas morrem por ano no mundo decorrente da asma (Pitchon et al., 2020).

Nos países em que a prevalência da asma está aumentando, pode haver um atraso no seu reconhecimento, como ocorreu no Reino Unido na década de 1970, quando houve uma preocupação crescente com subdiagnóstico de asma em crianças mais velhas. E, é possível que o mesmo fenômeno ocorra em outras partes do mundo onde a prevalência anteriormente era baixa e atualmente tem aumentado gradativamente. Esses fatores sugerem que as estimativas globais atuais de asma podem ser subestimadas (Asher & Pearce, 2014).

Apesar do aumento da prevalência, essa doença ainda é subdiagnosticada e subtratada e, representa um fardo substancial não apenas para os pacientes, mas também para seus familiares (OMS, 2020).

Sendo assim, é necessário que ocorram mais iniciativas no manejo de casos de asma, visando reduzir internações e principalmente os óbitos decorrentes desta. É fundamental a atenção e gestão de estudos para subsidiar pesquisas e amparar procedimentos que permitam melhorar a capacitação e o direcionamento de medidas preventivas, diagnósticas e terapêuticas (Marques et al., 2022).

Desta forma, é notável a complexidade e relevância que estão associadas à asma através de sua alta incidência e prevalência no Brasil e no mundo, tornando-a uma doença que ainda carece de atenção devida e controle para amenizar o impacto na vida de milhões de indivíduos que são acometidos.

2.2 IMUNOPATOLOGIA E FENÓTIPOS DE ASMA

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores que possui mecanismos imunopatológicos envolvendo distintos perfis celulares das respostas imunes inata e adaptativa, agindo em sinergia com as células epiteliais, causando hiperreatividade brônquica, produção exacerbada de muco, remodelamento

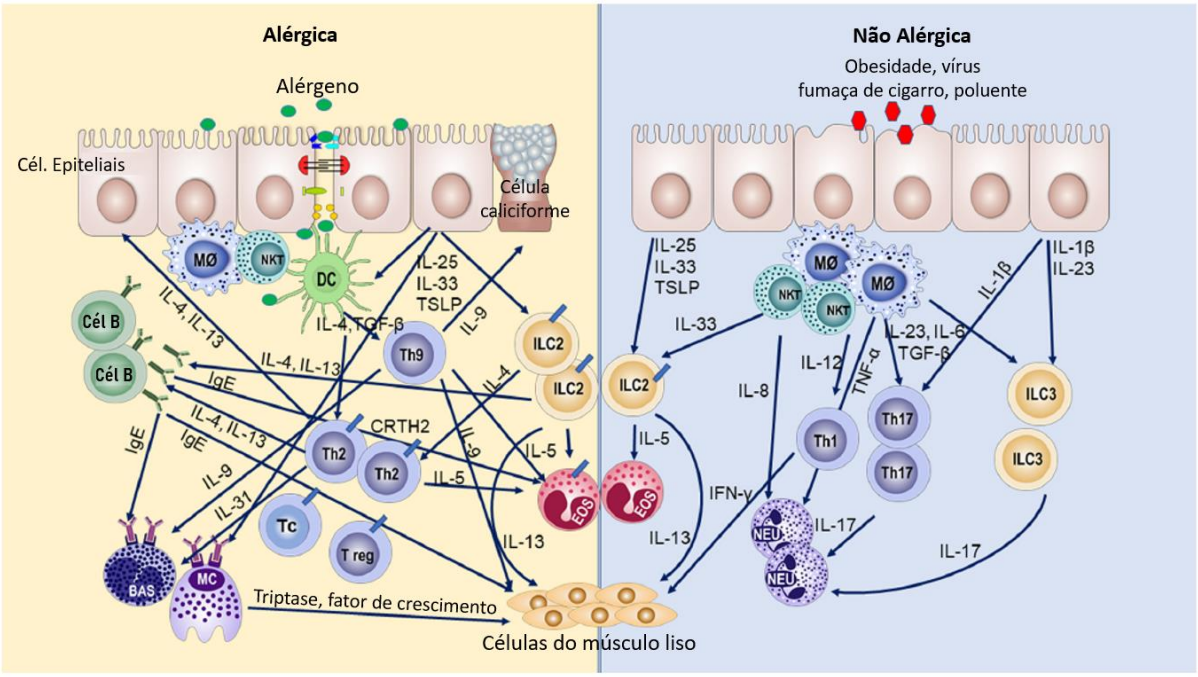
brônquico e estreitamento das vias aéreas. Essa resposta é responsável pelo surgimento de sinais e sintomas como períodos repetidos de falta de ar, sibilos, tosse e aperto no peito (Agache et al., 2021).

O estreitamento das vias aéreas resulta da resposta inflamatória nas vias aéreas secundária ao extravasamento de plasma e influxo de células inflamatórias, como eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e mastócitos. A hiperresponsividade das vias aéreas é uma resposta exagerada das vias aéreas a um estímulo inespecífico, que produziria pouco ou nenhum efeito em indivíduos saudáveis. Embora a asma seja frequentemente definida como uma obstrução reversível das vias aéreas, ela pode evoluir para comprometimento irreversível da função pulmonar (Dunn et al., 2018).

Devido à complexidade desta doença, muitos estudos têm sido realizados a fim de elucidar e esclarecer os mecanismos imunológicos envolvidos. Por muito tempo, pensava-se que a asma era unicamente mediada por um perfil de resposta imunológica voltado a atopia (Pearce et al., 1999). Isso devido ao envolvimento de células e mediadores imunológicos deste perfil. Porém, com o avanço nas investigações, cada vez mais tem-se descoberto que a asma é uma doença de perfil heterogêneo.

A figura 1 apresenta algumas formas que a asma pode ser desencadeada a partir da exposição a agentes ambientais, tais como aeroalérgenos, vírus, poluentes, além de condições patológicas, tais como a obesidade, dentre outros. A depender da natureza da exposição será desencadeado um perfil de resposta imune específico e distinto do que se pensava antes ser apenas alérgico. Apesar da heterogeneidade da doença, a asma é classificada essencialmente em dois fenótipos, com base em seu perfil inflamatório. Sendo estes, a asma atópica, também citada como tipo 2, onde o perfil de resposta é mediado por linfócitos T-help tipo 2 (Th2). O outro fenótipo é a asma não atópica, caracterizada como não-T2. Um perfil de respostas que envolvem outros linfócitos distintos do Th2 (Chen et al., 2021).

Figura 1. Perfis e vias celulares que participam dos mecanismos imunológicos da asma alérgica e não alérgica.



Fonte: adaptado de (Boonpiyathad et al., 2019).

As células epiteliais das vias aéreas contribuem para a inflamação tipo 2 e não tipo 2, devido à exposição alérgica ou não alérgica (por exemplo, tabagismo e poluição). As células epiteliais secretam IL-25, IL-33 e linfopoietina estromal tímica (TSLP) juntamente com células dendríticas, macrófagos e células NKT. Essas citocinas estimulam a resposta imune tipo 2 via células Th2 ativadas e ILC2. A IgE está envolvida no processo inflamatório precoce como causa da asma alérgica. Células Th2 e ILC2 secretoras de IL-5 estimulam a inflamação mediada por eosinófilos. Linfócitos Th9 produz IL-9 que induz inflamação eosinofílica e alérgica das vias aéreas. A expressão de CRTH2 em células Th, Tc e Treg são encontrados na imunopatologia da asma alérgica. A secreção de IL-1β e IL-23 por células epiteliais induzem inflamação neutrofílica estimulada por Th17 e ILC3 (Boonpiyathad et al., 2019).

Normalmente, o avanço ou gravidade da doença é marcada pela perda progressiva da função pulmonar ao longo do tempo (Menzies-Gow et al., 2021) e é parcialmente impulsionada por exacerbações (O'Byrne et al., 2019).

A asma atópica é mediada pela inflamação Th2, caracterizada por altos níveis de eosinófilos, fração de óxido nítrico, IgE sérica total e citocinas inflamatórias Th2,

como interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13. Recentemente, o papel do sistema imune inato na asma via células linfóides inatas tipo 2 (ILC2) foi também reconhecido como parte deste perfil. Na ausência de alergia mediada pela resposta Th2, acredita-se que a inflamação eosinofílica seja o resultado do aumento de ILC2, que produz citocinas associadas a Th2 após estimulação com citocinas derivadas do epitélio (incluindo altas quantidades de IL-5, que é importante para a maturação dos eosinófilos e migração) (Brusselle & Bracke, 2014; Kalinauskaite-Zukauske et al., 2019).

O aumento do número de eosinófilos está associado a uma maior gravidade da asma, incluindo aumento das taxas de exacerbação, hiperresponsividade e obstrução das vias aéreas. Jackson et al., (2020) afirma que a contagem de eosinófilos também pode ser um preditor geral de exacerbações graves (Jackson et al., 2020).

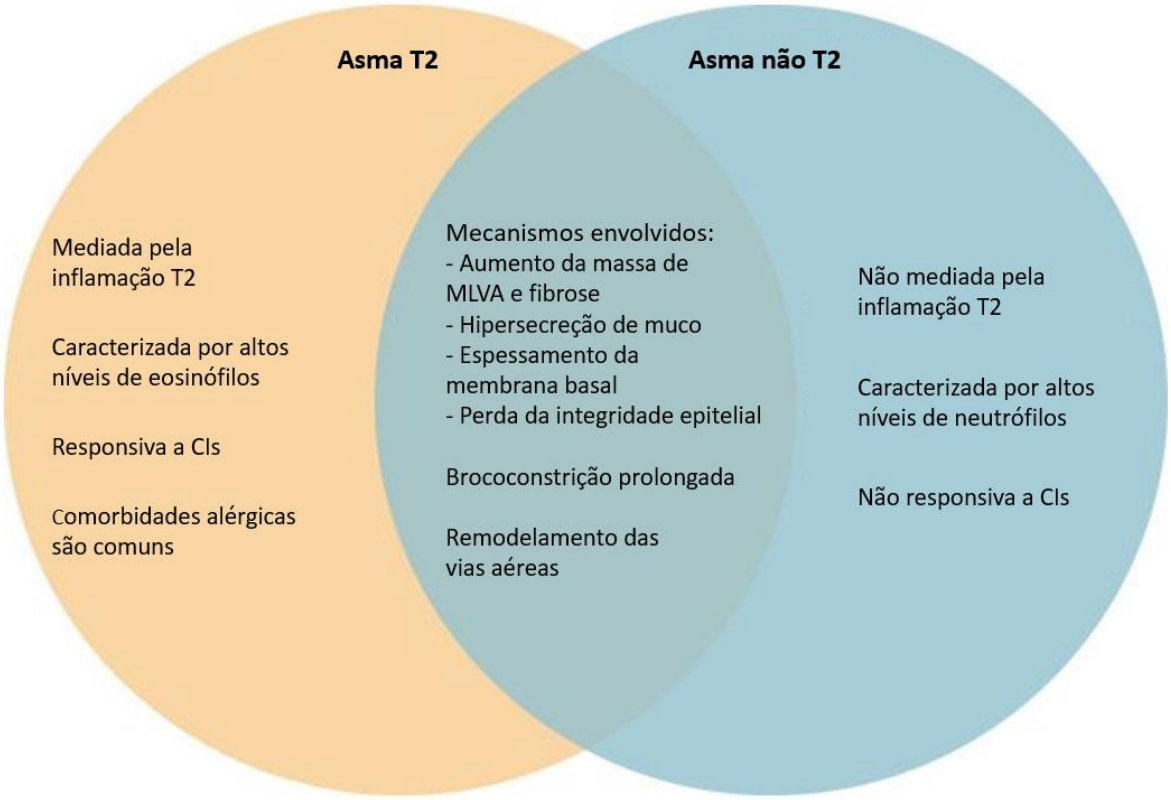
Comparando os dois fenótipos, a fisiopatologia da asma não Th2 ou não atópica é menos bem compreendida. No entanto, tem sido associada à ativação de células T-helper (Th)1 e/ou Th17 e um desequilíbrio de células reguladoras Th17 desencadeadas por infecções e/ou poluentes inalados (Licari et al., 2019). Estima-se que cerca de 50% dos adultos asmáticos podem apresentar o fenótipo da asma não-T2 (Woodruff et al., 2009). Porém, há evidências de que altas doses de corticosteroides inalatórios e orais podem diminuir os biomarcadores Th2, dificultando assim, a determinação da verdadeira prevalência do fenótipo não-Th2 (Busby et al., 2019; Heaney et al., 2021).

Foi realizado uma investigação envolvendo duas coortes com pacientes adultos portadores de asma grave, uma brasileira (ProAR) e outra europeia (UBIOPRED). Neste estudo, foi utilizada a mesma metodologia para avaliar e acompanhar os pacientes participantes. Os resultados mostraram que apesar das diferenças étnicas, ambientais e na gravidade, existem semelhanças entre os fenótipos da asma (Cruz et al., 2020).

A figura 2 expõe as semelhanças e diferenças na asma T2 e não-T2. Ambos os fenótipos podem resultar em remodelação brônquica e, o perfil dessa remodelação normalmente aumenta com o tempo e com a gravidade da doença. A eosinofilia também contribui muito para a remodelação das vias aéreas e hiperresponsividade brônquica, causando inflamação persistente e danos às vias aéreas (Fehrenbach et al., 2017). As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, produzidas por células Th2 e ILC2 ativadas, contribuem promovendo o recrutamento de eosinófilos, levando à hiperresponsividade e remodelamento das vias aéreas (Lemanske et al., 2010). A IgE também está

envolvida na patogênese da remodelação das vias aéreas e desempenha um papel central na manifestação dos sintomas relacionados à asma (Rabe et al., 2011). A asma alérgica frequentemente apresenta um início precoce dos sintomas (Tan et al., 2016), e mais de 50% das crianças e adolescentes com asma são sensibilizados a alérgenos comuns (Al-Zayadneh et al., 2019).

Figura 2. Semelhanças e diferenças na asma Th2 e não-Th2. MLVA: músculo liso das vias aéreas; CI: corticosteroide inalatório; Th2: linfócitos T help 2.



Fonte: Adaptado de (Busse et al., 2022)

É evidente que apesar das semelhanças, a diferença entre esses fenótipos e os perfis da resposta imunológica têm demonstrado serem relevantes para a asma, incluindo a expressão de genes candidatos, interações gene-ambiente e modificação genética e epigenética (Vercelli, 2008). Contudo, a diferenciação imunológica dos fenótipos da asma se mostra muito necessária. Identificar o fenótipo de asma de um paciente pode ajudar, na compreensão da fisiopatologia do fenótipo específico, na previsão do progresso da doença, na resposta ao tratamento bem como as terapias biológicas a serem consideradas.

2.3 INFLUÊNCIA DOS FATORES GENÉTICOS NA ASMA

A literatura aponta um vasto número de estudos que se propõe elucidar os fatores causadores e aprimoramento do tratamento da asma e alergia. Mas, apesar da vasta investigação sobre a asma nos últimos anos, é notória a complexidade que envolve os mecanismos imunopatológicos. Por muito tempo o debate acerca da asma voltava-se principalmente para a influência ambiental no seu desenvolvimento. No entanto, atualmente as evidências apontam que a asma é provocada por uma combinação complexa de fatores ambientais e genéticos.

Nos últimos anos, muitos estudos sobre asma em diversas populações no mundo têm identificado variantes genéticas que atuam como fatores de risco ou proteção de asma (J.-U. Lee et al., 2015; Y. Sun et al., 2023).

Assim, já é demonstrado que os fenótipos da doença são altamente hereditários e por esta razão, se faz necessário pesquisas intensas para compreender os mecanismos imunogenéticos. Estudos com gêmeos são comumente realizados para investigar se uma determinada característica ou doença tem um componente genético mensurável.

Já em 1971, um amplo estudo com 7.000 gêmeos do mesmo sexo, nascidos entre 1886 e 1925, evidenciou uma taxa de prevalência para asma em pares de gêmeos monozigóticos (MZ) foi de 19%, quatro vezes mais alta que 4,8% em gêmeos dizigóticos (DZ). O estudo apontou ainda que a herdabilidade foi estimada em até 60% e acredita-se que seja determinada por fatores genéticos, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (Edfors-Lubs, 1971). Estas estimativas de herdabilidade indicam que, em média, a variação genética entre os indivíduos representa a metade do risco para o desenvolvimento de asma (Ober, 2016).

Estudos de ampla associação genômica (GWAS) tem demonstrado ser adequados para investigação de SNPs associadas a diversas doenças, inclusive a asma e alergia, por identificarem SNPs com elevados níveis de significância genômica ($p < 10^{-8}$) e atestados pela replicação através de estudos em outras populações (Kabesch & Tost, 2020).

Resultados de GWAS destacam a importância de variantes genéticas implicados na asma ou doenças alérgicas. (Pividori et al., 2019), identificaram fatores de risco genéticos compartilhados e distintos para asma com início na infância e início na idade adulta. Foram identificados 61 *loci* de asma independentes: 23 eram

específicos de início na infância, um específico de início na idade adulta e 37 eram compartilhados. Os genes nos *loci* de início na infância foram mais expressos na pele, sangue e intestino delgado; os genes nos *loci* de início adulto foram mais expressos no pulmão, sangue, intestino delgado e baço. Neste estudo, foram identificados 113 genes candidatos em 22 dos 61 *loci* GWAS (Pividori et al., 2019).

Essas variantes de nucleotídeo único presentes nos genes principalmente não codificantes, desempenham um papel regulador na expressão gênica e na hereditariedade da asma (Gautam et al., 2020).

Existem muitas pesquisas do tipo GWAS em diferentes populações mundiais, porém até o ano de 2015, nenhum deles havia sido realizado em populações Sul-Americanas com alto grau de miscigenação, como é visto na população brasileira. Foi quando nosso grupo publicou o primeiro GWAS para asma na população brasileira envolvendo 1246 crianças de um estudo longitudinal coorte em Salvador, Brasil (Costa et al., 2015).

Foram identificadas neste estudo, regiões cromossômicas com um elevado nível de significância do genoma para sintomas da asma infantil. Destas, a principal região foi a 14q11 do cromossomo 14 flanqueando os genes *DAD1* e *OXA1L*, indicando que essa região pode estar associada a sintomas de asma na infância.

Outros estudos já reportaram a região 14q11 ao atraso do desenvolvimento corporal, desenvolvimento dentário, autismo, obesidade, narcolepsia e câncer. No entanto, esta associação em estudos de asma ainda não tinha sido relatada (Alhazmi et al., 2022; Comuzzie et al., 2012; Fatemifar et al., 2013; Hallmayer et al., 2009; Papaemmanuil et al., 2009; Smyk et al., 2016; Unger et al., 2023).

Além destes, alguns estudos do tipo gene candidato demonstraram associação da região 14q11 com SNPs em genes envolvidos na modulação de respostas inflamatórias e imunológicas. Dentre esses, o gene LTB4 (receptor de leucotrieno beta 4) foi associado à asma (Tulah et al., 2012) e TRA (receptor alfa de célula T) associado a um teste cutâneo (SPT) em um estudo de associação genética em um grupo de famílias asmáticas (Mansur et al., 1999).

A partir das evidências publicadas por (Costa et al., 2015), onde um top SNP presente na região intergênica de *DAD1* e *OXA1L* no cromossomo 14 foi fortemente associado com asma infantil, nosso grupo de pesquisa se propôs a investigar a associação de polimorfismos nesses dois genes com asma e marcadores de atopia em uma população de crianças sul-americanas. Os resultados evidenciaram que os

genes *DAD1* e *OXA1L* foram associados a asma, teste cutâneo (SPT) para aeroalérgenos, IgE específica para aeroalérgenos e produção de citocinas do tipo Th1/Th2. Além disso, usando qPCR, bem como análise de expressão gênica *in silico*, demonstramos que alguns dos polimorfismos em ambos os genes são capazes de afetar seus respectivos níveis de expressão gênica. Assim, nossos achados demonstram previamente que variantes nos genes *DAD1* e *OXA1L* podem influenciar a asma e atopia em uma população infantil latino-americana com alta prevalência de asma (Pires et al., 2018).

O gene *DAD1* (defensor contra a morte celular 1), foi inicialmente identificado na década de 1990 como um regulador negativo da morte celular programada em uma linhagem celular de hamster sensível à temperatura. Com a mutação no gene *DAD1* sensível à temperatura, as células permaneceram normais à temperatura permissiva, enquanto a mudança para a temperatura restritiva desencadeou à morte celular programada (Nakashima et al., 1993).

A morte celular programada, também conhecida como apoptose celular, é um dos processos mais fundamentais e essenciais para o desenvolvimento normal em organismos multicelulares. É um mecanismo rigorosamente controlado que atua na eliminação de células danificadas durante o desenvolvimento ou em células que podem estar em excesso quando houve um quadro inflamatório com grande influxo de leucócitos, para voltar a homeostasia. A desregulação da apoptose pode ser responsável por causar doenças, dentre as mais conhecidas, doenças neurodegenerativas e câncer. A apoptose celular envolve uma cascata de moléculas de sinalização extra e intracelular complexa, e o núcleo celular que inicia, medeia e executa a morte celular programada, bem como as vias regulatórias relacionadas (Fu et al., 2021).

Proteínas homólogas DAD1 de hamster de outras espécies foram descobertas como altamente conservadas em seqüência e função. O homólogo de levedura de DAD1 é chamado Ost2 com 40% de identidade em comparação com o hamster DAD1 e *Ost2* mutante induz apoptose de células de levedura (Silberstein et al., 1995).

Além disso, a função de DAD1 também tem sido estudada em organismos multicelulares. Camundongos com mutações no gene *DAD1* exibiram atraso no desenvolvimento, alteração na morfologia e aumento da apoptose celular durante a embriogênese e sobreviveram apenas até o estágio de meados da gestação (Brewster et al., 2000; N. A. Hong et al., 2000; Nishii et al., 1999).

No nematódeo *Caenorhabditis elegans*, a superexpressão do gene *DAD1* de *Caenorhabditis* ou *DAD1* humano induzida por um promotor de choque térmico inibiu o desenvolvimento da morte celular durante a embriogênese (Sugimoto et al., 1995).

Enquanto a expressão ectópica do gene *DAD1* em timócitos de camundongo não aumenta a sobrevivência de células T sob estímulos apoptóticos, as células T periféricas de baço e linfonodos em camundongos transgênicos *DAD1* aumentaram a proliferação celular (N. A. Hong et al., 1999).

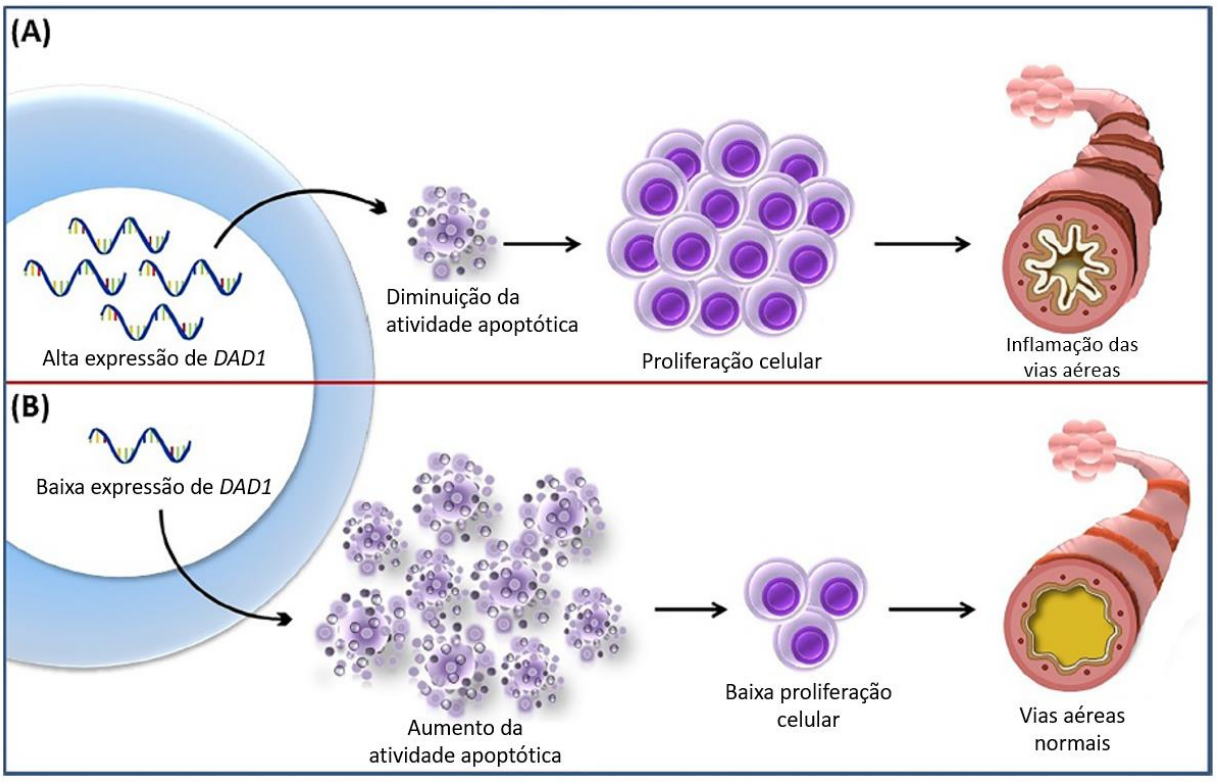
O aumento da expressão de *DAD1* foi detectado em amostras derivadas de pacientes clínicos com câncer de próstata em comparação com tecidos adjacentes normais. Além disso, o estudo revelou que diferentes graus de TNM (classificação da extensão anatômica da doença) e graus de Gleason foram associados a diferenças proeminentes nos níveis de expressão de *DAD1*, que aumentaram gradualmente com a progressão do câncer de próstata, fundamentando seu papel diagnóstico ou prognóstico como biomarcador (Tulane, 2015).

Outro achado importante foi o de (Paunel-Görgülü et al., 2012), onde evidenciou que os níveis de expressão de *DAD1* estão aumentados em neutrófilos no sangue de pacientes com sepse após politraumatismo, sugerindo que o *DAD1* pode ter um papel influente nos diferentes fenótipos de resposta inflamatória.

Ademais, demonstramos anteriormente que o gene *DAD1* teve uma elevada expressão em pacientes asmáticos quando comparado com controles. Estes resultados confirmam que *DAD1* desempenha um papel essencial na regulação da viabilidade celular e apoptose (Pires et al., 2018)

A figura 3 sugere que o aumento da expressão do gene *DAD1* induz a diminuição da atividade apoptótica levando ao aumento da proliferação celular e consequentemente exacerbação da resposta inflamatória (A). Ou, a baixa expressão de *DAD1* aumenta a atividade apoptótica que irá diminuir a proliferação celular e reduzir a resposta inflamatória (B).

Figura 3. Perfis da super ou baixa expressão de *DAD1* e influencia na a asma.



Fonte: adaptado de (Pires et al., 2018).

DAD1 é identificado como uma subunidade do complexo de oligossacariltransferase (OST), que atua no primeiro passo para a N-glicosilação da proteína (Kelleher & Gilmore, 1997; Sanjay et al., 1998).

A N-glicosilação é um importante processo de modificação de proteína, que transfere o oligossacarídeo para a asparagina selecionada de proteínas nascentes alvo para assegurar seu dobramento e maturação adequadas no retículo endoplasmático (RE). Em eucariotas, o complexo OST tem uma subunidade catalítica Stt3 como um núcleo e outras seis subunidades não catalíticas, incluindo Riboforina I, Riboforina II, Ost48, Dad1/Ost2, N33/Ost3 e Ost4. Existem dois genes da subunidade catalítica OST em vertebrados e insetos, referidos como *Stt3A* e *Stt3B* (Kelleher & Gilmore, 2006; Mohorko et al., 2011).

As subunidades não catalíticas facilitam a função catalítica de Stt3A e Stt3B. Entre eles, Ost48 e DAD1 são importantes para a montagem e estabilidade de Stt3, bem como o complexo OST, e a perda deles pode levar à hipoglicosilação (Roboti & High, 2012). A Riboforina I acompanha a N-glicosilação do complexo OST em substratos específicos, especialmente algumas proteínas de membrana (Wilson &

High, 2007). Uma vez que a perda de qualquer subunidade não catalítica não suprime completamente a função de OST, é possível que eles tenham papéis redundantes ou subunidades não catalíticas diferentes que auxiliem a glicosilação de alvos específicos (Y. Zhang et al., 2016).

DAD1, como uma proteína reguladora da N-glicosilação, desempenha um papel importante na sobrevivência celular, porém até agora nenhum mecanismo detalhado é conhecido sobre como a perda do gene *DAD1* induz a apoptose celular. Baseado em evidências de estudos em diferentes organismos, DAD1 pode facilitar o complexo OST para direcionar proteínas específicas que mantêm diretamente a sobrevivência celular. Outra possibilidade é que acúmulo de proteínas desdobradas ou mal dobradas de hipoglicosilação no retículo endoplasmático desencadeia a sinalização de estresse celular e inicia a morte celular programada. Também é possível que DAD1 afete a viabilidade celular de uma forma independente de OST. Por exemplo, DAD1 interage com uma proteína da família Bcl2, Mcl1, que pode conduzir à inibição da apoptose (Makishima et al., 2000).

Em um estudo recente, utilizando gene *DAD1* mutante de *Drosophila melanogaster* (dDAD1), que se mostra mais de 70% de identidade com *DAD1* humano, afim de avaliar como a perda da função de *DAD1* afeta a viabilidade celular e o crescimento de tecido, descobriu-se que a perda de *DAD1* na *Drosophila* diminuiu o crescimento do tecido devido à indução de apoptose e ausência de proliferação celular (Y. Zhang et al., 2016).

No mesmo estudo, foi mostrado que a via de sinalização JNK (quinase N-terminal de c-Jun) é ativada pela perda de *dDAD1* e é necessária para a perda da apoptose celular induzida por *dDAD1*. Além disso, essa via de sinalização já é conhecida por ser importante para regular a apoptose (Y. Zhang et al., 2016).

Ademais, os experimentos de Zhang, Cui *et al.*, (2016), elucidaram que o estresse no retículo endoplasmático é induzido pela perda de *dDAD1* e a apoptose das células mutantes *dDAD1* é dependente da via Perk-Atf4-JNK. O retículo endoplasmático tem um papel importante na dobragem de proteínas para assegurar a estrutura adequada das mesmas. A falta de glicosilação de proteínas é um grande desafio para o dobramento adequado dessas proteínas, levando ao acúmulo de proteínas desdobradas ou mal dobradas no retículo endoplasmático e, consequentemente o estresse.

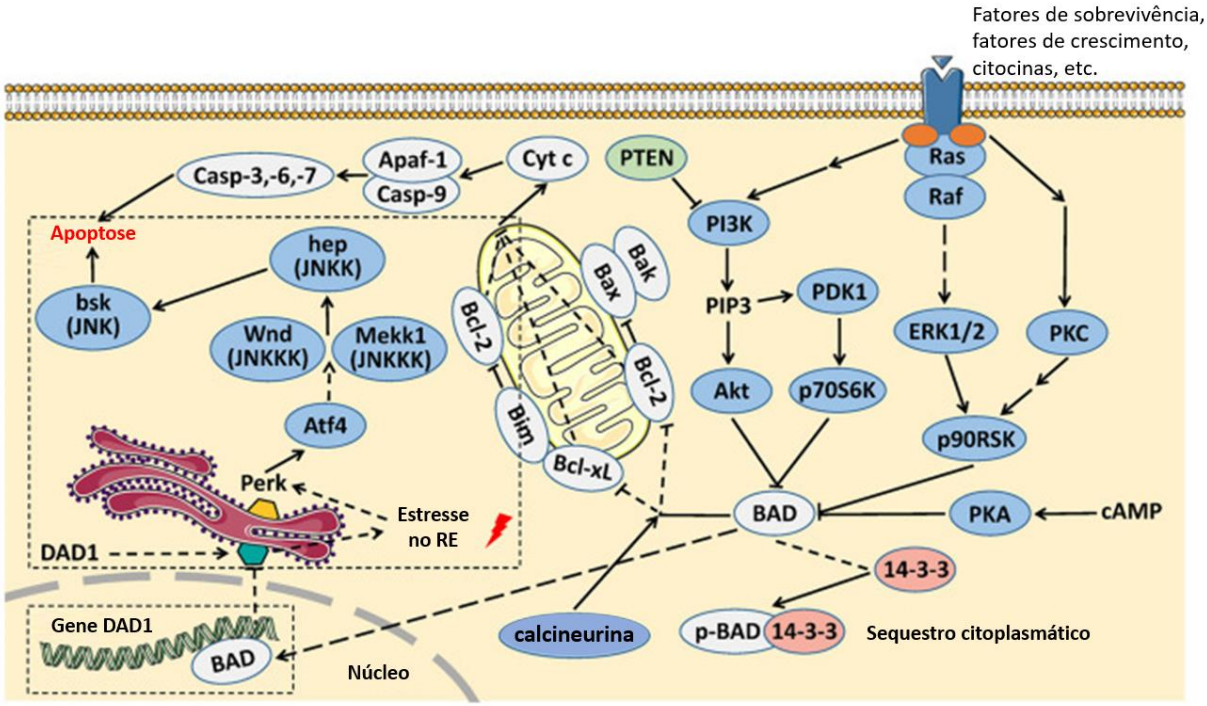
Curiosamente, embora o estudo sugira que o *dDAD1* regula o crescimento do tecido através do complexo OST, assegura que apenas uma das duas subunidades catalíticas, *Stt3A* (CG1518), interage geneticamente com *dDAD1* no controle do crescimento. Com a associação de *dDAD1*, o gene *Stt3A* pode tornar-se o principal complexo de funcionamento, modificando proteínas cruciais ou mais proteínas recentes em tecidos em desenvolvimento, induzindo assim estresse severo ou prolongado do RE se a atividade de *dDAD1* estiver ausente (Y. Zhang et al., 2016).

Os fatores de transcrição nuclear são moléculas que estão fortemente associados ao processo de expressão gênica. Muitos destes já são conhecidos por seu envolvimento na fisiopatologia da asma. O fator de transcrição nuclear κB (NF-κB) é um destes que é muito conhecido por seu mecanismo em diversas doenças inflamatórias. E já existem evidências que apontam elevação nos níveis de expressão de fator de transcrição nuclear κB (NF-κB) influenciado pelo aumento da expressão de *DAD1* em células de câncer de próstata perineural (Ayala et al., 2004).

Um estudo realizado por Meiliwuerti, 2017, revelou uma proteína identificada como BAD que possui relações diretas na expressão do gene *DAD1*. A superexpressão de BAD em células de câncer de esôfago pode inibiu a expressão de *DAD1*, mas pode ser revertido quando a expressão de BAD é regulada negativamente. Em conjunto, foi levantada a hipótese de que existe uma relação regulatória negativa entre BAD e *DAD1*. BAD pode atuar como uma proteína de ligação a região promotora dos genes e exercer um efeito semelhante ao fator de transcrição para regular negativamente os níveis de expressão de genes-alvo (Fernando et al., 2007).

A figura 4 expõe a interação entre BAD e *DAD1* ao exercer uma função semelhante ao fator de transcrição. A combinação entre BAD e a região promotora do gene *DAD1* resulta na inibição da expressão de *DAD1*. A perda da função *DAD1* desencadeia o estresse do Retículo Endoplasmático (RE) e ativa a via de sinalização Perk-Atf4, que ativa sequencialmente a via de sinalização JNK via MEKK1, juntamente com Wnd, e eventualmente inicia a apoptose.

Figura 4. Interação viável entre BAD e *DAD1* com a apoptose.



Fonte: adaptado de (Luo et al., 2021).

Uma vez que o *DAD1* é um regulador negativo da apoptose, a função antiapoptótica do *DAD1* pode representar vantagens potenciais para as células tumorais, permitindo a proliferação exacerbada. Assim, supomos que este mesmo mecanismo pode ser implicado para o papel deste gene na imunopatologia da asma e alergia contribuindo para a proliferação de células inflamatórias (Luo et al., 2021).

As evidências atuais tornam cada vez mais notável a necessidade de elucidar a associação das funções biológicas do *DAD1* com asma, a fim de esclarecer de que forma o mecanismo de apoptose pode estar envolvido com esta doença.

Por ser uma doença crônica do sistema respiratório, a asma tem como principais características a inflamação, através do aumento da migração de células inflamatórias para o tecido pulmonar, hiperreatividade brônquica e remodelação das vias aéreas (Lochte et al., 2016). O remodelamento das vias aéreas é um passo importante na ocorrência de asma, e está muito associado à gravidade da doença (Yang et al., 2012).

A proliferação anormal de células do músculo liso brônquico (BSMCs) tem papéis importantes no remodelamento das vias aéreas (Omran et al., 2013; Yang et al., 2012). Estudos anteriores relataram que BSMCs em pacientes com asma brônquica liberam mais citocinas do que em indivíduos normais, incluindo ligante 10

da quimiocina (motivo C-X-C) e ligante 1 de quimiocina (motivo C-X3-C) (Dileepan et al., 2016; Tsitsiou et al., 2012). Estas citocinas induzem a ligação de mastócitos às BSMCs, promovem a sobrevivência e proliferação de mastócitos, facilitam o acúmulo de substâncias inflamatórias, aumentam a espessura dos músculos lisos e conduzem à hiperreatividade das vias aéreas (Y. Zhang et al., 2016).

Investigações anteriores também já demonstraram que a ligação de linfócitos T as BSMCs induz a síntese de DNA nas BSMCs, o que aumenta a sua proliferação (Bara et al., 2010; Roviezzo et al., 2015). A proliferação aumentada e a diminuição da apoptose das BSMCs podem resultar em hiperreatividade das vias aéreas (Bara et al., 2010; Perry et al., 2014).

Visto a relevância desses processos fisiológicos e/ou patológicos, é notável a necessidade de avaliar a associação do gene *DAD1* com asma e atopia, uma vez que o aumento ou diminuição de sua expressão pode influenciar diretamente na fisiopatologia desses distúrbios.

O estudo de (Costa et al., 2015) apontou ainda outro gene que foi associado com sintomas de asma em uma população brasileira, o *OXA1L*. O gene *OXA1L* (proteína da membrana mitocondrial interna, oxidase citocromo c), codifica um componente da família de proteínas Oxa1/Alb3/YidC, que está envolvida na biogênese de proteínas de membrana de mitocôndrias, cloroplastos e bactérias (Stiburek et al., 2007).

As mitocôndrias são organelas presentes no citoplasma celular, cujo número varia de dezenas até centenas, a depender do tipo e função da célula. Estão presentes praticamente em todos os seres eucariontes, sejam animais, plantas, algas, fungos ou protozoários. Tais organelas desempenham um papel fundamental, sendo responsáveis pela produção da energia necessária para todas as atividades celulares (Bhatti et al., 2017).

A estrutura desta organela é muito organizada e complexa. O seu interior é preenchido por um fluido denominado matriz mitocondrial, onde estão presentes diversas enzimas, além de DNA e RNA e pequenos ribossomos e substâncias necessárias à síntese de determinadas proteínas. A matriz mitocondrial é o local onde ocorre a respiração celular, processo que resulta na liberação de energia em forma de ATP (adenosina trifosfato). Esse ATP se difunde para todas as regiões da célula, fornecendo a energia necessária para as mais diversas atividades celulares (Kim & Song, 2016).

Além destas, as mitocôndrias também realizam outros processos celulares, incluindo a síntese de ácidos graxos, homeostase de Ca^{2+} e biogênese de hemoproteínas. As mitocôndrias estão amplamente envolvidas no circuito de sinalização celular, e evidências recentes demonstraram que as mitocôndrias participam da regulação de várias vias de sinalização celular, fornecendo uma plataforma física para interações proteína-proteína e o tráfego de moléculas de sinalização intracelular e ajustando a hemostasia do Ca^{2+} e produção de ROS.

As mitocôndrias também regulam as vias de sinalização envolvidas na morte celular, autofagia, ativação da imunidade inata e adquirida, produção de fatores de crescimento, diferenciação celular e respostas ao estresse hipóxico. Por outro lado, a apoptose desregulada, principal forma de morte celular programada, contribui para a patogênese de várias doenças (Tait & Green, 2012).

Por haver regiões de elevada hidrofobicidade, imagina-se que as proteínas sintetizadas nas mitocôndrias sejam integradas na membrana, durante ou imediatamente após a sua síntese em ribossomos mitocondriais (Haque et al., 2010). Ribossomos mitocondriais estão associados com a membrana interna (Bonnefoy et al., 2009; Liu & Spremulli, 2000), e várias proteínas têm sido implicadas na ligação de ribossomos para estas membranas.

Algumas destas melhor descritas são as proteínas membro da família OXA1. OXA1 está localizado na membrana interna, onde atua como um componente da maquinaria que medeia a inserção de certas proteínas hidrofóbicas na membrana. Pertence à família YidC e Alb3 de proteínas encontrado em procariotas e eucariotas (Luirink et al., 2001; Ott & Herrmann, 2010).

Nos seres humanos é designada por OXA1L. A proteína OXA1L consiste de uma secção N terminal localizado no espaço intermembranar mitocondrial, cinco hélices transmembranares e uma extremidade C-terminal de ~100 aminoácidos expostas na matriz mitocondrial (Szyrach et al., 2003).

A extremidade C-terminal do homólogo de levedura da OXA1L (OXA1p) já foi descrita tendo uma ligação com ribossomos mitocondriais, também chamados de mitoribossomos. A supressão desta região do OXA1p diminui a eficiência da inserção na membrana da subunidade II da citocromo-oxidase, indicando que a extremidade C-terminal de levedura OXA1p desempenha um papel ativo na inserção de produtos de tradução mitocondriais na bicamada lipídica (Szyrach et al., 2003). Estudos Cryo-EM de levedura de OXA1p ligado aos ribossomos bacterianos indicam que interagem

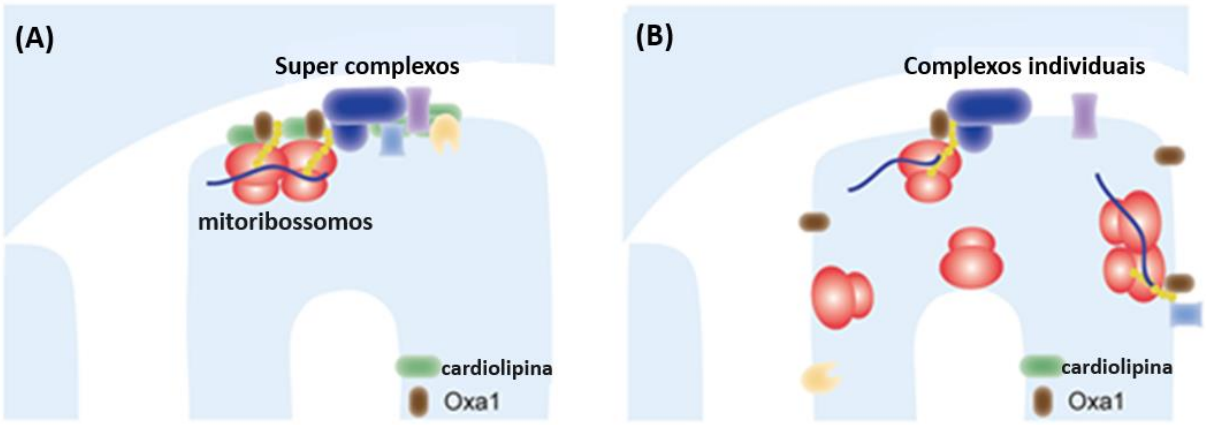
perto do túnel de saída localizado na parte posterior da grande subunidade ribossomal (Kohler et al., 2009).

Estudos prévios da extremidade C-terminal de OXA1L humana (OXA1L-CCT) sugeriram que a extremidade C-terminal atua como um equilíbrio das formas de monómero, dímero e tetrâmero. Estudos de dicroísmo circular indicou que contem ~ 20% de teor helicoidal α. Apesar das previsões com base na OXA1p levedura, OXA1L-CTT humano não formam uma estrutura em espiral enrolada. Duas cópias de OXA1L-CTT ligam-se aos ribossomos com uma constante de ligação na faixa de 0.3-0.8 μM. Estudos de ligação cruzada sugerem que os contatos OXA1L-CTT três proteínas que têm homólogos bacterianos (MRPL13, MRPL20, e MRPL28) e três proteínas que são únicas para mitoribossomos (MRPL48, MRPL49, e MRPL51). Acredita-se que estas proteínas estão localizadas no lado solvente da grande subunidade ribossomal (Haque et al., 2010).

Apesar deste recente trabalho, a compreensão da estrutura de OXA1L-CTT humana e a sua interação com os mitoribossomos dos mamíferos ainda é bastante limitada (Haque et al., 2010).

A OXA1L desempenha um papel importante na inserção de proteínas na membrana interna das mitocôndrias através da interação com outras moléculas como a cardiolipina por exemplo, como foi previamente elucidado por (R. G. Lee et al., 2020) e apresentado na figura 5.

Figura 5. Modelo de síntese de proteínas mitocondriais na membrana interna. (A) Quando a síntese de proteína mitocondrial é iniciada, cardiolipina(CL) medeia a associação do mitorribossomo e OXA1 na membrana interna. A CL serve como uma plataforma para o mitorribossomo e o OXA1 interagirem, permitindo que proteínas recém-sintetizadas sejam inseridas diretamente na membrana. Essa interação estável suporta a montagem dos supercomplexos da cadeia respiratória. (B) A perda de CL impede a interação do mitorribossomo com OXA1, o que reduz a taxa de síntese de proteínas. Aqui, o mitorribossomo e o OXA1 não têm plataforma estável para interagir, de modo que sua associação pode ser aleatória e resulta na redução da montagem do supercomplexo.



Fonte: Adaptado de (R. G. Lee et al., 2020).

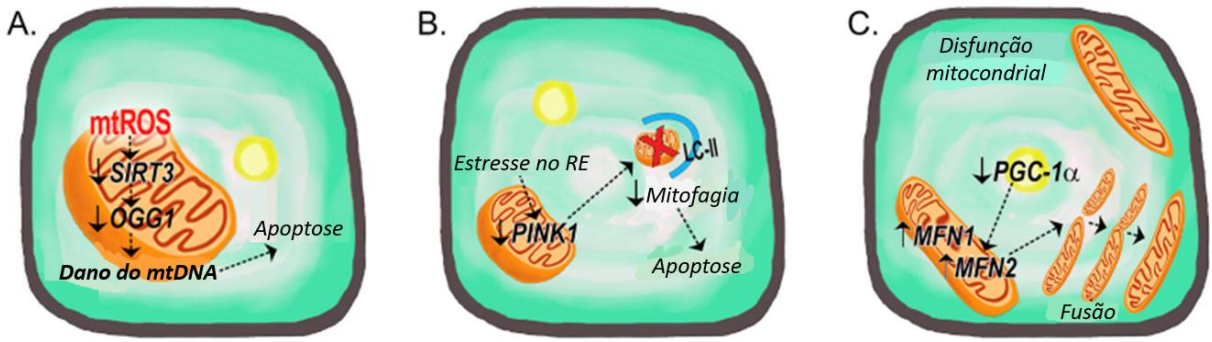
Os achados atuais, sugerem que alterações ou distúrbios mitocondriais podem estar diretamente envolvidos na fisiopatologia de doenças uma vez que seu papel é fundamental para a sobrevivência e manutenção celular. Uma vez que as mitocôndrias são a principal fonte de ATP celular, isso implica na relevância fisiopatológica que a disfunção mitocondrial representa (Dankowski et al., 2016).

As vias de sinalização mitocondrial estão envolvidas na liberação de vários metabólitos e no equilíbrio da dinâmica mitocondrial por meio de interações com outras organelas, como o retículo endoplasmático. A disfunção mitocondrial induz respostas de estresse que podem afetar outras organelas e interromper as funções celulares. De fato, qualquer desregulação nas vias de sinalização dependentes de mitocôndrias teria resultados fisiológicos e fisiopatológicos (Chandel, 2014).

Larson-Casey et al., (2020), se propôs a avaliar o controle de qualidade mitocondrial na fibrose pulmonar e descreveu que o controle de qualidade mitocondrial é mantido geralmente através de três mecanismos diferentes: (1) biogênese mitocondrial; (2) dinâmica mitocondrial (fusão e fissão); e (3) mitofagia (Larson-Casey et al., 2020). Em termos gerais, o controle de qualidade mitocondrial também inclui tráfego/migração intracelular mitocondrial e comunicação intracelular mitocondrial com o núcleo e outras organelas, como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi.

A figura 6 ilustra o esquema do controle de qualidade mitocondrial em células epiteliais alveolares (AECs) fibróticas tipo II. (A) A produção de mtROS promove danos ao mtDNA reduzindo a expressão mitocondrial de SIRT3 e OGG1 para mediar a apoptose de AEC. (B) AECs fibróticas tipo II mostram aumento do estresse do retículo endoplasmático (RE) que inibe a mitofagia mediada por PINK1 para promover a apoptose. (C) A expressão reduzida de PGC-1α leva ao aumento da fusão mitocondrial (MFN1 e 2) e ao acúmulo de AECs fibróticas tipo II de mitocôndrias inchadas e alongadas.

Figura 6. Esquema do controle de qualidade mitocondrial em células epiteliais alveolares (AECs) fibróticas tipo II.



Fonte: adaptado de (Larson-Casey et al., 2020).

Já se sabe que a disfunção mitocondrial é comumente causada por polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) do genoma mitocondrial e mecanismos de reparo inadequados (Wallace e Chalkia, 2013). Mutações monogênicas de genes mitocondriais são conhecidas por causar disfunção mitocondrial grave levando a doenças raras e multissistêmicas como síndrome de Kearns Sayre, síndrome de Leigh ou Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (Moraes et al., 1989; Riordan-Eva & Harding, 1995; Suzuki et al., 2011; S. B. Wang et al., 2008).

Além disso, existem muitas evidências que já descrevem o papel dos polimorfismos de genes mitocondriais no desenvolvimento de doenças comuns tais como diabetes mellitus tipo 2, doenças neurodegenerativas e vários tipos diferentes de câncer (Brandon et al., 2006; Lakatos et al., 2010; Saxena et al., 2006; van der Walt et al., 2003).

O estudo de (Costa et al., 2015) por exemplo, evidenciou que um polimorfismo com elevada significância estatística (rs1999071) na região 14q21 do DNA não mitocondrial, foi associado com asma e que este polimorfismo regula a expressão de *OXA1L* no tecido pulmonar.

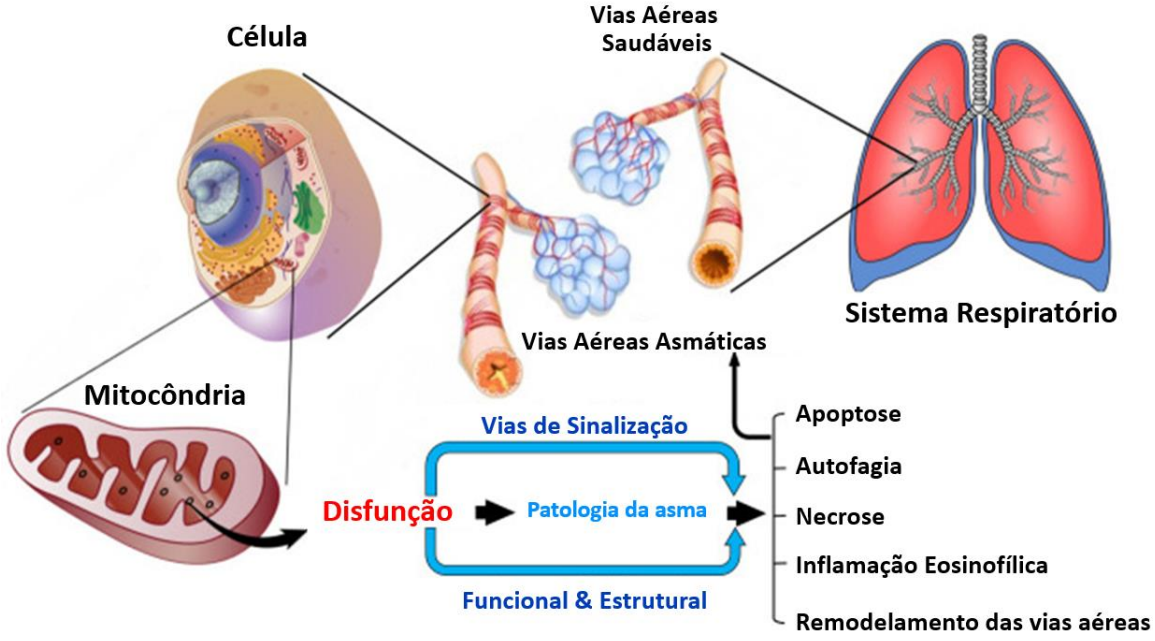
No entanto, as mitocôndrias ainda retêm alguns genes no seu próprio genoma, que são altamente essenciais para a respiração celular e geração de ATP. Um exemplo disso é o gene *MT-ND4* codifica uma subunidade da NADH desidrogenase 4 como uma parte do complexo de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) complexo 1. Esse complexo 1 consiste em 44 subunidades diferentes, sete das quais são codificadas mitocondrialmente (Breuer et al., 2013).

A função do complexo 1 como primeiro passo da cadeia de transporte de elétrons é extrair elétrons de NADH e doá-los para ubiquinona. Esta reação libera energia, que é usada para transportar prótons através da membrana interna mitocondrial. Desta forma, o complexo 1 contribui para a manutenção do gradiente de prótons, que alimenta a produção de ATP mitocondrial e muitas outras funções mitocondriais (Koopman et al., 2010).

Apesar de a asma não seja considerada uma síndrome mitocondrial, existe uma considerável sobreposição entre a fisiopatologia da asma e a biologia mitocondrial em aspectos de estresse oxidativo, homeostase de íons cálcio e também a apoptose (Mabalirajan & Ghosh, 2013).

A existência de alterações no estresse oxidativo pode levar ao desenvolvimento de asma ativando vias pró-inflamatórias (Nandedkar et al., 2011). A alteração da homeostase Ca^{++} nas células do músculo liso brônquico aumenta a biogênese mitocondrial, a proliferação celular e, consequentemente, a remodelação das vias aéreas em pacientes asmáticos (Trian et al., 2007). A (Figura 7) ilustra como algumas das alterações mitocondriais que podem influenciar na fisiopatologia de doenças respiratórias como asma.

Figura 7. Mitocôndrias e asma. A asma é uma importante doença do sistema respiratório que envolve as vias aéreas no pulmão. As células epiteliais, caliciformes, musculares lisas e imunológicas são influenciadas na asma. As mitocôndrias das células das vias aéreas estão envolvidas na fisiopatologia da asma e têm papéis principais na saúde do sistema respiratório, principalmente nos brônquios, influenciando o remodelamento das vias aéreas, fibrose, inflamação eosinofílica e apoptose celular, necrose e autofagia, que podem ser reguladas por ambas as vias de sinalização celular e mitocondrial.



Fonte: Adaptado de (Qian et al., 2022).

Além disso, há muito tempo sabe-se que o genoma mitocondrial é herdado exclusivamente (pelo menos em seres humanos) através da linha materna, pelo fato de as mitocôndrias dos espermatozóides não serem introduzidas no citoplasma do óvulo durante a fertilização, Assim, as doenças genéticas causadas por mutações mapeando o genoma mitocondrial também apresentam características de herança materna (Giles et al., 1980).

A importância preferencial da história materna de atopia ou asma (em comparação com a história paterna) como fator de risco para asma e atopia na criança está entre as observações mais consistentes e reprodutíveis na epidemiologia da asma. Embora seja claro que as contribuições genéticas do pai são importantes, particularmente no que se refere à hiperresponsividade das vias aéreas (Kurzius-Spencer et al., 2004; Raby et al., 2005), a história materna de asma ou atopia influencia mais fortemente o desenvolvimento de asma e atopia (Kurukulaaratchy et al., 2006; Litonjua et al., 1998; Soto-Quiros et al., 2002; Tariq et al., 1998).

Dados de várias coortes prospectivas sugerem que uma história materna (mas não paterna) de asma confere um risco substancial de desenvolvimento de sibilância ou asma persistente (Martinez et al., 1995; Raby et al., 2004). Este efeito maternal preferencial também é observado com fenótipos atópicos, incluindo dermatite atópica (Bradley et al., 2000; Harris et al., 2001), rinite alérgica (Tariq et al., 1998; Wright et al., 1994) e sensibilização alérgica específica (Kuehr et al., 1993).

Estas associações sugerem que variantes genéticas da seqüência mitocondrial comum podem influenciar outras doenças complexas comuns tais como a asma. Dadas as fortes observações epidemiológicas da influência materna predominante sobre asma e susceptibilidade a atopia, é válida a hipótese de que as variantes da seqüência mitocondrial afetam o desenvolvimento de fenótipos atópicos (Raby et al., 2005).

Assim, é perceptível a importância de *OXA1L* na biogênese mitocondrial e possíveis distúrbios que possam ocorrer nessa organela podem desencadear processos fisiopatológicos associados a diversas doenças como foi evidenciado. Além disso, visto que o gene *DAD1* foi descrito anteriormente tendo um relevante papel no retículo endoplasmático e o *OXA1L* na mitocôndria, é interessante notar a relação existente entre as duas organelas celulares com a disfunções pulmonares, reforçando o envolvimento destes genes na biogênese celular, sendo determinantes nesses processos.

Estudos de associação genética do tipo GWAS ou genes candidatos se mostram fundamentais na identificação de potenciais variantes influentes na asma e atopia. Estes podem levar a uma melhor compreensão dos fenótipos de asma em relação às vias biológicas envolvidas e também podem levar a melhores tratamentos. A asma, como dito antes é multifatorial, resultado de exposições ambientais específicas ou desencadeamento de um hospedeiro geneticamente suscetível. Por exemplo, em algumas crianças com uma composição genética específica, a exposição a um vírus específico durante um tempo específico no desenvolvimento fisiológico pode levar à asma. Além disso, um adulto com uma suscetibilidade genética específica vivendo em certa exposição ambiental cumulativa também pode levar ao desenvolvimento da asma (Jones & Rosenwasser, 2016).

Portanto, a investigação, identificação e descrição de variantes genéticas potencialmente relevantes na associação com asma e atopia podem levar a uma melhor compreensão do fenótipo dessas doenças e um melhor manejo futuramente.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Variantes genéticas presentes nos genes *DAD1* e *OXA1L* podem influenciar no desenvolvimento de asma e atopia.

3.2 Objetivo Geral

Descrever novas variantes nos genes *DAD1* e *OXA1L* e sua associação com asma e marcadores de atopia em indivíduos adultos.

3.3 Objetivos Específicos

- Descrever a frequência de variantes genéticas presentes nos genes *DAD1* e *OXA1L* em indivíduos asmáticos;
- Avaliar a associação de polimorfismos nos genes *DAD1* e *OXA1L* com asma e atopia;
- Comparar a dosagem da citocina pro-inflamatória IL-13 e de anticorpo IgE específico no plasma e eosinófilos no sangue de indivíduos asmáticos e não asmáticos e associar com dados genéticos;
- Analisar a associação dessas variantes genéticas com a expressão gênica *in silico* no tecido pulmonar e sangue total.

4. MANUSCRIPT

New variants of the *DAD1* and *OXA1L* genes are associated with asthma and atopy in the adult population

Anaque O. Pires[1], Louise C. de Lima[1], Raísa S. Coelho[1], Hátilla dos S. Silva[1], Álvaro A. Cruz[2], Ryan dos S. Costa[1], Camila A. V. Figueiredo[1]

[1]Department of Bioregulation, Laboratory of Immunopharmacology and Molecular Biology, Federal University of Bahia (ICS), Bahia-Brazil. [2]Program for the Control of Asthma and Rhinitis in Bahia (ProAR), Federal University of Bahia (UFBA), Bahia-Brazil.

ABSTRACT

Asthma is a highly complex immune-mediated disease, characterized by a reversible and intermittent obstruction of the airways that, despite having a higher prevalence in childhood, has shown a high incidence and mortality in adults. In recent years, several genomic wide association studies (GWAS) have identified a significant number of genetic variants responsible for susceptibility to asthma. These variants have been shown to play an important role in the regulation of gene expression and in the heritability of asthma. The *DAD1* gene is known for its role in the regulation of programmed cell death, and *OXA1L* is described for its involvement in mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation. The present study aimed to identify new variants in the *DAD1* and *OXA1L* genes and to evaluate the association with asthma and atopy markers in adults. The study involved the participation of 1,084 adult individuals divided into mild to moderate asthma, severe asthma and healthy controls enrolled in a case-control study cohort from the *Programa para Controle da Asma na Bahia*-ProAR. Association analyzes between variants in the studied genes and asthma or atopy were performed using a multivariate logistic regression model adjusted for sex, age, body mass index (BMI), smoking, forced expiratory volume in 1 second (FEV1) and component ancestry master (PC1) using PLINK 1.9 software. Additive, dominant and recessive genetic models were used for all analyzed variables. In this study, new variants in the *DAD1* and *OXA1L* genes that had never been described before were identified. The C allele of rs200470407 in *OXA1L* was negatively associated with lack of asthma control and increased IL-13. The A allele of rs61972400 and the C allele of rs76050305 in *DAD1* were positively associated with airway obstruction, in addition to being in total linkage disequilibrium. *In silico* gene expression analyzes demonstrated that some of the polymorphisms in both genes are able to affect their respective levels of gene expression. Thus, our findings demonstrate that variants in the *DAD1* and *OXA1L* genes may influence asthma and atopy in Brazilian adults.

Keywords: Asthma, Allergy, Polymorphisms, *DAD1*, *OXA1L*

Correspondence to: anaque.pires@gmail.com

ABBREVIATIONS

ALFA: Allele Frequency Aggregator
CONEP: National Research Ethics Commission
DNA: Deoxyribonucleic acid
GTEx: Genotype-Tissue Expression
IgE: Immunoglobulin E
MCO: Maternity Climério de Oliveira
PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping v2
SIFT: Sorting Intolerant from Tolerant
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
UTR: Untranslated Region

INTRODUCTION

Asthma is the most common chronic inflammatory disease of the airways nowadays, with several distinct phenotypes and pathogenetic mechanisms that are still poorly understood. It is a condition often associated with atopy, which is defined as the tendency to develop an increased IgE-mediated immune response to allergens and found in high prevalence in children and adults affected by asthma worldwide (Di Cicco et al., 2020). It is estimated that 8.2% of the population of the United States of America (USA) is affected by the disease, with 1 child affected in every 12 births (Boulet et al., 2019). In Brazil, it is estimated that 23.2% of the population is affected by the disease, and the incidence varies from 19.8% to 24.9% between regions of the country. In 2021, 1.3 million consultations were carried out, which corresponds to approximately 231,000 consultations / per month, 18% more than in the previous year (Marques et al., 2022).

It is a highly complex immune-mediated disease characterized by reversible and intermittent lower airway obstruction due to contraction of bronchial smooth muscle in response to an environmental trigger or an upper airway infection (Lambrecht et al., 2019). The main pathophysiological theories of asthma support inflammation mediated by an allergic pattern. Allergic inflammation is driven by CD4+ helper T lymphocytes (Th2), which secrete interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, and sometimes referred to as allergic asthma, while patients who do not have this type of inflammation are classified as non-allergic asthma (Loureiro et al., 2018).

Asthma usually starts in childhood, but some may first develop it during adulthood. Despite having a higher incidence and prevalence in children, asthma-related health care and mortality are higher in adults (Dharmage et al., 2019).

In the last decade, several genomic wide association studies (GWAS) have identified a significant number of genetic variants responsible for susceptibility to asthma (Kabesch & Tost, 2020). These variants have been shown to play an important role in the regulation of gene expression and in the heritability of asthma, mainly atopic asthma (Gautam et al., 2020). In Latin America context of non-atopic asthma, we highlight the variant, rs1999071, located in the intergenic region between the *DAD1* and *OXA1L* genes, both in the 14q11 region of chromosome 14.

The *DAD1* gene plays an important role in anti-apoptotic activity and is very relevant for the regulation of homeostasis and cell proliferation in various tissues (Luo et al., 2021). Among the multiple mechanisms of control of the inflammatory response,

apoptosis is one of the means of great importance in promoting homeostasis of the immune system (Riera Romo, 2021).

On the other hand, *OXA1L* gene encodes a protein called Oxa1, which is essential in biogenesis and in the process of mitochondrial oxidative phosphorylation (Herrmann & Neupert, 2003); (Hildenbeutel et al., 2008). Given the importance of mitochondria in various cellular processes, mitochondrial dysfunctions may be involved in the pathophysiology of several diseases and these dysfunctions may be caused by mitochondrial genome polymorphisms and inadequate repair mechanisms (Wallace & Chalkia, 2013); (Dankowski et al., 2016). Mitochondria may even contribute to pathological lung lesions by participating in the activation of pro-inflammatory signaling pathways (Hough et al., 2018).

Our group has previously described that polymorphisms in both genes *DAD1* and *OXA1L* can act as risk or protection factors for asthma and atopy in children where we also demonstrated gene expression to be up-regulated in asthmatic patients (Pires et al., 2018).

Since asthma and atopy can still affect adult individuals, in addition to the important role that the *DAD1* and *OXA1L* genes, the lack of studies that link polymorphisms in *DAD1* and *OXA1L* with asthma, lung function and atopy, reinforce the need for further investigations about the involvement of these genes on asthma, as well as a better understanding of the disease in adults.

Thus, the present study aimed to identify new polymorphisms in *DAD1* and *OXA1L* and to evaluate the association with asthma, lung function and atopy markers in adults. Since asthma is a multifactorial disease, a better understanding of the molecular mechanisms involved in asthma and atopy is a high priority, providing data for a better future management of these conditions.

METHODS

Population of study

For this study, 383 individuals with mild to moderate asthma, 365 with severe asthma and 336 healthy controls from Programa para Controle da Asma na Bahia - ProAR case-control study (Cruz et al., 2020) were included. The participants

underwent an interview, clinical evaluation, and filled out questionnaires and blood samples were collected.

All participants in this study were over 18 years old, signed an informed consent form to participate of the study, and had their asthma diagnosis validated by two physicians from the ProAR (Cruz et al., 2020). All methods and protocols were performed according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine (MCO/UFBA) and the National Council of Ethics (CONEP), resolution number 095/2012.

Clinical and laboratory analyzes

A Koko® spirometer was used for all spirometries using the protocol adopted by U-BIOPRED (Shaw et al., 2015) and also the asthma control was accessed using the 6-item version of the Asthma Control Questionnaire (ACQ-6) adapted into Portuguese (Leite et al., 2008).

Skin prick tests (SPT) were performed for the environmental allergens. The test was considered positive when the wheel of any tested aeroallergen was greater than or equal to 3 mm after 15 min. The antigens tested were *Alternaria alternata, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Cladosporium herbarum, Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Blatella germanica,* and *Periplaneta Americana*. Saline solution and histamine were used as negative control and positive control, respectively (Immunotech, Rio de Janeiro, Brazil).

Whole blood samples were collected from all participants. Blood eosinophil counts were obtained through hematological analysis using the CELL-DYN Ruby® equipment (Abbott, United Kingdom).

Plasma samples from participants with mild to moderate asthma and severe asthma were tested for a cytokine panel [list here all cytokines evaluated and detection limits] using the MILLIPLEX® kit (Merck, Germany), following the manufacturer's instructions. The test was performed with the Luminex MAGPIX® system (Life Technology, USA), and the cytokines panel was analyzed and their detection limits were: EOTAXIN (6.8 pg/ml), IFN-γ (1.1 pg/ml), IL-10 (1.6 pg/ml), IL-12 (p70) (1.0 pg/ml), IL-13 (1.9 pg/ml), IL-17A (1.2 pg/ml), IL-1β (1.0 pg/ml), IL-5 (0.7 pg/ml), IL-6 (1.3 pg/ml), IL-8 (0.7 pg/ml) and TNF (1.1 pg/ml).

Total IgE was measured by nephelometry by Image equipment (Beckman Coulter, USA) and measurements of specific IgE were performed using the fluor enzyme immunoassay (FEIA), ImmunoCAP test (Phadia, Sweden).

Definition of variables

Asthma was defined as wheezing, coughing or dyspnea and improvement of symptoms after the use of inhaled corticosteroids or bronchodilators (Jesus et al., 2018); (Lima-Matos et al., 2018). Patients were classified as having severe asthma according to the Global Asthma Initiative and National Institutes of Health (NIH), as previously described by (Cruz et al., 2020).

The lack of reversibility was established based on the GINA criteria (2002), with the percentage change in FEV1 (%FEV1) before and after the bronchodilator and the change in volume in liters. Individuals with relative variation less than 12% and/or absolute variation < 200ml were considered cases and greater than 12% and > 200mL were considered controls. Obstruction was defined as a post-bronchodilator FEV1/FVC ratio below 70% for cases and equal to or above 70% for controls, according to criteria adopted by Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) reports.

Using the ACQ-6 score, a score ≥1.5 was defined as uncontrolled asthma, and from 0.75 to 1.5 was considered partially controlled. A peripheral blood eosinophil count above 260 cells/mm3 was considered eosinophilia (X.-Y. Zhang et al., 2014). Individuals with >172 IU/mL for total IgE was considered positive (Lima et al., 2023) and for specific IgE the reference value was >0.70 kUA/L.

DNA Extraction and Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood samples according to the Flexigene® DNA Kit protocol (Qiagen, Germany) and genotyping performed using a commercial Multi-Ethnic Global Array (MEGA) panel, Illumina chip (Daya et al., 2019). The genetic information for *DAD1* was extracted from positions 23033807 to 23058130 (location: NC_000014.8) on chromosome 14 and for *OXA1L* from positions 23235897 to 23242251 (location: NC_000014.8) on chromosome 14.

In silico analysis and statistics

In silico gene expression analyses were performed for associated SNP using the GTEx portal v.9 (www.gtexportal.org) in the following tissues: lung, skin, fibroblasts and whole blood, according to the genotype of each SNP.

Data from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) and RegulomeDB v.2.2 (www.regulomedb.org) were used for functional annotations of SNPs significantly associated with asthma and atopy. The RegulomeDB project describes possible functions of genetic variants as well as regulatory mechanisms through manual annotations. Scores of 1a through 1f indicate that a variant can affect DNA binding and is linked to expression of a target gene; scores from 2a to 2c, indicate that the variant affects the DNA binding; scores of 3a through 3b indicate that the variant is less likely to affect DNA binding; and scores above 4 indicate minimal evidence of DNA binding or no data available (Boyle et al., 2012).

All polymorphisms were analyzed using HaploReg v4.2 (https://pubs.broadinstitute.org/). Non-synonymous variants were evaluated using the Polyphen-2 algorithm (http://genetics.bwh.harvard.edu) and SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg/).

In addition to these analyses, the linkage disequilibrium (LD) was calculated in the studied genes considering the values of r2 >0.80 through the Haploview 4.2 software.

To determine data normality, covariates, and statistical differences between the study groups, the SPSS version 25.0 program was used. Using the Plink program version 1.9, single nucleotide variants (SNPs) were filtered according to the following criteria: Hardy-Weinberg equilibrium test (p-value <0.05); minor allele frequency (>0.1) and percentage of lost *loci* (>0.1).

Analyzes of associations between polymorphisms in the studied genes and asthma or atopy variables were performed using a multivariate logistic regression model adjusted for sex, age, body mass index (BMI), smoking, forced expiratory volume in one second (FEV1), and principal component ancestry (PC1). Covariates were chosen for each variable according to the result of the chi-square test. Additive, dominant, and recessive genetic models were used for all variables analyzed. Adaptive permutations were calculated and a p-value <0.05 was considered significant, as previously described (Teixeira et al., 2017); (Pires et al., 2018).

Statistical analysis of cytokine levels, total IgE levels and eosinophil counts by the presence of different SNPs genotypes were performed using GraphPad 8 software, using a t-test and ANOVA test for parametric data and a Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test for non-parametric data.

For *in silico* exploration of lung transcriptomic data, the publicly available Gene Expression Omnibus (GEO) data sets of bronchial epithelia from asthmatic patients and healthy subjects (GSE76227 and GSE67472) were used. The data were explored to extract normalized gene expression of the *OXA1L* and *DAD1* (Perotin et al., 2019); (Christenson et al., 2015); (Kasela et al., 2021).

RESULTS

Table 1 presents the characteristics of the studied population. Women represented a higher percentage than men in all groups. The median age was 35 years for mild asthma and 50 years for severe asthma ($p < 0.001$). Medians for BMI were similar in all groups. There was a higher percentage of smokers in the severe asthma group (36%) compared to the mild asthma group (27%) ($p = 0.03$). Statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed between asthmatics and non-asthmatics for spirometry parameters, atopy markers and immunological markers. There were also significant differences ($p < 0.05$) between mild and severe asthma, except for specific IgE and blood eosinophil counts.

Table 1: Clinical characteristics and markers of atopy in the studied population separated by asthmatics or non-asthmatics and by mild or severe asthma.

	No Asthma n = 336	Asthma n = 748	p value	Mild to Moderate Asthma n = 383	Severe Asthma n = 365	p value
Sex‡						
Male	48 (14%)	154 (21%)	0.01	86 (23%)	68 (19%)	0.21
Female	288 (86%)	594 (79%)		297 (78%)	297 (81%)	
Age†						
median (IQR)	44 (34 - 54)	43 (31- 54)	0.21	35 (25 - 45)	50 (41- 61)	< 0.001
BMI†						
median (IQR)	26.2 (23.0 – 30.0)	28.0 (24.0 - 31.2)	0.002	26.2 (23.0 - 30.0)	29.0 (25.4 - 32.2)	< 0.001
Smoke‡						
No	211 (63%)	490 (66%)	0.16	259 (68%)	231 (63%)	0.03
Yes	125 (37%)	238 (32%)		105 (27%)	133 (36%)	
Pre-BD FEV1% predicted†						
median (IQR)	87.1 (80.0 – 96.0)	75.0 (61.0 – 86.1)	< 0.001	83.0 (72.2 – 91.2)	64.0 (51.5 – 76.0)	< 0.001
Post-BD FEV1% predicted†						
median (IQR)	90.0 (83.0 – 98.1)	81.0 (68.0 – 90.2)	< 0.001	88.0 (79.3 – 95.1)	71.4 (59.0 – 82.0)	< 0.001
Post-FEV1/FVC% predicted†						
median (IQR)	105.0 (99.0 – 109.0)	94.0 (82.0 – 102.3)	< 0.001	101.2 (94.4 – 106.1)	84.0 (74.0 – 93.0)	< 0.001
SPT for at least one mite, cockroach or fungus‡						
Negative	180 (54%)	226 (30%)	< 0.001	105 (27%)	121 (33%)	0.004
Positive	79 (24%)	391 (52%)		229 (60%)	162 (44%)	
Specific IgE at least one allergen tested‡						
Negative	67 (20%)	168 (23%)	0.03	86 (23%)	82 (23%)	0.93
Positive	81 (24%)	306 (41%)		158 (41%)	148 (41%)	
Total IgE dosage†						
median (IQR)	118.5 (33.7 0 – 340.8)	271.0 (106.0– 527.4)	< 0.001	226.0 (90.2 – 540.5)	312.4 (135.3 – 514.0)	0.04
Eosinophil count†						
median (IQR)	151 (92 – 242)	241 (133 – 387)	< 0.001	230 (128 – 397)	248 (142 – 380)	0.29

‡: Qui-quadrado; †: Mann-Whitney test; BMI: body mass index; IQR: interquartile range; BD: bronchodilator; FEV1: forced expiratory volume in 1 second; SPT: skin prick test.

Table 2 shows the characterization of the eleven SNPs associated with the asthma or atopy in this study. A total of four SNPs were explored in *OXA1L* gene, all were significantly associated with at least one variable studied. Two of these polymorphisms are missense variants. Fourteen SNPs from the *DAD1* gene were studied and seven of them were significantly associated with at least one study variable evaluated herein. All *DAD1* SNPs are located in the non-coding region of the gene.

Table 2: Characterization of the significant SNPs associated with asthma and atopy in the *DAD1* and *OXA1L* genes.

Gene	SNP	Alt/Ref	HWE	MAF			RegulomeDB		Functional[2]		Prediction[3,4]
				PROAR	AFR[1]	EUR[1]	Rank	Score	Annotation	Consequence	
OXA1L	rs116761683	G/A	0.24	0.09	0.08	0	5	0.13	3 Prime UTR Variant	-	-
	rs17619	A/G	0.87	0.2	0.29	0.03	4	0.61	Missense Variant	Val [**G**TA] > Ile [**A**TA]	0.11 tolerated
	rs200470407	C/T	1	0.21	0.02	0.16	5	0.81	Synonymous Variant	Pro [CC**T**] > Pro [CC**C**]	-
	rs8572	G/A	0.15	0.28	0.37	0.15	4	0.74	Missense Variant	Ala [G**C**A] > Val [G**T**A]	0.00 tolerated
DAD1	rs1051101	A/G	0.46	0.23	0.17	0.22	1f	0.55	5 Prime UTR Variant	-	-
	rs1681577	C/A	0.71	0.3	0.42	0.16	2b	0.35	Intron Variant	-	-
	rs5742742	A/G	1	0.11	0.16	0.06	5	0.61	Intron Variant	-	-
	rs5742761	C/G	0.16	0.36	0.09	0.08	4	0.61	Intron Variant	-	-
	rs5742803	G/A	1	0.19	0.08	0.38	6	0.31	Intron Variant	-	-
	rs61972400	A/G	1	0.14	0.1	0.03	6	0	Intron Variant	-	-
	rs76050305	C/A	1	0.14	0.05	0.02	6	0.14	Intron Variant	-	-

1: ALFA project; 2: National Center for Biotechnology Information (NCBI); 3: Prediction of Functional Effects of Human nsSNPs (PolyPhen-2); 4: Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT). SNP: single nucleotide polymorphism; Alt: alternative allele; Ref: reference allele; HWE: hady-weinberg equlibrium; MAF: minor allele frequency; AFR: african; EUR: european.

Fig. 1 shows the linkage disequilibrium (LD) analysis between the studied SNPs in the *DAD1* and *OXA1L* genes. There is perfect linkage disequilibrium between the rs76050305 and rs61972400 SNPs in the *DAD1* gene with R^2 value equal to 1.0 (100%). No other polymorphism studied showed a degree of disequilibrium above 0.8 (80%).

Table 3 shows the significant associations between *OXA1L* polymorphisms with asthma and allergy markers. The rs8572 polymorphism was negatively associated with asthma (OR: 0.62, CI: 0.39 - 0.99) in the recessive model. The rs200470407 was negatively associated (OR: 0.32, CI: 0.10 - 0.99) with poor asthma control in the

dominant model. The SNPs rs116761683 and rs17619 were positively associated with lack of reversibility in asthma in the additive model (OR: 1.51, CI: 1.0 - 2.3; OR: 1.43, CI: 1.06 - 1.93) and in the dominant model (OR: 1.44, CI: 1.0 - 2.1). These polymorphisms were also negatively associated with positive SPT in the additive and dominant models for rs116761683 (OR: 0.66, CI: 0.48 - 0.91; OR: 0.65, CI: 0.45 - 0.92) and in the recessive model for rs17619 (OR: 0.46, CI: 0.23 - 0.93). The rs116761683 was also positively associated with blood eosinophilia (OR: 3.31, CI: 1.1 - 9.98) in the recessive model.

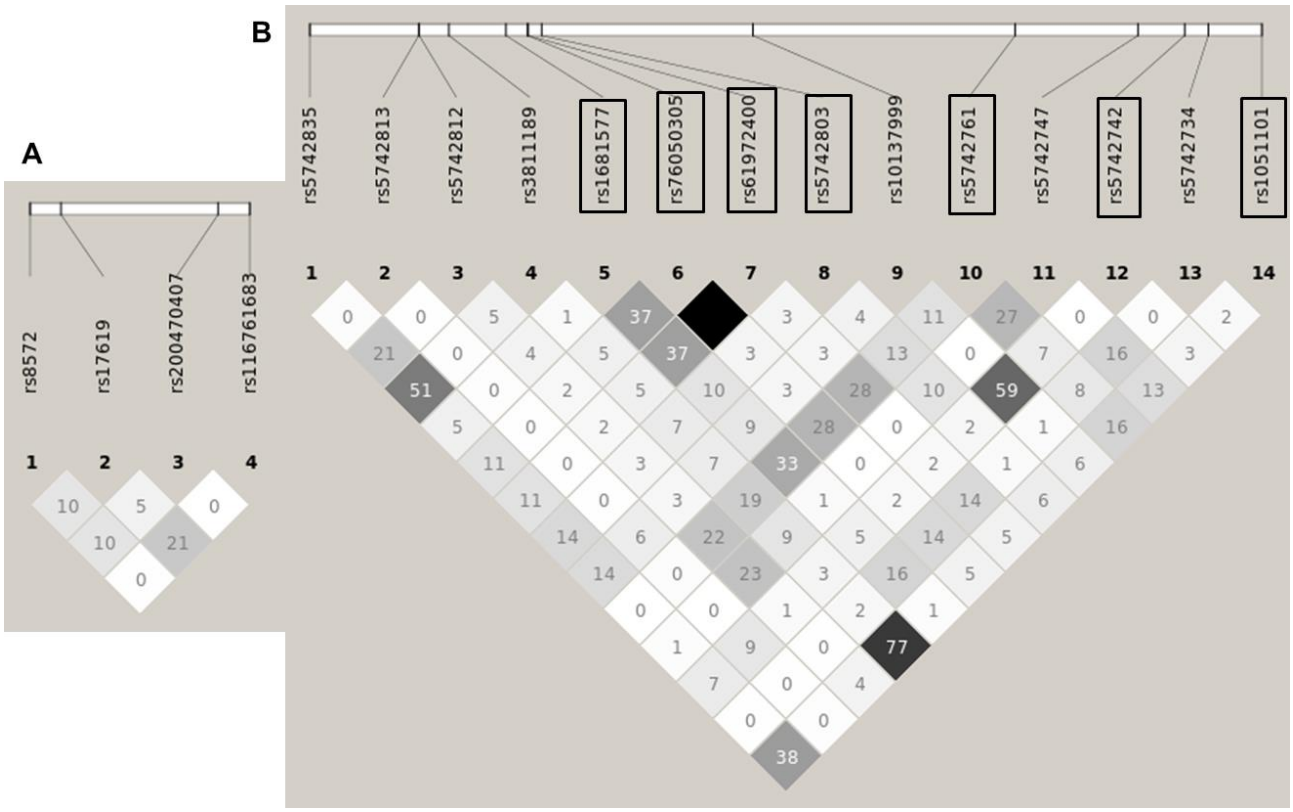


Fig. 1. R^2 significance analysis of the LD plot performed with Haploview software of four SNPs in *OXA1L*. (A) and fourteen SNPs in *DAD1* (B) in the ProAR population. The colors of each square vary according to the degree of LD, with total balance in the white color with a value of R^2 equal to zero and total imbalance in the black color with a value of R^2 equal to one. The different shades of gray show an intermediate imbalance with R^2 value > 0 and < 0.8. The top bar indicates the physical location of each variant.

Table 4 shows the significant associations between *DAD1* polymorphisms with asthma and allergy markers. The rs1681577 polymorphism was positively associated with asthma severity (OR: 2.23, CI: 1.21 - 4.12) in the recessive model, pulmonary obstruction (OR: 2.19, CI: 1.01 - 4.72) in the dominant model, and blood eosinophilia (OR: 1.79, CI: 1.16 - 2.75) in the dominant model. The rs61972400 and rs76050305 polymorphisms were also positively associated with pulmonary obstruction (OR: 2.59,

CI: 1.12 - 6.0; OR: 2.59, CI: 1.12 - 6.0) in the dominant model and rs5742742 was also positively associated with blood eosinophilia (OR: 3.14, CI: 1.14 - 8.63) in the recessive model. rs1051101 was positively associated with poor asthma control (OR: 2.8, CI: 1.1 - 7.32) in the recessive model. rs5742761 was negatively associated with specific IgE (OR: 0.7, CI: 0.5 - 0.98) in the dominant model. And the rs5742803 polymorphism was negatively associated with high total IgE levels in the additive (OR: 0.76, CI: 0.61 - 0.96) and dominant (OR: 0.71, CI: 0.54 - 0.93) models.

Table 3: Significant associations between *OXA1L* SNPs, asthma, and atopy markers using logistic regression adjusted for ancestry markers and other covariates.

SNP	Model	Genotype	Controls n (%)	Cases n (%)	OR (95% CI)	p value (p perm)
No asthma X Mild asthma and Severe asthma[1,3,5,6]						
rs8572	Recessive	AA+GA	300 (89%)	700 (94%)	0.62 (0.39 - 0.99)	0.045 (0.049)
		GG	36 (11%)	48 (6%)		
Controlled severe asthma X Uncontrolled severe asthma[1,6]						
rs200470407	Dominant	TT	28 (61%)	77 (66%)	0.32 (0.10 - 0.99)	0.049 (0.034)
		CT+CC	18 (39%)	39 (34%)		
With reversibility X No reversibility[1,6]						
rs116761683	Aditive	AA	182 (84.2%)	669 (80.6%)	1.51 (1.0 - 2.3)	0.047 (0.049)
		GA	33 (15.3%)	147 (17.7%)		
		GG	1 (0.5%)	14 (1.7%)		
rs17619	Aditive	GG	148 (68%)	519 (62%)	1.43 (1.06 - 1.93)	0.019 (0.015)
		AG	60 (28%)	273 (33%)		
		AA	8 (4%)	39 (5%)		
	Dominant	GG	148 (68%)	519 (62%)	1.44 (1.0 - 2.1)	0.046 (0.04)
		AG+AA	68 (32%)	312 (38%)		
No eosinophilia X With eosinophilia[1,2,3,6]						
rs116761683	Recessive	AA+GA	651 (99.2%)	394 (97.5%)	3.31 (1.1 - 9.98)	0.033 (0.021)
		GG	5 (0.8%)	10 (2.5%)		
Negative SPT X Positive SPT[1,2,3,4,6]						
rs116761683	Aditive	AA	312 (78%)	389 (85%)	0.66 (0.48 - 0.91)	0.011 (0.014)
		GA	79 (20%)	64 (14%)		
		GG	9 (2%)	5 (1%)		
	Dominant	AA	312 (78%)	389 (85%)	0.65 (0.45 - 0.92)	0.016 (0.019)
		GA+GG	88 (22%)	69 (15%)		
rs17619	Recessive	GG+AG	377 (94%)	445 (97%)	0.46 (0.23 - 0.93)	0.031 (0.026)
		AA	24 (6%)	13 (3%)		

1: ancestry markers; 2: adjusted for age; 3: adjusted for sex; 4: adjusted for smoke; 5: adjusted for BMI; 6: adjusted for FEV1; SNP: single nucleotide polymorphism; OR: odds ratio; SPT: skin prick test.

A higher plasma level of IL-13 and higher serum total IgE was found in asthmatic subjects with AG+AA genotype for rs17619 in *OXA1L* compared to GG subjects (Fig. 2A and 3B). The rs200470407 CT+CC genotype was associated with increased plasma IL-13 levels in comparison to TT subjects (Fig. 2B), while the rs8572 GG genotype was associated with decreased plasma IL-13 levels in comparison to GA+AA individuals with asthma (Fig. 2C).

Table 4: Significant associations between *DAD1* SNPs, asthma, and atopy markers using logistic regression adjusted for ancestry markers and other covariates.

SNP	Model	Genotype	Controls (%)	Cases (%)	OR (95% CI)	p value (p perm)
Mild asthma X Severe asthma[1,2,4,5,6]						
rs1681577	Recessive	AA+CA	341 (93.7%)	320 (88%)	2.23 (1.21 - 4.12)	0.01 (0.016)
		CC	23 (6.3%)	44 (12%)		
Controlled and Partially controlled severe asthma X Uncontrolled severe asthma[1,6]						
rs1051101	Recessive	GG+AG	236 (96.7%)	105 (91.3%)	2.8 (1.1 - 7.32)	0.036 (0.03)
		AA	8 (3.3%)	10 (8.7%)		
No obstruction X With obstruction[1,2,6]						
rs1681577	Dominant	AA	472 (48%)	27 (42.9%)	2.19 (1.01 - 4.72)	0.046 (0.041)
		CA+**CC**	512 (52%)	36 (57.1%)		
rs61972400	Dominant	GG	730 (74.2%)	44 (69.8%)	2.59 (1.12 - 6.0)	0.026 (0.031)
		AG+AA	254 (25.8%)	19 (30.2%)		
rs76050305	Dominant	AA	729 (74.2%)	44 (69.8%)	2.59 (1.12 - 6.0)	0.026 (0.031)
		CA+**CC**	254 (25.8%)	19 (30.2%)		
No eosinophilia X With eosinophilia[1,2,3,6]						
rs1681577	Recessive	AA+CA	605 (92.2%)	358 (88.4%)	1.79 (1.16 - 2.75)	0.008 (0.01)
		CC	51 (7.8%)	47 (11.6%)		
rs5742742	Recessive	GG+AG	650 (99.1%)	393 (97%)	3.14 (1.14 - 8.63)	0.026 (0.018)
		AA	6 (0.9%)	12 (3%)		
Negative specific IgE X Positive specific IgE[1]						
rs5742761	Dominant	GG	81 (34.6%)	165 (42.6%)	0.7 (0.5 - 0.98)	0.04 (0.042)
		CG+CC	153 (65.4%)	222 (57.4%)		
Low total IgE X High total IgE[1,2,3,6]						
rs5742803	Aditive	AA	284 (61.6%)	408 (69.3%)	0.76 (0.61 - 0.96)	0.019 (0.033)
		GA	155 (33.6%)	157 (26.7%)		
		GG	22 (4.8%)	23 (4%)		
rs5742803	Dominant	AA	284 (61.6%)	408 (69.3%)	0.71 (0.54 - 0.93)	0.013 (0.014)
		GA+GG	177 (38.4%)	180 (30.7%)		

1: ancestry markers; 2: adjusted for age; 3: adjusted for sex; 4: adjusted for smoke; 5: adjusted for BMI; 6: adjusted for FEV1; SNP: single nucleotide polymorphism; OR: odds ratio; SPT: skin prick test.

The AA genotype of rs5742742 in *DAD1* was associated with increased plasma IL-13 levels in comparison to GG individuals (Fig. 2D), whereas the AA genotype of this polymorphism was associated with increased total serum IgE in comparison to GG + AG individuals (Fig. 3C). The CC genotype for rs1681577 was associated with increased eosinophils in the blood of individuals with asthma in comparison to CA+AA carriers (Fig. 2E). Higher total serum IgE levels were found in asthmatic subjects with the GA+GG genotype for the rs116761683 in *OXA1L* in comparison to AA genotype (Fig. 3A). The allele C of rs5742803 in *DAD1* was associated with a decrease in serum total IgE in GA+GG genotype in comparison to AA genotype (Fig. 3D).

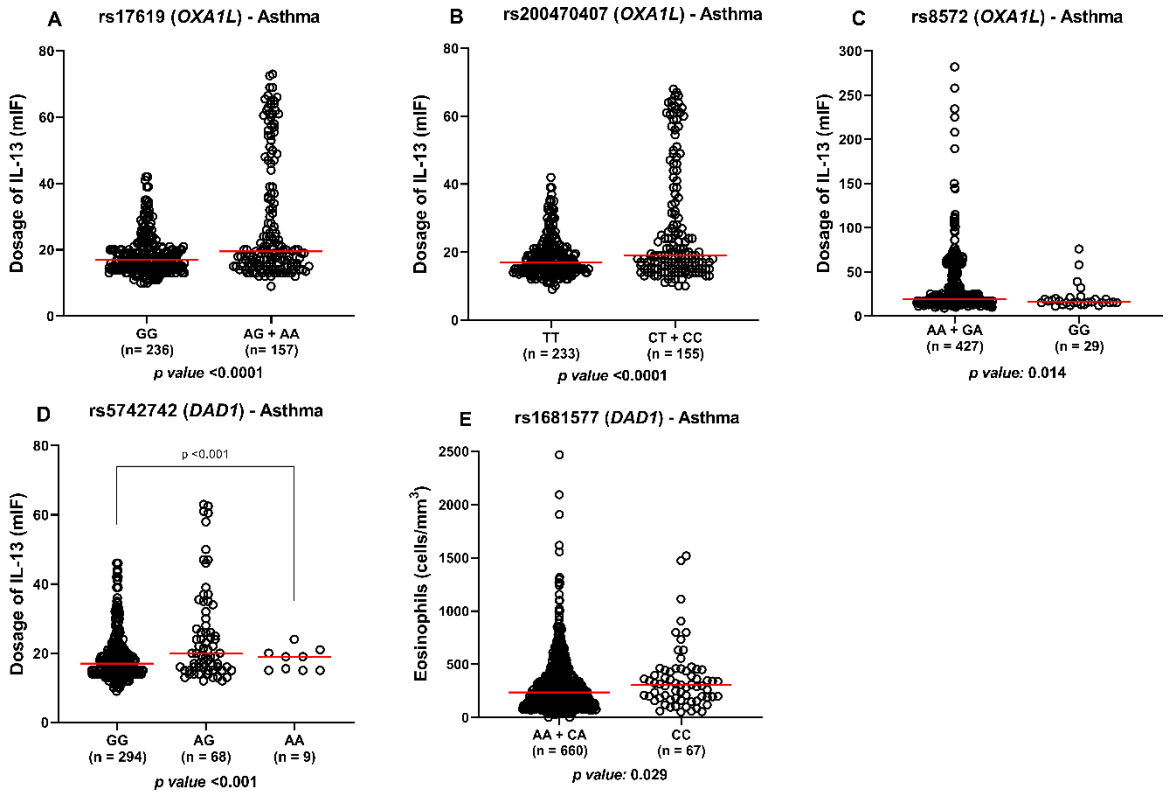


Fig. 2. Number of eosinophils per mm^3 in the blood and dosage of IL-13 in the plasma of asthmatic individuals according to genotypes of SNPs in *OXA1L* and *DAD1*. In the scatter plot, the red bar represents the median according to each genotype and the graph points represent the values of each individual. A: IL-13 dosage according to rs17619 genotypes (GG: median = 19.5, IQR = 14.0 - 20.4; AA+AG: median = 17.0, IQR = 15.0 - 38.0). B: IL-13 dosage according to rs200470407 genotypes (TT: median = 17.0, IQR = 14.0 - 20.0; CT+CC: median = 19.0, IQR = 15.0 - 34.5). C: IL-13 dosage according to rs8572 genotypes (AA+GA: median = 18.0, IQR = 14.0 - 22.0; GG: median = 15.8, IQR = 14.5 - 19.0). D: IL-13 dosage according to rs5742742 genotypes (GG: median = 17.0, IQR = 14.0 - 20.0); AG: median = 20.0, IQR = 16.0 - 31.5; AA: median = 19.0, IQR = 15.0 - 20.5). E: eosinophil count according to rs1681577 genotypes (AA+CA: median = 237, IQR = 130 - 381; CC: median = 309, IQR = 186 - 444). Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used.

Figure 4 shows the multi-tissue eQTL comparison heatmap according to *OXA1L* and *DAD1* SNPs taken from the Gtex v.9 portal in lung tissue, blood, and skin. The SNP with m-value greater than 0.9 has more evidence of affecting gene expression. The rs8572 had the greatest impact on skin tissue (m-value = 1.00 and 0.99); the rs1681577 had impact on all analyzed tissues; the rs5742761 had a greater impact on blood (m-value = 1.00); and the SNPs rs61972400 and rs76050305 had a greater impact on lung tissue and skin.

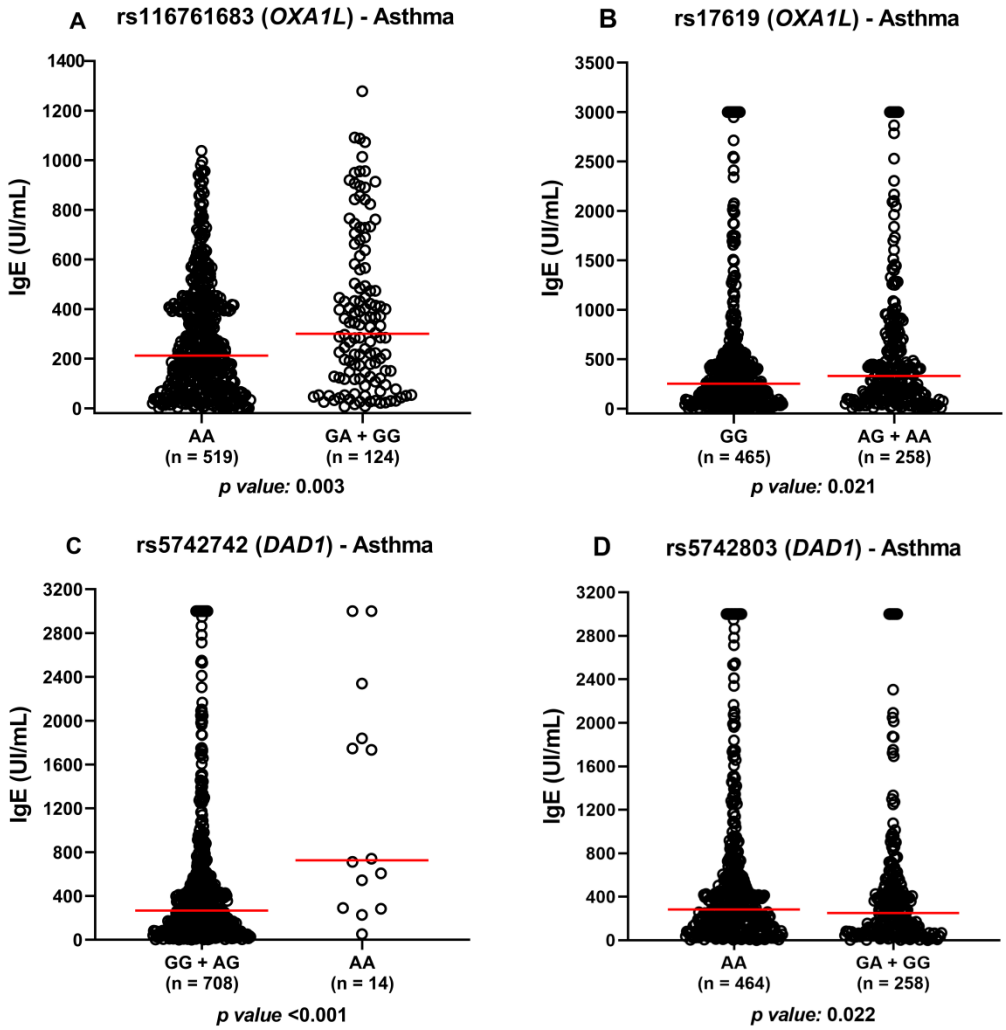


Fig. 3. Total IgE dosage in the serum of asthmatic individuals according to SNPs genotypes in *OXA1L* and *DAD1*. In the scatter plot, the red bar represents the median according to each genotype and the graph points represent the values of each individual. A: total IgE dosage according to rs116761683 genotypes (AA: median = 212.00, IQR = 86.1 - 410.0; GA+GG: median = 330.0, IQR = 119.0 - 564.1). B: total IgE dosage according to rs17619 genotypes (GG: median = 251.9, IQR = 101.7 - 480.5; AG+AA: median = 330.5, IQR: 122.3 - 679.1). C: total IgE dosage according to rs5742742 genotypes (GG+AG: median = 267.4, IQR = 104.5 - 509.0; AA: median = 725.8, IQR = 287.7 - 1964.0). D: total IgE dosage according to rs5742803 genotypes (AA: median = 283.2, IQR = 125.3 - 556.6; GA+GG: median = 249.9, IQR = 74.2 - 476.1). Mann-Whitney tests were used.

Figure 5 shows *DAD1* and *OXA1L* expression data obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) in bronchial biopsy samples (GSE76227) and airway epithelium (GSE67472) from controls and asthmatics with different categories. *DAD1* expression in bronchial biopsies from severe asthmatics was higher than its expression in moderate asthmatics (Fig. 5A) and was higher in epithelial cells from asthmatics compared to controls (Figs. 5C e 5D). The expression of *OXA1L* in bronchial biopsies was higher in severe asthmatics not using oral corticosteroids compared to severe asthmatics using oral corticosteroids (Fig. 5B).

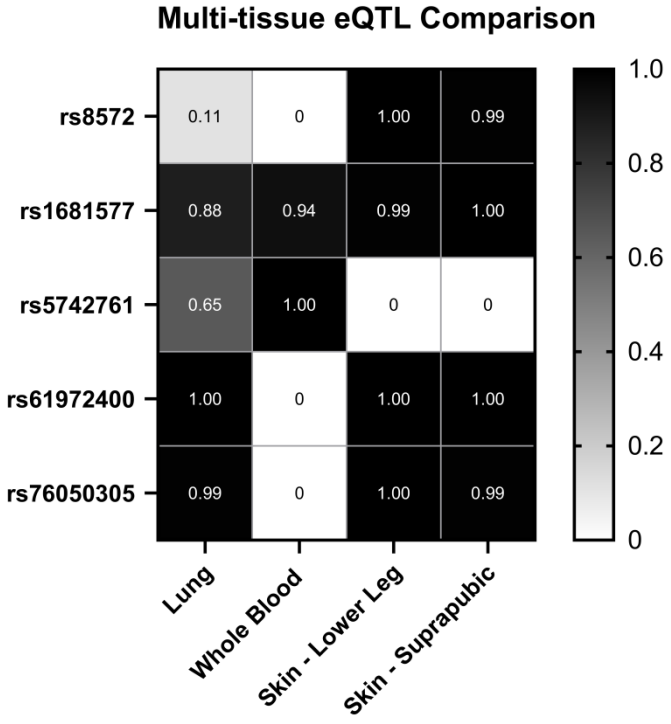


Fig. 4. Multi-tissue eQTL comparison heatmap. Each square represents the m-value according to the Gtex portal for each SNP in *OXA1L* and *DAD1* for lung, blood, and skin tissues.

Figure 6 shows the expression of rs5742761 in *DAD1* according to their genotypes. The CC genotype is associated with a decreased gene expression in blood tissue compared to CG and GG genotypes.

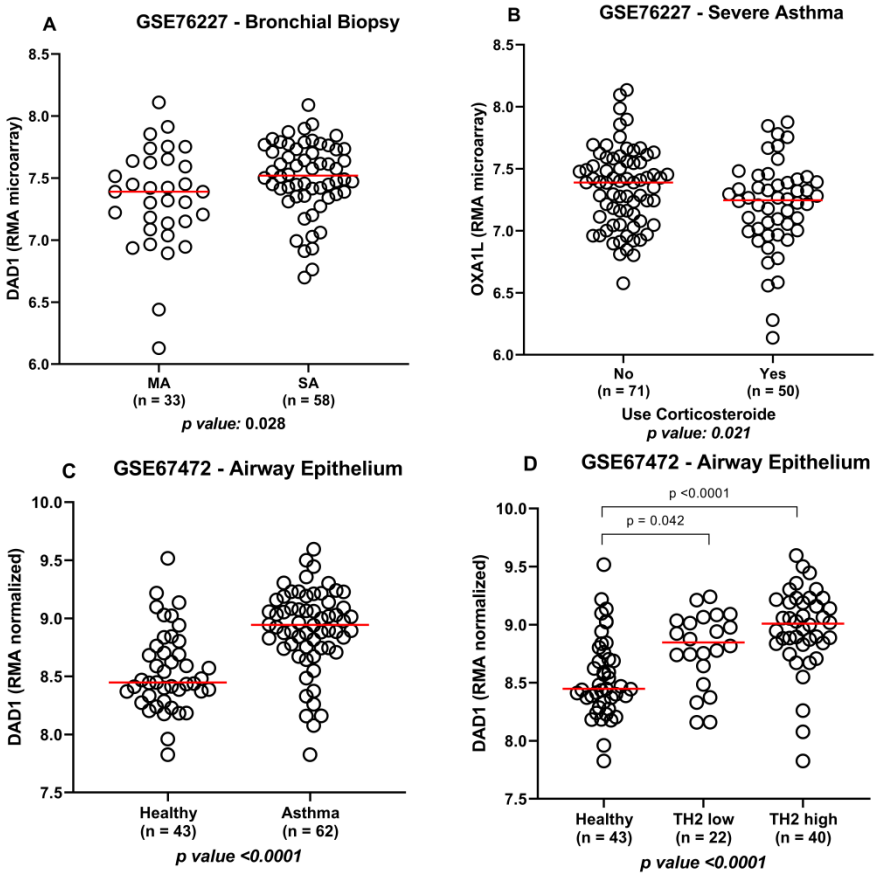


Fig. 5. *DAD1* and *OXA1L* expression profile in lung tissues. A: Comparison of *DAD1* expression in bronchial biopsy of patients with moderate and severe asthma from GSE76227. B: Comparison of *OXA1L* expression in bronchial biopsy of patients with severe asthma from GSE76227 according to the use of oral corticosteroids. C: Comparison of *DAD1* expression in the airway epithelium of healthy and asthmatic patients from GSE67472. D: Comparison of *DAD1* expression in the airway epithelium of healthy and asthmatic patients from GSE67472 according to the subdivision of asthma into Th2 low and Th2 high.

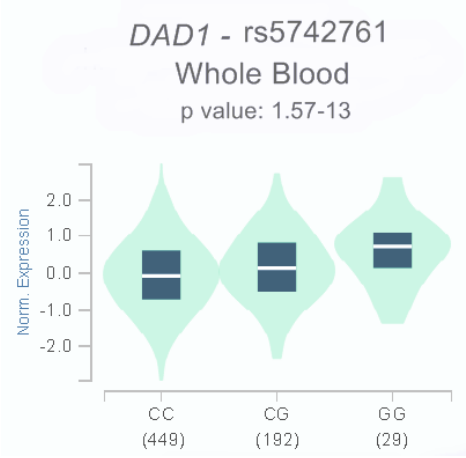


Fig. 6. Human tissue expression *in silico* by genotypes of rs5742761 in the *DAD1* gene. The presence of the C allele of rs5742761 decreased gene expression in whole blood tissue.

DISCUSSION

The interest in *DAD1* and *OXA1L* has been initially directed by our previous genome wide approach conducted by (Costa et al., 2015), when a variant found in the intergenic region between *DAD1* and *OXA1L* on chromosome 14 was identified linked to asthma in children in Brazil. Later on, we have identified several genetic polymorphisms in such genes associated with asthma, its severity and atopy markers in the same Brazilian children (Pires et al., 2018).

Since the previous studies were conducted in a pediatric, population-based study, in the present work, we intent to verify if such polymorphisms linked to asthma symptoms in children could be also play a role in adult asthma and severe cases of asthma with the participants of Brazilian severe asthma cohort, the ProAR study (Cruz et al., 2020).

Variants in *DAD1* and *OXA1L* never explored before in asthma context were included in this study as well very well phenotype subjects in terms of clinical, exposures and genetic data was used herein.

One of the variants previously described as a risk factor for allergic conditions (Pires et al., 2018), the missense rs8572 variant, was negatively associated with asthma in this study. The polymorphic allele of this variant decreases the production of IL-13, which corroborates with a lower risk for asthma. Missense mutations are found in protein coding regions and can alter the structure, stability and function of proteins, leading to various human diseases (Deák & Cook, 2022). Furthermore, rs8572 was shown to have the ability to influence *OXA1L* expression in skin tissues (Figure 4).

The alternative allele of rs17619 was positively associated with lack of reversibility in asthma in addition to having elevated levels of total IgE. This SNP also showed an increase in the production of the cytokine IL-13, although it was also negatively associated with the skin prick test. Previously, this same variant was described as having a negative association with spontaneous IFN-y production (Pires et al., 2018).

The IL-13 cytokine plays an important role in the pathophysiology of asthma by inducing goblet cell metaplasia, increases mucus secretion, increases airway hyperreactivity and, indirectly, induces the eosinophil traffic to the site of tissue injury by chemotaxis (Doran et al., 2017). Increased IL-13 expression in the lung also results in alveolar remodeling through IL-13 activation of proteolytic pathways (Fulkerson et

al., 2006). Studies also indicate that increased production of this cytokine is related to a secondary drop in nasal airflow and increased symptoms of nasal obstruction (Campion et al., 2023).

rs116761683 was positively associated with an increase in the number of eosinophils and with a lack of reversibility in spirometers parameters, in addition to an elevated level of total IgE. Furthermore, this variant showed a negative association with the skin prick test for common regional aero-allergens.

The alternative allele of rs200470407 seems to be a protective factor for asthma control. However, carriers of this variant have a higher expression of IL-13, compared to those that do not have the polymorphism. It is still unclear how polymorphisms associated with atopic variables such as total IgE and IL-13, present in the blood, may also prove to be a protective factor for skin allergens reactivity. A previous study carried out by (Bianchi et al., 2011), also demonstrated a counterpoint between positivity for SPT while the same patients were negative for IgE. Based on these data, it is possible to assume that despite having similar immunological mechanisms, as it is a local skin test, the skin prick test does not represent the lung tissue so reliably.

Our study also showed increased expression of the *OXA1L* gene in individuals with severe asthma not using corticosteroids in bronchial biopsy tissue (Figure 5B). In our previous study we tried to access *OXA1L* expression among asthmatics in comparison to health individuals, although we found a slight increased difference among asthmatics, that difference was not statistically significant (Pires et al., 2018).

Although there are no studies linking the molecular role of *OXA1L* in asthma and atopy, recent discoveries have shown that *OXA1L* is required for the assembly of multiple respiratory chain complexes in mitochondria (Thompson et al., 2018). Furthermore, there is considerable overlap between the pathophysiology of asthma and mitochondrial biology in aspects of oxidative stress, calcium ion homeostasis and also apoptosis (Mabalirajan & Ghosh, 2013). Mitochondria may contribute to pathological lung injury by participating in the activation of pro-inflammatory signaling pathways (Hough et al., 2018).

A recent study showed that the *OXA1L* gene was downregulated in diabetic retinopathy (DR). Downregulation of the *OXA1L* gene may indicate that mitochondrial ATP synthesis was associated with the pathogenesis and development of DR (Xu et al., 2023).

Zheng et al., (2023) demonstrated that the *OXA1L* gene, among other genes, is entirely related to cuproptosis and had a significant difference in its expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) compared to normal tissues(Zheng et al., 2023). Cuproptosis is a new type of copper-induced cell death that differs from other types of programmed cell death (P. Sun et al., 2022).

The *OXA1L* gene was revealed to be a new pathway involved in nociception and may provide new insights to better understand the genetic mechanisms of inflammatory pain and serve as models for validation of therapeutic targets and drug development (Wotton et al., 2022). Furthermore, the significant association between *OXA1L* expression and HNSC progression indicated that this gene may have a potential role as a diagnostic, therapeutic and prognostic biomarker for cancer (Zheng et al., 2023).

These findings allow us to hypothesize that *OXA1L* may also be involved in the pathogenesis of asthma and atopy, since some of its single nucleotide variants are associated with these conditions. However, there is still much to understand about how *OXA1L* polymorphisms present a mixed profile of trends to some associations.

DAD1 variants were also associated with the phenotypes evaluated in our study. Previous investigations have shown that *DAD1* is present in the genome of humans, mice, chickens and other species, and that this gene is expressed at varying levels in all tissues (N. a Hong et al., 1997; K. Wang et al., 1997). The *DAD1* gene has been known for at least two decades its anti-apoptotic activity and previous experiments showed that *DAD1* is necessary for cell viability in several tissues (Nakashima et al., 1993; Silberstein et al., 1995).

The alternative allele of rs1681577 was associated with risk for asthma, airway obstruction and eosinophilia. Furthermore, in whole blood samples there was an increased number of eosinophils in individuals with the polymorphic allele. The important role that eosinophils play in the pathophysiology of asthma and atopy is well established in the literature, and asthma even has a specific phenotype characterized as eosinophilic asthma (Strauss et al., 2023).

This variant has also a high influence on the expression of the *DAD1* gene (Figure 4), which can be further confirmed by the potential role in regulating the transcription of this gene, since its score on the RegulomeDB portal was 2b, as shown in Table 2 rs1681577 was first described to be associated with asthma in our previous

study with a child population. However, in this study, this same SNP showed a negative association with asthma (Pires et al., 2018).

Similarly, the alternative allele of rs1051101 was positively associated with poor asthma control. This polymorphism had never been described until in 2018 when our group has described an association with the risk of spontaneous IL-13 production (Pires et al., 2018). The rs1051101 also has a score of 1f on the RegulomeDB portal, which points to a potential role in the regulation of *DAD1* gene transcription.

The rs76050305 and rs61972400 variants had their polymorphic alleles positively associated with airway obstruction. Furthermore, these same SNPs have a high influence on *DAD1* expression (Figure 4). The fact that they are associated with the same phenotype can perhaps be explained, at least in part, that both are in 100% linkage disequilibrium. Which means that they have a huge probability of being inherited together, thus making an even greater risk for individuals who have both polymorphisms. Airway obstruction is a well-known clinical sign in the manifestations of asthma attacks. For this reason, asthmatic individuals, in order to inhibit the occurrence of obstruction, commonly use bronchodilator drugs, given the risk and consequences that this obstruction can cause (Visser et al., 2023).

The rs5742742 polymorphism had its alternative allele associated with a higher risk of eosinophilia. Individuals carrying this polymorphic allele showed higher production of IL-13 and total IgE compared to individuals carrying the wild-type allele (Figure 2D and 3C). Taken together, these data allow us to hypothesize the relevance of this polymorphism in atopic conditions. IgE antibodies act by binding to mast cells and basophils, which contain histamine granules that are released in the reaction causing the common clinical signs seen in bronchial asthma and allergic conditions (Justiz Vaillant et al., 2023).

The SNPs rs5742761 and rs5742803 had their polymorphic alleles negatively associated with atopy markers. rs5742761 has been associated as a protective factor for specific IgE production. Furthermore, this polymorphism has a high influence on the expression of the *DAD1* gene (Figure 4), which corroborates with the decrease in *DAD1* expression in whole blood as seen in (Figure 6). The rs5742803 in the logistic regression analyzes proved to be a protective factor for the production of total IgE and, in experiments where we measured the levels of total IgE in the blood, in fact, individuals who have the polymorphic allele had lower levels of this antibody.

Although the alternative alleles of these two variants are associated as a protective factor for atopy, we can assume that the wild-type alleles may be associated with the risk of developing these conditions.

In gene expression analyses, *DAD1* was shown to have higher expression in severe asthmatic subjects in bronchial biopsy tissue and airway epithelial tissue compared to subjects with moderate asthma (Figure 5A and C). Similarly, *DAD1* also showed a higher expression in subjects with high Th2 asthma compared to healthy subjects and low Th2 (Figure 5D).

It is not the first time that increased expression of *DAD1* has been associated with pathological conditions. In our previous study, the *DAD1* gene also showed increased expression in asthmatic individuals compared to healthy individuals in a Real-Time-PCR assay (Pires et al., 2018). Other studies have also shown high levels of *DAD1* expression in neutrophils from patients with sepsis after multiple traumas, perineural prostate cancer cells (Ayala et al., 2004; Paunel-Görgülü et al., 2012; True et al., 2006). High levels of *DAD1* expression have also been determined in chronic lymphocytic leukemia (Schnormeier et al., 2020). However, as far as we know, the concrete mechanism remains unclear. Future experimental assays in a murine model of allergic asthma with knockout animals for *DAD1* and *OXA1L* could be extremely useful in better understanding the mechanisms and functional impact of these genes on asthma and allergy.

As *DAD1* is a negative regulator of apoptosis, the anti-apoptotic function of *DAD1* may represent potential advantages for tumor cells, allowing them to proliferate infinitely (Luo et al., 2021). Similarly, we can hypothesize that the anti-apoptotic function of *DAD1* may represent potential advantages for the inflammatory cells involved in the pathophysiology of asthma, contributing to the exacerbation of the disease.

The investigation of epigenetic mechanisms in *DAD1* and *OXA1L* could elucidate the role of these genes in asthma and atopy through epigenetic modification influenced by the environment or by genetic variants that can alter the DNA sequence, impacting gene transcription, making the role increasingly clear. of genetics and epigenetics in such conditions.

Although these two genes have distinct immunobiological functions, it is possible to assume that both may have a joint impact on certain diseases, since the induction of endoplasmic reticulum (ER) stress alters mitochondrial bioenergetics,

making it dysfunctional and directly influences apoptosis (Larson-Casey et al., 2020). Our previous study demonstrated that *DAD1* genotypes with *OXA1L* were associated with increased risk of susceptibility to asthma when the alleles that acted as risk factors were presented together (Pires et al., 2018).

Our findings in light of the literature suggest that the association of genetic variants of *DAD1* and *OXA1L* in this study may influence complex and common diseases such as allergies and asthma.

REFERENCES

Ayala, G. E., Dai, H., Ittmann, M., Li, R., Powell, M., Frolov, A., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., & Rowley, D. (2004). Growth and Survival Mechanisms Associated with Perineural Invasion in Prostate Cancer. *Cancer Research*, *64*(17), 6082–6090. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0838

Bianchi, A., Di Rienzo Businco, A., Bondanini, F., Mistrello, G., Carlucci, A., & Tripodi, S. (2011). Rosaceae-associated exercise-induced anaphylaxis with positive SPT and negative IgE reactivity to Pru p 3. *European annals of allergy and clinical immunology*, *43*(4), 122–124.

Boulet, L.-P., Reddel, H. K., Bateman, E., Pedersen, S., FitzGerald, J. M., & O'Byrne, P. M. (2019). The Global Initiative for Asthma (GINA): 25 years later. *European Respiratory Journal*, *54*(2), 1900598. https://doi.org/10.1183/13993003.00598-2019

Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., Karczewski, K. J., Park, J., Hitz, B. C., Weng, S., Cherry, J. M., & Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, *22*(9), 1790–1797. https://doi.org/10.1101/gr.137323.112

Campion, N. J., Villazala-Merino, S., Thwaites, R. S., Stanek, V., Fd, H. K., Pertsinidou, E., Zghaebi, M., Toth, J., Fröschl, R., Perkmann, T., Gangl, K., Schneider, S., Ristl, R., Scott, I. C., Cohen, E. S., Molin, M., Focke-Tejkl, M., Regelsberger, G., Hansel, T. T., … Niederberger-Leppin, V. (2023). Nasal IL-13 production identifies patients with late phase allergic responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.06.026

Christenson, S. A., Steiling, K., van den Berge, M., Hijazi, K., Hiemstra, P. S., Postma, D. S., Lenburg, M. E., Spira, A., & Woodruff, P. G. (2015). Asthma–COPD Overlap. Clinical Relevance of Genomic Signatures of Type 2 Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *191*(7), 758–766. https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1458OC

Costa, G. N. O., Dudbridge, F., Fiaccone, R. L., da Silva, T. M., Conceição, J. S., Strina, A., Figueiredo, C. A., Magalhães, W. C. S., Rodrigues, M. R., Gouveia, M. H., Kehdy, F. S. G., Horimoto, A. R. V. R., Horta, B., Burchard, E. G., Pino-Yanes, M., Del Rio Navarro, B., Romieu, I., Hancock, D. B., London, S., … Barreto, M. L. (2015). A genome-wide association study of asthma symptoms in Latin American children. *BMC Genetics*, *16*(1), 141. https://doi.org/10.1186/s12863-015-0296-7

Cruz, A. A., Riley, J. H., Bansal, A. T., Ponte, E. V., Souza-Machado, A., Almeida, P. C. A., Biao-Lima, V., Davis, M., Bates, S., Adcock, I. M., Sterk, P. J., Chung, K. F., Alcantara-Neves, N., Almeida, P. C. A., Amorim, L., Araujo, M. I., Barnes, K. C., Barreto, M. L., Belitardo, E., … Wilson, S. J. (2020). Asthma similarities across ProAR (Brazil) and U-BIOPRED (Europe) adult cohorts of contrasting locations, ethnicity and socioeconomic status. *Respiratory Medicine*, *161*, 105817. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.105817

Dankowski, T., Schröder, T., Möller, S., Yu, X., Ellinghaus, D., Bär, F., Fellermann, K., Lehnert, H., Schreiber, S., Franke, A., Sina, C., Ibrahim, S. M., & König, I. R. (2016). Male-specific association between MT-ND4 11719 A/G polymorphism and ulcerative colitis: A mitochondria-wide genetic association study. *BMC Gastroenterology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12876-016-0509-1

Daya, M., Rafaels, N., Brunetti, T. M., Chavan, S., Levin, A. M., Shetty, A., Gignoux, C. R., Boorgula, M. P., Wojcik, G., Campbell, M., Vergara, C., Torgerson, D. G., Ortega, V. E., Doumatey, A., Johnston, H. R., Acevedo, N., Araujo, M. I., Avila, P. C., Belbin, G., … Yazdanbakhsh, M. (2019). Association study in African-admixed populations

across the Americas recapitulates asthma risk loci in non-African populations. *Nature Communications*, *10*(1), 880. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08469-7

Deák, G., & Cook, A. G. (2022). Missense Variants Reveal Functional Insights Into the Human ARID Family of Gene Regulators. *Journal of Molecular Biology*, *434*(9), 167529. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167529

Dharmage, S. C., Perret, J. L., & Custovic, A. (2019). Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Frontiers in Pediatrics*, *7*. https://doi.org/10.3389/fped.2019.00246

Di Cicco, M., D'Elios, S., Peroni, D. G., & Comberiati, P. (2020). The role of atopy in asthma development and persistence. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, *20*(2), 131–137. https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000627

Doran, E., Cai, F., Holweg, C. T. J., Wong, K., Brumm, J., & Arron, J. R. (2017). Interleukin-13 in Asthma and Other Eosinophilic Disorders. *Frontiers in Medicine*, *4*. https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00139

Fulkerson, P. C., Fischetti, C. A., Hassman, L. M., Nikolaidis, N. M., & Rothenberg, M. E. (2006). Persistent Effects Induced by IL-13 in the Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *35*(3), 337–346. https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0474OC

Gautam, Y., Afanador, Y., Ghandikota, S., & Mersha, T. B. (2020). Comprehensive functional annotation of susceptibility variants associated with asthma. *Human Genetics*, *139*(8), 1037–1053. https://doi.org/10.1007/s00439-020-02151-5

Herrmann, J. M., & Neupert, W. (2003). Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. Em *IUBMB Life* (Vol. 55, Números 4–5, p. 219–225). https://doi.org/10.1080/1521654031000123349

Hildenbeutel, M., Habib, S. J., Herrmann, J. M., & Rapaport, D. (2008). New insights into the mechanism of precursor protein insertion into the mitochondrial membranes. *International review of cell and molecular biology*, *268*(08), 147–190. https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00805-8

Hong, N. a, Cado, D., Mitchell, J., Ortiz, B. D., Hsieh, S. N., & Winoto, a. (1997). A targeted mutation at the T-cell receptor alpha/delta locus impairs T-cell development and reveals the presence of the nearby antiapoptosis gene Dad1. *Molecular and cellular biology*, *17*(4), 2151–2157. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Hough, K. P., Trevor, J. L., Strenkowski, J. G., Wang, Y., Chacko, B. K., Tousif, S., Chanda, D., Steele, C., Antony, V. B., Dokland, T., Ouyang, X., Zhang, J., Duncan, S. R., Thannickal, V. J., Darley-Usmar, V. M., & Deshane, J. S. (2018). Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox Biology*, *18*, 54–64. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.009

Jesus, J. P. V. de, Lima-Matos, A. S., Almeida, P. C. A., Lima, V. B., Mello, L. M. de, Souza-Machado, A., Ponte, E. V., & Cruz, Á. A. (2018). Obesity and asthma: clinical and laboratory characterization of a common combination. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, *44*(3), 207–212. https://doi.org/10.1590/s1806-37562017000000034

Justiz Vaillant, A. A., Vashisht, R., & Zito, P. M. (2023). *Immediate Hypersensitivity Reactions*.

Kabesch, M., & Tost, J. (2020). Recent findings in the genetics and epigenetics of asthma and allergy. *Seminars in Immunopathology*, *42*(1), 43–60. https://doi.org/10.1007/s00281-019-00777-w

Kasela, S., Ortega, V. E., Martorella, M., Garudadri, S., Nguyen, J., Ampleford, E., Pasanen, A., Nerella, S., Buschur, K. L., Barjaktarevic, I. Z., Barr, R. G., Bleecker, E. R., Bowler, R. P., Comellas, A. P., Cooper, C. B., Couper, D. J., Criner, G. J., Curtis,

J. L., Han, M. K., … Christenson, S. A. (2021). Genetic and non-genetic factors affecting the expression of COVID-19-relevant genes in the large airway epithelium. *Genome Medicine*, *13*(1), 66. https://doi.org/10.1186/s13073-021-00866-2

Lambrecht, B. N., Hammad, H., & Fahy, J. V. (2019). The Cytokines of Asthma. *Immunity*, *50*(4), 975–991. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.018

Larson-Casey, J. L., He, C., & Carter, A. B. (2020). Mitochondrial quality control in pulmonary fibrosis. *Redox Biology*, *33*, 101426. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101426

Leite, M., Ponte, E. V., Petroni, J., D'Oliveira Júnior, A., Pizzichini, E., & Cruz, Á. A. (2008). Avaliação do questionário de controle da asma validado para uso no Brasil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, *34*(10), 756–763. https://doi.org/10.1590/S1806-37132008001000002

Lima, L. C., Cruz, Á. A., Costa, R. dos S., Silva, H. dos S., Coelho, R. S., Teixeira, H. M. P., Oliveira, P. R. S., Barnes, K. C., Figueiredo, C. A., & Carneiro, V. L. (2023). TSLP and IL25 variants are related to asthma and atopy. *Gene Reports*, *30*, 101727. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101727

Lima-Matos, A., Ponte, E. V., de Jesus, J. P. V., Almeida, P. C. A., Lima, V. B., Kwon, N., Riley, J., de Mello, L. M., & Cruz, Á. A. (2018). Eosinophilic asthma, according to a blood eosinophil criterion, is associated with disease severity and lack of control among underprivileged urban Brazilians. *Respiratory Medicine*, *145*, 95–100. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.10.025

Loureiro, C. C., Amaral, L., Ferreira, J. A., Lima, R., Pardal, C., Fernandes, I., Semedo, L., & Arrobas, A. (2018). Omalizumab for Severe Asthma: Beyond Allergic Asthma. *BioMed Research International*, *2018*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2018/3254094

Luo, Y., Wu, Y., Huang, H., Yi, N., & Chen, Y. (2021). Emerging role of BAD and DAD1 as potential targets and biomarkers in cancer (Review). *Oncology Letters*, *22*(6), 811. https://doi.org/10.3892/ol.2021.13072

Mabalirajan, U., & Ghosh, B. (2013). Mitochondrial Dysfunction in Metabolic Syndrome and Asthma. *Journal of Allergy*, *2013*, 1–12. https://doi.org/10.1155/2013/340476

Marques, C. P. C., Bloise, R. F., Lopes, L. B. M., Godói, L. F., Souza, P. R. P. de, Rosa, I. M. S., Costa, S. de S., Barros, M. C., Souza, A. C. L. de, & Carvalho, B. M. M. de. (2022). Epidemiologia da Asma no Brasil, no período de 2016 a 2020. *Research, Society and Development*, *11*(8), e5211828825. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.28825

Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S., & Nishimoto, T. (1993). Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(10), 6367–6374. https://doi.org/10.1128/MCB.13.10.6367

Paunel-Görgülü, A., Kirichevska, T., Lögters, T., Windolf, J., & Flohé, S. (2012). Molecular Mechanisms Underlying Delayed Apoptosis in Neutrophils from Multiple Trauma Patients with and without Sepsis. *Molecular Medicine*, *18*(3), 325–335. https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00380

Perotin, J.-M., Schofield, J. P. R., Wilson, S. J., Ward, J., Brandsma, J., Strazzeri, F., Bansal, A., Yang, X., Rowe, A., Corfield, J., Lutter, R., Shaw, D. E., Bakke, P. S., Caruso, M., Dahlén, B., Fowler, S. J., Horváth, I., Howarth, P., Krug, N., … Djukanović, R. (2019). Epithelial dysregulation in obese severe asthmatics with gastro-oesophageal reflux. *European Respiratory Journal*, *53*(6), 1900453. https://doi.org/10.1183/13993003.00453-2019

Pires, A. de O., Queiroz, G. de A., de Jesus Silva, M., da Silva, R. R., da Silva, H. B. F., Carneiro, N. V. Q., Fonseca, H. F., de Santana, M. B. R., Nascimento, R. S.,

Alcântara-Neves, N. M., Costa, G. N. de O., Costa, R. dos S., Barreto, M. L., & Figueiredo, C. A. (2018). Polymorphisms in the DAD1 and OXA1L genes are associated with asthma and atopy in a South American population. *Molecular Immunology*, *101*, 294–302. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.07.014

Riera Romo, M. (2021). Cell death as part of innate immunity: Cause or consequence? *Immunology*, *163*(4), 399–415. https://doi.org/10.1111/imm.13325

Schnormeier, A.-K., Pommerenke, C., Kaufmann, M., Drexler, H. G., & Koeppel, M. (2020). Genomic deregulation of PRMT5 supports growth and stress tolerance in chronic lymphocytic leukemia. *Scientific Reports*, *10*(1), 9775. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66224-1

Shaw, D. E., Sousa, A. R., Fowler, S. J., Fleming, L. J., Roberts, G., Corfield, J., Pandis, I., Bansal, A. T., Bel, E. H., Auffray, C., Compton, C. H., Bisgaard, H., Bucchioni, E., Caruso, M., Chanez, P., Dahlén, B., Dahlen, S.-E., Dyson, K., Frey, U., … Chung, K. F. (2015). Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. *European Respiratory Journal*, *46*(5), 1308–1321. https://doi.org/10.1183/13993003.00779-2015

Silberstein, S., Collins, P. G., Kelleher, D. J., & Gilmore, R. (1995). The essential OST2 gene encodes the 16-kD subunit of the yeast oligosaccharyltransferase, a highly conserved protein expressed in diverse eukaryotic organisms. *Journal of Cell Biology*, *131*(2), 371–383. https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.371

Strauss, R., Leflein, H., Kolesar, A., & Hammel, J. (2023). Long-Term Efficacy and Safety Among Patients with Severe Eosinophilic Asthma Treated with Mepolizumab and its Effect on Small Airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2023.08.010

Sun, P., Xu, H., Zhu, K., Li, M., Han, R., Shen, J., Xia, X., Chen, X., Fei, G., Zhou, S., & Wang, R. (2022). The cuproptosis related genes signature predicts the prognosis and correlates with the immune status of clear cell renal cell carcinoma. *Frontiers in Genetics*, *13*. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1061382

Teixeira, H. M. P., Alcantara-Neves, N. M., Barreto, M., Figueiredo, C. A., & Costa, R. S. (2017). Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. *Molecular Immunology*, *82*, 137–145. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.001

Thompson, K., Mai, N., Oláhová, M., Scialó, F., Formosa, L. E., Stroud, D. A., Garrett, M., Lax, N. Z., Robertson, F. M., Jou, C., Nascimento, A., Ortez, C., Jimenez-Mallebrera, C., Hardy, S. A., He, L., Brown, G. K., Marttinen, P., McFarland, R., Sanz, A., … Taylor, R. W. (2018). *<scp>OXA</scp> 1L* mutations cause mitochondrial encephalopathy and a combined oxidative phosphorylation defect. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(11). https://doi.org/10.15252/emmm.201809060

True, L., Coleman, I., Hawley, S., Huang, C.-Y., Gifford, D., Coleman, R., Beer, T. M., Gelmann, E., Datta, M., Mostaghel, E., Knudsen, B., Lange, P., Vessella, R., Lin, D., Hood, L., & Nelson, P. S. (2006). A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(29), 10991–10996. https://doi.org/10.1073/pnas.0603678103

Visser, E., de Jong, K., van Zutphen, T., Kerstjens, H. A. M., & ten Brinke, A. (2023). Muscle Function in Moderate to Severe Asthma: Association With Clinical Outcomes and Inflammatory Markers. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *11*(5), 1439-1447.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.12.043

Wallace, D. C., & Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. Em *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 5, Número 11). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220

Wang, K., Gan, L., Kuo, C. L., & Hood, L. (1997). A highly conserved apoptotic suppressor gene is located near the chicken T-cell receptor alpha chain constant region. *Immunogenetics*, *46*(5), 376–382.

Wotton, J. M., Peterson, E., Flenniken, A. M., Bains, R. S., Veeraragavan, S., Bower, L. R., Bubier, J. A., Parisien, M., Bezginov, A., Haselimashhadi, H., Mason, J., Moore, M. A., Stewart, M. E., Clary, D. A., Delbarre, D. J., Anderson, L. C., D'Souza, A., Goodwin, L. O., Harrison, M. E., … White, J. K. (2022). Identifying genetic determinants of inflammatory pain in mice using a large-scale gene-targeted screen. *Pain*, *163*(6), 1139–1157. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002481

Xu, W., Liang, Y., Zhuang, Y., & Yuan, Z. (2023). Identification of miRNA-mRNA Regulatory Networks associated with Diabetic Retinopathy using Bioinformatics Analysis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, *23*. https://doi.org/10.2174/1871530323666230419081351

Zhang, X.-Y., Simpson, J. L., Powell, H., Yang, I. A., Upham, J. W., Reynolds, P. N., Hodge, S., James, A. L., Jenkins, C., Peters, M. J., Lin, J.-T., & Gibson, P. G. (2014). Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clinical & Experimental Allergy*, *44*(9), 1137–1145. https://doi.org/10.1111/cea.12345

Zheng, X., Zhang, C., Zheng, D., Guo, Q., Maierhaba, M., Xue, L., Zeng, X., Wu, Y., & Gao, W. (2023). An original cuproptosis-related genes signature effectively influences the prognosis and immune status of head and neck squamous cell carcinoma. *Frontiers in Genetics*, *13*. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1084206

5 CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, demonstramos que polimorfismos presentes em *DAD1* e *OXA1L* estão associados a asma e marcadores de atopia em indivíduos adultos. Além disso, estes genes demonstram ser um fator de risco ou proteção para essas condições e impactam a produção de citocinas e de IgE.

Previamente já foram realizados estudos com camundongos knockout dos genes *DAD1* e *OXA1L*. Nosso grupo de pesquisa já possui um protocolo experimental padronizado de asma alérgica em modelo murino (Machado et al., 2015). Futuros ensaios com animais knockout para os genes *DAD1* e *OXA1L* e investigações de mecanismos epigenéticos, poderiam ser extremamente úteis na melhor compreensão dos mecanismos e impacto funcional destes genes na asma e alergia. Ademais, nossos resultados podem contribuir com pesquisas futuras que se proponham a entender mais profundamente como estes genes influenciam nestas condições.

REFERÊNCIAS

Agache, I., Eguiluz-Gracia, I., Cojanu, C., Laculiceanu, A., Giacco, S., Zemelka-Wiacek, M., Kosowska, A., Akdis, C. A., & Jutel, M. (2021). Advances and highlights in asthma in 2021. *Allergy*, *76*(11), 3390–3407. https://doi.org/10.1111/all.15054

Alhazmi, S., Aljahdli, B., Farsi, R., Alharbi, M., Algothmi, K., Alburae, N., Ganash, M., Azhari, S., Basingab, F., Almuhammadi, A., Alqosaibi, A., Alkhatabi, H., Elaimi, A., Jan, M., Aldhalaan, H., Alyoubi, R., Alrafiah, A., & Alrofaidi, A. (2022). The correlation between copy number variation in Chromosome 14 and DNA methylation in Saudi autistic children. *European review for medical and pharmacological sciences*, *26*(21), 7866–7882. https://doi.org/10.26355/eurrev_202211_30138

Alizadeh, Z., Mortaz, E., Adcock, I., & Moin, M. (2017). Role of Epigenetics in the Pathogenesis of Asthma. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, *16*(2), 82–91.

Al-Zayadneh, E. M., Alnawaiseh, N. A., Altarawneh, A. H., Aldmour, I. H., Albataineh, E. M., Al-Shagahin, H., Alharazneh, A., & Alzayadneh, E. (2019). Sensitization to inhaled allergens in asthmatic children in southern Jordan: a cross-sectional study. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, *14*(1), 37. https://doi.org/10.1186/s40248-019-0199-y

Asher, I., & Pearce, N. (2014). Global burden of asthma among children. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, *18*(11), 1269–1278. https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0170

Ayala, G. E., Dai, H., Ittmann, M., Li, R., Powell, M., Frolov, A., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., & Rowley, D. (2004). Growth and Survival Mechanisms Associated with Perineural Invasion in Prostate Cancer. *Cancer Research*, *64*(17), 6082–6090. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0838

Bara, I., Ozier, A., Tunon de Lara, J.-M., Marthan, R., & Berger, P. (2010). Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *The European respiratory journal*, *36*(5), 1174–1184. https://doi.org/10.1183/09031936.00019810

Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, *1863*(5), 1066–1077. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010

Bianchi, A., Di Rienzo Businco, A., Bondanini, F., Mistrello, G., Carlucci, A., & Tripodi, S. (2011). Rosaceae-associated exercise-induced anaphylaxis with positive SPT and negative IgE reactivity to Pru p 3. *European annals of allergy and clinical immunology*, *43*(4), 122–124.

Bonnefoy, N., Fiumera, H. L., Dujardin, G., & Fox, T. D. (2009). Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochimica et biophysica acta*, *1793*(1), 60–70. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.004

Boonpiyathad, T., Sözener, Z. C., Satitsuksanoa, P., & Akdis, C. A. (2019). Immunologic mechanisms in asthma. *Seminars in immunology*, *46*, 101333. https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101333

Boulet, L.-P., Reddel, H. K., Bateman, E., Pedersen, S., FitzGerald, J. M., & O'Byrne, P. M. (2019). The Global Initiative for Asthma (GINA): 25 years later. *European Respiratory Journal*, *54*(2), 1900598. https://doi.org/10.1183/13993003.00598-2019

Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., Karczewski, K. J., Park, J., Hitz, B. C., Weng, S., Cherry, J. M., & Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, *22*(9), 1790–1797. https://doi.org/10.1101/gr.137323.112

Bradley, M., Kockum, I., Söderhäll, C., Van Hage-Hamsten, M., Luthman, H., Nordenskjöld, M., & Wahlgren, C. F. (2000). Characterization by phenotype of families with atopic dermatitis. *Acta dermato-venereologica*, *80*(2), 106–110.

Brandon, M., Baldi, P., & Wallace, D. C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, *25*(34), 4647–4662. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209607

Breuer, M. E., Willems, P. H. G. M., Smeitink, J. A. M., Koopman, W. J. H., & Nooteboom, M. (2013). Cellular and animal models for mitochondrial complex I deficiency: a focus on the NDUFS4 subunit. *IUBMB life*, *65*(3), 202–208. https://doi.org/10.1002/iub.1127

Brewster, J. L., Martin, S. L., Toms, J., Goss, D., Wang, K., Zachrone, K., Davis, A., Carlson, G., Hood, L., & Coffin, J. D. (2000). Deletion of Dad1 in mice induces an apoptosis-associated embryonic death. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *26*(4), 271–278.

Brusselle, G., & Bracke, K. (2014). Targeting Immune Pathways for Therapy in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of the American Thoracic Society*, *11*(Supplement 5), S322–S328. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201403-118AW

Busby, J., Holweg, C. T. J., Chai, A., Bradding, P., Cai, F., Chaudhuri, R., Mansur, A. H., Lordan, J. L., Matthews, J. G., Menzies-Gow, A., Niven, R., Staton, T., & Heaney, L. G. (2019). Change in type-2 biomarkers and related cytokines with prednisolone in uncontrolled severe oral corticosteroid dependent asthmatics: an interventional open-label study. *Thorax*, *74*(8), 806–809. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212709

Busse, W. W., Melén, E., & Menzies-Gow, A. N. (2022). Holy Grail: the journey towards disease modification in asthma. *European Respiratory Review*, *31*(163), 210183. https://doi.org/10.1183/16000617.0183-2021

Campion, N. J., Villazala-Merino, S., Thwaites, R. S., Stanek, V., Fd, H. K., Pertsinidou, E., Zghaebi, M., Toth, J., Fröschl, R., Perkmann, T., Gangl, K., Schneider, S., Ristl, R., Scott, I. C., Cohen, E. S., Molin, M., Focke-Tejkl, M., Regelsberger, G., Hansel, T. T., … Niederberger-Leppin, V. (2023). Nasal IL-13 production identifies patients with late phase allergic responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.06.026

CDCP EUA. (2021). *Dados mais recentes sobre asma*. Centros de Controle e Prevenção de Doenças.

Chandel, N. S. (2014). Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biology*, *12*(1), 34. https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-34

Chen, M., Shepard, K., Yang, M., Raut, P., Pazwash, H., Holweg, C. T. J., & Choo, E. (2021). Overlap of allergic, eosinophilic and type 2 inflammatory subtypes in moderate-to-severe asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, *51*(4), 546–555. https://doi.org/10.1111/cea.13790

Christenson, S. A., Steiling, K., van den Berge, M., Hijazi, K., Hiemstra, P. S., Postma, D. S., Lenburg, M. E., Spira, A., & Woodruff, P. G. (2015). Asthma–COPD Overlap. Clinical Relevance of Genomic Signatures of Type 2 Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *191*(7), 758–766. https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1458OC

Comuzzie, A. G., Cole, S. A., Laston, S. L., Voruganti, V. S., Haack, K., Gibbs, R. A., & Butte, N. F. (2012). Novel Genetic Loci Identified for the Pathophysiology of Childhood Obesity in the Hispanic Population. *PLoS ONE*, *7*(12), e51954. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051954

Costa, G. N. O., Dudbridge, F., Fiaccone, R. L., da Silva, T. M., Conceição, J. S., Strina, A., Figueiredo, C. A., Magalhães, W. C. S., Rodrigues, M. R., Gouveia, M. H., Kehdy, F. S. G., Horimoto, A. R. V. R., Horta, B., Burchard, E. G., Pino-Yanes, M., Del Rio Navarro, B., Romieu, I., Hancock, D. B., London, S., … Barreto, M. L. (2015). A genome-wide association study of asthma symptoms in Latin American children. *BMC Genetics*, *16*(1), 141. https://doi.org/10.1186/s12863-015-0296-7

Cruz, A. A., Riley, J. H., Bansal, A. T., Ponte, E. V., Souza-Machado, A., Almeida, P. C. A., Biao-Lima, V., Davis, M., Bates, S., Adcock, I. M., Sterk, P. J., Chung, K. F., Alcantara-Neves, N., Almeida, P. C. A., Amorim, L., Araujo, M. I., Barnes, K. C., Barreto, M. L., Belitardo, E., … Wilson, S. J. (2020). Asthma similarities across ProAR (Brazil) and U-BIOPRED (Europe) adult cohorts of contrasting locations, ethnicity and socioeconomic status. *Respiratory Medicine*, *161*, 105817. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.105817

Dankowski, T., Schröder, T., Möller, S., Yu, X., Ellinghaus, D., Bär, F., Fellermann, K., Lehnert, H., Schreiber, S., Franke, A., Sina, C., Ibrahim, S. M., & König, I. R. (2016). Male-specific association between MT-ND4 11719 A/G polymorphism and ulcerative colitis: A mitochondria-wide genetic association study. *BMC Gastroenterology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12876-016-0509-1

Daya, M., Rafaels, N., Brunetti, T. M., Chavan, S., Levin, A. M., Shetty, A., Gignoux, C. R., Boorgula, M. P., Wojcik, G., Campbell, M., Vergara, C., Torgerson, D. G., Ortega, V. E., Doumatey, A., Johnston, H. R., Acevedo, N., Araujo, M. I., Avila, P. C., Belbin, G., … Yazdanbakhsh, M. (2019). Association study in African-admixed populations across the Americas recapitulates asthma risk loci in non-African populations. *Nature Communications*, *10*(1), 880. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08469-7

Deák, G., & Cook, A. G. (2022). Missense Variants Reveal Functional Insights Into the Human ARID Family of Gene Regulators. *Journal of Molecular Biology*, *434*(9), 167529. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167529

Dharmage, S. C., Perret, J. L., & Custovic, A. (2019). Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Frontiers in Pediatrics*, *7*. https://doi.org/10.3389/fped.2019.00246

Di Cicco, M., D'Elios, S., Peroni, D. G., & Comberiati, P. (2020). The role of atopy in asthma development and persistence. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, *20*(2), 131–137. https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000627

Dileepan, M., Sarver, A. E., Rao, S. P., Panettieri, R. A., Subramanian, S., & Kannan, M. S. (2016). MicroRNA Mediated Chemokine Responses in Human Airway Smooth Muscle Cells. *PloS one*, *11*(3), e0150842. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150842

Doran, E., Cai, F., Holweg, C. T. J., Wong, K., Brumm, J., & Arron, J. R. (2017). Interleukin-13 in Asthma and Other Eosinophilic Disorders. *Frontiers in Medicine*, *4*. https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00139

Dunn, R. M., Busse, P. J., & Wechsler, M. E. (2018). Asthma in the elderly and late-onset adult asthma. *Allergy*, *73*(2), 284–294. https://doi.org/10.1111/all.13258

Edfors-Lubs, M. L. (1971). Allergy in 7000 twin pairs. *Acta allergologica*, *26*(4), 249–285. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1971.tb01300.x

Fatemifar, G., Hoggart, C. J., Paternoster, L., Kemp, J. P., Prokopenko, I., Horikoshi, M., Wright, V. J., Tobias, J. H., Richmond, S., Zhurov, A. I., Toma, A. M., Pouta, A., Taanila, A., Sipila, K., Lähdesmäki, R., Pillas, D., Geller, F., Feenstra, B., Melbye, M., … Evans, D. M. (2013). Genome-wide association study of primary tooth eruption identifies pleiotropic loci associated with height and craniofacial distances. *Human Molecular Genetics*, *22*(18), 3807–3817. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt231

Fehrenbach, H., Wagner, C., & Wegmann, M. (2017). Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell and Tissue Research*, *367*(3), 551–569. https://doi.org/10.1007/s00441-016-2566-8

Fernando, R., Foster, J. S., Bible, A., Ström, A., Pestell, R. G., Rao, M., Saxton, A., Baek, S. J., Yamaguchi, K., Donnell, R., Cekanova, M., & Wimalasena, J. (2007). Breast Cancer Cell Proliferation Is Inhibited by BAD. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(39), 28864–28873. https://doi.org/10.1074/jbc.M700785200

Fu, X., Li, M., Tang, C., Huang, Z., & Najafi, M. (2021). Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, *26*(11–12), 561–573. https://doi.org/10.1007/s10495-021-01689-7

Fulkerson, P. C., Fischetti, C. A., Hassman, L. M., Nikolaidis, N. M., & Rothenberg, M. E. (2006). Persistent Effects Induced by IL-13 in the Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *35*(3), 337–346. https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0474OC

Gautam, Y., Afanador, Y., Ghandikota, S., & Mersha, T. B. (2020). Comprehensive functional annotation of susceptibility variants associated with asthma. *Human Genetics*, *139*(8), 1037–1053. https://doi.org/10.1007/s00439-020-02151-5

GBD. (2018). O Relatório Global sobre Asma 2018. *Estudo Carga Global de Doenças*.

Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(11), 6715–6719. https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715

Hallmayer, J., Faraco, J., Lin, L., Hesselson, S., Winkelmann, J., Kawashima, M., Mayer, G., Plazzi, G., Nevsimalova, S., Bourgin, P., Hong, S.-C., Honda, Y., Honda, M., Högl, B., Longstreth, W. T., Montplaisir, J., Kemlink, D., Einen, M., Chen, J., … Mignot, E. (2009). Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nature Genetics*, *41*(6), 708–711. https://doi.org/10.1038/ng.372

Haque, M. E., Elmore, K. B., Tripathy, A., Koc, H., Koc, E. C., & Spremulli, L. L. (2010). Properties of the C-terminal tail of human mitochondrial inner membrane protein Oxa1L and its interactions with mammalian mitochondrial ribosomes. *The Journal of biological chemistry*, *285*(36), 28353–28362. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148262

Harris, J. M., Cullinan, P., Williams, H. C., Mills, P., Moffat, S., White, C., & Newman Taylor, A. J. (2001). Environmental associations with eczema in early life. *The British journal of dermatology*, *144*(4), 795–802. https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04135.x

Heaney, L. G., Busby, J., Hanratty, C. E., Djukanovic, R., Woodcock, A., Walker, S. M., Hardman, T. C., Arron, J. R., Choy, D. F., Bradding, P., Brightling, C. E., Chaudhuri, R., Cowan, D. C., Mansur, A. H., Fowler, S. J., Niven, R. M., Howarth, P. H., Lordan, J. L., Menzies-Gow, A., … Yang, F. (2021). Composite type-2 biomarker strategy versus a symptom–risk-based algorithm to adjust corticosteroid dose in patients with severe asthma: a multicentre, single-blind, parallel group, randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, *9*(1), 57–68. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30397-0

Herrmann, J. M., & Neupert, W. (2003). Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. Em *IUBMB Life* (Vol. 55, Números 4–5, p. 219–225). https://doi.org/10.1080/1521654031000123349

Hildenbeutel, M., Habib, S. J., Herrmann, J. M., & Rapaport, D. (2008). New insights into the mechanism of precursor protein insertion into the mitochondrial membranes. *International review of cell and molecular biology*, *268*(08), 147–190. https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00805-8

Hong, N. a, Cado, D., Mitchell, J., Ortiz, B. D., Hsieh, S. N., & Winoto, a. (1997). A targeted mutation at the T-cell receptor alpha/delta locus impairs T-cell development and reveals the presence of the nearby antiapoptosis gene Dad1. *Molecular and cellular biology*, *17*(4), 2151–2157. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Hong, N. A., Flannery, M., Hsieh, S. N., Cado, D., Pedersen, R., & Winoto, A. (2000). Mice lacking Dad1, the defender against apoptotic death-1, express abnormal N-linked glycoproteins and undergo increased embryonic apoptosis. *Developmental biology*, *220*(1), 76–84. https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9615

Hong, N. A., Kabra, N. H., Hsieh, S. N., Cado, D., & Winoto, A. (1999). In vivo overexpression of Dad1, the defender against apoptotic death-1, enhances T cell proliferation but does not protect against apoptosis. *Journal of immunology*, *163*(4), 1888–1893. https://doi.org/ji_v163n4p1888 [pii]

Hough, K. P., Trevor, J. L., Strenkowski, J. G., Wang, Y., Chacko, B. K., Tousif, S., Chanda, D., Steele, C., Antony, V. B., Dokland, T., Ouyang, X., Zhang, J., Duncan, S. R., Thannickal, V. J., Darley-Usmar, V. M., & Deshane, J. S. (2018). Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox Biology*, *18*, 54–64. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.009

Jackson, D. J., Humbert, M., Hirsch, I., Newbold, P., & Garcia Gil, E. (2020). Ability of Serum IgE Concentration to Predict Exacerbation Risk and Benralizumab Efficacy for Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *Advances in Therapy*, *37*(2), 718–729. https://doi.org/10.1007/s12325-019-01191-2

Jaffer, O. A., Carter, A. B., Sanders, P. N., Dibbern, M. E., Winters, C. J., Murthy, S., Ryan, A. J., Rokita, A. G., Prasad, A. M., Zabner, J., Kline, J. N., Grumbach, I. M., & Anderson, M. E. (2015). Mitochondrial-targeted antioxidant therapy decreases transforming growth factor-β-mediated collagen production in a murine asthma model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *52*(1), 106–115. https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0519OC

Jesus, J. P. V. de, Lima-Matos, A. S., Almeida, P. C. A., Lima, V. B., Mello, L. M. de, Souza-Machado, A., Ponte, E. V., & Cruz, Á. A. (2018). Obesity and asthma:

clinical and laboratory characterization of a common combination. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, *44*(3), 207–212. https://doi.org/10.1590/s1806-37562017000000034

Jones, B. L., & Rosenwasser, L. J. (2016). Linkage and Genetic Association in Severe Asthma. *Immunology and allergy clinics of North America*, *36*(3), 439–447. https://doi.org/10.1016/j.iac.2016.03.002

Justiz Vaillant, A. A., Vashisht, R., & Zito, P. M. (2023). *Immediate Hypersensitivity Reactions*.

Kabesch, M., & Tost, J. (2020). Recent findings in the genetics and epigenetics of asthma and allergy. *Seminars in Immunopathology*, *42*(1), 43–60. https://doi.org/10.1007/s00281-019-00777-w

Kalinauskaite-Zukauske, V., Januskevicius, A., Janulaityte, I., Miliauskas, S., & Malakauskas, K. (2019). Expression of eosinophil β chain-signaling cytokines receptors, outer-membrane integrins, and type 2 inflammation biomarkers in severe non-allergic eosinophilic asthma. *BMC Pulmonary Medicine*, *19*(1), 158. https://doi.org/10.1186/s12890-019-0904-9

Kasela, S., Ortega, V. E., Martorella, M., Garudadri, S., Nguyen, J., Ampleford, E., Pasanen, A., Nerella, S., Buschur, K. L., Barjaktarevic, I. Z., Barr, R. G., Bleecker, E. R., Bowler, R. P., Comellas, A. P., Cooper, C. B., Couper, D. J., Criner, G. J., Curtis, J. L., Han, M. K., … Christenson, S. A. (2021). Genetic and non-genetic factors affecting the expression of COVID-19-relevant genes in the large airway epithelium. *Genome Medicine*, *13*(1), 66. https://doi.org/10.1186/s13073-021-00866-2

Kelleher, D. J., & Gilmore, R. (1997). DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(10), 4994–4999. https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4994

Kelleher, D. J., & Gilmore, R. (2006). An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*, *16*(4), 47R-62R. https://doi.org/10.1093/glycob/cwj066

Kim, B., & Song, Y. S. (2016). Mitochondrial dynamics altered by oxidative stress in cancer. *Free radical research*, *50*(10), 1065–1070. https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1210141

Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., & Ban, N. (2009). YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Molecular cell*, *34*(3), 344–353. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.019

Koopman, W. J. H., Nijtmans, L. G. J., Dieteren, C. E. J., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J. A. M., & Willems, P. H. G. M. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants & redox signaling*, *12*(12), 1431–1470. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2743

Kuehr, J., Karmaus, W., Forster, J., Frischer, T., Hendel-Kramer, A., Moseler, M., Stephan, V., Urbanek, R., & Weiss, K. (1993). Sensitization to four common inhalant allergens within 302 nuclear families. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *23*(7), 600–605. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1993.tb00900.x

Kurukulaaratchy, R. J., Matthews, S., & Arshad, S. H. (2006). Relationship between childhood atopy and wheeze: what mediates wheezing in atopic phenotypes? *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American*

College of Allergy, Asthma, & Immunology, *97*(1), 84–91. https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61375-0

Kurzius-Spencer, M., Holberg, C. J., Sherrill, D. L., Carrozzi, L., Di Pede, F., Baldacci, S., & Viegi, G. (2004). Segregation analysis of bronchial hyperresponsiveness in a general population in north Italy. *American journal of medical genetics. Part A*, *125A*(3), 232–239. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20481

Lakatos, A., Derbeneva, O., Younes, D., Keator, D., Bakken, T., Lvova, M., Brandon, M., Guffanti, G., Reglodi, D., Saykin, A., Weiner, M., Macciardi, F., Schork, N., Wallace, D. C., Potkin, S. G., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2010). Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neurobiology of aging*, *31*(8), 1355–1363. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.031

Lambrecht, B. N., Hammad, H., & Fahy, J. V. (2019). The Cytokines of Asthma. *Immunity*, *50*(4), 975–991. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.018

Larson-Casey, J. L., He, C., & Carter, A. B. (2020). Mitochondrial quality control in pulmonary fibrosis. *Redox Biology*, *33*, 101426. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101426

Lee, J.-U., Kim, J. D., & Park, C.-S. (2015). Gene-Environment Interactions in Asthma: Genetic and Epigenetic Effects. *Yonsei medical journal*, *56*(4), 877–886. https://doi.org/10.3349/ymj.2015.56.4.877

Lee, R. G., Gao, J., Siira, S. J., Shearwood, A.-M., Ermer, J. A., Hofferek, V., Mathews, J. C., Zheng, M., Reid, G. E., Rackham, O., & Filipovska, A. (2020). Cardiolipin is required for membrane docking of mitochondrial ribosomes and protein synthesis. *Journal of Cell Science*. https://doi.org/10.1242/jcs.240374

Leishangthem, G. D., Mabalirajan, U., Singh, V. P., Agrawal, A., Ghosh, B., & Dinda, A. K. (2013). Ultrastructural changes of airway in murine models of allergy and diet-induced metabolic syndrome. *ISRN allergy*, *2013*, 261297. https://doi.org/10.1155/2013/261297

Leite, M., Ponte, E. V., Petroni, J., D'Oliveira Júnior, A., Pizzichini, E., & Cruz, Á. A. (2008). Avaliação do questionário de controle da asma validado para uso no Brasil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, *34*(10), 756–763. https://doi.org/10.1590/S1806-37132008001000002

Li, M., & Shang, Y. X. (2014). Ultrastructural changes in rat airway epithelium in asthmatic airway remodeling. *Pathology, research and practice*, *210*(12), 1038–1042. https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.03.010

Licari, A., Manti, S., Castagnoli, R., Marseglia, A., Foiadelli, T., Brambilla, I., & Marseglia, G. L. (2019). Immunomodulation in Pediatric Asthma. *Frontiers in Pediatrics*, *7*. https://doi.org/10.3389/fped.2019.00289

Lima, L. C., Cruz, Á. A., Costa, R. dos S., Silva, H. dos S., Coelho, R. S., Teixeira, H. M. P., Oliveira, P. R. S., Barnes, K. C., Figueiredo, C. A., & Carneiro, V. L. (2023). TSLP and IL25 variants are related to asthma and atopy. *Gene Reports*, *30*, 101727. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101727

Lima-Matos, A., Ponte, E. V., de Jesus, J. P. V., Almeida, P. C. A., Lima, V. B., Kwon, N., Riley, J., de Mello, L. M., & Cruz, Á. A. (2018). Eosinophilic asthma, according to a blood eosinophil criterion, is associated with disease severity and lack of control among underprivileged urban Brazilians. *Respiratory Medicine*, *145*, 95–100. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.10.025

Litonjua, A. A., Carey, V. J., Burge, H. A., Weiss, S. T., & Gold, D. R. (1998). Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk

than father? *American journal of respiratory and critical care medicine*, *158*(1), 176–181. https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.1.9710014

Liu, M., & Spremulli, L. (2000). Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *The Journal of biological chemistry*, *275*(38), 29400–29406. https://doi.org/10.1074/jbc.M002173200

Lochte, L., Nielsen, K. G., Petersen, P. E., & Platts-Mills, T. A. E. (2016). Childhood asthma and physical activity: a systematic review with meta-analysis and Graphic Appraisal Tool for Epidemiology assessment. *BMC pediatrics*, *16*, 50. https://doi.org/10.1186/s12887-016-0571-4

Loureiro, C. C., Amaral, L., Ferreira, J. A., Lima, R., Pardal, C., Fernandes, I., Semedo, L., & Arrobas, A. (2018). Omalizumab for Severe Asthma: Beyond Allergic Asthma. *BioMed Research International*, *2018*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2018/3254094

Luirink, J., Samuelsson, T., & de Gier, J. W. (2001). YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS letters*, *501*(1), 1–5. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02616-3

Luo, Y., Wu, Y., Huang, H., Yi, N., & Chen, Y. (2021). Emerging role of BAD and DAD1 as potential targets and biomarkers in cancer (Review). *Oncology Letters*, *22*(6), 811. https://doi.org/10.3892/ol.2021.13072

Mabalirajan, U., & Ghosh, B. (2013). Mitochondrial Dysfunction in Metabolic Syndrome and Asthma. *Journal of Allergy*, *2013*, 1–12. https://doi.org/10.1155/2013/340476

Machado, M. S. S., Ferreira Silva, H. B., Rios, R., Pires de Oliveira, A., Vilany Queiroz Carneiro, N., Santos Costa, R., Santos Alves, W., Meneses Souza, F.-L., da Silva Velozo, E., Alves de Souza, S., Sarmento Silva, T. M., Silva, M. L., Pontes-de-Carvalho, L. C., Alcântara-Neves, N. M., & Figueiredo, C. A. (2015). The anti-allergic activity of Cymbopogon citratus is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kb) activation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1), 168. https://doi.org/10.1186/s12906-015-0702-8

Makishima, T., Yoshimi, M., Komiyama, S., Hara, N., & Nishimoto, T. (2000). A subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase, DAD1, interacts with Mcl-1, one of the bcl-2 protein family. *Journal of biochemistry*, *128*(3), 399–405. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022767

Mansur, A. H., BISHOP, D. T., MARKHAM, A. F., MORTON, N. E., HOLGATE, S. T., & MORRISON, J. F. J. (1999). Suggestive Evidence for Genetic Linkage Between IgE Phenotypes and Chromosome 14q Markers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *159*(6), 1796–1802. https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.6.9804036

Marques, C. P. C., Bloise, R. F., Lopes, L. B. M., Godói, L. F., Souza, P. R. P. de, Rosa, I. M. S., Costa, S. de S., Barros, M. C., Souza, A. C. L. de, & Carvalho, B. M. M. de. (2022). Epidemiologia da Asma no Brasil, no período de 2016 a 2020. *Research, Society and Development*, *11*(8), e5211828825. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.28825

Martinez, F. D., Wright, A. L., Taussig, L. M., Holberg, C. J., Halonen, M., & Morgan, W. J. (1995). Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *The New England journal of medicine*, *332*(3), 133–138. https://doi.org/10.1056/NEJM199501193320301

Mazurek, J. M., & Syamlal, G. (2018). Prevalence of Asthma, Asthma Attacks, and Emergency Department Visits for Asthma Among Working Adults — National

Health Interview Survey, 2011–2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *67*(13), 377–386. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6713a1

Menzies-Gow, A., Szefler, S. J., & Busse, W. W. (2021). The Relationship of Asthma Biologics to Remission for Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *9*(3), 1090–1098. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.10.035

Mohorko, E., Glockshuber, R., & Aebi, M. (2011). Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *Journal of inherited metabolic disease*, *34*(4), 869–878. https://doi.org/10.1007/s10545-011-9337-1

Moraes, C. T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A. F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L. C., Servidei, S., Nonaka, I., Koga, Y., Spiro, A. J., W. Brownell, A. K., Schmidt, B., Schotland, D. L., Zupanc, M., DeVivo, D. C., Schon, E. A., & Rowland, L. P. (1989). Mitochondrial DNA Deletions in Progressive External Ophthalmoplegia and Kearns-Sayre Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *320*(20), 1293–1299. https://doi.org/10.1056/NEJM198905183202001

Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S., & Nishimoto, T. (1993). Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(10), 6367–6374. https://doi.org/10.1128/MCB.13.10.6367

Nandedkar, S. D., Weihrauch, D., Xu, H., Shi, Y., Feroah, T., Hutchins, W., Rickaby, D. A., Duzgunes, N., Hillery, C. A., Konduri, K. S., & Pritchard, Jr. K. A. (2011). D-4F, an apoA-1 mimetic, decreases airway hyperresponsiveness, inflammation, and oxidative stress in a murine model of asthma. *Journal of Lipid Research*, *52*(3), 499–508. https://doi.org/10.1194/jlr.M012724

Nishii, K., Tsuzuki, T., Kumai, M., Takeda, N., Koga, H., Aizawa, S., Nishimoto, T., & Shibata, Y. (1999). Abnormalities of developmental cell death in Dad1-deficient mice. *Genes to Cells*, *4*(4), 243–252. https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00256.x

Ober, C. (2016). Asthma Genetics in the Post-GWAS Era. *Annals of the American Thoracic Society*, *13 Suppl 1*(Suppl 1), S85-90. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201507-459MG

O'Byrne, P., Fabbri, L. M., Pavord, I. D., Papi, A., Petruzzelli, S., & Lange, P. (2019). Asthma progression and mortality: the role of inhaled corticosteroids. *European Respiratory Journal*, *54*(1), 1900491. https://doi.org/10.1183/13993003.00491-2019

Omran, A., Elimam, D., & Yin, F. (2013). MicroRNAs: new insights into chronic childhood diseases. *BioMed research international*, *2013*, 291826. https://doi.org/10.1155/2013/291826

OMS. (2020). *Asma*. Organização Mundial de Saúde.

OMS. (2023). *Asma: Tópicos de Saúde*. Organização Mundial de Saúde.

Ott, M., & Herrmann, J. M. (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et biophysica acta*, *1803*(6), 767–775. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.11.010

Papaemmanuil, E., Hosking, F. J., Vijayakrishnan, J., Price, A., Olver, B., Sheridan, E., Kinsey, S. E., Lightfoot, T., Roman, E., Irving, J. A. E., Allan, J. M., Tomlinson, I. P., Taylor, M., Greaves, M., & Houlston, R. S. (2009). Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute

lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, *41*(9), 1006–1010. https://doi.org/10.1038/ng.430

Paunel-Görgülü, A., Kirichevska, T., Lögters, T., Windolf, J., & Flohé, S. (2012). Molecular Mechanisms Underlying Delayed Apoptosis in Neutrophils from Multiple Trauma Patients with and without Sepsis. *Molecular Medicine*, *18*(3), 325–335. https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00380

Pearce, N., Pekkanen, J., & Beasley, R. (1999). How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*, *54*(3), 268–272. https://doi.org/10.1136/thx.54.3.268

Perotin, J.-M., Schofield, J. P. R., Wilson, S. J., Ward, J., Brandsma, J., Strazzeri, F., Bansal, A., Yang, X., Rowe, A., Corfield, J., Lutter, R., Shaw, D. E., Bakke, P. S., Caruso, M., Dahlén, B., Fowler, S. J., Horváth, I., Howarth, P., Krug, N., … Djukanović, R. (2019). Epithelial dysregulation in obese severe asthmatics with gastro-oesophageal reflux. *European Respiratory Journal*, *53*(6), 1900453. https://doi.org/10.1183/13993003.00453-2019

Perry, M. M., Baker, J. E., Gibeon, D. S., Adcock, I. M., & Chung, K. F. (2014). Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *50*(1), 7–17. https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0067OC

Pires, A. de O., Queiroz, G. de A., de Jesus Silva, M., da Silva, R. R., da Silva, H. B. F., Carneiro, N. V. Q., Fonseca, H. F., de Santana, M. B. R., Nascimento, R. S., Alcântara-Neves, N. M., Costa, G. N. de O., Costa, R. dos S., Barreto, M. L., & Figueiredo, C. A. (2018). Polymorphisms in the DAD1 and OXA1L genes are associated with asthma and atopy in a South American population. *Molecular Immunology*, *101*, 294–302. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.07.014

Pitchon, R. R., Alvim, C. G., Andrade, C. R. de, Lasmar, L. M. de L. B. F., Cruz, Á. A., & Reis, A. P. dos. (2020). Asthma mortality in children and adolescents of Brazil over a 20-year period. *Jornal de Pediatria*, *96*(4), 432–438. https://doi.org/10.1016/j.jped.2019.02.006

Pividori, M., Schoettler, N., Nicolae, D. L., Ober, C., & Im, H. K. (2019). Shared and distinct genetic risk factors for childhood-onset and adult-onset asthma: genome-wide and transcriptome-wide studies. *The Lancet. Respiratory medicine*, *7*(6), 509–522. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30055-4

Qian, L., Mehrabi Nasab, E., Athari, S. M., & Athari, S. S. (2022). Mitochondria signaling pathways in allergic asthma. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, *70*(4), 863–882. https://doi.org/10.1136/jim-2021-002098

Rabe, K. F., Calhoun, W. J., Smith, N., & Jimenez, P. (2011). Can anti-IgE therapy prevent airway remodeling in allergic asthma? *Allergy*, *66*(9), 1142–1151. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02617.x

Raby, B. A., Celedón, J. C., Litonjua, A. A., Phipatanakul, W., Sredl, D., Oken, E., Ryan, L., Weiss, S. T., & Gold, D. R. (2004). Low-normal gestational age as a predictor of asthma at 6 years of age. *Pediatrics*, *114*(3), e327-32. https://doi.org/10.1542/peds.2003-0838-L

Raby, B. A., Van Steen, K., Celedón, J. C., Litonjua, A. A., Lange, C., Weiss, S. T., & CAMP Research Group. (2005). Paternal history of asthma and airway responsiveness in children with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *172*(5), 552–558. https://doi.org/10.1164/rccm.200501-010OC

Riera Romo, M. (2021). Cell death as part of innate immunity: Cause or consequence? *Immunology*, *163*(4), 399–415. https://doi.org/10.1111/imm.13325

Riordan-Eva, P., & Harding, A. E. (1995). Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *JMed Genet*, *32*, 81–87. https://doi.org/10.1136/jmg.32.2.81

Roboti, P., & High, S. (2012). The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation. *Journal of cell science*, *125*(Pt 14), 3474–3484. https://doi.org/10.1242/jcs.103952

Roviezzo, F., Sorrentino, R., Bertolino, A., De Gruttola, L., Terlizzi, M., Pinto, A., Napolitano, M., Castello, G., D'Agostino, B., Ianaro, A., Sorrentino, R., & Cirino, G. (2015). S1P-induced airway smooth muscle hyperresponsiveness and lung inflammation in vivo: molecular and cellular mechanisms. *British journal of pharmacology*, *172*(7), 1882–1893. https://doi.org/10.1111/bph.13033

Sanjay, A., Fu, J., & Kreibich, G. (1998). DAD1 is required for the function and the structural integrity of the oligosaccharyltransferase complex. *The Journal of biological chemistry*, *273*(40), 26094–26099. https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.26094

Saxena, R., de Bakker, P. I. W., Singer, K., Mootha, V., Burtt, N., Hirschhorn, J. N., Gaudet, D., Isomaa, B., Daly, M. J., Groop, L., Ardlie, K. G., & Altshuler, D. (2006). Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *American journal of human genetics*, *79*(1), 54–61. https://doi.org/10.1086/504926

Schnormeier, A.-K., Pommerenke, C., Kaufmann, M., Drexler, H. G., & Koeppel, M. (2020). Genomic deregulation of PRMT5 supports growth and stress tolerance in chronic lymphocytic leukemia. *Scientific Reports*, *10*(1), 9775. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66224-1

Shaw, D. E., Sousa, A. R., Fowler, S. J., Fleming, L. J., Roberts, G., Corfield, J., Pandis, I., Bansal, A. T., Bel, E. H., Auffray, C., Compton, C. H., Bisgaard, H., Bucchioni, E., Caruso, M., Chanez, P., Dahlén, B., Dahlen, S.-E., Dyson, K., Frey, U., … Chung, K. F. (2015). Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. *European Respiratory Journal*, *46*(5), 1308–1321. https://doi.org/10.1183/13993003.00779-2015

Silberstein, S., Collins, P. G., Kelleher, D. J., & Gilmore, R. (1995). The essential OST2 gene encodes the 16-kD subunit of the yeast oligosaccharyltransferase, a highly conserved protein expressed in diverse eukaryotic organisms. *Journal of Cell Biology*, *131*(2), 371–383. https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.371

Smyk, M., Poluha, A., Jaszczuk, I., Bartnik, M., Bernaciak, J., & Nowakowska, B. (2016). Novel 14q11.2 microduplication including the *CHD8* and *SUPT16H* genes associated with developmental delay. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *170*(5), 1325–1329. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37579

Soto-Quiros, M. E., Silverman, E. K., Hanson, L. A., Weiss, S. T., & Celedón, J. C. (2002). Maternal history, sensitization to allergens, and current wheezing, rhinitis, and eczema among children in Costa Rica. *Pediatric pulmonology*, *33*(4), 237–243. https://doi.org/10.1002/ppul.10070

Stiburek, L., Fornuskova, D., Wenchich, L., Pejznochova, M., Hansikova, H., & Zeman, J. (2007). Knockdown of human Oxa1l impairs the biogenesis of F1Fo-ATP synthase and NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Journal of molecular biology*, *374*(2), 506–516. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.044

Strauss, R., Leflein, H., Kolesar, A., & Hammel, J. (2023). Long-Term Efficacy and Safety Among Patients with Severe Eosinophilic Asthma Treated with Mepolizumab and its Effect on Small Airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2023.08.010

Sugimoto, A., Hozak, R. R., Nakashima, T., Nishimoto, T., & Rothman, J. H. (1995). dad-1, an endogenous programmed cell death suppressor in Caenorhabditis elegans and vertebrates. *The EMBO Journal*, *14*(18), 4434–4441. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00122.x

Sun, P., Xu, H., Zhu, K., Li, M., Han, R., Shen, J., Xia, X., Chen, X., Fei, G., Zhou, S., & Wang, R. (2022). The cuproptosis related genes signature predicts the prognosis and correlates with the immune status of clear cell renal cell carcinoma. *Frontiers in Genetics*, *13*. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1061382

Sun, Y., Kersten, E. T. G., Qi, C., & Koppelman, G. H. (2023). Asthma susceptibility: Learning from genetic diversity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *151*(4), 904–906. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.01.034

Suzuki, T., Nagao, A., & Suzuki, T. (2011). Human Mitochondrial tRNAs: Biogenesis, Function, Structural Aspects, and Diseases. *Annual Review of Genetics*, *45*(1), 299–329. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132531

Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *The EMBO journal*, *22*(24), 6448–6457. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg623

Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2012). Mitochondria and cell signalling. *Journal of cell science*, *125*(Pt 4), 807–815. https://doi.org/10.1242/jcs.099234

Tan, D. J., Walters, E. H., Perret, J. L., Burgess, J. A., Johns, D. P., Lowe, A. J., Lodge, C. J., Hayati Rezvan, P., Simpson, J. A., Morrison, S., Thompson, B. R., Thomas, P. S., Feather, I., Giles, G. G., Hopper, J. L., Abramson, M. J., Matheson, M. C., & Dharmage, S. C. (2016). Clinical and functional differences between early-onset and late-onset adult asthma: a population-based Tasmanian Longitudinal Health Study. *Thorax*, *71*(11), 981–987. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-208183

Tariq, S. M., Matthews, S. M., Hakim, E. A., Stevens, M., Arshad, S. H., & Hide, D. W. (1998). The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *101*(5), 587–593. https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70164-2

Teixeira, H. M. P., Alcantara-Neves, N. M., Barreto, M., Figueiredo, C. A., & Costa, R. S. (2017). Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. *Molecular Immunology*, *82*, 137–145. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.001

Thompson, K., Mai, N., Oláhová, M., Scialó, F., Formosa, L. E., Stroud, D. A., Garrett, M., Lax, N. Z., Robertson, F. M., Jou, C., Nascimento, A., Ortez, C., Jimenez-Mallebrera, C., Hardy, S. A., He, L., Brown, G. K., Marttinen, P., McFarland, R., Sanz, A., … Taylor, R. W. (2018). *<scp>OXA</scp> 1L* mutations cause mitochondrial encephalopathy and a combined oxidative phosphorylation defect. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(11). https://doi.org/10.15252/emmm.201809060

Trian, T., Benard, G., Begueret, H., Rossignol, R., Girodet, P.-O., Ghosh, D., Ousova, O., Vernejoux, J.-M., Marthan, R., Tunon-de-Lara, J.-M., & Berger, P. (2007). Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent

enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *The Journal of experimental medicine*, *204*(13), 3173–3181. https://doi.org/10.1084/jem.20070956

True, L., Coleman, I., Hawley, S., Huang, C.-Y., Gifford, D., Coleman, R., Beer, T. M., Gelmann, E., Datta, M., Mostaghel, E., Knudsen, B., Lange, P., Vessella, R., Lin, D., Hood, L., & Nelson, P. S. (2006). A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(29), 10991–10996. https://doi.org/10.1073/pnas.0603678103

Tsitsiou, E., Williams, A. E., Moschos, S. A., Patel, K., Rossios, C., Jiang, X., Adams, O.-D., Macedo, P., Booton, R., Gibeon, D., Chung, K. F., & Lindsay, M. A. (2012). Transcriptome analysis shows activation of circulating CD8+ T cells in patients with severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *129*(1), 95–103. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.08.011

Tulah, A. S., Beghé, B., Barton, S. J., Holloway, J. W., & Sayers, I. (2012). Leukotriene B4 receptor locus gene characterisation and association studies in asthma. *BMC Medical Genetics*, *13*(1), 110. https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-110

Tulane, N. (2015). *DAD1 como potencial alvo terapêutico e biomarcador no câncer de próstata*. Universidade Bhasin .

Unger, K., Hess, J., Link, V., Buchner, A., Eze, C., Li, M., Stief, C., Kirchner, T., Klauschen, F., Zitzelsberger, H., Niyazi, M., Ganswindt, U., Schmidt-Hegemann, N.-S., & Belka, C. (2023). DNA-methylation and genomic copy number in primary tumors and corresponding lymph node metastases in prostate cancer from patients with low and high Gleason score. *Clinical and translational radiation oncology*, *39*, 100586. https://doi.org/10.1016/j.ctro.2023.100586

van der Walt, J. M., Nicodemus, K. K., Martin, E. R., Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Haines, J. L., Koller, W. C., Lyons, K., Pahwa, R., Stern, M. B., Colcher, A., Hiner, B. C., Jankovic, J., Ondo, W. G., Allen, F. H., Goetz, C. G., Small, G. W., … Vance, J. M. (2003). Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *American journal of human genetics*, *72*(4), 804–811. https://doi.org/10.1086/373937

Vercelli, D. (2008). Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology*, *8*(3), 169–182. https://doi.org/10.1038/nri2257

Visser, E., de Jong, K., van Zutphen, T., Kerstjens, H. A. M., & ten Brinke, A. (2023). Muscle Function in Moderate to Severe Asthma: Association With Clinical Outcomes and Inflammatory Markers. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *11*(5), 1439-1447.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.12.043

Wallace, D. C., & Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. Em *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 5, Número 11). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220

Wang, K., Gan, L., Kuo, C. L., & Hood, L. (1997). A highly conserved apoptotic suppressor gene is located near the chicken T-cell receptor alpha chain constant region. *Immunogenetics*, *46*(5), 376–382.

Wang, S. B., Weng, W. C., Lee, N. C., Hwu, W. L., Fan, P. C., & Lee, W. T. (2008). Mutation of Mitochondrial DNA G13513A Presenting with Leigh Syndrome, Wolff-Parkinson-White Syndrome and Cardiomyopathy. *Pediatrics and Neonatology*, *49*(4), 145–149. https://doi.org/10.1016/S1875-9572(08)60030-3

Wilson, C. M., & High, S. (2007). Ribophorin I acts as a substrate-specific facilitator of N-glycosylation. *Journal of cell science*, *120*(Pt 4), 648–657. https://doi.org/10.1242/jcs.000729

Woodruff, P. G., Modrek, B., Choy, D. F., Jia, G., Abbas, A. R., Ellwanger, A., Arron, J. R., Koth, L. L., & Fahy, J. V. (2009). T-helper Type 2–driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *180*(5), 388–395. https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0392OC

Wotton, J. M., Peterson, E., Flenniken, A. M., Bains, R. S., Veeraragavan, S., Bower, L. R., Bubier, J. A., Parisien, M., Bezginov, A., Haselimashhadi, H., Mason, J., Moore, M. A., Stewart, M. E., Clary, D. A., Delbarre, D. J., Anderson, L. C., D'Souza, A., Goodwin, L. O., Harrison, M. E., … White, J. K. (2022). Identifying genetic determinants of inflammatory pain in mice using a large-scale gene-targeted screen. *Pain*, *163*(6), 1139–1157. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002481

Wright, A. L., Holberg, C. J., Martinez, F. D., Halonen, M., Morgan, W., & Taussig, L. M. (1994). Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics*, *94*(6 Pt 1), 895–901.

Xu, W., Liang, Y., Zhuang, Y., & Yuan, Z. (2023). Identification of miRNA-mRNA Regulatory Networks associated with Diabetic Retinopathy using Bioinformatics Analysis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, *23*. https://doi.org/10.2174/1871530323666230419081351

Yang, L., Boldin, M. P., Yu, Y., Liu, C. S., Ea, C.-K., Ramakrishnan, P., Taganov, K. D., Zhao, J. L., & Baltimore, D. (2012). miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *The Journal of experimental medicine*, *209*(9), 1655–1670. https://doi.org/10.1084/jem.20112218

Zhang, X.-Y., Simpson, J. L., Powell, H., Yang, I. A., Upham, J. W., Reynolds, P. N., Hodge, S., James, A. L., Jenkins, C., Peters, M. J., Lin, J.-T., & Gibson, P. G. (2014). Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clinical & Experimental Allergy*, *44*(9), 1137–1145. https://doi.org/10.1111/cea.12345

Zhang, Y., Cui, C., & Lai, Z.-C. (2016). The defender against apoptotic cell death 1 gene is required for tissue growth and efficient N-glycosylation in Drosophila melanogaster. *Developmental biology*, *420*(1), 186–195. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.09.021

Zheng, X., Zhang, C., Zheng, D., Guo, Q., Maierhaba, M., Xue, L., Zeng, X., Wu, Y., & Gao, W. (2023). An original cuproptosis-related genes signature effectively influences the prognosis and immune status of head and neck squamous cell carcinoma. *Frontiers in Genetics*, *13*. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1084206

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

Nº011D/2023

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE INTITULADO **"ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *DAD1* E *OXA1L* COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA"** DO DOUTORANDO **ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES**.

Aos trinta e um dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e três, na sala de reunião vinculada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA), a Banca Examinadora composta pelos Professores: **Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo** (orientadora)**, Dra. Carina da Silva Pinheiro, Dra. Cinthia Vila Nova Santana**, **Dra. Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto e Dra. Valdirene Leão Carneiro,** se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de tese **"ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES DAD1 E OXA1L COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA"** do doutorando **Anaque de Oliveira Pires**. Após a apresentação, arguição e comentários dos membros da Banca Examinadora fica determinado que as sugestões discutidas sejam implementadas na versão final da dissertação. Havendo cumprido as exigências do Programa quanto à defesa do trabalho final, a Banca Examinadora concluiu que mediante a entrega do exemplar final pelo aluno com as devidas modificações no prazo de 60 dias, o Pós-Graduando está habilitado à obtenção do título de Doutor em Imunologia. Adicionalmente, os pareceres individuais dos membros da Banca Examinadora serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar se encerra a sessão da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo doutorando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, trinta e um de agosto de dois mil e vinte e três.

gov.br Documento assinado digitalmente
CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO F(
Data: 04/09/2023 09:17:42-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo
Orientadora

gov.br Documento assinado digitalmente
TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA MUNIZ CARLETT
Data: 01/09/2023 09:59:57-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto
Banca Examinadora

gov.br Documento assinado digitalmente
CARINA DA SILVA PINHEIRO
Data: 01/09/2023 10:49:48-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Carina da Silva Pinheiro
Banca Examinadora

gov.br Documento assinado digitalmente
VALDIRENE LEAO CARNEIRO LIMA
Data: 31/08/2023 21:46:18-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra.Valdirene Leão Carneiro
Banca Examinadora

CINTHIA VILA NOVA SANTANA:03338483570
Digitally signed by CINTHIA VILA NOVA SANTANA:03338483570
Date: 2023.08.31 16:29:21 -03'00'

Dra. Cinthia Vila Nova Santana
Banca Examinadora

Anaque de Oliveira Pires

Anaque de Oliveira Pires
Doutorando

Dra. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS-UFBA

Parecer da Comissão Examinadora Sobre a Defesa do Trabalho de Tese intitulado: **"ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *DAD1* E *OXA1L* COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA"** do doutorando **ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES**.

O doutorando Anaque de Oliveira Pires realizou a apresentação de seu trabalho dentro do tempo previsto, com domínio e fluidez do conteúdo. Com relação ao documento escrito, esse foi apresentado com uma revisão de literatura e um manuscrito ainda a ser submetido, mas com potencial para boa publicação. Foram feitas algumas considerações com relação ao texto e limitação dos dados, que o doutorando se comprometeu em rever, mas nada que prejudique a qualidade do trabalho. Na arguição, Anaque respondeu aos questionamentos com louvor. Por fim, todos os objetivos do trabalho foram respondidos com êxito e, portanto, considero Anaque Pires aprovado em seu exame de defesa de doutorado.

Salvador, 31 de agosto 2023.

CINTHIA VILA NOVA SANTANA:03338483570

Digitally signed by CINTHIA VILA NOVA SANTANA:03338483570
Date: 2023.08.31 16:26:10 -03'00'

Dra. Cinthia Vila Nova Santana
Banca Examinadora

Parecer da Comissão Examinadora Sobre a Defesa do Trabalho de Tese intitulado: **"ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *DAD1* E *OXA1L* COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA"** do doutorando **ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES**.

É com satisfação que escrevo este parecer positivo para o trabalho de Tese intitulado "ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES DAD1 E OXA1L COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA," apresentado pelo doutorando ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES. O doutorando apresentou sua pesquisa de forma competente e completa dentro do tempo alocado para a defesa, demonstrando domínio do assunto e habilidades de comunicação eficazes. Além disso, este trabalho de tese demonstra um comprometimento com a pesquisa científica e contribui significativamente para o entendimento da genética subjacente à asma e à atopia em uma população brasileira. Com base nas informações apresentadas e na competência demonstrada durante a defesa, recomendo que a tese seja aceita.

Salvador, 31 de agosto 2023

gov.br Documento assinado digitalmente
CARINA DA SILVA PINHEIRO
Data: 01/09/2023 11:00:20-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Carina da Silva Pinheiro
Banca Examinadora

Parecer da Comissão Examinadora Sobre a Defesa do Trabalho de Tese intitulado: **"ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *DAD1* E *OXA1L* COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA"** do doutorando **ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES**.

Nesta data, o doutorando ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES fez a apresentação oral do seu trabalho de forma didática e segura. O tema estudado é relevante, apresenta fundamentação científica e métodos em consonância com os objetivos propostos. O aluno respondeu à arguição com segurança e clareza; e soube discutir sobre limitações do trabalho e sugestões da banca. Alguns ajustes serão necessários para a publicação do artigo original. Sendo assim, como membro da comissão examinadora, aprovo o referido discente neste Exame.

Salvador, 31 de agosto 2023

Dra. Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto
Banca Examinadora

Parecer da Comissão Examinadora Sobre a Defesa do Trabalho de Tese intitulado: **"ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *DAD1* E *OXA1L* COM ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA"** do doutorando **ANAQUE DE OLIVEIRA PIRES**.

O doutorado Anaque de Oliveira Pires realizou com segurança a apresentação oral do seu trabalho de Tese, inclusive com destaque pela didática na apresentação. Em seguida, foi iniciada a arguição pela banca examinadora tendo o doutorando demonstrando segurança e conhecimento dos dados apresentados. Apesar de nâo haver produção científica publicada até o momento da defesa, foi apresentado o manuscrito escrito em inglês e com potencial para publicação em revista Qualis A. As sugestões da banca examinadora poderão contribuir para melhoria da versão final da submissão. Dessa forma, meu parecer é favorável para a obtenção do título de doutor para Anaque de Oliveira Pires.

Salvador, 31 de agosto 2023

gov.br
Documento assinado digitalmente
VALDIRENE LEAO CARNEIRO LIMA
Data: 31/08/2023 22:13:43-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Valdirene Leão Carneiro
Banca Examinadora