

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**PERFIL GENÉTICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ASMA
GRAVE E REFRACTÁRIA AOS GLICOCORTICÓIDES**

MARIANA ISADORA RIBEIRO VIEIRA

Belo Horizonte

2022

PERFIL GENÉTICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ASMA GRAVE E REFRACTÁRIA AOS GLICOCORTICÓIDES

MARIANA ISADORA RIBEIRO VIEIRA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laura Maria de Lima Belizário Facury Lasmar.

Coorientação: Prof^o. Dr^o. Ryan dos Santos Costa

Belo Horizonte

2022

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof^ª. Alamanda Kfoury Pereira

Vice-Diretora: Prof^ª. Cristina Gonçalves Alvim

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^ª Eli Lola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^ª. Laura Maria de Lima Belizário Facury Lasmar

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – SAÚDE DA CRIANÇA E ADOLESCENTE

Coordenador: Prof^ª . Roberta Maia de Castro Romanelli

Vice-Coordenadora: Prof^ª Débora Marques de Miranda

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Prof^ª. Ana Cristina Simões e Silva - Titular

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira – Suplente

Prof^ª. Débora Marques de Miranda – Titular

Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz - Suplente

Prof^ª. Cláudia Regina Lindgren Alves - Titular

Prof^ª . Zilma Silveira Nogueira Reis - Suplente

Prof^ª. Juliana Gurgel – Titular

Prof^ª. Ivani Novato Silva- Suplente

Prof^ª Lêni Márcia Anchieta – Titular

Prof^ª Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana - Suplente

Prof^ª . Roberta Maia de Castro Romanelli – Titular

Prof^ª . Luana Caroline dos Santos – Suplente

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro – Titular

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina – Suplente

REPRESENTANTES DISCENTES

Laura Rangel Frumond de Menezes – Titular

Rafaela Cristina Vieira e Souza

V658p Vieira, Mariana Isadora Ribeiro.
Perfil genético de pacientes pediátricos com Asma Grave e Refratária aos Glicocorticoides [recursos eletrônicos]. / Mariana Isadora Ribeiro Vieira. - - Belo Horizonte: 2022.

61f.:il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Laura Maria de Lima Belizario Facury Lasmar.

Coorientador (a): Ryan dos Santos Costa.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Asma. 2. Corticosteroides. 3. Interleucina-17. 4. Interleucina-10. 5. Polimorfismo Genético. 6. Dissertação Acadêmica. I. Lasmar, Laura Maria de Lima Belizario Facury. II. Costa, Ryan dos Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WF 555



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA - CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às nove horas do dia vinte e sete de maio de dois mil e vinte e dois, na sala 526 (sala de videoconferência do CPG), 5º andar, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a defesa de dissertação de mestrado da aluna **MARIANA ISADORA RIBEIRO VIEIRA**, número de registro 2020658539, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente. A Presidência da sessão coube à Prof.ª Laura Maria de Lima Belizário Facury Lasmar – Orientadora (UFMG). Inicialmente a Presidente após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do trabalho final de Pós-Graduação, fez a apresentação da Comissão Examinadora, assim, constituída pelos Professores Doutores: Adyléia Aparecida Dalbo Contrera Toro (UNICAMP), Cláudia Ribeiro de Andrade (UFMG) e Ryan dos Santos Costa - Coorientador (UFBA). A comissão examinadora participou da sessão pelo link eletrônico da Plataforma LifeSize, hospedada no site: <https://signuo.lifesize.com/>. Em seguida a Presidente autorizou que a aluna iniciasse a apresentação de seu trabalho final intitulado "PERFIL GENÉTICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ASMA GRAVE E REFRATÁRIA AOS GLUCOCORTICÓIDES". Seguiu-se à arguição pela comissão Examinadora, com a respectiva defesa da aluna. Logo após a Comissão reuniu-se sem a presença da aluna e do público para julgamento e expedição do resultado da avaliação do trabalho final da aluna e decidiu considerar a dissertação Aprovada. O resultado final foi comunicado publicamente à aluna pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, após lida, será assinada eletronicamente na Plataforma SEI-UFMG (Sistema Eletrônico de Informações do Governo Federal), por todos os membros da Comissão Examinadora presente.

Belo Horizonte, 27 de maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Laura Maria de Lima Belizario Facury Lasmar, Chefe de departamento**, em 29/05/2022, às 07:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Ribeiro de Andrade, Professora do Magistério Superior**, em 29/05/2022, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adyléia Aparecida Dalbo Contrera Toro, Usuário Externo**, em 30/05/2022, às 09:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ryan dos Santos Costa, Usuário Externo**, em 31/05/2022, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1488580** e o código CRC **438463A0**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o senhor da vida, por ter conseguido a graça de hoje estar aqui celebrando mais essa vitória na minha trajetória acadêmica. Obrigada pela proteção e amparo ao longo de todos os momentos da minha caminhada.

À professora Dra. Laura Maria de Lima Belizário Facury Lasmar, minha orientadora e amiga, pela oportunidade de trabalharmos juntas desde o início da minha trajetória na pneumologia pediátrica. Obrigada por acreditar em mim e por não poupar esforços para me ensinar e orientar com tanta sabedoria. Minha eterna gratidão por desfrutar de tanto conhecimento repassado, mas também pela sua escuta nas horas de angústias. Obrigada por me receber com tanto carinho no Centro Multidisciplinar para Asma de Difícil Controle (CEMAD), me incluindo como membro desse serviço e pesquisadora. A você, todo meio respeito e admiração.

Ao professor Dr. Ryan dos Santos Costa, meu coorientador, pela tão proveitosa parceria e por se mostrar disponível para auxiliar em todos os momentos ao longo desse percurso. Obrigada pela oportunidade de desenvolvermos um trabalho com tanta riqueza. Seu conhecimento, tranquilidade e perspicácia são exemplos a se seguir.

À Professora Dra Mônica Versiani Nunes Pinheiro de Queiroz, pela amizade e fonte de inspiração desde a época da faculdade de medicina e que se perpetuou ao longo de mais essa trajetória. Sua leveza em ensinar é um exemplo que levo comigo.

Aos amigos do grupo da Pneumologia Pediátrica do HC/UFMG, tanto aos mestres quanto aos pneumologistas e residentes pela amizade, oportunidade inesgotável de conhecimento, por sempre me acolherem tão bem e por me permitirem fazer parte de um espaço que considero minha segunda casa.

A toda a equipe da pesquisa, especialmente aos funcionários do Laboratório Central do Hospital das Clínicas e do Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, principalmente ao técnico Diego, pelas tardes agradáveis e proveitosas durante a coleta de dados e processamento das amostras. Com certeza, a trajetória junto a vocês tornou o trabalho motivador. A todos os funcionários do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia que estiveram empenhados no processo de análise das amostras. A todos vocês, serei eternamente grata, pois sem a ajuda e o conhecimento de bancada de laboratório de vocês, nosso trabalho não seria possível.

A todas as crianças e adolescentes do CEMAD meu eterno agradecimento. O intuito desse trabalho e de tantos outros desenvolvidos nesse centro, é melhorar a assistência e o

tratamento de vocês. Dessa forma, agradeço imensamente a cada um dos pacientes e aos seus pais, por confiarem em nosso trabalho e permitirem a realização desse projeto.

Aos meus pais, Vânia e Luiz Carlos, por todo o amor e dedicação na minha criação e formação pessoal. Vocês são a base sólida de toda minha trajetória e meus maiores exemplos. Sem vocês nenhuma conquista seria sido possível. Obrigado por estarem presentes em todos os momentos. À minha irmã Camila, minha melhor amiga, pelo apoio incondicional em toda minha trajetória e em todas as minhas escolhas. À toda a minha família, por todo o apoio, sempre.

Ao Fred, meu parceiro de vida, obrigada por ser o melhor companheiro que poderia ter escolhido. Seu apoio e amor em todos os momentos só me permitem continuar buscando o crescimento. Obrigado por tanto, sempre.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, especialmente à Juliana e ao Hélio, por serem parte da minha vida de diversas maneiras, sempre me apoiando e levando palavras de conforto e risadas nos dias difíceis.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte e foram responsáveis por mais essa conquista. Minha eterna gratidão e todos! Finalizo mais uma etapa da minha caminhada com a sensação de dever cumprido.

RESUMO

Introdução: A asma grave, apesar de pouco prevalente é responsável por uma alta morbimortalidade entre a faixa etária pediátrica. Além dos múltiplos e complexos fatores que podem explicar os vários mecanismos para o descontrole dos sintomas, a predisposição genética é considerada um fator importante para o entendimento das diversas vias de regulação da resposta inflamatória. Vias alternativas à clássica resposta TH2 podem explicar a heterogeneidade da asma grave e podem estar relacionadas às citocinas da IL-17A e IL-10.

Objetivos: avaliar associações entre polimorfismos dos genes IL-10 e IL-17 com a susceptibilidade, o controle da asma e a responsividade ao broncodilatador em uma amostra de pacientes com asma grave.

Métodos: Estudo observacional, realizado no período entre 2021 e 2022, envolvendo crianças, adolescentes e adultos jovens entre 5-28 anos com asma grave (em uso de doses maiores ou iguais a 800 µg budesonida equivalente em associação ou não com outros controladores), com técnica inalatória adequada, comorbidades medicadas e diagnóstico funcional bem estabelecido. Conforme o controle clínico da asma, os pacientes foram divididos em 2 grupos: não controlado (refratário) e grupo controlado. Foram ainda incluídos adultos saudáveis entre 20-57 anos para controles genéticos. Todos os pacientes foram submetidos a coleta de sangue periférico para extração do DNA e realização de genotipagem. As variantes de nucleotídeo único (SNVs) genotipadas foram o rs3024498 da IL-10 e os rs2275913 e rs3819024 da IL17A.

Resultados: Foram selecionados 56 pacientes com asma grave e 19 controles saudáveis. No grupo asma grave, observou-se que apenas as variáveis ACT (Asthma Control Test), peso e estatura mostraram diferenças entre os grupos controlado e não controlado, evidenciando que a redução da estatura pode estar associada com a dose elevada de corticoide inalatório e falha no controle da asma. Em relação à chance de asma grave, apenas a presença do alelo A da variante rs2275913 (IL17A) mostrou um valor p permutacional significativo. A falta de controle da asma grave foi associado à presença de pelo menos um alelo C do rs3024498 (IL10), (OR: 6,93, IC95%: 1,00-47,9). Os pacientes asmáticos com ao menos um alelo G do rs3819024 (IL17A) apresentaram menor resposta ao estímulo agudo do broncodilatador beta-2 adrenérgico nos três modelos testados: alélico (OR: 3,89, IC95%: 1,07-14,12), aditivo (OR: 4,72; IC95%: 1,16-19,19) e dominante (OR: 5,20; IC95%: 1,11-24,34).

Conclusão: As vias da IL17 e da IL10 e seus polimorfismos genéticos estão envolvidos na asma grave pediátrica. Devido à grande variabilidade interindividual da asma, especialmente quanto à resposta aos glicocorticoides, é possível que polimorfismos das vias da IL17 e da IL10

tenham um papel importante na fisiopatologia dessa condição e expliquem a refratariedade ao tratamento, a fim de serem usados com alternativas para o manejo terapêutico da asma, contribuindo para a redução dos riscos do contínuo e progressivo aumento da dose de corticoide inalado.

Descritores: Asma grave, resistência ao corticoide, gene IL17, gene IL10, polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Introduction: Severe asthma, although not very prevalent, is responsible for high morbidity and mortality among the pediatric age group. In addition to the multiple and complex factors that can explain the various mechanisms for the lack of control of symptoms, genetic predisposition is considered an important factor for the understanding of the various regulatory pathways of the inflammatory response. Alternative pathways to the classic TH2 response may explain the heterogeneity of severe asthma and may be related to IL-17A and IL-10 cytokines.

Objectives: to evaluate associations between polymorphisms of IL-10 and IL-17 genes with susceptibility, asthma control, and bronchodilator responsiveness in a sample of patients with severe asthma

Methods: This was an observational study, conducted between 2021 and 2022, involving children, adolescents and young adults aged 5-28 years with severe asthma (using doses greater than or equal to 800 µg budesonide equivalent in association or not with other controllers), with appropriate inhalation technique, medicated comorbidities and well-established functional diagnosis. The patients were divided into 2 groups according to the asthma clinical control: non-controlled (refractory) and controlled group. Healthy adults aged 20-57 years were also included for genetic controls. All patients were submitted to peripheral blood sampling for DNA extraction and genotyping. The single nucleotide variants (SNVs) genotyped were rs3024498 of IL-10 and rs2275913 and rs3819024 of IL17A.

Results: 56 patients with severe asthma and 19 healthy controls were selected. In the severe asthma group, it was observed that only the variables ACT (Asthma Control Test), weight and height showed differences between the control and non-control groups, evidencing that the reduction in height can be associated with the high dose of inhaled corticosteroids and failure in asthma control. Regarding the chance of severe asthma, only the presence of the A allele of the rs2275913 variant (IL17A) showed a significant permutational p value. Lack of control of severe asthma was associated with the presence of at least one C allele of rs3024498 (IL10), (OR: 6.93, 95%CI: 1.00-47.9). Asthma patients with at least one G allele of rs3819024 (IL17A) showed a lower response to acute beta-2 adrenergic bronchodilator stimulation in the three models tested: allelic (OR: 3.89, 95% CI: 1.07-14.12), additive (OR: 4.72, 95% CI: 1.16-19.19) and dominant (OR: 5.20, 95% CI: 1.11-24.34).

Conclusion: The IL17 and IL10 pathways and their genetic polymorphisms are involved in severe pediatric asthma. Due to the great interindividual variability of asthma, especially regarding the response to glucocorticoids, polymorphisms of the IL17 and IL10 pathways may play an important role in the pathophysiology of this condition and explain the

refractoriness to treatment, to be used as alternatives for the therapeutic management of asthma, contributing to the reduction of the risks of continuous and progressive increase of the inhaled corticoid dose.

Keywords: Severe asthma, corticosteroid resistance, IL17 gene, IL10 gene, genetic polymorphisms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
ACT	<i>Asthma Control Test</i>
AG	Asma grave
ARIA	<i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde - Brasil
Bud equiv.	Equivalente à dose de budesonida
C-ACT	<i>Childhood Asthma Control Test</i>
CEMAD	Centro Multidisciplinar para Asma de Difícil Controle
CI+ LABA	Corticoide inalatório+ β agonista de longa duração
CI	Corticosteroides inalados
CVF	Capacidade vital forçada
FEF 25-75	Fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da CV
FeNO	Fração exalada de óxido nítrico
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
<i>IFN-γ</i>	Interferon gama
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
Kg	Quilograma
IgE	Imunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
NO	Óxido nítrico
PUBMED	Publicações Médicas
SNV	Variantes de nucleotídeo único
STRA	<i>Severe therapy-resistant asthma</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEF1	Volume expiratório forçado do primeiro segundo

NOTA EXPLICATIVA

De acordo com as normas estabelecidas pelo Colegiado do Programa de Ciências da Saúde – área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, esta dissertação será apreentada em forma de dois artigos:

ARTIGO 1 (REVISÃO) - POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM VIA IMUNOLÓGICA E ASMA PEDIÁTRICA

ARTIGO 2 (ORIGINAL) – POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL10 E IL17A NA ASMA GRAVE PEDIÁTRICA

Os dois artigos têm número de palavras e/ ou tabelas que excedem as recomendações dos periódicos e, após a avaliação da banca examinadora, foram formatados em sua versão final para a devida publicação nas revistas sugeridas pela banca.

Sumário

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS E JUSTIFICATIVA.....	14
2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM VIA IMUNOLÓGICA E ASMA PEDIÁTRICA	17
2.1. Introdução.....	17
2.2. Métodos	18
2.3. Resultados	20
2.4. Discussão	21
2.5. Conclusão	27
2.6. Referências Bibliográficas:.....	27
3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL10 E IL17 NA ASMA GRAVE PEDIÁTRICA	33
3.1. Introdução.....	33
3.2. Pacientes e Métodos	34
3.2.1. Análise estatística	37
3.3. Resultados	37
3.4. Discussão	43
3.5. Referências Bibliográficas	46
3.6. Anexos	51

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS E JUSTIFICATIVA

A asma grave se configura como uma das condições clínicas mais desafiadoras na rotina médica do pneumologista pediátrico, em razão da dificuldade de se conseguir o controle clínico adequado e da elevada morbidade envolvida. Para esses pacientes, em agosto de 2010 foi implantado, no Hospital das Clínicas/UFMG, um centro de referência para assistência e pesquisa, o Centro Multidisciplinar para Asma de Difícil Controle (CEMAD).

Esse centro é responsável pelo atendimento de crianças e adolescentes referenciados por pneumologistas pediátricos da rede de atenção secundária do município e do estado e vinculado ao Programa “Criança que Chia”, pioneiro na instalação do corticoide inalado no Brasil.¹ O atendimento é realizado por equipe multiprofissional, com diagnóstico confirmado com controle das comorbidades, avaliação clínica e funcional, mensuração da adesão e revisão da técnica inalatória, de modo a obter o nível de controle adequado da asma.

Neste centro de referência são desenvolvidas várias pesquisas já que sua equipe é composta por doutorandos, mestrados, alunos da iniciação científica, da graduação e residentes da pneumologia pediátrica e imunologia pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG e de universidades parceiras. Já foram concluídas cinco dissertações de mestrado e duas teses de doutorado e atualmente, em andamento outros dois projetos de mestrado e um de doutorado. As pesquisas resultaram em publicações em periódicos internacionais de impacto relevante.²⁻¹¹ Além disso, em 2019 o CEMAD recebeu premiação de melhor trabalho apresentado, conferido pela Sociedade Mineira de Pneumologia e Cirurgia Torácica.

No CEMAD, onde o cuidado clínico é realizado com excelência, a variabilidade clínica dos pacientes com asma grave, sempre me chamou a atenção, fomentando uma curiosidade em entender, mais profundamente, as vias patobiológicas relacionadas à asma e os mecanismos genéticos que regem e determinam tamanha diversidade clínica, sobretudo no contexto atual de emergência dos medicamentos imunobiológicos como o omalizumabe e medicamentos antinterleucinas, aprovados na faixa etária pediátricas.

Neste sentido, a equipe do CEMAD da Universidade Federal da Bahia e do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG se propuseram avaliar polimorfismos genéticos de vias imunobiológicas relacionadas à asma grave que possam explicar a refratariedade ao tratamento e me integrei à equipe com minha admissão no mestrado. Esse trabalho foi aprovado pelo COEP 4.048.940 e realizado em cooperação com as duas instituições.

Referências:

1. LASMAR, L MLBF; CALAZANS, GMC ; FONTES, M.J.F ; CAMARGOS, PAM . Programa Criança que Chia. Experiencia Mineira com um Programa Municipal de atendimento à Criança asmatica. In: Alcindo Cerci Neto. (Org.). Asma em Saúde Pública. 1ªed.São Paulo: Manole, 2006, v. 1, p. 93-102.
2. FALEIRO, RITA C. ; MANCUZO, ELIANE V. ; LANZA, FERNANDA C. ; QUEIROZ, MÔNICA V. N. P. ; DE OLIVEIRA, LUCIANO F. L. ; GANEM, VINICIUS O. ; LASMAR, LAURA B. . Exercise Limitation in Children and Adolescents With Severe Refractory Asthma: A Lack of Asthma Control?. *Frontiers in Physiology* , v. 11, p. 1-10, 2021.
3. BRESOLINI, DANIELA SOARES ROSA ; QUEIROZ, MÔNICA VERSIANI NUNES PINHEIRO DE ; GASPAR, GUILHERME RACHE ; REIS, LUÍSA DINIZ ; ARAUJO, ALISSON ; LASMAR, LAURA MARIA DE LIMA BELIZÁRIO FACURY . Use of home visits in pediatric severe asthma: randomized controlled trial*. *REVISTA DA ESCOLA DE ENFERMAGEM DA USP* , v. 54, p. 1-7, 2020.
4. CAMARGOS, PAULO ; LASMAR, LAURA ; BRAND, PAUL . What are the effects of inhaled corticosteroids on growth in children?.. *Paediatric Respiratory Reviews* , v. 28, p. 33-40, 2018
5. QUEIROZ, M. V. N. ; QUEIROZ, J. V. C. ; LASMAR, L MLBF . Severe Pediatric Asthma Refractory to Treatment: The Ongoing Challenge of Exacerbation. *CLINICAL RESEARCH IN PULMONOLOGY*, v. 51, p. 1-7, 2017.
6. VERSIANI NUNES PINHEIRO DE QUEIROZ, MÔNICA ; GONÇALVES ALVIM, CRISTINA ; CRUZ, ÁLVARO A. ; DE LIMA BELIZÁRIO FACURY LASMAR, LAURA MARIA . Lung function in severe pediatric asthma: a longitudinal study in children and adolescents in Brazil. *Clinical and Translational Allergy* , v. 7, p. 48-59, 2017.
7. CAMARGOS, PAULO ; LASMAR, LAURA ; BRAND, PAUL . What are the effects of inhaled corticosteroids on growth in children?.. *Paediatric Respiratory Reviews* , v. 28, p. 33-40, 2018.
8. VERSIANI NUNES PINHEIRO DE QUEIROZ, MÔNICA ; GONÇALVES ALVIM, CRISTINA ; CRUZ, ÁLVARO A. ; DE LIMA BELIZÁRIO FACURY LASMAR, LAURA MARIA . Lung function in severe pediatric asthma: a longitudinal study in

- children and adolescents in Brazil. *Clinical and Translational Allergy* , v. 7, p. 48-59, 2017.
9. LASMAR, LAURA; BRAND, PAUL L.P. ; LIMA, ANNA CAROLINA LUSTOSA ; MACIEL, MARIA FERNANDA ; CAMARGOS, PAULO . Growth velocity in prepubertal children using both inhaled and intranasal corticosteroids. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* , v. 16, p. 47-48, 2016.
 10. ANDRADE, WENDERSON CLAY CORREIA DE ; LASMAR, LAURA MARIA DE LIMA BELIZÁRIO FACUR ; RICCI, CRISTIANE DE ABREU TONELLI ; CAMARGOS, PAULO AUGUSTO MOREIRA ; CRUZ, ÁLVARO A . Phenotypes of severe asthma among children and adolescents in Brazil: a prospective study. *BMC Pulmonary Medicine (Online)* , v. 15, p. 36, 2015.
 11. LASMAR, L MLBF; FONTES, M.J.F; FONSECA, MTM ; FONSECA, A. C. ; CAMARGOS, PAM . Wheezy Child Program - The Experience of the Belo Horizonte Pediatric Asthma Management Program. *The World Allergy Organization Journal* , v. 2, p. 289-295, 2009.

2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM VIA IMUNOLÓGICA E ASMA PEDIÁTRICA

2.1. Introdução

Estudos epidemiológicos nacionais estimam que mais de 20 milhões de brasileiros, entre crianças e adultos têm asma.¹ Em 2006, Solé et al. realizaram um estudo com 23.422 crianças e adolescentes de 20 cidades brasileiras e verificaram que a prevalência da asma foi de 24,3% em crianças em idade escolar e de 19% nos adolescentes, evidenciando o impacto que a asma tem na população pediátrica.²

Apesar de a maioria dos pacientes atingirem o controle da asma com as terapias atualmente disponíveis, menos de 5% dos asmáticos não respondem adequadamente, necessitando de altas doses de corticoide inalado (CI), além de associações com outros medicamentos, como beta-agonistas de longa ação (LABA), antileucotrienos e corticoides orais, classificados, portanto, como asma grave.³ Um estudo realizado na Holanda em 2015, utilizando a definição da *American Thoracic Society/European Respiratory Society* (ATS/ERS), estimou que 3,7% dos asmáticos tinham asma grave.⁴ Já um trabalho, realizado em 2018, no Reino Unido, estimou que a proporção de indivíduos com asma grave eosinofílica não controlada era menos de 1% na população geral de asma.⁵

Apesar de minoria, a morbidade da asma grave é elevada^{6,7} pois além de onerar o sistema de saúde com idas frequentes aos serviços de urgência e internações, esses pacientes estão sujeitos aos efeitos adversos das altas doses de medicações e têm risco de comprometimento da função pulmonar.^{8,9} Isso foi demonstrado em uma coorte pediátrica de asma grave, a qual mesmo com o uso de doses elevadas de CI associado a outros controladores, não promoveu melhora de função pulmonar.¹⁰

Dentre os pacientes com asma grave, a *European Respiratory Society* (ERS) considera que mesmo em uso de doses diárias elevadas de corticoides inalatórios (mais de 500mcg de fluticasona ou equivalente), uma parcela de crianças não obtém o controle clínico e funcional satisfatório, caracterizando a refratariedade ao tratamento.³ Em estudo brasileiro de coorte pediátrica com 36 pacientes com asma não controlada foi demonstrado que 55,6% dos pacientes eram refratários ao tratamento.⁶ Uma série de mecanismos tentam explicar essa falta de resposta ao tratamento habitual: combinação da ação de interleucinas na inflamação das vias aéreas, remodelação contínua das vias aéreas com consequente perda da função pulmonar ao longo do tempo, produção de forma inativa de receptor de glicocorticóide, expressão de genes proinflamatórios.³

De fato, a heterogeneidade da asma grave e a pouca compreensão dessas vias patológicas envolvidas dificultam a identificação de alvos terapêuticos assertivos, sobretudo na era dos imunobiológicos.¹¹ Para melhor entender essa heterogeneidade, o conceito de fenotipagem têm emergido integrando características clínicas à diversas vias biológicas, contemplando alvos genéticos, moleculares e celulares, os chamados endótipos da asma.^{12,13} Isso porque atualmente não há biomarcadores ou fenótipos bem estabelecidos para asma pediátrica grave refratária, sendo o diagnóstico baseado na história clínica e função pulmonar.

14

Entre os múltiplos e complexos fatores que podem contribuir para o descontrole dos sintomas da asma, a predisposição genética é considerada um fator importante.¹⁵ Por exemplo, dados disponíveis de estudos farmacogenéticos sugerem que entre 60-80% da variabilidade nas respostas terapêuticas à farmacoterapia é determinada geneticamente.¹⁶⁻¹⁹

Vários polimorfismos de genes que codificam diferentes enzimas, receptores e citocinas envolvidas na terapia medicamentosa e nas vias de inflamação da asma pediátrica têm sido descritos, a exemplo; genes que codificam o receptor b2-adrenérgico (ADRB2), receptor 1 do hormônio liberador de corticotrofina (CRHR1), gene ORMDL3, interleucina-4 (IL4), interleucina-13 (IL13), receptor de interleucina 4A (IL4RA), Fator de Necrose Tumoral (TNF), interleucina-33 (IL33), interleucina-17 (IL17) e interleucina10 (IL10).^{15,20} O conhecimento desses polimorfismos na população brasileira, caracteristicamente miscigenada é de suma importância a fim de criarmos painéis de biomarcadores concebidos para permitir uma medicina personalizada com base no perfil genético do indivíduo.

Dessa forma, diante das várias possibilidades genéticas de estudo e à escassez da literatura na asma grave pediátrica o presente estudo tem como objetivo fazer uma revisão narrativa sobre o papel da fisiopatologia das interleucinas IL-17 e IL-10 explorando seus polimorfismos genéticos e sua possível relação com o fenótipo de refratariedade do tratamento.

2.2. Métodos

Foi realizada revisão não sistemática da literatura. Foram utilizadas as seguintes bases de dados: Publicações Médicas-PUBMED/MEDLINE e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), utilizando-se a seguinte estratégia de busca: (Asthma) AND (Child OR Adolescent OR Pediatrics) AND (Interleukin-10 OR IL-10 OR Interleukin-17 OR IL-17 OR "Interleukin 10" OR IL10 OR "Interleukin 17" OR IL17) AND ("Genetic Variation" OR "Polymorphism, Genetic" OR "Genetic Variant" OR "Gene Polymorphism" OR "Genetic Polymorphism").

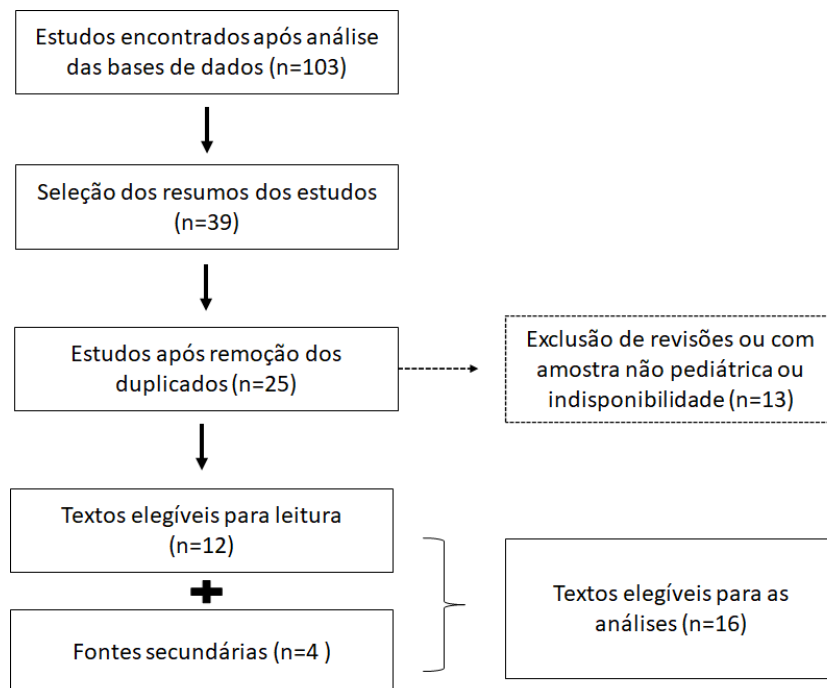
Foram selecionados artigos originais, publicados nos últimos 20 anos, nos idiomas: inglês, português e espanhol que contemplassem os seguintes critérios de inclusão:

1. Genes e polimorfismos genéticos das interleucinas IL10 e IL17 relacionados à asma pediátrica, contemplando apenas crianças e adolescentes até 18 anos

A busca foi finalizada em abril de 2022 sendo acrescentados artigos encontrados em referências secundárias, originais ou não. Foram ainda, adicionados artigos conceituais para fundamentação teórica.

Após a busca, foram analisados os títulos dos estudos originais e realizado levantamento da presença dos critérios de inclusão nos artigos. Após escolha dos artigos, foram lidos os resumos e selecionados os artigos que se enquadrassem nos critérios de inclusão para leitura na íntegra.

FIGURA 1. FLUXOGRAMA DA SELEÇÃO DOS ESTUDOS



2.3. Resultados

Identificaram-se 103 artigos nas bases de dados consultadas, mas 39 foram selecionados para avaliação. Desses, foram excluídos 14 devido a duplicidade e 13 por não preencherem os critérios de inclusão. Dentre os 12 artigos eleitos para a análise foram acrescentados outros 4 artigos oriundos de fontes secundárias, totalizando 16 trabalhos para análises.

A Tabela 1 traz os principais achados em relação aos polimorfismos da IL10 e IL17 relacionados com asma encontrados na literatura:

TABELA 1. ANÁLISE DE ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE IL17 E IL10 COM ASMA

SNV	População	Gene	Associações	Referências
rs2275913	Tunísia	IL17A	Asma pediátrica	Maalmi et al., 2014
rs2397084	Tunísia	IL17F	Asma pediátrica	Maalmi et al., 2014
rs2275913	China	IL17A	Asma com aumento de IgE e alteração de função pulmonar	Chen et al., 2010
rs8193036	Taiwan	IL17A	Asma	Wang et al., 2009
rs1974226	Brasil	IL17A	Asma	Silva et al., 2019
rs7741835	Alemanha	IL17F	Associação negativa Asma não atópica e asma atópica	Schieck et al., 2014
rs4819553, rs4819554 rs4819558	Finlândia	IL17RA	Sem associação com risco de asma e perda de função pulmonar após BVA	Lauhkonen et al, 2021
rs2275913	Finlândia	IL17A	Diminuição risco Asma após BVA	Holster et al., 2017
rs1800896	Finlândia	IL10	Asma na adolescência após BVA	Holster et al, 2019
rs1800896 rs1800871 rs1800872	Coreia	IL10	Hiperresposividade à metacolina (rs1800896)	Kim et al, 2011

rs1518111				
rs3024490	Brasil	IL10	Gravidade da asma	Mocellin et al, 2021
rs3024496				
rs3024491				
rs1800896	Arábia Saudita	IL10	Asma atópica	Hussein et al, 2014
rs1800896				
rs1800871	Caucasianos americanos	IL10	Níveis de IgE Função pulmonar	Lyon at al, 2004
rs1800872				
4299 T/C				
rs1800896			Níveis de controle e de IL-	
rs1800871	Rússia	IL10	10 na asma moderada e grave	Smolnikova et al, 2013
rs1800872				
rs1800896	China	IL10	Asma	Huang et al., 2016
rs1800896				
rs1800871	China	IL10	Asma e aumento de IgE	Zhang et al., 2002
rs1800872				
rs3024492	Brasil	IL10	Sintomas de asma atópica	Figueiredo et al., 2012

Como pode- se observar a maioria dos estudos foram desenhados para avaliar a associação entre asma e polimorfismos genéticos, mas alguns deles os resultados não evidenciaram associação com determinados polimorfismos. Poucos trabalhos avaliaram a associação com a gravidade da asma e, nenhum envolvendo pacientes com asma grave refratária.

2.4. Discussão

A asma grave pediátrica tem sido caracterizada como uma doença de respostas imunes Th2 desreguladas a alérgenos ambientais. Já é bastante conhecido que o mecanismo patogénico da asma pediátrica é mediado por células T helper-2 (TH2). Assim, quando fatores ambientais interagem com células epiteliais brônquicas em indivíduos susceptíveis e ocorre

uma resposta inflamatória, as células Th2 produzem IL-4, IL-5, e IL-13. Entre outras ações, a IL-4 estimula as células Th0 a se diferenciarem para Th2, e também induzem uma mudança na produção de imunoglobulinas pelas células B para classe IgE. Como resultado, nas vias aéreas inferiores, aparecem eosinófilos, produção de muco e contração da musculatura lisa.²¹

Contudo, os pacientes com asma grave parecem manifestar diferentes padrões de inflamação das vias aéreas que não podem ser explicados apenas pela resposta Th2.²² Em estudo realizado com 53 crianças com asma grave resistentes à terapia (STRA) acompanhadas no serviço de Pneumologia Pediátrica do Hospital Royal Brompton, foi visto em amostras de escarro, lavado broncoalveolar e biopsia pulmonar que a eosinofilia era uma característica marcante no processo inflamatório das vias aéreas, mas essa não estava relacionada às interleucinas típicas da inflamação Th2, já que IL4, IL-5 e IL-13 foram indetectáveis nesses pacientes.²³

Esses dados sugerem que as citocinas Th2 até podem ter iniciado a inflamação eosinofílica em pacientes com STRA, mas evidenciam claramente que não foram responsáveis pela manutenção desse tipo de inflamação, ressaltando a importância de se conhecer outros mediadores envolvidos no processo de inflamação e resistência a esteróides.²¹ Em estudo brasileiro não foi encontrada diferença significativa entre asma grave refratária e asma grave de difícil tratamento em relação ao padrão de celularidade em amostra de escarro induzido, sendo que eosinofilia do escarro persistiu em 25% dos pacientes mesmo após a otimização do tratamento.⁶

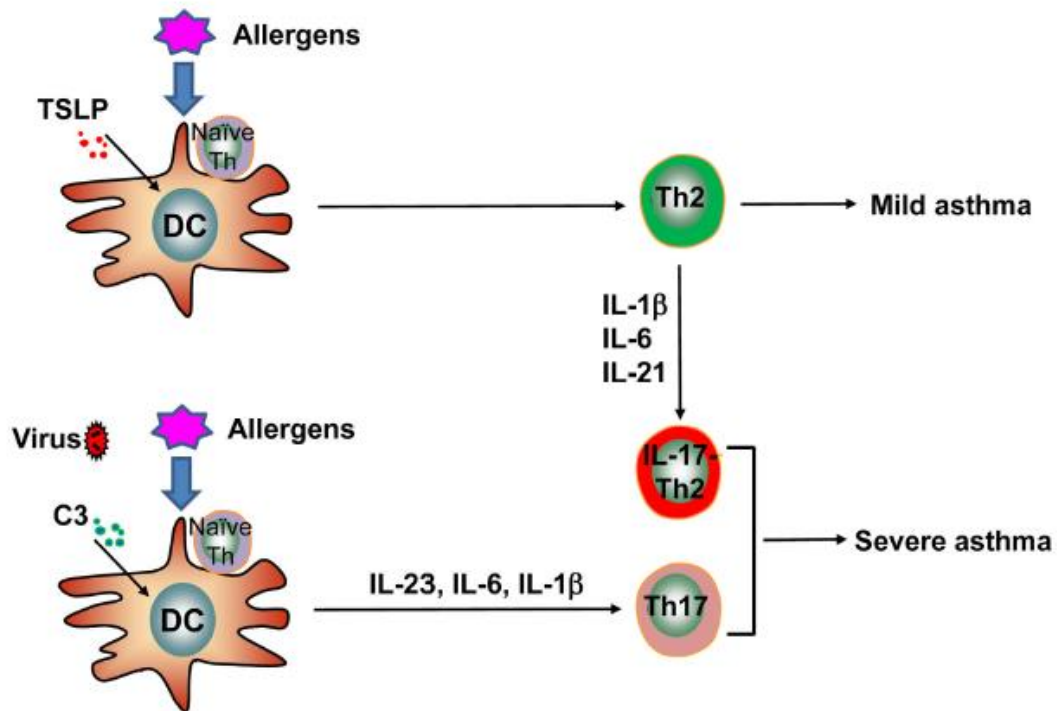
Algumas vias alternativas que pudessem explicar a heterogeneidade da asma grave e as diferentes respostas aos medicamentos seria às relacionadas às citocinas IL-10 ou derivadas de linfócitos Th17 como IL-17A e IL-17F. Por isso, se faz necessário entender a regulação da produção da IL-17 e da IL-10, seus mecanismos de ação no pulmão e as bases genéticas relacionadas à asma grave e refratária pediátrica.

A IL17 é uma glicoprotéina sintetizada pelas células T helper CD4+, um subconjunto de células definidas como Th17.²⁹ Sua família é composta por 6 membros: IL-17A até IL-17F, sendo que a IL-17A e a IL-17F são os membros mais próximos com 50% de homologia.²⁴ O gene IL17A está localizado no cromossomo 6q12.1, região genômica associada à asma.²⁵

Foi descrito também um subconjunto de células de memória Th2 humanas que são capazes de produzir simultaneamente citocinas Th17 e Th2, encontradas principalmente no pulmão.²¹ Essas células Th2 produtoras de IL-17 expressam fatores de transcrição GATA3 E

ROR γ T, necessários no desenvolvimento das linhagens Th2 e Th17,²⁶ como descrito na Figura 2:

Figura 2. (Adaptado de Wang,H. Wills-Karp, M.21): após exposição a alérgenos e agentes infecciosos, as células dendríticas (DC) são ativadas por moléculas como TSLP (linfopoiética tímica) ou C3 (anafilatoxina), as quais induzem as células T virgens a se diferenciarem em células TH2 ou TH17. Dependendo dos sinais inflamatórios locais, as células TH2 podem se tornarem produtoras de IL-17 que promovem a gravidade da asma.



O envolvimento da IL 17 na asma é explicado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF, IL-6, IL-1 γ) e quimiocinas (CXCL2 E CXCL-IL8) desencadeando a infiltração de neutrófilos, favorecendo a hipersecreção de muco, a hiperplasia de células caliciformes e a proliferação do músculo liso das vias aéreas.²⁷⁻²⁹

Em estudo com camundongos, foi demonstrada uma ligação causal entre as células Th17 e a insensibilidade aos corticoides na asma.³⁰ Foi observado que os tratamentos com glicocorticoides não anularam a produção de IL-17 por células Th17 in vitro, enquanto que os tratamentos com glicocorticoides foram eficazes na inibição de doenças causadas por Th2. Uma das razões desses achados seria pela maior expressão de receptor de glicocorticoide beta (GR β), a forma inativa desse receptor, induzida pela IL-17.²⁹

A correlação da gravidade e do controle da asma pediátrica com os níveis de IL-17 foram comprovadas em estudo realizado por Chen et al com 120 crianças asmáticas entre 5-18

anos, dentro das quais 10 delas eram asma grave. Esse trabalho evidenciou que os níveis séricos de IL-17 foram positivamente correlacionados com a FeNO e o C-ACT.³¹ Isso também foi observado em estudo realizado por Alyasin et al, em que as concentrações séricas da IL-17 e expressão gênica de mRNA de IL17 estava maior nas crianças com fenótipos graves em relação àquelas com asma leve/moderada.³²

Já a IL-10 é um importante fator anti-inflamatório secretado por diferentes células do sistema imune incluindo linfócitos Th1, Th2, Th17, linfócitos CD8+ e linfócitos B, mediante expressão do seu gene localizado no cromossomo 1q31q32. Além de inibir a síntese de TNF (fator de necrose tumoral) e IL-2, bem como citocinas relacionadas à inflamação alérgica como IL-4 e IL-5 também reduz o efeito citotóxico e diminui a produção de NO.³³⁻³⁶

Sua relação com a asma diz respeito à sua produção diminuída em detrimento do aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-4 e IFN- γ (interferon-gama) favorecendo a remodelação das vias aéreas, a limitação do fluxo aéreo e o dano ao tecido pulmonar. Assim, a IL10 inibe o aparecimento de asma por inibir a produção de citocinas Th2, bem como a infiltração de eosinófilos.³⁴ Isso foi demonstrado em estudo com crianças japonesas com asma leve a moderada realizado por Tomiita et al, onde foi observado que existem significativamente menos células produtoras de IL-10 em pacientes com asma em comparação com controles não asmáticos, mostrando menor produção de IL-10 em pacientes com asma.³⁵

Corroborando com esses achados, foi demonstrado em uma coorte de crianças inglesas entre 5 e 16 anos, incluindo 19 pacientes com asma grave e refratária ao tratamento, já em uso de 800mcg ou mais de beclometasona, a redução dos níveis de IL-10 no lavado broncoalveolar em comparação com crianças não asmáticas, as quais tiveram aumento progressivo após tratamento com dexametasona.³⁷

No entanto, outros estudos mostraram resultados conflitantes. Em estudo brasileiro com 45 crianças com asma grave sendo 13 destas, asma grave refratária à terapia (STRA), Eller et al observou que os níveis de IL-10 em amostras de escarro estavam maiores no grupo de asmáticos refratários.³⁸ Hussein et al, avaliando 65 crianças com asma grave e 50 controles saudáveis, observou que não houve diferença significativa no nível de IL-10 entre os 2 grupos.³⁶ Esses resultados incongruentes podem ser explicados pelo fato de que a função da IL-10 pode não estar relacionada apenas ao seu nível sérico, mas também a outros fatores como sua expressão gênica.

Como possivelmente a dosagem das interleucinas pode sofrer variação conforme o uso de corticoides ou variar dependendo do local da coleta, a avaliação dos polimorfismos faz-se

necessária. Maalmi et al avaliaram quais polimorfismos da IL17A e IL17F tinham de fato relação com a asma na faixa pediátrica na Tunísia. Foram selecionadas 171 crianças asmáticas, dentre as quais 9 eram asma grave e avaliado 3 polimorfismos: rs2275913 (IL17A), rs2397084 e rs763780 (IL17F), sendo que apenas os dois primeiros mostraram, de fato, associação com a asma pediátrica.³⁹ Com metodologia semelhante, Wang et al avaliaram 9 polimorfismos da IL17A em amostra de crianças entre 5 e 12 anos com mais de mil crianças asmáticas do Taiwan. Nesse trabalho, o único polimorfismo que evidenciou associação com asma pediátrica foi o rs8193036 da IL17A. Contudo, nesse trabalho não houve uma diferenciação de gravidade da asma e parâmetros de função pulmonar entre as crianças envolvidas.⁴⁰

Schieck et al, em um grande estudo multicêntrico de crianças alemãs oriundas das coortes Multicentre Asthma Genetics in Childhood (MAGICS) e International Study of Asthma and Allergy in Childhood, phase II (ISAAC II) se propuseram a avaliar se genes da via TH17 influenciavam na ocorrência de asma e em níveis séricos de IgE durante a infância. Foram avaliados 203 polimorfismos de 17 genes envolvidos nessa via, mas o rs9395766 IL17A teve associação positiva com asma atópica, enquanto que o rs7741835 IL17F foi associado negativamente com asma, e ambos os fenótipos de asma, atópica e não atópica.⁴¹ De modo semelhante, aqui no Brasil um estudo realizado com crianças de Salvador/Bahia avaliou variantes em genes da via da IL17 e encontrou que o SNV rs1974226 na IL17A estava associado positivamente a asma.⁴² Variantes nos genes IL17RC, NFKB1 e RORC também foram associados ao risco de asma nessa população.

Já com crianças chinesas asmáticas, Chen et al, mostraram que pacientes com aumento de IgE e função pulmonar alterada para padrão de obstrução mostraram forte associação com a expressão do genótipo homozigoto AA do polimorfismo rs2275913 na IL17A.²⁵ O impacto funcional desse polimorfismo a nível de expressão da citocina foi demonstrado no sangue do cordão umbilical humano, sugerindo que tal variante pode contribuir para o desenvolvimento da asma em um estágio inicial da vida.⁴¹

Em uma avaliação retrospectiva e considerando que muitas das crianças asmáticas, iniciam seus quadros de sibilância com quadros de bronquiolite, esse mesmo polimorfismo (rs2275913 IL17A) foi avaliado por Holster et al, com o objetivo de avaliar o impacto de uma bronquiolite antes dos 6 meses de vida em relação à presença de asma, uso de medicação para asma e presença de rinite alérgica em escolares e adolescentes.⁴³ Nesse trabalho, esse polimorfismo foi associado com diminuição do risco de asma pós bronquiolite entre os adolescentes entre 11-13 anos, mas não mais cedo durante o período escolar. Lauhkonen et al,

também não observaram associação com asma ou alteração da função pulmonar após episódios de bronquiolite avaliando polimorfismos do receptor da IL-17 (IL17R).⁴⁴

No caso da IL-10, uma metanálise realizada por Huang et al, envolvendo 16 estudos caso-controle compreendendo 2.494 casos e 2.160 controles avaliou a associação entre polimorfismos na região promotora da IL10 e o risco de asma pediátrica.³³ Esses estudos se concentraram na análise de 3 polimorfismos da IL10: rs1800896 (-1082G/A), rs1800871 (-819C/T) e rs1800872 (-592C/A) e observaram que o primeiro foi associado com o risco de asma, sendo observado uma frequência do alelo G de 14,72% em asiáticos e 43,98% em não asiáticos. Outro resultado observado foi que heterozigose de -1082G/A foi significativamente associado à asma não atópica, enquanto que a forma recessiva estava relacionada à asma atópica. Lyon et al avaliando esses mesmos polimorfismos entre 518 crianças da coorte Childhood Asthma Management Program (CAMP) com asma leve e moderada observou correlação positiva com os níveis de IgE e sem associação com a função pulmonar, sendo observado apenas que a presença do alelo C do polimorfismo 4299 T/C estava relacionada a aumento de VEF1.⁴⁵ Já a função pulmonar foi avaliada por Kim et al avaliando esses mesmos 3 polimorfismos em 333 crianças asmáticas. Foi observado que apenas o polimorfismo rs1800896 estava relacionado com hiper-reatividade brônquica testada com metacolina.⁴⁶

Hussein et al, ao avaliar o SNV rs1800896 em 200 crianças asmáticas da Arábia Saudita, sendo 65 delas com asma grave, observaram relevância estatística com asma atópica quando comparados aos controles. Além disso, os níveis séricos de IgE total foram significativamente maiores em pacientes de asma grave e com genótipos de AA e GA do que com GG.³⁶

Zhang et al relataram que a substituição C-T do polimorfismo rs1800871 poderia aumentar o nível sérico total de IgE, possivelmente devido ao aumento da expressão de IL-10.⁴⁷ Adicionalmente, Smolnikova et al, et al. concluíram que indivíduos com o genótipo AA do rs1800872 do gene IL10 estava ausente no grupo controle e numa porcentagem pequena no grupo de asma controlada, sugerindo que a variante A desse alelo também foi correlacionada com menores níveis de IL-10 e gravidade da asma.⁴⁸

Mocellin et al em estudo com crianças brasileiras observou, estudando 4 SNVs de IL10 (rs1518111, rs3024490, rs3024496 e rs3024491), que a asma moderada estava associada a alta frequência do alelo T do SNV rs3024491, o qual o genótipo TT dessa variante correlacionava-se com redução da IL-10 e aumento de células T reguladoras, sugerindo possíveis mecanismos que influenciam na gravidade da asma.⁴⁹

De forma semelhante ao estudo com IL17, o risco de asma após bronquiolite também foi estudado por Holster et al com polimorfismos de IL10. Nesse estudo foi observado que a presença do alelo A do genótipo rs1800896 correlacionava-se com o diagnóstico de asma e uso de corticoide inalatório na adolescência em torno dos 11-13 anos.⁵⁰

No Brasil, Figueiredo et al. demonstrou que o polimorfismo rs3024492 da IL10, ainda pouco estudado na asma está associado positivamente com sintomas de asma atópica em crianças da cidade de Salvador/BA.⁵¹

2.5. Conclusão

A asma é uma doença heterogênea caracterizada por mecanismos fisiopatológicos complexos de genes e interleucinas que interagem em diversos fenótipos clínicos. Evidências emergentes sugerem que a ativação das células produtoras de IL-17 pode estar associada à resposta Th2 low e ao desenvolvimento de formas graves da asma, como consequência de predisposição genética. Adicionalmente, um comprometimento genético da adequada resposta imunorregulatória da via IL-10 pode contribuir para uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento da asma grave em crianças. Entretanto, até o momento, são escassos os estudos avaliando o impacto de variantes genéticas na IL17 e na IL10 com a gravidade e controle terapêutico de crianças com asma. Assim, mais estudos com crianças especificamente com asma grave são necessários para melhor explorar os fatores que regulam a produção das IL-17 e da IL-10, a fim de elucidar os mecanismos fisiopatológicos que medeiam a gravidade e o controle da asma, otimizando custos e tratamento para essa parcela de pacientes com asma grave.

2.6. Referências Bibliográficas:

1. Pereira AB, Basili, JOV, Pereira GF, Kalil J, Giavina-Biancgu P, Agondi RC. Comportamento clínico dos pacientes com asma durante a pandemia de Covid-19. *Arq Asma Alerg Imunol.* 5(1):93-99, 2021.
2. Solé D, Rosário Filho NA, Sarinho ES, Camelo-Nunes IC, Barreto BA, Medeiros ML, et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). *J Pediatr (Rio J).* 2015;91:30-5.
3. Chung KF, Israel E, Gibson PG, Hurst J. *Severe Asthma.* Sheffield, United Kingdom: European Respiratory Society; 2019; pp. 1-360

4. Hekking PW, Wener RR, Amelink M, Zwinderman AH, Bouvy ML, Bel EH. The prevalence of severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):896-902.
5. .Kerkhof M, Tran TN, Soriano JB, Golam S, Gibson D, Hillyer EV, et al. Healthcare resource use and costs of severe, uncontrolled eosinophilic asthma in the UK general population. *Thorax*. 2018;73(2):116-124.
6. Andrade, Wenderson Clay Correia de ; Lasmar, Laura Maria De Lima Belizário Facury ; Ricci, Cristiane De Abreu Tonelli ; Camargos, Paulo Augusto Moreira ; Cruz, Álvaro A . Phenotypes of severe asthma among children and adolescents in Brazil: a prospective study. *BMC Pulmonary Medicine (Online)* , v. 15, p. 36, 2015
7. Faleiro, Rita C. ; Mancuzo, Eliane V. ; Lanza, Fernanda C. ; Queiroz, Mônica V. N. P. ; de Oliveira, Luciano F. L. ; Ganem, Vinicius O. ; Lasmar, Laura B. . Exercise Limitation in Children and Adolescents With Severe Refractory Asthma: A Lack of Asthma Control?. *Frontiers in Physiology* , v. 11, p. 1-10, 2021.
8. Alves AM, Marques de Mello L, Lima Matos AS, Cruz AA. Severe asthma: Comparison of different classifications of severity and control. *Respiratory Medicine*. 2019;156:1-7.
9. Versiani Nunes Pinheiro de Queiroz, Mônica ; Gonçalves Alvim, Cristina ; Cruz, Álvaro A. ; De Lima Belizário Facury Lasmar, Laura Maria . Lung function in severe pediatric asthma: a longitudinal study in children and adolescents in Brazil. *Clinical and Translational Allergy* , v. 7, p. 48-59, 2017.
10. Pizzichini MM, Carvalho-Pinto RM, Cançado JE, Rubin, AS, Cerci Neto A, Cardoso AP et al. 2020 Brazilian Thoracic Association recommendations for the management of asthma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2020;46(1).
11. Wadhwa R, Dua K, Adcock IM, Horvat JC, Kim RY, Hansbro PM. Cellular mechanisms underlying steroid-resistant asthma. *European Respiratory Review*. 2019;28(153):190096.
12. Nagakumar P, Puttur F, Gregory LG, Denney L, Fleming L, Bush A, Lloyd CM, Saglani S. Pulmonary type-2 innate lymphoid cells in paediatric severe asthma: phenotype and response to steroids. *European Respiratory Journal*. 2019;54(2):1801809.
13. Holguin F, Cardet JC, Chung KF, Diver S, Ferreira DS, Fitzpatrick A et al. Management of severe asthma: a European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline. *European Respiratory Journal*. 2019;55(1):1900588.
14. Duong-Thi-Ly H, Nguyen-Thi-Thu H, Nguyen-Hoang L, Nguyen-Thi-Bich H, Craig TJ, Duong-Quy S. Effects of genetic factors to inhaled corticosteroid response in children with

- asthma: a literature review. *Journal of International Medical Research*. 2017;45(6):1818-30.
15. Almomani B, Hawwa AF, Millership JS, Heaney L, Douglas I, McElnay JC, Shields MD. Can Certain Genotypes Predispose to Poor Asthma Control in Children? A Pharmacogenetic Study of 9 Candidate Genes in Children with Difficult Asthma. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60592.
 16. Duong-Thi-Ly, H. Effects of genetic factors to inhaled corticosteroid response in children with asthma: a literature review. *Journal of International Medical Research* 2017, Vol. 45(6) 1818–1830.
 17. L. P. Chung, G. Waterer and P. J. Thompson. Pharmacogenetics of b2 adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting b-agonists and asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 2011 (41) 312–326.
 18. Drazen, J.M. Heterogeneity of therapeutic responses in Asthma. *British Medical Bulletin*. 2000; 56 (No. 4): 1054-1070
 19. ST Weiss et al. Overview of the pharmacogenetics of asthma treatment. *British Medical Bulletin*. 2000; 56 (No. 4): 1054-1070.
 20. Jones, B.L. Linkage and Genetic Association in Severe Asthma. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2016; 36: 439–447.
 21. Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11(5):388-94.
 22. Branchett WJ, Stölting H, Oliver RA, Walker SA, Puttur F, Gregory LG, Gabryšová L, Wilson MS, O'Garra A, Lloyd CM. A T cell-myeloid IL-10 axis regulates pathogenic IFN- γ -dependent immunity in a mouse model of type 2-low asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(2):666-678.e9.
 23. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, Tsartsali L, Lloyd CM, Bush A, Saglani S. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without TH2 cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* . 2012;129(4):974-82.
 24. Hofmann MA, Fluhr JW, Ruwwe-Glösenkamp C, Stevanovic K, Bergmann K, Zuberbier T. Role of IL-17 in atopy—A systematic review. *Clinical and Translational Allergy*. 2021;11(6).
 25. Chen, J. The Polymorphism of IL-17 G-152A was Associated with Childhood Asthma and Bacterial Colonization of the Hypopharynx in Bronchiolitis. *J Clin Immunol*. 2010; 30:539–545.

26. Wang YH, Voo KS, Liu B, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med*. 2010; 207:2479–2491
27. Chakir J, Shannon J, Molet S, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111:1293–1298.
28. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*. 1998; 160:3513–3521.
29. Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2019;13(11):1057-68.
30. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*. 2008; 181:4089–4097
31. Chien JW, Lin CY, Yang KD, Lin CH, Kao JK, Tsai YG. Increased IL-17A secreting CD4+ T cells, serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(9):1018-26.
32. Alyasin S, et al. Interleukin-17 Gene Expression and Serum Levels in Children with Severe Asthma. *Iran J Immunol*. 2013; 10(3):179-87
33. Huang ZY, Cheng BJ, Wan Y, Zhou C. Meta-analysis of the IL-10 promoter polymorphisms and pediatric asthma susceptibility. *Genetics and Molecular Research*. 2016;15(2).
34. Zhang YL, Luan B, Wang XF, Qiao JY, Song L, Lei RR, Gao WX, Liu Y. Peripheral Blood MDSCs, IL-10 and IL-12 in Children with Asthma and Their Importance in Asthma Development. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63775.
35. Tomiita M, Campos-Alberto E, Shima M, Namiki M, Sugimoto K, Kojima H, Watanabe H, Sekine K, Nishimuta T, Kohno Y, Shimojo N. Interleukin-10 and interleukin-5 balance in patients with active asthma, those in remission, and healthy controls. *Asia Pacific Allergy*. 2015;5(4):210.
36. Hussen et al. Association of serum cytokines levels, interleukin 10 _1082G/A and interferon-c +874T/A polymorphisms with atopic asthma children from Saudi Arabia. *Cellular Immunology*. 2014; 289: 21–26.
37. Gupta A, Dimeloe S, Richards DF, et al. Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma *Thorax* 2014;69: 508–515.

38. Eller MC, Vergani KP, Saraiva-Romanholo BM, Antonangelo L, Leone C, Rodrigues JC. Can inflammatory markers in induced sputum be used to detect phenotypes and endotypes of pediatric severe therapy-resistant asthma? *Pediatric Pulmonology*. 2018;53(9):1208-17.
39. Maalmi H, Beraies A, Charad R, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. IL-17A and IL-17F genes variants and susceptibility to childhood asthma in Tunisia. *Journal of Asthma*. 2014;51(4):348-54.
40. Wang JY, Shyur SD, Wang WH, Liou YH, Lin CG, Wu YJ, Wu LS. The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population. *Allergy*. 2009;64(7):1056-60.
41. Schieck M, Michel S, Suttner K, Illig T, Zeilinger S, Franke A, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Kerzel S, Kabesch M. Genetic variation in TH17 pathway genes, childhood asthma, and total serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):888-91.
42. Silva MJ, de Santana MBR, Tosta BR, Espinheira RP, Alcantara-Neves NM, Barreto ML, Figueiredo CA, Costa RDS. Variants in the IL17 pathway genes are associated with atopic asthma and atopy makers in a South American population. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019; 29;15:28.
43. Holster A, Teräsjärvi J, Lauhkonen E, Törmänen S, Helminen M, Koponen P, Korppi M, Peltola V, He Q, Nuolivirta K. IL-17A gene polymorphism rs2275913 is associated with the development of asthma after bronchiolitis in infancy. *Allergol Int*. 2018;67(1):109-113.
44. Lauhkonen E, Holster A, Teräsjärvi J, Nuolivirta K, He Q, Korppi M. IL17RA variations showed no associations with post-bronchiolitis asthma or lung function. *Pediatr Int*. 2021;63(2):196-201.
45. Lyon H, Lange C, Lake S, Silverman EK, Randolph AG, Kwiatkowski D, Raby BA, Lazarus R, Weiland KM, Laird N, Weiss ST. IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children. *Genet Epidemiol*. 2004;26(2):155-65.
46. Kim KW, Lee KE, Hong JY, Kim MN, Heo WI, Sohn MH, Kim KE. Involvement of IL-10 gene promoter polymorphisms in the susceptibility for childhood asthma. *Lung*. 2011;189(5):417-23.
47. Zhang J, Chen H, Hu L, Fu J, Zhang H, Chen Y. Correlation between polymorphism of IL-4 and IL-10 gene promoter and childhood asthma and their impact upon cytokine expression. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2002;82(2):114-8.

48. Smolnikova MV, Smirnova SV, Freidin MB, Tyutina OS. Immunological parameters and gene polymorphisms (C-590T IL4, C-597A IL10) in severe bronchial asthma in children from the Krasnoyarsk region, West Siberia. *International Journal of Circumpolar Health*. 2013;72(1):21159.
49. Mocellin M, de Azeredo Leitão LA, de Araújo PD, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM, de Souza APD, Pinto LA. Association between interleukin-10 polymorphisms and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells in asthmatic children. *J Pediatr (Rio J)*. 2021;97(5):546-551.
50. Holster A, Nuolivirta K, Törmänen S, Lauhkonen E, Teräsjärvi J, Vuononvirta J, Koponen P, Helminen M, He Q, Korppi M. Interleukin-10 gene polymorphism rs1800896 is associated with post-bronchiolitis asthma at 11-13 years of age. *Acta Paediatr*. 2019;108(11):2064-2069.
51. Figueiredo CA, Barreto ML, Alcantara-Neves NM, Rodrigues LC, Cooper PJ, Cruz AA, Pontes-de-Carvalho LC, Lemaire DC, dos Santos Costa R, Amorim LD, Vergara C, Rafaels N, Gao L, Foster C, Campbell M, Mathias RA, Barnes KC. Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Jun;131(6):1683-90.

3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL10 E IL17 NA ASMA GRAVE PEDIÁTRICA

3.1. Introdução

A asma grave é uma condição clínica incomum na faixa etária pediátrica, acometendo menos de 5 % das crianças com asma.¹ No entanto, abrange fenótipos diversos quanto à frequência e gravidade dos sintomas, função pulmonar e resposta ao tratamento.² Uma importante razão para o sucesso limitado no controle da asma grave, e conseqüentemente, sua elevada morbidade é provavelmente a natureza heterogênea da doença, cuja patogênese resulta de uma interação de fatores ambientais e variabilidade individual associados à uma base genética complexa.³

Classicamente, a asma alérgica é orquestrada pela resposta imune do tipo T-helper 2 (Th2) que é mediada por citocinas, incluindo IL4, IL5 e IL13, responsáveis pela clássica eosinofilia, produção de IgE, hiperresponsividade das vias aéreas e remodelação das vias aéreas. No entanto, o paradigma Th2 falha na interpretação de todo o espectro de gravidade da asma.⁴ Estudos têm demonstrado que a heterogeneidade da asma pode ser explicada com fenótipos moleculares distintos abrangendo respostas Th2-high e Th2-low e uma variedade de interleucinas.⁵ Além disso, em avaliação broncoscópica de crianças com asma grave refratária à terapia com corticoides foi visto que, ao contrário dos adultos, apesar da inflamação eosinofílica na via aérea, os mediadores Th2 encontravam-se na sua maioria, ausentes.⁶

Dessa forma, a asma grave pode ser regida pela inflamação de citocinas não relacionadas à via Th2 clássica.⁴ Nesse contexto, interleucinas como IL10 e IL17 podem explicar a dificuldade de controle clínico e funcional nesse grupo de pacientes e sua refratariedade ao tratamento. A IL10 atua reduzindo a inflamação alérgica, ao inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Na asma grave, possivelmente ocorre resposta anti-inflamatória defeituosa de IL10 a doses crescentes de esteróides inalatórios nesses pacientes.⁷ Ao contrário da IL-10, a IL-17 atua estimulando a produção de citocinas inflamatórias do perfil TH17, contribuindo para a inflamação das vias aéreas.⁸

Variações nos genes das vias da IL10 e da IL17 podem estar envolvidas na fisiopatologia da asma atópica.^{9,10} Vários polimorfismos no gene IL10 como rs1800896, rs1800871 e rs1800872, foram descritos em metanálise de pacientes pediátricos de diversas etnias avaliando o risco de asma.¹⁰ Já estudo brasileiro com crianças asmáticas, avaliando o polimorfismo rs302449 da IL10 observou associação com a gravidade da asma moderada.¹¹ Em relação à IL17, também foram descritos SNVs com o risco de asma como rs2275913 e rs2397084 em

crianças na Tunísia ou com o risco de asma após quadros de bronquiolites em crianças chinesas.^{12,13} Entretanto, não foram encontrados estudos prévios associando variantes genéticas da IL10 e IL17 apenas com asma grave e seu controle clínico.

Como estas citocinas desempenham papéis importantes na patogênese da asma, os seus polimorfismos genéticos podem ser biomarcadores úteis de características individuais de pacientes, os quais, por sua vez, podem ser levados em conta para o ajuste dos regimes terapêuticos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar associações entre polimorfismos nos genes IL10 e IL17 com a susceptibilidade à asma grave, o controle da asma e a responsividade ao broncodilatador em uma amostra de crianças e adolescentes com asma grave.

3.2. Pacientes e Métodos

Foi realizado um estudo transversal observacional, aninhado à uma coorte prospectiva de asma grave, no período entre 2021 e 2022 no Centro Multidisciplinar para Asma de Difícil Controle (CEMAD) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) em colaboração com o Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG) e com o Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular (IMUNOBIO) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA).

Foram recrutados de uma coorte bem selecionada de asma grave 62 pacientes, em acompanhamento clínico durante uma média de 4 anos, o que permitiu a validação do diagnóstico de AG, a avaliação dos fatores associados à falha do controle (diagnóstico diferencial, comorbidades, fatores ambientais, adesão, técnica inalatória) e o ajuste das medicações de acordo com o nível de controle da asma, segundo o protocolo do serviço segundo protocolo previamente publicado.¹⁴⁻¹⁶

Nessa coorte, o diagnóstico de AG foi definido naqueles pacientes sem controle clínico ou com controle dos sintomas às custas de elevadas doses de corticoide inalado associados à LABA e/ou outros controladores, e/ou uso frequente ou crônico de corticoide oral (CO), além de um diagnóstico funcional bem estabelecido durante seu acompanhamento ao longo dos anos (espirometria diagnóstica com elevação de 12% e/ou 200 mL do VEF1 após administração de broncodilatador de curta ação). Os pacientes selecionados foram ainda classificados em AG refratários (não controlados) e não refratários (controlados) ao tratamento. A AG refratária foi caracterizada pela ausência de controle dos sintomas, mesmo com a utilização de elevadas doses

de corticoide inalado conforme a idade, associado ao β_2 agonista de ação prolongada e/ou antileucotrienos e uso frequente ou crônico de CO, conforme Global Initiative for Asthma.¹⁷

Foram excluídos participantes com parentesco de 1º grau como irmãos, outras doenças pulmonares crônicas, além dos que não concordaram em participar da pesquisa.

Foram ainda selecionados para controles genético 19 adultos sadios entre 20 e 57 anos, cuja participação foi divulgada em faculdades de medicina, pública e privadas, da cidade de Belo Horizonte. Asma, rinite alérgica e dermatite atópica foram excluídas nos controles utilizando-se o questionário International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), previamente utilizado em estudos com adultos brasileiros.¹⁸

Para a admissão no estudo, foram realizadas avaliação de variáveis clínicas e funcionais e a coleta de sangue periférico para a genotipagem, os quais ocorreram entre agosto e dezembro de 2021. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: Grupo 1: controle saudável, Grupo 2: asma controlada e Grupo 3: asma não controlada para avaliação dos 3 desfechos: suscetibilidade à asma grave, controle da asma e reversibilidade ao broncodilatador.

Inicialmente, foram coletadas informações pregressas e variáveis sociodemográficas: a idade do início dos sintomas e do uso do corticoide inalado, tempo de acompanhamento no serviço, relato de exposição a tabagismo materno na gestação e tabagismo passivo atual do paciente, internação anterior em Centro de Terapia Intensiva (CTI) devido a asma, exacerbação grave da asma nos últimos 12 meses anteriores (caracterizada por necessidade de uso de oxigênio suplementar ou corticoide sistêmico).¹⁷

Os pacientes ainda foram avaliados em relação a comorbidades relacionadas à asma (rinite alérgica e atopias, transtornos emocionais e comportamentais, doença do refluxo gastroesofágico e síndrome do respirador oral) em avaliação multidisciplinar. O diagnóstico e a classificação da gravidade da Rinite foram definidos conforme os critérios do Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA).¹⁹

A dose do corticoide inalado, foi avaliado em equivalência com a budesonida. A taxa de adesão ao corticoide inalado, considerada otimizada quando acima de 80%, foi obtida pelo cálculo da porcentagem da dose total recomendada em relação a dose utilizada, verificando-se a contagem de doses no inalador pressurizado dosimetrado e a contagem das cápsulas utilizadas em inaladores de pó.¹⁶ Foram também avaliados o uso atual antileucotrienos ou imunobiológicos. Foram utilizados inaladores de pó com as formulações da budesonida em associação a formoterol (Alenia® - Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A., Guarulhos, Brasil); nebulímetros pressurizados contendo fluticasona em associação a salmeterol (Seretide® -

GlaxoSmithKline, Stevenage, Reino Unido) e omalizumabe (Xolair; Novartis Biociências S/A., São Paulo, Brasil).

No dia da coleta do sangue, foi avaliado o nível de controle da asma nas últimas quatro semanas utilizando parâmetros estabelecidos pelo GINA.¹⁷ Usou-se ainda o Asthma Control Test (ACT), 20 em maiores de 12 anos e em crianças com idade de 5 a 12 anos utilizou-se c-ACT, definindo ausência de controle os valores abaixo de 20 do total de 25 pontos.²¹

O teste alérgico foi realizado através da punctura da pele com exposição de alérgenos é considerado positivo quando o tamanho da pápula foi superior a 3 mm em relação ao controle negativo.²² Os seguintes alérgenos foram testados (IMUNOTEC, São Paulo, Brasil): Dermatophagoydes Pteronyssinus, Dermatophagoyde Farinae, Blomia Tropicalis, epitélio de cão e gato, Aspergillus, Penicillium, Periplaneta Americana e Cladosporium. Foram também avaliados o valor sérico da imunoglobulina IgE e da eosinofilia periférica.

Foram mensurados peso, estatura e índice de massa corpórea / idade (IMC), em valores absolutos para avaliação do diagnóstico nutricional.

As espirometrias atuais foram realizadas dentro dos meses de coletas dos dados, utilizando o espirômetro Koko PFT Spirometer (Koko® Spirometer, PDS Instrumentation, Louisville, CO, EUA) conforme recomendações da American Thoracic Society (ATS) antes e após a administração da dose de 400 µg de salbutamol por nebulímetro pressurizado. Foram consideradas variação significativa ao broncodilatador (BD) ou reversibilidade ao broncodilatador as elevações de 200 mL ou 12% no Volume Expiratório Forçado do no primeiro segundo (VEF1).²³

O sangue periférico foi coletado a vácuo em tubos de 10 ml contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer – BD, E.U.A.) no laboratório Central do Hospital das Clínicas/UFMG. Imediatamente após a coleta, essas amostras foram processadas no Laboratório de Genética do ICB/Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As amostras de sangue foram centrifugadas em centrífuga Kasvi ® a 3000 RPM por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi realizada a separação do plasma e do buffy coat, os quais foram colocados em tubos eppendorf cada um e, posteriormente, congelados para o envio ao Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular (IMUNOBIO)/UFBA, de acordo com as normas da ANVISA para transporte, segurança e armazenamento de material imunobiológico.

No IMUNOBIO - ICS/UFBA foi realizada a extração do DNA a partir de amostras de sangue de acordo com o protocolo do kit Gentra® Puregene® Blood Kit (Quiagen). Todas as amostras genotipadas foram uniformizadas à concentração de 5 ng/µl e armazenadas à -30°C

até seu uso. Foram genotipados os SNVs rs3819024 e rs2275913 na IL17A e o rs3024498 na IL10, que foram selecionados baseado em estudos prévios de associação com asma. A genotipagem foi realizada usando a tecnologia de TaqMan probe-based 5'-nuclease assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no equipamento QuantStudio 12K da Applied Biosystem. Após a realização dos ensaios foram considerados para análise apenas SNVs com taxa de genotipagem “call rates” de no mínimo 93% e que apresentaram $p > 0.05$ na análise de equilíbrio de Hardy–Weinberg usando os indivíduos saudáveis da população. Como controles, utilizamos poços sem DNA para avaliar amplificação inespecífica.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CEP) 4.048.940. Todos os pacientes e seus responsáveis que consentiram em participar do estudo e assinaram o termo de assentimento e consentimento livre esclarecido.

3.2.1. Análise estatística

As variáveis foram digitadas em um banco de dados e analisadas com IBM SPSS Statistics software package, version 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, United States).

A distribuição normal das variáveis quantitativas foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão, mediana (quartil 1 – quartil 3) ou frequência relativa (frequência absoluta), conforme o tipo de variável. Para a comparação entre os grupos (pacientes vs controles ou genótipos), foram utilizados os testes t de Student não pareado ou Mann-Whitney, conforme indicado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As análises de associação foram realizadas por Regressão Logística em três modelos genéticos (alélico, aditivo e dominante), ajustados pelas covariáveis sexo e idade, utilizando o software Plink 1.9 (Purcell et al., 2007). Foram considerados estatisticamente significativos apenas os resultados de associações de SNVs obtidos com $p < 0,05$, os quais foram revalidados por meio do cálculo dos procedimentos de permutação (Perm), a fim de reduzir o risco de associações com resultados falso-positivos de p-valor.²⁴

3.3. Resultados

Dos 62 pacientes em acompanhamento com asma grave, 6 foram excluídos do estudo pelo parentesco com outros pacientes selecionados totalizando 56 pacientes entre 5 e 28 anos com asma grave e 19 controles saudáveis. As variáveis clínicas e funcionais da população estudada estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

	G1. Grupo controle (n = 19)	G2. Grupo asma (C) (n = 19)	G3. Grupo asma (NC) (n = 37)	p
Idade, anos	29,84(± 8,53)	14.632 (± 3,74)	12,16 (±5,48)	G2 e G3: 0,063
Sexo: M/F	8 (42,10%) 11 (57,90%)	10 (52,6%) 9 (47,4%)	18 (48,65%) 19 (51,35%)	0,893
Idade de início de sintomas (meses) #	---	11	6	0,947
Idade de início de CI (meses) #	---	34	24	0,563
Tabagismo materno na gestação	---	1 (5,26%)	3 (8,10%)	0,696
Tabagismo passivo	---	6 (31,58%)	17 (45,94%)	0,301
Internação em CTI	---	7 (36,84%)	9 (24,32%)	0,271
Internação grave no último ano	---	1 (5,26%)	6 (16,21%)	0,237
Comorbidades Rinite alérgica	---	9 (47,37%)	15 (40,54%)	0,699
Rinite + outras comorbidades*	---	10 (52,63%)	22 (59,46%)	0,699
ACT #	---	24	20	0,0024
Antropometria				
Peso, Kg #	---	51,00	42,15	0,0276
Estatura, cm #	---	164	147,40	0,0026
IMC, kg/m ² #	---	20,800	19,000	0,3754
Medicamentos				
BUD equivalente (mcg)#	---	800	800	0,4434
Adesão mensurada (>80%)	---	9 (47,37 %)	22 (59,46 %)	0,256
CI+ LABA	---	18 (94,74%)	33(89,19%)	---
CI+ LABA+ antileucotrieno	---	0	3 (8,11%)	---
CI+ LABA+ Omalizumabe	---	1 (5,26%)	1 (2,70%)	---
Teste alérgico, n (%)				
Positivo	---	19 (100,00%)	18 (81,82%)	0,050
IgE absoluto				
Positivo	---	17 (89,47%)	30 (83,33%)	0,539

Eosinófilos periféricos (%) #	---	8,3	7,4	0,4124
Função pulmonar # VEF1 PRÉ (ml)	---	2,820	2,57	0,6817
VEF1 PRE (%)	---	86,00	89,50	0,4911
VEF1/CVF	---	82,00	82,00	0,7304
VEF1 PÓS (ml)	---	2,88	2,735	0,5912
VEF1 PÓS (%)	---	89,00	94,00	0,4951

Dados referentes a uma média de acompanhamento de 4,78 anos dos pacientes (\pm 3,22 anos).

Legenda – G1: grupo 1; G2: Grupo 2; G3: grupo3; C: controlada, NC: não controlada; M: masculino; F: feminino; CI: corticoide inalatório; CTI: Centro de Terapia Intensiva; *Outras comorbidades: dermatite atópica, respirador oral, doença refluxo gastroesofágico, transtornos emocionais e comportamentais; ACT: Asthma Control Test; BUD equivalente: dose equivalente à Budesonida; CI + LABA: Corticoide inalatório + β -agonista de ação longa; VEF1: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; # dados descritos em mediana (IQ25-75).

Observa-se que em relação às variáveis clínicas, funcionais e de marcadores biológicos não houve diferença estatística quanto à idade, sexo, idade de início dos sintomas, idade de início de corticoide inalatório, presença de tabagismo na gestação ou passivo, internações prévias em CTI ou internação grave nos últimos 12 meses, dose de corticoide inalatório, adesão mensurada, IMC, IgE, eosinófilos, VEF1 pré e pós e VEF1/CVF evidenciando que marcadores clínicos, funcionais e biológicos não discriminam os pacientes quanto ao nível de controle (controlado X não controlado).

Já variáveis como ACT, peso e estatura, porém não IMC mostraram diferenças entre os grupos controlado e não controlado. Os dois grupos de pacientes utilizavam corticoide inalado associado a outros controladores em doses elevadas, não havendo diferença estatisticamente significantes quanto à dose e taxa de adesão. Entretanto, o grupo não controlado apresentou menor estatura, evidenciando que não apenas a dose elevada, mas a falha no controle da asma pode interferir no crescimento de forma importante.

Com relação aos SNPs estudados, a Tabela 3 apresenta as características descritivas das variantes estudadas:

TABELA 3. CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS							
SNP	Gene	Cromossomo	Posição*	1/A2	AF	WE	Consequência Funcional
rs3024498	IL10	1	206768184	C/T	0.1429	0.3963	3 prime UTR variant

rs3819024	IL17A	6	52185988	G/A	0.2987	0.4647	2KB upstream variant
rs2275913	IL17A	6	52186235	A/G	0.2208	0.6999	2KB upstream Variant

A frequência do menor alelo (MAF) dos 3 SNVs na população estudada foi superior a 10%. Nenhuma variante foi excluída pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ou por baixa taxa de genotipagem. As variantes na IL17A estão na região 2KB Upstream Variant e a variante na IL10 está na região 3 prime UTR variant.

A associação das variantes estudadas da IL10 e IL17 e a chance de asma grave é mostrada na Tabela 4.

TABELA 4. ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES NOS GENES IL10 E IL17 COM ASMA GRAVE

Asma								
Variante	Genótipo	Controle (%)	Caso (%)	Modelo	OR	95%CI	Valor de P	P Perm
rs3024498 (IL10)	TT	13 (68,42)	44 (77,19)	Alélico	0,87	0,31-2,41	0,793	0,793
	TC	6 (31,58)	10 (17,54)	Aditivo	74,7	0,24-2360	0,141	0,137
	CC	0 (0)	3 (5,27)	Dominante	74,7	0,24-2352	0,141	0,141
rs3819024 (IL17)	AA	12 (63,16)	24 (44,45)	Alélico	1,80	0,75-4,31	0,221	0,1835
	AG	6 (31,58)	23 (42,59)	Aditivo	0,005	0,00-2,97	0,105	0,087
	GG	1 (5,26)	7 (12,96)	Dominante	NA	NA	NA	NA
rs2275913 (IL17)	GG	15 (78,95)	31 (54,38)	Alélico	3,04	0,99-9,27	0,045	0,039
	GA	4 (21,05)	22 (38,60)	Aditivo	0,25	0,01-5,89	0,393	0,454
	AA	0 (0)	4 (7,02)	Dominante	0,25	0,01-5,88	0,391	0,295

Apesar do intervalo de confiança passar pelo 1, o valor p permutacional é significativo demonstrando que a presença do alelo A da variante rs2275913 (IL17A) foi associada com maior chance do desenvolvimento de asma grave (OR: 3,04) em nossa amostra. Essa associação não foi encontrada nas análises genotípicas. As outras duas variantes não foram associadas com asma em nenhum dos modelos genéticos testados.

A relação do controle da asma grave com as variantes estudadas é mostrada na Tabela 5.

TABELA 5. ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES NOS GENES IL10 E IL17 COM CONTROLE DA ASMA GRAVE, DE ACORDO COM GINA

Controle de asma (GINA)								
Variante	Genótipo	Controle (%)	Caso (%)	Modelo	OR	95%CI	Valor de P	P Perm
rs3024498 (IL10)	TT	17 (89,47%)	26 (70,27%)	Alélico	4,2	0,90- 19,55	0,084	0,118
	TC	2 (10,52%)	8 (21,62%)	Aditivo	5,91	0,95- 36,84	0,056	0,037
	CC	0 (0%)	3 (8,11%)	Dominante	6,93	1,003- 47,9	0,049	0,02
rs3819024 (IL17)	AA	9 (47,37%)	18 (48,65%)	Alélico	0,87	0,38-1,99	0,831	0,929
	AG	7 (36,84%)	15 (40,54%)	Aditivo	0,65	0,27-1,56	0,334	0,7
	GG	3 (15,79%)	4 (10,81%)	Dominante	0,62	0,18-2,12	0,443	0,571
rs2275913 (IL17)	GG	13 (68,42%)	18 (48,65%)	Alélico	2,40	0,88-6,55	0,111	0,115
	GA	6 (31,58%)	15 (40,54%)	Aditivo	2,18	0,74-6,41	0,157	0,203
	AA	0 (0,0%)	4 (10,81%)	Dominante	2,03	0,60-6,82	0,254	0,295

Observamos que pacientes asmáticos com ao menos um alelo C do rs3024498 da IL10 possuem maior chance (OR: 6,93, IC95%: 1,00-47,9) de ter a sua doença não controlada, apesar do tratamento regular, conforme mostrado na tabela 4. As outras duas variantes não foram associadas com falha do controle da asma grave em nenhum dos modelos genéticos testados.

A relação da resposta ao broncodilatador e as variantes estudadas é descrita na Tabela 6:

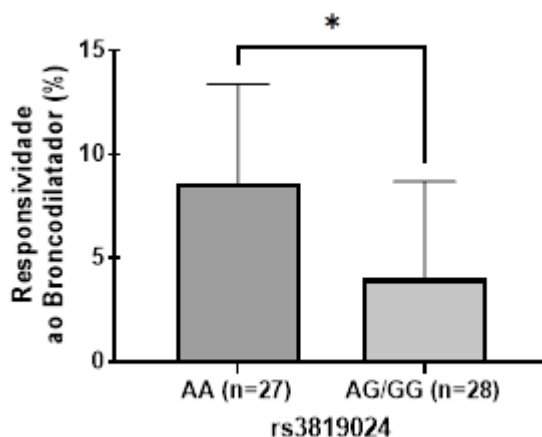
TABELA 6. ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES NOS GENES IL10 E IL17 COM REVERSIBILIDADE APÓS USO DE BRONCODILATADOR AGONISTA BETA2 DE CURTA AÇÃO (SABA)

Resposta ao broncodilatador								
Variante	Genótipo	Controle (%)	Caso (%)	Modelo	OR	95%CI	Valor de P	P Perm
rs3024498 (IL10)	TT	10 (83,33%)	31 (73,80%)	Alélico	1,28	0,33-4,93	1	1
	TC	1 (8,33%)	9 (21,42%)	Aditivo	0,99	0,28-3,49	0,99	1
	CC	1 (8,33%)	2 (4,76%)	Dominante	1,38	0,24-7,88	0,714	0,833
rs3819024 (IL17)	AA	9 (75,0%)	18 (42,86%)	Alélico	3,89	1,07-14,12	0,042	0,046
	AG	3 (25,0%)	18 (42,86%)	Aditivo	4,72	1,16-19,19	0,03	0,02
	GG	0 (0,0%)	6 (14,28%)	Dominante	5,20	1,11-24,34	0,04	0,02
rs2275913 (IL17)	GG	7 (58,33%)	23 (54,77%)	Alélico	1,35	0,45-4,05	0,790	0,636
	GA	5 (41,67%)	16 (38,09%)	Aditivo	1,78	0,55-5,81	0,337	0,343
	AA	0 (0,0%)	3 (7,14%)	Dominante	1,52	0,39-5,94	0,548	0,857

Em relação às variantes genéticas estudadas observa-se que os pacientes asmáticos com ao menos um alelo G do rs3819024 (IL17A) possuem maior chance de não responder ao estímulo agudo com broncodilatador beta-2 adrenérgico. A associação foi significativa nos três modelos testados: alélico (OR: 3.89, IC95%: 1,07-14,12), aditivo (OR: 4,72; IC95%: 1,16-19,19) e dominante (OR: 5,20; IC95%: 1,11-24,34). Já as outras duas variantes não foram associadas com falta de reversibilidade em pacientes com asma em nenhum dos modelos genéticos testados.

Corroborando esses achados, os pacientes com os genótipos AG ou GG desse SNV apresentaram menor porcentagem de resposta broncodilatadora quando comparado com os indivíduos com o genótipo AA ($p < 0,05$, Figura 2).

Figura 3. Comparação Da Mediana Da Porcentagem Da Mudança Da FEV1% Predita Após Uso Do Broncodilatador De Acordo Com Os Genótipos Do Rs3819024. Indivíduos Com Asma Que Possuem O AG Ou GG Apresentaram Menor Reversibilidade Ao Broncodilatador Quando Comparado Aos Indivíduos AA. ($P < 0,05$, Mann-Whitney)



3.4. Discussão

O presente estudo demonstrou que os polimorfismos genéticos das IL-10 e IL-17 foram associados à suscetibilidade, ao controle e à resposta ao broncodilatador em pacientes de uma coorte de asma grave refratária ao tratamento.

Classicamente na pediatria, a inflamação das vias aéreas relacionada ao processo alérgico é tipicamente eosinofílica e orquestrada pelas células Th2. No entanto, eosinofilia não é sinônimo de ativação da resposta Th2. 4,5 Isso foi demonstrado em uma coorte pediátrica com pacientes asmáticos graves refratários a terapia após coleta de amostras de escarro e de biópsia endobrônquica, as quais não apresentaram níveis significativos de IL4, IL5 e IL13. 6 Diante disso, questiona-se qual seria mecanismo imune que explicaria a conversão da eosinofilia na asma e o fenótipo de gravidade.

Uma das possibilidades seria à relacionada à interleucina 10. Essa interleucina regula os linfócitos T helper e pode atenuar a resposta Th2 na resposta imunológica a alérgenos, atuando, portanto, como uma citocina anti-inflamatória. 25 Basicamente, o que ocorre é que ao ser sintetizada por linfócitos T CD4 e CD8 ativados, ela inibe a síntese de uma série de citocinas pró-inflamatórias, produzidas por Th1 (IFN-g, IL-2, TNF-b, IL-1, IL-6 e TNF-a), que levam à polarização da resposta imune ao Perfil Th2, o que explicaria a importância dessa interleucina na patogênese da asma. 26,10 Dessa forma, a produção prejudicada de IL-10 pelos linfócitos helper e variantes genéticas que afetam a expressão de IL10 localizada no cromossomo 1q31-q32 têm sido associados à incidência e gravidade da asma. 25

Outra via que merece destaque na asma grave e refratária é a da IL17. Está bem estabelecido que as interleucinas derivadas da via Th17 são importantes reguladoras da inflamação neutrofílica nos adultos e estão associadas a formas graves da doença.²⁷ Contudo, nas crianças que tem inflamação predominante eosinofílica, essa via pode ser explicada pela presença de um subconjunto de células de memória Th2 humanas que são capazes de produzir simultaneamente citocinas Th17 e Th2.²⁸ Essas células Th2 produtoras de IL-17 expressam fatores de transcrição GATA3 e ROR γ t, que são conhecidos por serem necessários para o desenvolvimento da linhagem celular Th2 e Th17, respectivamente.²⁷

Os linfócitos Th17 atuam produzindo várias citocinas pró-inflamatórias como a IL17A, promovendo inflamação tecidual, o que a longo prazo pode facilitar a hiperresponsividade e o remodelamento das vias aéreas.²⁹ Além disso, a IL17 está associada à superexpressão da isoforma β inibitória do receptor de glicocorticoide (GR- β) nas células das vias aéreas.³⁰ O GR- β é uma isoforma alternativa, que funciona como regulador negativo do GR- α , receptor ativo de glicocorticoides. Assim, essas citocinas estão associadas a uma resposta diminuída aos glicocorticoides, ressaltando sua importância na asma grave refratária.³¹

Em relação à suscetibilidade de asma, observamos que tanto os polimorfismos rs 3819024 da IL17 e rs 2275913 da IL10 não demonstraram relação com a chance de asma com significância estatística. Contudo, quando avaliamos especificamente o polimorfismo rs 2275913 na IL17 observamos que indivíduos com o alelo G apresentam maior chance de desenvolver asma, apesar do resultado ser estatisticamente limítrofe, o que pode ser consequência do tamanho amostral. Isso foi visto em trabalho realizado por Chen et al, em amostra com 168 crianças asmáticas e 205 controles saudáveis, sendo observado que a presença do alelo A do SNV rs2275913 foi significativamente relacionado para o risco de desenvolver asma na infância (OR=1,38, IC 95%=1,03–1,84, P=0,03) e na forma homocigota esse risco aumentava para 2,29 vezes.³² Diferentemente desses achados, Maalmi et al avaliando 171 crianças asmáticas na Tunísia observou que o alelo G do polimorfismo rs 2275913 é que estava associado ao risco de 1,89 vezes de asma.³³ Contudo, Wang et al avaliando 1210 crianças asmáticas no Taiwan e 287 crianças asmáticas na China não observou relação com o risco de asma na avaliação dos polimorfismos Rs 3819024 e e Rs 2275913.^{34,35} Um estudo brasileiro envolvendo pacientes pediátricos mostrou que variantes de polimorfismos da via da IL17 podem estar associadas na asma e atopia, porém dentre os SNVs, o rs3819024 e o rs2275913 não foram avaliados.⁹ No entanto, em nenhum desses trabalhos houve estratificação quanto à gravidade da asma.

Já a falha no controle dos sintomas foi associada com a presença de pelo menos um alelo C do polimorfismo rs3024498 da IL-10 em pacientes em tratamento regular com altas doses de corticoide inalatório. Sabe-se que no tratamento da asma, um dos objetivos é adquirir o controle dos sintomas com a menor dose de medicação inalatória possível.¹ Contudo, em pacientes com asma grave refratária ao tratamento, os pacientes ou não se controlam com elevadas doses ou perdem o controle na primeira tentativa de redução das medicações. Assim, como elevadas doses de corticoides inalatórios têm eventos adversos importantes e sabendo-se que essa falha de controle clínico pode estar associada a esse polimorfismo, este pode ser futuramente utilizado para orientar a conduta médica, contribuindo para a redução dos riscos do contínuo e progressivo aumento da dose de corticoide inalado.

Não conseguimos identificar o polimorfismo rs3024498 da IL10 em trabalhos prévios associando esse SNV a falha no controle da asma pediátrica, apesar de bem descrito em outras condições clínicas com processo inflamatório exuberante como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, hepatite crônica, dentre outras.^{36,37} Além disso, outros polimorfismos da IL-10 (rs1800896, rs1800871 ou rs3021097, rs1800872) têm sido associados à asma pediátrica.¹⁰

Na avaliação da resposta ao broncodilatador observou-se que pacientes homocigotos AA do rs3819024 (IL17A) possuem maior chance de responder ao estímulo agudo com broncodilatador beta-2 adrenérgico (salbutamol). No presente estudo avaliamos a resposta com beta dois de curta ação, mas importante considerar que o formoterol, apesar de ser um broncodilatador de longa ação e ser preconizado em todos steps da asma grave, tem início de ação semelhante ao do salbutamol.³⁸ Isso vai ao encontro de estudos que apontam que a IL-17A atua diretamente na musculatura lisa das vias aéreas levando ao aumento da função contrátil.^{4,39} Na prática clínica, esses achados sugerem que, possivelmente, o bloqueio da sinalização de IL-17 pode ser um alvo atraente em asma com fenótipo Th17-high.⁴

Vale ressaltar que nem sempre a falta de adesão aos medicamentos é responsável pela ausência de controle dos sintomas, pois os pacientes do presente estudo apresentaram boa taxa de adesão ao tratamento, não havendo diferença entre as taxas de adesão do tratamento e o nível de controle. Por isso, outros medicamentos devem ser acrescentados ao arsenal terapêutico para estes pacientes. Mas, deve-se considerar que a expressão fenotípica depende da interação de fatores ambientais e da predisposição genética de um indivíduo, admitindo que os genes não operam isoladamente, mas no seu ambiente (que inclui outros genes ao seu redor), o que pode modificar e até reverter completamente seus efeitos.⁴⁰

Desta forma, e devido ao elevado custo para toda sociedade, estudos que gerem evidências envolvendo fenotipagem, endotipagem e genotipagem devem ser estimulados na tentativa de encontrar o paciente alvo e dispendar os recursos de forma racional, a exemplo de outras doenças crônicas.

A principal limitação do presente estudo é o tamanho da amostra, mas a asma grave refratária é um fenótipo raro. Nossos pacientes foram selecionados de uma coorte de pacientes com asma grave, com um diagnóstico bem estabelecido e sob acompanhamento regular por um longo período, no qual vários métodos foram usados para medir a adesão, minimizar a exposição a alérgenos e controlar as comorbidades. O cálculo de tamanho amostral foi realizado a posteriori e evidenciou que para o estudo dos desfechos avaliados seria necessário pelo menos 34 pacientes com asma grave com um poder estatístico de 80%. Mas, devem ser conduzidas coortes maiores para se descobrir mais genes que aparentemente possam explicar a falha no controle da asma grave.

Em conclusão, os polimorfismos da IL10 e IL17 podem estar envolvidos nas complexas vias de modulação relacionadas à suscetibilidade, à falha do controle e variação ao broncodilatador na asma grave refratária em crianças e adolescentes. Estudos funcionais devem ser realizados para caracterizar o impacto molecular dessas variantes contribuindo para a implementação da personalização do manejo terapêutico da asma.

3.5. Referências Bibliográficas

1. Chung KF, Israel E, Gibson PG, Hurst J. Severe Asthma. Sheffield, United Kingdom: European Respiratory Society; 2019; pp. 1-360
2. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2018;56(2):219-33.
3. Bush A. Genes in their environment: how can we read the riddles? *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(3):185-188.
4. Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2019;13(11):1057-68.
5. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180(5):388-95.

6. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, Tsartsali L, Lloyd CM, Bush A, Saglani S. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):974-82.e13
7. Gupta A, Dimeloe S, Richards DF, Chambers ES, Black C, Urry Z, Ryanna K, Xystrakis E, Bush A, Saglani S, Hawrylowicz CM. Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. *Thorax*. 2014;69(6):508-15.
8. Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11(5):388-94.
9. Silva MJ, de Santana MBR, Tosta BR, Espinheira RP, Alcantara-Neves NM, Barreto ML, Figueiredo CA, Costa RDS. Variants in the IL17 pathway genes are associated with atopic asthma and atopy makers in a South American population. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019;15:28.
10. Huang ZY, Cheng BJ, Wan Y, Zhou C. Meta-analysis of the IL-10 promoter polymorphisms and pediatric asthma susceptibility. *Genet Mol Res*. 2016;15(2).
11. Mocellin M, de Azeredo Leitão LA, de Araújo PD, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM, de Souza APD, Pinto LA. Association between interleukin-10 polymorphisms and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells in asthmatic children. *J Pediatr (Rio J)*. 2021;97(5):546-551.
12. Maalmi H, Beraies A, et al. Variantes dos genes IL-17A e IL-17F e suscetibilidade à asma infantil na Tunísia. *J Asma*. 2014;51(4):348–54
13. Holster A, Teräsjärvi J, et al. O polimorfismo rs2275913 do gene IL-17A é associada ao desenvolvimento de asma após bronquiolite na infância. *Allergol Int*. 2018;67(1):109–13
14. de Andrade WC, Lasmar LM, Ricci Cde A, Camargos PA, Cruz AA. Phenotypes of severe asthma among children and adolescents in Brazil: a prospective study. *BMC Pulm Med*. 2015;15:36.
15. Faleiro RC, Mancuzo EV, Lanza FC, Queiroz MVNP, de Oliveira LFL, Ganem VO, Lasmar LB. Exercise Limitation in Children and Adolescents With Severe Refractory Asthma: A Lack of Asthma Control? *Front Physiol*. 2021;11:620736.
16. Versiani Nunes Pinheiro de Queiroz M, Gonçalves Alvim C, Cruz AA, de Lima Belizário Facury Lasmar LM. Lung function in severe pediatric asthma: a longitudinal study in children and adolescents in Brazil. *Clin Transl Allergy*. 2017;7:48.

17. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Fontana, Global Initiative for Asthma, 2021.
18. Maçãira, Elayne de Fátima et al. Determinação de escore e nota de corte do módulo de asma do International Study of Asthma and Allergies in Childhood para discriminação de adultos asmáticos em estudos epidemiológicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2005, v. 31, n. 6, pp. 477-485.
19. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63(Suppl 86):8- 160.
20. Roxo JP, Ponte EV, Ramos DC, Pimentel L, D'Oliveira Júnior A, Cruz AA. [Portuguese-language version of the Asthma Control Test]. *J Bras Pneumol*. 2010;36(2):159-66.
21. Oliveira SG, Sarria EE, Roncada C, Stein RT, Pitrez PM, Mattiello R. Validation of the Brazilian version of the childhood asthma control test (c-ACT). *Pediatr Pulmonol*. 2016; 51(4):358–63
22. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, *et al*. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2012; 67(1):18–24.
23. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319–38.
24. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*. 2007 Sep;81(3):559–75.
25. Branchett WJ, Stölting H, Oliver RA, Walker SA, Puttur F, Gregory LG, Gabryšová L, Wilson MS, O'Garra A, Lloyd CM. A T cell-myeloid IL-10 axis regulates pathogenic IFN- γ -dependent immunity in a mouse model of type 2-low asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(2):666-678.e9.
26. Smolnikova MV, Smirnova SV, Freidin MB, Tyutina OS. Immunological parameters and gene polymorphisms (C-590T IL4, C-597A IL10) in severe bronchial asthma in children from the Krasnoyarsk region, West Siberia. *International Journal of Circumpolar Health*. 2013;72(1):21159.
27. Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11(5):388-94.

28. Wang YH, Voo KS, Liu B, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med*. 2010; 207:2479–2491.
29. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*. 2008;453(7198):1051-7.
30. Hamid Q, Wenzel S, Hauk P, Tscopoulos A, Wallaert B, Lafitte Jj, Chrousos G, Szeffler S, Leung Dm. Increased Glucocorticoid Receptor β in Airway Cells of Glucocorticoid-insensitive Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;159(5):1600-4.
31. MJ Silva, et al. Glucocorticoid Resistant Asthma: The Potential Contribution of IL-17. *Biomarkers journal*, 2015. Vol. 1 No. 1:6
32. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, Ren L, Wang L, Fu Z, Yang X, Liu E. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol*. 2010 Jul;30(4):539-45.
33. Maalmi H, Beraies A, Charad R, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. IL-17A and IL-17F genes variants and susceptibility to childhood asthma in Tunisia. *J Asthma*. 2014 May;51(4):348-54..
34. Wang JY, Shyur SD, Wang WH, Liou YH, Lin CG, Wu YJ, Wu LS. The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population. *Allergy*. 2009;64(7):1056-60.
35. Wang J, Zhou J, Lin LH, Li J, Peng X, Li L. Association of single nucleotide polymorphism of IL-17 gene promoter with childhood asthma. *Academic Journal of Second Military Medical University*. 2011;32:481-4.
36. Lv TT, Wu J, Li J, Zhang TP, Yang XK, Xiang N, Fan YG, Pan HF, Wang B. Association of interleukin-10 gene single nucleotide polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Gene*. 2018;642:549-554.
37. Świątek-Kościelna B, Kałużna E, Strauss E, Januszkiewicz-Lewandowska D, Bereszyńska I, Wysocki J, Rembowska J, Barcińska D, Antosik D, Mozer-Lisewska I, Nowak J. Interleukin 10 gene single nucleotide polymorphisms in Polish patients with chronic hepatitis C: Analysis of association with severity of disease and treatment outcome. *Hum Immunol*. 2017;78(2):192-200.

38. Campos, Luiz Eduardo Mendes. β 2-agonista de longa duração na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). *Jornal de Pneumologia*. 2000, v. 26, n. 3, pp. 129-136.
39. Kudo M, Melton AC, Chen C, et al. IL-17A produced by alpha-beta T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nature medicine*. 2012;18(4):547-54.
40. Bush A. Genes in their environment: how can we read the riddles? *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(3):185-8.

















3.6. Anexos

Anexo 1: *Asthma Control Test* - ACT maiores de 12 anos

Nas últimas quatro semanas:	
Q1. A asma prejudicou suas atividades no trabalho, na escola ou em casa?	
<input type="checkbox"/>	Nenhuma vez
<input type="checkbox"/>	Poucas vezes
<input type="checkbox"/>	Algumas vezes
<input type="checkbox"/>	Maioria das vezes
<input type="checkbox"/>	Todo o tempo
Q2. Como está o controle da sua asma?	
<input type="checkbox"/>	Totalmente descontrolada
<input type="checkbox"/>	Pobremente controlada
<input type="checkbox"/>	Um pouco controlada
<input type="checkbox"/>	Bem controlada
<input type="checkbox"/>	Completamente controlada
Q3. Quantas vezes você teve falta de ar?	
<input type="checkbox"/>	De jeito nenhum
<input type="checkbox"/>	Uma ou duas vezes por semana
<input type="checkbox"/>	Três a seis vezes por semana
<input type="checkbox"/>	Uma vez ao dia
<input type="checkbox"/>	Mais que uma vez ao dia
Q4. A asma acordou você à noite ou mais cedo que de costume?	
<input type="checkbox"/>	De jeito nenhum
<input type="checkbox"/>	Uma ou duas vezes
<input type="checkbox"/>	Uma vez por semana
<input type="checkbox"/>	Duas ou três noites por semana
<input type="checkbox"/>	Quatro ou mais noites por semana
Q5. Quantas vezes você usou o remédio por inalação para alívio?	
<input type="checkbox"/>	De jeito nenhum
<input type="checkbox"/>	Uma vez por semana ou menos
<input type="checkbox"/>	Poucas vezes por semana
<input type="checkbox"/>	Uma ou duas vezes por dia
<input type="checkbox"/>	Três ou mais vezes por dia

O escore do questionário é calculado a partir da soma dos valores de cada questão, as quais valem de 1 a 5 pontos. As respostas que indicam maior controle da asma devem receber maior pontuação. Dessa forma, o escore do questionário varia entre 5 e 25 pontos: quanto maior o escore, mais controlada é a asma.

Anexo 2: Childhood Asthma Control Test – c-ACT

QUESTÃO	PONTUAÇÃO
<p>1 - Como está sua asma hoje?</p>  <p>(0) Muito ruim</p>  <p>(1) Ruim</p>  <p>(2) Boa</p>  <p>(3) Muito boa</p>	
<p>2 - Quanto problema sua asma causa quando você corre, se exercita ou pratica algum esporte?</p>  <p>(0) Muito problema. Não posso fazer o que quero</p>  <p>(1) É um problema e eu não gosto</p>  <p>(2) Algum problema, mas tudo bem</p>  <p>(3) Nenhum problema</p>	
<p>3 - Você tosse devido a sua asma?</p>  <p>(0) Sim, o tempo todo</p>  <p>(1) Sim, a maior parte do tempo</p>  <p>(2) Sim, às vezes</p>  <p>(3) Não, em nenhum momento</p>	
<p>4 - Você acorda no meio da noite devido a sua asma?</p>  <p>(0) Sim, o tempo todo</p>  <p>(1) Sim, a maior parte do tempo</p>  <p>(2) Sim, às vezes</p>  <p>(3) Não, em nenhum momento</p>	
<p>5 - Nas últimas 4 semanas, quantos dias/mês seu filho teve algum sintoma da asma durante o dia?</p> <p>(5) Nenhum</p> <p>(4) 1 a 3 dias/mês</p> <p>(3) 4 a 10 dias/mês</p> <p>(2) 11 a 18 dias/mês</p> <p>(1) 19 a 24 dias/mês</p> <p>(0) Todos os dias</p>	
<p>6 - Nas últimas 4 semanas, quantos dias/mês seu filho teve algum chiado durante o dia?</p> <p>(5) Nenhum</p> <p>(4) 1 a 3 dias/mês</p> <p>(3) 4 a 10 dias/mês</p> <p>(2) 11 a 18 dias/mês</p> <p>(1) 19 a 24 dias/mês</p> <p>(0) Todos os dias</p>	
<p>7 - Nas últimas 4 semanas, quantos dias/mês seu filho acordou no meio da noite devido à asma?</p> <p>(5) Nenhum</p> <p>(4) 1 a 3 dias/mês</p> <p>(3) 4 a 10 dias/mês</p> <p>(2) 11 a 18 dias/mês</p> <p>(1) 19 a 24 dias/mês</p> <p>(0) Todos os dias</p>	
<p>ESCORE FINAL (soma dos 7 itens acima)</p>	
<p>IMPORTANTE: A criança deverá responder às questões de 1 a 4. Os pais podem ajudar na leitura das mesmas, mas a criança deverá escolher a opção. Os pais devem responder às questões 5 a 7 sem se deixar influenciar pelas respostas iniciais da criança. O escore do questionário é calculado a partir da soma dos valores de cada questão. As respostas que indicam maior controle da asma devem receber maior pontuação. Dessa forma, o escore do questionário varia entre 0 e 27 pontos: quanto maior o escore, mais controlada é a asma. Escore ≥ 19 pontos: asma controlada.</p>	

* Oliveira SG, Sarria EE, Roncada C, Stein RT, Pitrez PM, Mattiello R. Validation of the Brazilian version of the childhood asthma control test (c-ACT). *Pediatr Pulmonol.* 2016;51(4):358-63.

Anexo 3: Questionário ISAAC - Study of asthma and allergies in Childhood

Nome: _____ Data: _____

Responda SIM ou NÃO para cada uma das perguntas abaixo :

- 1) “Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?”
- 2) “Nos últimos 12 meses você teve sibilos (chiado no peito)?”
- 3) “Nos últimos 12 meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?”
- 4) “Nos últimos 12 meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?”
- 5) “Nos últimos 12 meses seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?”
- 6) “Alguma vez na vida você teve asma?”
- 7) “Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal ou obstrução nasal), quando não estava resfriado ou gripado?”
- 8) “Nos últimos 12 meses você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal ou obstrução nasal), quando não estava resfriado ou gripado?”
- 9) “Nos últimos doze meses esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?”
- 10) “Em qual dos últimos 12 meses esse problema nasal ocorreu?”
- 11) “Nos últimos 12 meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por esse problema nasal?”
- 12) “Alguma vez na vida você teve rinite?”
- 13) “Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?”
- 14) “Nos últimos 12 meses você teve essas manchas na pele (eczema)?”
- 15) “Alguma vez essas manchas com coceira afetaram: dobras de cotovelos, atrás de joelhos, na frente de nádegas ou em volta de pescoço, orelhas ou olhos?”
- 16) “Alguma vez essas manchas com coceira desapareceram completamente nos últimos 12 meses?”
- 17) “Nos últimos 12 meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado a noite por causa dessa coceira na pele?”
- 18) “Alguma vez você teve eczema?”

Anexo 4: Tabela de identificação dos pacientes (iniciais) com os respectivos SNVs

IDENTIFICAÇÃO (INICIAIS)	rs3819024 (IL17A)	rs2275913 (IL17A)	rs3024498 (IL10)
ACMS	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
MGO	s A/G	Heterozygous s A/G	Heterozygous T/T
JPTV	A/A	Homozygous s A/G	Heterozygous C/T
GCS	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
ESN	s A/G	Heterozygous G/G	Homozygous T/T
RAGMC	G/G	Homozygous s A/G	Heterozygous T/T
RHNL	s A/G	Heterozygous s A/G	Heterozygous T/T
WHS	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
RVS	s A/G	Heterozygous G/G	Homozygous T/T
YCS	G/G	Homozygous s A/G	Heterozygous C/T
WSL	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
JLP	A/A	Homozygous G/G	Heterozygous C/T
JPSA	s A/G	Heterozygous G/G	Homozygous T/T
SANF	A/A	Homozygous G/G	Homozygous C/C
POS	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
LS	A/A	Homozygous G/G	Heterozygous C/T
RVSA	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
JPT	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
MLL	A/A	Homozygous G/G	Heterozygous C/C
FFG	A/A	Homozygous G/G	Homozygous T/T
ABSP	s A/G	Heterozygous A/A	Homozygous T/T

ACTA	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
IT	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	C/T	Heterozygous
DT	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	C/T	Heterozygous
GGAA	G/G	Homozygous	G/G	Homozygous	C/T	Heterozygous
MEM	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
IVA	A/A	Homozygous	s A/G	Heterozygous	T/T	Homozygous
JVRD	A/A	Homozygous	s A/G	Heterozygous	T/T	Homozygous
WSS	s A/G	Heterozygous	s A/G	Heterozygous	T/T	Homozygous
CHF	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
LFO	s A/G	Heterozygous	s A/G	Heterozygous	T/T	Homozygous
NR	G/G	Homozygous	A/A	Homozygous	T/T	Homozygous
AMV	s A/G	Heterozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
FG	s A/G	Heterozygous	s A/G	Heterozygous	C/C	Homozygous
EVS	s A/G	Heterozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
ECB	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	C/T	Heterozygous
JK	s A/G	Heterozygous	s A/G	Heterozygous	C/T	Heterozygous
LFS	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
MLS	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
AIB	s A/G	Heterozygous	s A/G	Heterozygous	T/T	Homozygous
CABS	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
PHAC	s A/G	Heterozygous	s A/G	Heterozygous	T/T	Homozygous
PAS	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
SFB	s A/G	Heterozygous	s A/G	Heterozygous	T/T	Homozygous

JDA	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
VTS	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	C/T	Heterozygous
MCLM	A/A	Homozygous	s A/G	Heterozygou	T/T	Homozygous
MFC	s A/G	Heterozygou	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
CTS	G/G	Homozygous	A/A	Homozygous	T/T	Homozygous
SSF	A/A	Homozygous	G/G	Homozygous	C/T	Heterozygous
SLPO	s A/G	Heterozygou	s A/G	Heterozygou	T/T	Homozygous
ACPO	s A/G	Heterozygou	G/G	Homozygous	C/T	Heterozygous
NSL	s A/G	Heterozygou	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
KR	s A/G	Heterozygou	s A/G	Heterozygou	C/T	Heterozygous
DM	G/G	Homozygous	s A/G	Heterozygou	T/T	Homozygous
BLAD	A/A	Homozygous	s A/G	Heterozygou	T/T	Homozygous
MIF	s A/G	Heterozygou	s A/G	Heterozygou	T/T	Homozygous
YIF	G/G	Homozygous	A/A	Homozygous	T/T	Homozygous
NB	s A/G	Heterozygou	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
ASC	s A/G	Heterozygou	G/G	Homozygous	T/T	Homozygous
YVB	s A/G	Heterozygou	s A/G	Heterozygou	T/T	Homozygous
LE	s A/G	Heterozygou	s A/G	Heterozygou	T/T	Homozygous
