**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

Sítios polimórficos do gene *HLA-G* na asma brônquica

Cinthia Caroline Alves

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

CINTHIA CAROLINE ALVES

Sítios polimórficos do gene *HLA-G* na asma brônquica

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em imunologia básica e aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia básica e aplicada

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

RIBEIRÃO PRETO

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Alves, Cinthia Caroline
Sítios polimórficos do gene *HLA-G* na asma brônquica.
Ribeirão Preto, 2016.
117 p. il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Donadi, Eduardo Antônio.

1. HLA-G 2. Gravidade 3. Asma brônquica.

Nome: Cinthia Caroline Alves

Título: Sítios polimórficos do gene *HLA-G* na asma brônquica.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Dedico

Em primeiro, a *Deus*

Pois, sem Ele, eu jamais teria chegado ao final desta jornada;

Em segundo, aos meus pais, *Suzimara B. Alves* e *José F. Alves*, e a minha irmã, *Ciane C. Alves*

Por serem meus alicerces até a tão esperada vitória.

AGRADECIMENTO

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. Por me iluminar nos momentos de escuridão a ponto de quase desistir do meu sonho. Obrigado, Senhor!

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, por ter aceito me orientar e me mostrar o caminho da ciência. Por ser um exemplo de profissional e de pessoa que abriu as portas para que eu pudesse dar os primeiros passos rumo a realização de um ideal. Obrigada, Professor!

Ao Prof. Dr. Celso T. Mendes Junior, por ter me ensinado como proceder toda a análise estatística deste trabalho, e revisão da mesma e, também, por toda ajuda nos momentos que mais precisei. E Ao Prof. Dr. Erick Castelli por fornecer os controles já tipificados utilizados neste trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Fabíola R. Oliveira, por compartilhar comigo seu conhecimento quanto aos parâmetros clínicos da doença, além disso, agradeço imensamente pela orientação na coleta das informações registradas nos prontuários médicos dos pacientes e, principalmente, pela amizade. Muito obrigada!

Ao MSc. Luiz Otávio Guiderolli, pelo processamento prévio das amostras dos pacientes utilizados neste trabalho.

À Dra. Juliana D. Massaro e Dr. Fabrício C. Dias, pela assistência técnica inicial no desenvolvimento deste trabalho. Principalmente, à Dra. Juliana, pela ajuda no fim desta caminhada. Obrigada por tudo.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular, especialmente, às técnicas Sandra e Flávia, pelo apoio técnico e amizade.

À MSc. Ana Lígia C. Suman por seus valiosos conselhos e orientação quanto a formatação da dissertação e pela sua valiosa amizade.

Aos meus pais e minha irmã, por sempre apoiarem minhas decisões, principalmente pelo auxílio emocional frente as dificuldades e momentos de incerteza, onde o afeto e amor que sempre me proporcionaram foram o combustível para enfrentar as

adversidades e conflitos da pós-graduação. O amparo e o amor de vocês nos momentos de reclusão foram e são essenciais em minha vida. Eu amo vocês. Obrigada por tudo.

A todos os meus familiares, em especial, minha querida avó, Maria, e minha tia, Cristina, pelo carinho, paciência e incentivo, e a todos os outros não destacados aqui, mas que estavam comigo nos momentos mais difíceis desta jornada.

À banca examinadora por aceitar julgar meu trabalho e contribuir para a melhoria do mesmo.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração e amizade. A todos os colegas, professores e funcionários da Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, em especial a secretária do programa, Ana Cristine, pela assistência, apoio e amizade. Obrigada por tudo!!!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

- *Charles Chaplin*

Porém....

“Se A é o sucesso, então, A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada”.

- *Albert Einstein*

E lembre-se...

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim”.

- *Chico Xavier*

SUMÁRIO

Assunto	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Asma Brônquica.....	1
1.1.1. Epidemiologia	1
1.1.2. Manifestações Clínicas	5
1.1.3. Diagnóstico.	6
1.1.4. Classificação da gravidade da asma	7
1.1.5. Asma Brônquica Grave.....	9
1.1.6. Fisiopatologia da Asma.....	10
1.1.7. Fatores Genéticos.	16
1.2. O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)	19
1.2.1. O HLA-G: Estrutura, Expressão e Função.....	20
1.2.2. Polimorfismos da região 3' não traduzida do gene <i>HLA-G</i>	25
1.2.3. O gene <i>HLA-G</i> e Asma Brônquica.....	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. População de estudo	34
4.2. Extração de DNA	36
4.3. Amplificação da região 3' UTR do gene <i>HLA-G</i>	36
4.4. Sequenciamento da região 3' UTR do <i>HLA-G</i>	38

4.5. Análises Estatísticas	39
4.5.1. Estimativas das frequências alélicas e genotípicas.....	39
4.5.2. Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	40
4.5.3. Desequilíbrio de ligação entre os <i>loci</i>	40
4.5.4. Reconstrução de haplótipos	41
4.5.5. Teste exato de Fisher para identificação de frequências significativamente distintas	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Análise das frequências genotípicas e alélicas para os sítios polimórficos da 3' UTR do <i>HLA-G</i>	44
5.2. Análise das frequências haplotípicas da 3'UTR do gene <i>HLA-G</i>	51
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICE	81
ANEXO	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Critérios para o diagnóstico da asma quanto à obstrução do fluxo aéreo....	6
Tabela 2 Classificação da gravidade da asma.....	7
Tabela 3 Tratamento sugerido segundo a gravidade da doença	8
Tabela 4 Características clínicas e laboratoriais dos pacientes.....	35
Tabela 5 Frequências alélicas e genotípicas dos sítios polimórficos na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene <i>HLA-G</i> em pacientes asmáticos estratificados de acordo com a gravidade da doença e indivíduos saudáveis.	45
Tabela 6 Comparação das frequências alélicas e genotípicas da região 3' não traduzida (3'UTR) do gene <i>HLA-G</i>	48
Tabela 7 Frequências haplotípicas em pacientes asmáticos estratificados de acordo com a gravidade da doença e em indivíduos saudáveis (controle).	52
Tabela 8 Características clínicas e laboratoriais de cada paciente.....	81
Tabela 9 Banco de genótipos e haplótipos da 3'UTR do gene <i>HLA-G</i> de cada paciente.....	86
Tabela 10 Probabilidades do teste de desequilíbrio de ligação (LD) para os sítios polimórficos detectados da 3'UTR do <i>HLA-G</i> na população geral de pacientes asmáticos.....	91
Tabela 11 Probabilidades do teste de desequilíbrio de ligação (LD) para os sítios polimórficos detectados da 3'UTR do <i>HLA-G</i> na população geral de pacientes asmáticos graves	91
Tabela 12 Probabilidade do teste de desequilíbrio de ligação (LD) para os sítios polimórficos detectados na 3'UTR do <i>HLA-G</i> na população de pacientes com asma leve ou moderada	92
Tabela 13 Probabilidade do teste de desequilíbrio de ligação (LD) para os sítios polimórficos detectados na 3'UTR do <i>HLA-G</i> na população de indivíduos saudáveis	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mapa com prevalência de asma brônquica no mundo	2
Figura 2 Prevalência da asma para todas as idades: Estados Unidos, 1980-2010....	3
Figura 3 Eventos da hipersensibilidade imediata	13
Figura 4 Resumo dos genes associados a asma brônquica em pelo menos cinco estudos independentes	18
Figura 5 Mapa do MHC humano	20
Figura 6 As sete isoformas da molécula HLA-G produzidas por edição alternativa .	22
Figura 7 Ilustração com os principais polimorfismos presentes nas regiões 3'UTR .	25
Figura 8 Gel de poliacrilamida 7% corado pela prata, ilustrando a detecção do polimorfismo de 14-pb do gene <i>HLA-G</i>	37
Figura 9 Cromatograma obtido a partir de sequenciamento direto do produto de amplificação	39

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nomes
ADAM	Disintegrin and Metalloproteinase Domain
AG	Grupo de Pacientes Asma Grave
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALM	Grupo de Pacientes com Asma Leve ou Moderada
APC	Antigen Presentation Cell
AT	Grupo Total de Pacientes Asmáticos
BANPI	Bando de Amostras do Núcleo de Pesquisa em Imunogenética
BD	Broncodilatador
C	Grupo de Indivíduos Saudáveis
CCL	CC Chemokine Ligands
CDC	Center of Disease Control and Prevention
CI	Corticoide inalatório
CRTH2	Chemoattractant Receptor-Homologous Molecule Expressed on Th2 Cells Receptor
CVF	Capacidade Vital Forçada
DC	Células Dendríticas
Del	Deleção
DP	Desvio Padrão
DPP	Dipeptidyl-Peptidase
ECRHS	European Community Respiratory Health Survey
EUA	Estados Unidos da América
FcεRI	Receptor de Alta Afinidade para IgE
FEF	Fluxo Expiratório Forçado Médio
FOCA	Foco no Controle da Asma
GINA	Global Initiative for Asthma
GM-CST	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GWAS	World-wide Genome Association
HCFMRP USP	Hospital Das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Human Leucocyte Antigen
sHLA-G	HLA-G Solúvel
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina Humana
IL	Interleucina
ILC	Célula Linfoide Inata
Ins	Inserção
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor
LABA	Long-acting Beta Agonist

Abreviatura	Nomes
LD	Linkage-Desequilibrium
LILRB	Lleukocyte Immunoglobulin-like Receptor B
MHC	Major Compatibility Complex
miRNA	Micro RNA
NIH	National Institute of Health
NK	Natural Killer
OR	Odds Ratio
PAMPS	Padrões Moleculares
PB	Pares de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEF	Pico expiratório Forçado
<i>pHWE</i>	Hardy-Weinberg Equilibrium Probability
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrão
RNAm	RNA Mensageiro
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SI	Sistema Imune
SIH	Sistema de Internação Hospitalares
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUS	Sistema Único de Saúde
TBE	Tris Borato EDTA
TCR	T Cell Receptor
TEMED	Tetrametiletenodiamino
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T Helper
TLR	Toll Like Receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	Células T Reguladoras
TSLP	Linfoepoetina Estromal Tímica
URR	Upstream Regulatory Region
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
UTR	Untranslated Region
VEF1	Volume Expiratório no primeiro segundo
WHO	World Health Organization

RESUMO

ALVES, C. C. Sítios polimórficos do gene *HLA-G* na asma brônquica. 2016. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

A asma brônquica é doença inflamatória crônica complexa das vias aéreas provocada pela interação de fatores genéticos e ambientais. O gene *HLA-G* (Antígeno Leucocitário Humano G) foi identificado como gene de susceptibilidade à asma, codificando uma molécula não clássica do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe I com função moduladora das células do sistema imunológico. Nesse contexto, avaliamos o papel do *HLA-G* na asma afim de identificar genótipos, alelos e haplótipos associados com proteção ou susceptibilidade nas diferentes formas de apresentação da doença. Investigamos os sítios polimórficos da região 3' não traduzida (3'UTR-*untranslated region*) do *HLA-G* (14 pb Ins/Del, + 3001 C/T, +3003 C/T, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 C/G, +3187 A/G e +3196 C/G) em 118 pacientes asmáticos estratificados em asma leve ou moderada e grave e 183 indivíduos brasileiros saudáveis. Testes de associação foram realizados para avaliar as frequências dos genótipos, alelos e haplótipos da 3'UTR do *HLA-G* na asma brônquica, considerada como grupo total ou estratificada de acordo com a gravidade da doença. Nossos resultados demonstraram que as frequências dos alelos +3001 C, +3003 C, +3035 C e +3196 C e do genótipo 14 bp DI estavam aumentadas no grupo total e nas diversas formas de apresentação da doença. Os alelos +3010 C e +3142 G e o genótipo +3010 CC estavam mais representados em pacientes com asma leve ou moderada. Por outro lado, os genótipos +3010 GG, +3142 CG e +3187 AG e o alelo +3010 G apresentaram maior frequência nos asmáticos graves, estando fortemente associados com o desenvolvimento da forma grave da asma. Além disso, os genótipos 14 pb II, +3010 CC e +3142 GG e o alelo +3010 C conferiram proteção à asma grave. Além disso, identificamos um haplótipo da 3'UTR do *HLA-G* associado ao desenvolvimento de asma brônquica, a UTR-8, e um haplótipo que conferiu proteção contra a mesma, a UTR-7. Concluindo, neste estudo, observamos frequências diferenciais de sítios polimórficos do segmento 3'UTR do *HLA-G* associados com predisposição à asma brônquica e, também, com a gravidade da doença.

Palavras-chaves: 3'UTR, *HLA-G*, proteção, alelo, gravidade, asma, susceptibilidade, haplótipos

ABSTRACT

ALVES, C. A. Polymorphic sites of *HLA-G* gene and bronchial asthma. 2016. School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Bronchial asthma is a complex chronic inflammatory disease of the airways caused by the interaction of genetic susceptibility and environmental factors. The HLA-G (Human Leucocyte Antigen G) gene was identified as a susceptible marker for bronchial asthma, encoding a non-classical Major Histocompatibility Complex (MHC) class I molecule, considered to be an important immune check point modulator. In the present study, we evaluated the role of HLA-G in bronchial asthma susceptibility and disease severity, evaluating HLA-G genotypes, alleles or haplotypes. We investigated the HLA-G 3'Untranslated region (3'UTR) polymorphic sites (14-bp INS/DEL, +3001, +3003C/T, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T, +3142C/G, +3187A/G, and +3196C/G) in 118 asthmatic Brazilian patients, stratified according to disease severity into mild/moderate and severe asthma, and in 183 healthy individuals. HLA-G 3'UTR variation sites were individually analyzed or lumped together as haplotypes. Our results showed that frequencies of +3001 C, +3003 C, +3035 C e +3196 C alleles and 14 pb ID genotype were increased in asthma group considered as a whole and in patients stratified according to disease severity. The +3010 C and .3142 G alleles and the +3010 CC genotype were overrepresented in patients with mild and moderate forms. Similarly, the +3010 GG, +3142 CG, +3187 AG genotypes and +3010 G allele presented increased frequency in severe asthmatic patients. In contrast, the 14 pb II, +3010 CC and +3142 GG genotypes and +3010 C allele conferred protection against severe asthma. In addition, we identified a 3'UTR *HLA-G* haplotype that was associated with bronchial asthma development (UTR-8) and one haplotype that conferred protection against asthma (UTR-7). In conclusion, in this study, we observed differential frequencies at *HLA-G* 3'UTR polymorphic sites that are associated with bronchial asthma predisposition and, also, with disease severity.

Key words: 3'UTR, HLA-G, protection, allele, severity, asthma, susceptibility, haplotype.

Introdução

---

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma Brônquica

A asma brônquica é doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável ao fluxo aéreo, reversível, espontaneamente ou com tratamento. Manifesta-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispneia, aperto no peito e tosse, em particular, à noite e pela manhã ao despertar. Apesar do estreitamento das vias aéreas (broncoconstrição) geralmente ser reversível, a inflamação em pacientes com asma crônica pode determinar obstrução irreversível ao fluxo aéreo (BUSSE *et al*, 2001).

É doença complexa que pode se manifestar em crianças e adultos, resultando de interação de fatores genéticos, ambientais e outros que levam ao desenvolvimento e manutenção dos sintomas. Dessa forma, a história familiar de atopia caracteriza uma maior predisposição genética que, associada à presença de diversos fatores desencadeantes, contribui para o desenvolvimento do fenótipo da asma (KUHLEN *et al*. 2014; WENZEL, 2012).

1.1.1. Epidemiologia

Os casos de asma têm aumentado significativamente nas últimas décadas no mundo. Segundo a Iniciativa Global contra a Asma (do inglês *Global Initiative for Asthma*, GINA) (2015) estima-se que 346.000 pessoas morrem de asma por ano no mundo e 300 milhões de pessoas sofrem da doença. Além disso, há estimativas de mais 100 milhões de pessoas até 2025 (GINA, 2015). A asma ocorre em todas as idades e etnias, porém, cerca de 60% dos indivíduos acometidos pela doença são crianças. A Figura 1 ilustra os países mais acometidos pela asma brônquica, com base em dois estudos que avaliaram a prevalência da doença no mundo: o Estudo sobre a Saúde Respiratória da Comunidade Europeia (do inglês *European Community Respiratory Health Survey*, ECRHS) em adultos (EUROPEAN COMMUNITY RESPIRATORY HEALTH SURVEY, 1996) e o Estudo Internacional sobre Asma e Alergias na Infância (do inglês *International Study of Asthma and*

Allergies in Childhood, ISAAC) em crianças (*INTERNATIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGIES IN CHILDHOOD*, 1998).

FIGURA 1: MAPA COM PREVALÊNCIA DE ASMA BRÔNQUICA NO MUNDO (FONTE: ADAPTADO DE WHO, 2007).

Muitos fatores contribuem para o aumento no índice de asmáticos em diversos países no mundo. Na Europa Ocidental como um todo, o número de asmáticos dobrou em 10 anos; na Suíça, 10% da população está acometida pela doença, onde antes, há 25-30 anos, esse valor era de apenas 2%; já na Alemanha o número de pessoas que sofrem com a doença é estimado em 4 milhões (WHO, 2016); na Itália, houve aumento de 3,4% para 7,2% de asmáticos em 25 anos (MAIO, S. *et al.*, 2015); na Austrália, 1 em cada 10 indivíduos tem asma, totalizando 2,3 milhões de asmáticos no país (ASTHMA AUSTRALIA, 2016)

No continente africano, há registros de elevada incidência no Quênia, atingindo aproximadamente 20% da população. Números significativos também foram relatados na Ásia, onde a doença atinge cerca de 15% das crianças entre 5 e 11 anos de idade, particularmente na Índia. No Japão, dos 3 milhões de asmáticos, 7% apresentam a forma grave e 30% a forma moderada da asma (WHO, 2016).

Nos estados Unidos (EUA) a prevalência da asma vem aumentando desde o início da década de 1980. Ao analisar os dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Center of Disease Control And Prevention*, CDC), o número de asmáticos aumentou de 3,1%, 1980, para 5,5%, em 1996 e de 7,3% em 2001 para 8,4% em 2010 (**Figura 2**), totalizando cerca de 26 milhões de asmáticos no país. Desses, na população de asmáticos em geral, havia mais crianças asmáticas

FIGURA 2: PREVALÊNCIA DA ASMA PARA TODAS AS IDADES: ESTADOS UNIDOS, 1980-2010 (FONTE: CDC/NCHS).

(9,5%) do que adultos (7,7%) e mais mulheres (9,2%) do que homens (7,0%), porém, na infância ocorria supremacia do sexo masculino. Considerando a etnia, a grande maioria eram negros (11,2%) contra 7,7% de brancos, 6,5% latinos e 5,2% asiáticos (CDC, 2016).

A asma no Brasil atinge 6,4 milhões de indivíduos acima de 18 anos e, nesse grupo, as mulheres são as mais acometidas pela doença: cerca de 3,9 milhões contra 2,4 milhões de homens, ou seja, prevalência de 39% a mais entre o sexo feminino. Além disso, a asma brônquica é responsável por número representativo de internações hospitalares. Em 2014, o DATASUS registrou em 10 meses 105,5 mil internações pela doença, originando custo de R\$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde, segundo dados do Sistema de Internação Hospitalares (SIH/SUS) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, SBPN, 2012; PORTAL BRASIL, 2016).

O impacto sócio econômico da asma é muito maior quando comparado aos países desenvolvidos, sendo uma das doenças que mais consome recursos nesta categoria. Em termos mundiais, os custos com a asma superam aos da tuberculose somado ao do HIV/AIDS (WHO, 2016). Por exemplo, nos EUA, os custos anuais com asmáticos, direta ou indiretamente, ultrapassam US\$56 bilhões; o Reino Unido gasta cerca de US\$1,8 bilhões e Austrália excede US\$460 milhões (CDC a, b, 2016).

É importante ressaltar que áreas de perfil sócio econômico mais baixos têm sido associadas com alta morbidade e a mortalidade por asma (DURAN-TAULERIA & RONA, 1999). De fato, uma maior prevalência de morbidade e mortalidade é observada em crianças asmáticas vivendo em sociedades de baixo nível sócio econômico, o que pode ser explicado devido ao menor acesso ao tratamento e a ambiente com intensa exposição a alérgenos, relacionados com as condições de habitação e moradia (gatos, baratas e fungos - mofo) (BRYANT-STEPHENS, 2009).

Além do baixo nível sócio econômico, diversos fatores de risco têm sido associados aos óbitos por asma, tais como tabagismo, histórico de asma na família, história de exacerbação grave, internação em unidades de terapia intensiva (UTI), hospitalizações, atendimentos em unidades de emergência, dentre outros. É de extrema importância compreender estes fatores de mau prognóstico a fim de reduzir a morbidade/mortalidade da asma através do planejamento e oferecimento de atendimento personalizado ao asmático (GUILL, M. F., 2004).

No Brasil, entre 1998 e 2007, a taxa de mortalidade por asma foi de 1,52 a cada 100,000 habitantes. Nos EUA, nos anos de 1996, 1997 e 1998, o coeficiente de mortes por asma, a cada grupo de 100,000 habitantes foi de, respectivamente, 1,6, 1,7, e 1,7. Já no ano de 2007, foi registrado que 185 crianças e 3.262 adultos americanos morreram de asma (SOCIEDADE DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2012; CDC, 2016).

Para redução de mortes e hospitalizações decorrentes da asma brônquica, estudos apontam para a elaboração de estratégias simples de âmbito nacional e internacional como a capacitação das equipes de saúde, criação de programas voltados para o controle da asma e acesso aos medicamentos antiasmáticos gratuitamente (DE SOUZA-MACHADO & CRUZ, 2012). No Brasil, tornaram-se disponíveis gratuitamente nas Farmácias Populares, desde junho de 2012, medicamentos inalatórios, mediante prescrição médica. Quanto a programas voltados para o controle da Asma, há iniciativas locais muito bem-sucedidas no

controle da doença como o ProAR na Bahia, o Projeto FOCA (Foco no Controle da Asma) em Ribeirão Preto - SP, o Respira Rio (Rio de Janeiro), o Programa de Controle de Asma de Vitória, ES, e o Programa de Atendimento ao Paciente Asmático do Distrito Federal (ARRUDA & VIANNA, 2013).

1.1.2. Manifestações Clínicas

Cerca de 70% dos casos de asma estão associados às reações alérgicas com produção de IgE. Nos 30% restantes dos pacientes, a asma pode ser desencadeada por outros estímulos como exercícios, infecções virais, alterações climáticas, estresse, fumo, medicamentos e fatores ocupacionais. Assim, as manifestações clínicas mais importantes observadas na asma após o contato com o fator desencadeante são os sibilos (chiado no peito), a sensação de opressão torácica, a dispneia (falta de ar) e a tosse (principalmente em crianças). No caso da asma alérgica, quando em contato com o alérgeno, as respostas brônquicas podem ser precoces (dentro de minutos) e tardias (horas após a exposição) (WILLS, 1999).

A resposta imediata (precoce) é caracterizada por rápido início de edema de mucosa, aumento do tônus do músculo liso das vias aéreas e estreitamento das vias aéreas, coincidindo com as fases iniciais da desgranulação de mastócitos. Alguns asmáticos alérgicos também desenvolvem respostas de fase tardia que começam 3-6 horas após o desafio alergênico e podem persistir por diversos dias na ausência de terapia. Nessas respostas, o estreitamento das vias aéreas está associado com migração de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos do sangue periférico para o parênquima pulmonar e epitélio das vias aéreas (WILLS-KARP, 1999).

O exame físico durante estas crises revela taquipnéia (respiração acelerada), taquicardia, sibilância e uso de músculos acessórios da respiração, além disso, a fase expiratória está prolongada. Em geral, o pulso apresenta-se rápido e a pressão arterial pode estar elevada, sendo que, a observação de pulso paradoxal, ou seja, quando ocorre diminuição da amplitude do pulso ou até o seu desaparecimento, é indicativa de asma grave. Os campos pulmonares podem exibir hipersonoridade à percussão. Em uma crise com alto grau de obstrução, pode-se ouvir sibilos inspiratórios e expiratórios, mas quando ausentes são sinais de muita gravidade, principalmente, quando acompanhados de palidez e cianose periférica, excitação ou ansiedade e incapacidade de falar (TERR- ABBA, 2000).

1.1.3. Diagnóstico.

O diagnóstico clínico é realizado com base no padrão dos sintomas do paciente. São indicativos de asma, a presença de dispneia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente, à noite ou nas primeiras horas da manhã. Porém, a asma pode ser difícil de ser diagnosticada, pois alguns dos sintomas como a dispneia, o aperto torácico e a sibilância podem ser provocados por outras doenças que acometem as vias aéreas. A dispneia, geralmente, pode apresentar melhora espontânea ou pelo uso de broncodilatadores e anti-inflamatórios esteroides (SIERSTED, *et al.*, 1996).

O diagnóstico funcional é feito para avaliar o grau de obstrução brônquica nas vias aéreas e limitação do fluxo aéreo. Para isso é realizada espirometria que identifica e quantifica a obstrução ao fluxo de ar. Segundo o informativo do GINA (2015), os critérios utilizados para o diagnóstico da asma são (**Tabela 1**):

TABELA 1: CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA ASMA QUANTO À OBSTRUÇÃO DO FLUXO AÉREO.

-
- Obstrução das vias aéreas, caracterizada por redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) inferior a 80% do previsto e redução da relação VEF1/CVF (CVF-capacidade vital forçada), sendo inferior a 0,75-0,80 em adultos e a 0,90 em crianças;
-
- Obstrução ao fluxo aéreo que desaparece ou melhora significativamente após uso de broncodilatador (aumento do VEF1 de 12% em relação ao previsto e 200 ml em valor absoluto, após inalação de β_2 -adrenérgico de curta duração em adultos; em crianças aumento do VEF1 de 12%);
-
- Variabilidade excessiva no PEF (Pico Expiratório Forçado) duas vezes por dia durante 2 semanas* (Adultos: média diurna variabilidade diária PFE > 10%**; Crianças: média diurna variabilidade diária PFE > 13%**;
-
- Aumento significativo da função pulmonar após 4 semanas de tratamento anti-inflamatório (Adultos: aumento do VEF1 em 12% e 200 ml), excluindo asma por infecções respiratórias;
-
- Podem ser utilizados para demonstração de hiperresponsividade das vias aéreas em indivíduos com espirometria normal e ausência de reversibilidade ao uso de broncodilatador, os testes de bronco provacação com metacolina, histamina, solução salina hipotônica ou desafio com manitol em adultos (Queda no VEF1 maior ou igual a 20% com doses padronizadas de metacolina ou histamina e maior ou igual a 15% com solução salina hipotônica ou desafio com manitol);
-

* Estes testes podem ser feitos durante os sintomas ou no início da manhã;

Continuação tabela 1

** A variabilidade diária do PEF diurna é calculada a partir de dois PEF ao dia (Maior PEF menos o menor PEF ou média destes dois PEF) e média dos PEF ao longo de uma semana (Fonte: GINA, 2015).

Além disso, são realizados exames específicos para avaliar, por exemplo, se a asma é decorrente de atopia, utilizando o *prick test* (teste cutâneos de hipersensibilidade imediata) e dosagem de IgE, e o diagnóstico diferencial, que nada mais é que a exclusão de situações que poderiam se confundir com a asma, por exemplo por compartilhar os mesmos sintomas. Porém, algumas dessas doenças podem ser encontradas em associação com a asma e varia com a idade do indivíduo (SIERSTED, 1996; GINA, 2015)

1.1.4. Classificação da gravidade da asma

Documentos anteriores da GINA classificavam a asma segundo a sua gravidade, baseados nos sintomas, na limitação do fluxo aéreo e na variabilidade da função pulmonar em quatro categorias: intermitente, persistente leve, persistente moderada ou persistente grave. Essa classificação é útil quando as decisões sobre o tratamento inicial do paciente estão sendo feitas, como determinar a dose de medicamentos suficientes para que o indivíduo atinja o controle da doença. No entanto, a gravidade é característica variável da asma, podendo mudar ao longo de meses ou anos, e portanto, não é um parâmetro recomendado como base para decisões de tratamento em curso, mas muito utilizado para caracterização de pacientes asmáticos em estudos. Feitas tais considerações, a classificação da gravidade é realizada a partir da análise da intensidade e ocorrência dos sintomas e da prova de função pulmonar, segundo os parâmetros ilustrados na **Tabela 2** (Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, SBPT, 2006; BATEMAN *et al*, 2008).

TABELA 2: CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA ASMA

Intermitente		Persistente		
		LEVE	MODERADA	GRAVE
Sintomas	Raros	Semanais	Diários	Diários ou contínuos
Despertares noturnos	Raros	Mensais	Semanais	Quase diários
β_2 para alívio	Nenhuma	Eventual	Diária	Diária

Continuação tabela 2

	Intermitente		Persistente	
		LEVE	MODERADA	GRAVE
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente nas exacerbações	Presente nas exacerbações	Contínua
Exacerbações	Raras	Afeta atividades e o sono	Afeta atividades e o sono	Frequentes
VEF1 ou PFE	≥ 80% previsto	≥ 80% previsto	60-80% previsto	≤ 60% previsto
Variação VEF1 ou PFE	<20%	< 20-30%	> 30%	> 30%

Classificar o paciente sempre pela manifestação de maior gravidade. *Pacientes com asma intermitente, mas com exacerbações graves, devem ser classificados como tendo asma persistente moderada. VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo; PFE: pico de fluxo expiratório. (Fonte: Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2006; Bateman, 2008).

Todo este manejo da asma visa alcançar o controle da doença, ou seja, o controle da asma significa a intensidade com que as manifestações da asma estão suprimidas. A asma leve é aquela que necessita de baixa intensidade de tratamento para ser controlada, a asma moderada necessita de intensidade intermediária de tratamento e a asma grave de alta intensidade de tratamento. Na tabela abaixo (**Tabela 3**), são ilustradas as opções de tratamento adotadas para cada tipo de asma, sugeridas pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2012) e GINA (2015).

TABELA 3: TRATAMENTO SUGERIDO SEGUNDO A GRAVIDADE DA DOENÇA.

ASMA LEVE	ASMA MODERADA	ASMA GRAVE
Dose baixa de CI + BD	Dose baixa de CI + LABA + BD	Dose moderada ou alta de CI + LABA + BD
Antileucotrienos	Dose média ou alta de CI	Dose moderada ou alta de CI + LABA + antileucotrienos
Dose baixa de teofilina*	Dose baixa de CI + antileucotrienos	Dose moderada ou alta de CI + LABA + teofilina* de liberação lenta
	Dose baixa de CI + teofilina* de liberação lenta	Corticoide oral na dose mais baixa possível

Continuação tabela 3

ASMA LEVE	ASMA MODERADA	ASMA GRAVE
		Tratamento com anti-IgE (Pacientes atópicos)

BD: broncodilatador; CI: corticoide inalatório; e LABA: long-acting beta agonist (b2-agonista de ação prolongada); as opções preferenciais estão evidenciadas em negrito. *Para crianças entre 6-11 anos, teofilina não é recomendado e, na asma grave é preferencial que a dose média de CI (Fonte: Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2012; GINA, 2015).

1.1.5. Asma Brônquica Grave.

A asma grave é pouco compreendida clínica e patologicamente. Enquanto formas mais leves da doença são, geralmente, fáceis de tratar, a forma grave permanece refratária aos tratamentos mais intensivos. Embora apenas 5-10% dos asmáticos apresentem a forma grave, é nesse grupo que está a maior parte dos óbitos relacionados à doença (WENZEL, 2005).

A maior gravidade da asma resulta em considerável aumento nos custos totais da doença. De fato, asmáticos graves têm maior impacto da doença na sua qualidade de vida e consomem grande parte dos custos totais alocados para os cuidados com a asma brônquica (acima de 50%). Famílias com asmáticos graves dispõem de grande parte da renda familiar para o tratamento da doença (SUISSA & ERNST, 2001).

Pacientes com asma grave podem apresentar dispneia mesmo em repouso, são incapazes de falar utilizando-se de sentenças ou frases, ficam agitados e apresentam ortopnéia. Sonolência ou confusão são sinais associados com parada respiratória iminente. Os sinais vitais incluem: média da frequência respiratória >30 incursões/min, média da frequência cardíaca >120 batimentos/min, sibilância durante expiração e inspiração, uso de músculos respiratórios acessórios, retrações supraesternais e pulso paradoxal (GINA, 2015).

Apesar de sua patogenia ser pouco conhecida e mais limitada se comparada às formas mais leves, ela possui múltiplas explicações que podem ser agrupadas em quatro áreas diferentes (WENZEL, 2005):

- Processo inflamatório contínuo, mesmo com terapia apropriada. Cerca de metade a dois terços dos asmáticos graves apresentam eosinofilia tecidual, mesmo com elevadas doses de esteroides sistêmicos;
- Presença de doença subjacente. Um segundo fenótipo patológico/inflamatório foi descrito, no qual o número de neutrófilos está

aumentado (ora isoladamente ora associados com eosinófilos) (WENZEL, 1997; WENZEL, 1999). Esse aumento no número de neutrófilos também é observado em estudos de escarro em asmáticos graves que utilizam altas doses de esteroides inalados/orais (JATAKANON *et al.*, 1999; LOUIS *et al.*, 2000), e pode ser resultado de diminuição no número de eosinófilos, concomitante ao aumento no número de neutrófilos (COX, 1995).

- Remodelamento das vias aéreas. Na asma grave com persistência de eosinófilos, a membrana subepitelial basal está mais espessa se comparada com as formas mais leves de asma e grupos controles normais (WENZEL *et al.*, 1999).
- A distribuição de células inflamatórias pode ser diferente no pulmão distal, com maior número de neutrófilos na parede interna das pequenas vias aéreas, enquanto na parede externa das pequenas vias aéreas o aumento é de mastócitos (CARROLL *et al.*, 2002).

1.1.6. Fisiopatologia da Asma.

A asma é uma desordem que ocorre nas vias aéreas com obstrução variável do fluxo aéreo, associado com hiperresponsividade e remodelamento do trato respiratório. A inflamação brônquica, decorrente da interação de fatores genéticos e estímulos ambientais, tem papel chave na fisiopatologia da asma e está relacionada com a disfunção das vias aéreas, particularmente através da ação de citocinas, quimiocinas, e mediadores lipídicos, produzidos por células imunológicas e inflamatórias, e células estruturais da árvore brônquica (HOLGATE, S., 2012).

Dentre os estímulos externos (não genéticos) associados ao desenvolvimento e progressão da asma há os fatores demográficos, incluindo idade, etnia e condição sócioeconômica (EVANS *et al.*, 1987), os aeroalergenos (SPORIK *et al.*, 1990), o hábito de fumar (YOUNG *et al.*, 1991), agentes no local de trabalho (CHAN-YEUNG & MALO, 1995), poluição do ar dentro e fora de casa (SAMET & LAMBERT, 1991), infecções virais (FOLKERTS *et al.*, 1998), exposição às endotoxinas domésticas (MICHEL *et al.*, 1996; GEREDA *et al.*, 2000; PARK *et al.* 2001) e ocupacionais (SCHWARTZ *et al.*, 1995).

Em relação ao tipo de resposta inflamatória desencadeada, pacientes com asma leve e moderada apresentam inflamação associada principalmente com perfil de resposta Th2 com presença de eosinófilos (HOLGATE, 2012), já os asmáticos

graves podem apresentar perfil de resposta Th17, ou ainda Th1, com presença de neutrófilos associados ou não a eosinófilos (BELL *et al*, 2011). Além disso, estudos apontam que a presença e o tipo de resposta inflamatória definem se o asmático irá ou não responder a determinados medicamentos como os corticoides inalatórios (WENZEL. *et al*.,1999; GREEN *et al*., 2002; JAYARAM *et al*., 2006). De fato, a mucosa brônquica inflamada torna-se hiperreativa a diversos estímulos, sejam eles alérgicos ou não e, assim, a presença de células e moléculas no processo inflamatório em cada caso é variável (MADDOX & SCHWARTZ, 2002).

A asma alérgica é o tipo mais comum (cerca de 70%) e tem início geralmente na infância. A atopia é definida como predisposição genética para o desenvolvimento de resposta imune mediada por IgE contra aeroalergenos e é um fator predisponente para o desenvolvimento da asma. Em países desenvolvidos, a atopia afeta cerca de 40% das crianças e adolescentes, mas apenas um terço dos casos desenvolvem asma (WENZEL, 2012).

O processo inflamatório na asma alérgica surge como resultado de resposta imunológica a alérgenos geralmente inalados, que culmina na ativação de células Th2 e produção de IgE. Esses alérgenos são reconhecidos por células apresentadoras de antígeno (do inglês *Antigen Presentation Cell*, APC) do sistema imune (SI). Dessa forma, eles são capturados por células dendríticas (do inglês *Dendritic Cells*, DC) residentes nas vias aéreas através dos receptores de reconhecimento de padrão (do inglês *Toll Like Receptors*, TLR - receptores que reconhecem padrões moleculares - PAMPS) e os processam em pequenos peptídeos antigênicos (**Figura 3a**). A agressão provocada pelos alérgenos nas vias aéreas, estimula as células da mucosa epitelial dos brônquios e outras células imunes, a produzirem quimiocinas e citocinas que estimulam e maturação das DCs, como as quimiocinas CCL-20, CCL-27 e CCL-19, que estimulam a migração e maturação de muitas DCs imaturas para o linfonodo e, as citocinas IL-25, IL-33, GM-CSF (do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e Linfoepoetina estromal tímica (do inglês *Thymic Stromal Lymphopoietin*, TSLP), que auxiliam na sua maturação (HAMMAD *et al*.,2010). Assim, estas DCs migram através dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais, onde interagem com linfócitos T virgens via receptor de células T (do inglês *T Cell Receptor*, TCR) e moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (Do inglês *Major Histocompatibility Complex*, MHC), associadas a um peptídeo antigênico e

moléculas coestimulatórias que irão direcionar a diferenciação das células T (**Figura 3a**). (SIMPSON *et al.*, 2010).

A produção de IL-4 pelas APC, após interação com o linfócito T virgem, resulta na diferenciação da célula T para um perfil Th2, pela ativação dos fatores de transcrição STAT-6 (do inglês *Signal Transducer And Activator Of Transcription 6*) e GATA-3. Por sua vez, ocorre aumento de RNAm (RNA mensageiro) para citocinas de padrão Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL13) e diminuição de RNAm para fatores de transcrição e citocinas de resposta Th1 ou Th17 e vice versa (VOLTARELLI *et al.*, 2003). A IL-4 e IL-13 tem papel importante no aumento de IgE específica pela indução da troca de classe de IgM para IgE pelos linfócitos B, produção de IgE pelos linfócitos B já diferenciados em plasmócitos e geração de células de memória (**Figura 3a**). A IL-4 também aumenta a expressão de receptores de alta e baixa afinidade pela IgE em mastócitos, eosinófilos e basófilos. Já a IL-5 é importante na maturação e aumento da sobrevivência de eosinófilos, principal célula efetora da lesão tecidual através da liberação de proteínas catiônicas que agredem a matriz extracelular e as células epiteliais (discutido adiante). O processo chamado de **sensibilização** ocorre logo após o primeiro contato com o alérgeno, no qual os mastócitos são revestidos com IgE específica para o alérgeno em questão (**Figura 3a**) (LARCHÉ *et al.*, 2006).

Após exposição repetida ao mesmo alérgeno, ocorre ligação cruzada na superfície dos mastócitos sensibilizados entre o alérgeno e os receptores FcεRI já ligados a IgE (**Figura 3b**), o que resulta em **reação de hipersensibilidade imediata**, caracterizada pela liberação de aminas vasoativas e mediadores lipídicos (como a histamina, prostaglandina, leucotrienos) do interior dos grânulos citoplasmáticos minutos após o segundo contato com o alérgeno, resultando em broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e hipersecreção de muco. A **fase tardia** ocorre dentre 3-6 horas após a segunda exposição ao alérgeno e é caracterizada pela ação de quimiocinas (CXCL-8, CXCL-10, CCL-2, CCL-4 e CCL-5) e citocinas (tais como IL-4, IL-5 e IL-13, GM-CSF) liberadas, também, pela desgranulação dos mastócitos, onde as células Th2 e células B de memórias específicas para o alérgeno são ativadas, ocorrendo a expansão clonal. Em adição, um outro subtipo de células T é ativada frente ao alérgeno e parecem atuar junto a células Th2 na asma, as células Th9, produtoras da citocina IL-9 levando ao crescimento e ao recrutamento de mastócitos (KAIKO & FOSTER, 2011).

FIGURA 3: EVENTOS DA HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA (FONTE: ADAPTADO DE LANCHE *ET AL.*, 2006 E ABBAS *ET AL.*, 2015).

As quimiocinas liberadas pelos mastócitos ativados também são importantes no recrutamento dos eosinófilos para o local da inflamação, como a IL-5. Como consequência do recrutamento e desgranulação prolongada dos eosinófilos, há liberação contínua de produtos citotóxicos, incluindo proteínas básicas, catiônicas, neurotoxinas e peroxidases responsáveis por lesão tecidual das vias aéreas, pela superprodução de muco a partir de células caliciformes, por hiperresponsividade brônquica e por comprometer o batimento ciliar. Além disso, os eosinófilos, assim como os mastócitos, secretam leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄), que são poderosos mediadores pró-inflamatórios que induzem broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e hipersecreção de muco (KAIKO & FOSTER, 2011).

A presença de eosinófilos em asmáticos adultos pode ser proveniente de asma não alérgica, ou seja, se desenvolve frequentemente na ausência de ativação de células Th2 dependentes do alérgeno. Relatos na literatura atribuem o desenvolvimento de asma não alérgica eosinofílica a células linfoides inatas do tipo 2 (ILC-2). As ILC-2s liberam citocinas do tipo Th2, incluindo grandes quantidades de IL-5 e IL-13, mas muito menos IL-4, na presença de citocinas

liberadas por células epiteliais (TSLP, IL-25 e IL-33) do brônquio frente a um estímulo (como vírus ou fungos) ou através da ativação do CRTH2 (do inglês *Chemoattractant Receptor-Homologous Molecule Expressed On Th2 Cells Receptor*) expressos na superfície celular dessas células ativadas pela prostaglandina (BRUSSELLE *et al.*, 2013; WALKER *et al.*, 2013; MCKENZIE *et al.*, 2014; XUE *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2014).

A eosinofilia geralmente está associada a forma grave da doença em adultos asmáticos. Os eosinófilos geralmente são muito responsivos aos corticoides orais e, na presença deste medicamento morrem. Porém, cerca de 50% dos asmáticos mesmo sob tratamento com corticoides apresentam grande quantidade de eosinófilos no sangue e no pulmão. Há relação direta do aumento no número destas células e o aumento na gravidade da doença (WENZEL *et al.*, 1999). Estes indivíduos apresentam membrana basal subepitelial mais espessa em relação a asmáticos sem inflamação eosinofílica, observação mais frequente nos sintomas mais graves da doença e em eventos quase fatais por asma (GIBSON *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2004).

Enquanto os linfócitos Th2 estão envolvidos no desenvolvimento de asma alérgica eosinofílica, outros subtipos de células T induzem inflamação neutrofílica das vias aéreas, muitas vezes associada com o fenótipo de asma mais grave. Em especial, uma linhagem de células TCD4 efectoras, denominadas Th17, tem sido envolvida na asma grave e na resistência a corticosteroides. A polarização para este subtipo de célula T requer a presença das citocinas IL-6, TGF- β e IL-1 β para ativação dos fatores de transcrição para Th17, o ROR γ t e STAT-3. Assim, uma vez diferenciadas, essas células produzirão as citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22. (NEWCOMB & PEEBLES, 2013). Por sua vez, as IL-17A e IL-17F induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, e quimiocinas, como CXCL10 e CXCL8, pelas células epiteliais, endoteliais, neutrófilos e eosinófilos. Em especial, a indução de CXCL-8 está diretamente ligada com a associação das células Th17 na inflamação neutrofílica das vias aéreas, pois esta é um potente quimioatraente para neutrófilos, além disso, sua expressão está elevada na forma grave da doença (LOUTEN *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2009). Já a IL-17A, mas não a IL-17F e IL-22, está envolvida no aumento da força contráctil do músculo liso das vias respiratórias. Diversos estímulos ambientais foram descritos como fatores desencadeantes de inflamação neutrofílica por células Th17 em asmáticos, tais como partículas presentes na fumaça do cigarro, poluentes no ar, componentes da parede

bacteriana e do envelope viral (THOMSON, CHAUDHURI, LIVINGSTON, 2004; POLOSA & THOMSON, 2013; SAIJAN *et al.*, 2008; VROMAN *et al.*, 2015). A asma neutrofílica associada a células Th17 é geralmente muito difícil de manejar devido a frequente resistência aos medicamentos, caminhando para o agravamento da doença (SAFFAR *et al.*, 2011; BUSSE. *et al.*, 2013).

Antes da descoberta dos linfócitos Th17, atribuíam as células Th1 como os principais coordenadores celulares da asma neutrofílica. A diferenciação para o perfil Th1 é conduzida por APCs, como as DC, produtoras de IL-12, IL-18 e interferon- γ (IFN- γ) e requer a expressão do fator de transcrição T-bet e STAT-1. As citocinas produzidas pelas células Th1 efectoras, o IFN- γ e TNF- α , estão aumentadas em pacientes com asma grave, sugerindo que células Th1 poderiam mediar a inflamação neutrofílica das vias aéreas, fator característico dessa forma da doença, mas este mecanismo ainda é pouco compreendido (BERRY *et al.*, 2006; VROMAN *et al.*, 2015).

Todos estes eventos de diferenciação celular para perfis Th1, Th2 ou Th17 envolvidos na fisiopatologia da asma parecem ocorrer por consequência de defeito na função das células T reguladoras (Treg). As Tregs representam subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula CD25+ e do fator nuclear FoxP3 e induzem a supressão das células T efectoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imune (CAMPBELL & ZIEGLER, 2007). Certamente, a secreção de IL-10 por estas células poderiam atuar na asma induzindo a supressão de DC envolvidas na diferenciação de células T efectoras, inibição direta de células Th1, Th2 e Th17, a supressão de IgE específica para o alérgeno, inibição de mastócitos, basófilos e eosinófilos e a prevenção da migração das células T efectoras no tecido alvo. Mas, o comprometimento funcional da imunomodulação mediada pelas Treg torna os pacientes asmáticos sensíveis ao desenvolvimento de inflamação brônquica eosinofílica e neutrofílica, onde a combinação de ambos os neutrófilos e eosinófilos infiltrados nas vias aéreas podem coexistir na asma grave (DOUGHERTY & FAHY, 2009).

A reação inflamatória causada por todas essas células e seus produtos ocasionam mudanças estruturais no trato respiratório inferior. Através dos mediadores e citocinas, as células causam lesões e alterações na integridade epitelial e anormalidades do tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da

reatividade do músculo liso da via aérea. Além disso, tais mediadores podem atingir o epitélio ciliado, causando-lhe dano e ruptura. Consequentemente, células epiteliais e miofibroblastos, presentes abaixo do epitélio, proliferam e iniciam o depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular da membrana basal, isso explica o aparente espessamento da membrana basal e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes com asma. Hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, elevação no número de células caliciformes e aumento das glândulas submucosas são alterações que ocorrem no remodelamento brônquico que interfere na arquitetura da via aérea. O remodelamento consiste em um meio de reparação das vias aéreas em resposta a inflamação crônica e está relacionado com o agravamento da doença resultando em limitação do fluxo aéreo irreversível devido à perda da função pulmonar (KUMAR, 2001; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, SBPT, 2012; FAHY, 2015).

1.1.7. Fatores Genéticos.

Diversos genes candidatos, em diferentes níveis de associação, têm sido relacionados a diferentes fenótipos de asma. Tipicamente, o impacto destes diversos genes individualmente nas manifestações fenotípicas da doença é pequeno, entretanto, grandes efeitos podem advir da atuação sinérgica de múltiplos destes genes, em um contexto ambiental favorável. A grande heterogeneidade fenotípica da asma, que pode iniciar em qualquer idade, pode ser leve, e até mesmo transitória, ou, ao contrário, persistente e extremamente grave, além de estar associada a diferentes fenótipos intermediários, como atopia, hiperresponsividade brônquica, níveis séricos de IgE, dentre outros, colabora para a dificuldade na caracterização do papel específico de genes isolados no desenvolvimento da doença (LEE *et al.*, 2015).

Mais de 30 genes já foram identificados como candidatos ao desenvolvimento de asma, e estão divididos em quatro grandes grupos: (a) associados à imunidade inata e imunorregulação (ex. CD14, TLR2, 4, 6, 10, IL-10, TGF-beta e HLA DR, DQ e DP); (b) associados à atopia, diferenciação Th2 e suas funções (p.ex. GATA-3, IL-4, IL-4R, FcεRI, IL-5, IL-5R e STAT-6); (c) associados à biologia epitelial e imunidade das mucosas (p.ex. genes de quimiocinas CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, filagrina e outros) e (d) associados à função pulmonar e remodelamento brônquico (ADAM-33, DPP-10). Além disso, outras características individuais também estão associadas ao

desenvolvimento de asma. Crianças do sexo masculino têm risco 2 vezes superior de desenvolver asma em comparação com meninas da mesma idade, assim como a obesidade tem sido associada ao maior risco de asma (VERCELLI, 2008; LEE *et al.*, 2015).

Na **Figura 4**, estão listados mais de 30 dos genes candidatos à susceptibilidade a asma brônquica identificados por estudos de associação englobando todo o genoma (do inglês *World-wide Genome Association*, GWAS) e por clonagem posicional (estudos de ligação). A figura lista também os cromossomos mapeados e resumo das funções que estes genes estão envolvidos (VERCELLI, 2008; WEISS, 2015). Além desses, um gene identificado pelo método de clonagem posicional como tendo associação com a asma brônquica foi o *HLA-G*. A ligação com a região 6p21 (região do complexo principal de histocompatibilidade - MHC) onde se localiza o gene *HLA-G* foi descrita em estudos de ligação gênica (NICOLAE *et al*, 2005).

FIGURA 4: RESUMO DOS GENES ASSOCIADOS A ASMA BRÔNQUICA EM PELO MENOS CINCO ESTUDOS INDEPENDENTES E, AO LADO, A QUANTIDADE DE TRABALHOS COM ASSOCIAÇÕES POSITIVAS PARA ASMA BRÔNQUICA PARA CADA GENE, PUBLICADOS ATÉ 2007. OS GENES ESTÃO ORDENADOS SEGUNDO SEU CROMOSSOMO. AS SIGLAS DOS GENES SÃO DO INGLÊS: ACE (ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME); ADAM33 (DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE DOMAIN 33); ADRB2 (B2 ADRENERGIC RECEPTOR); CC16 (CLARA CELL-SPECIFIC 16 KD PROTEIN - SCGB1A1); CCL11 (CC-CHEMOKINE LIGAND 11); CCL5 (CC-CHEMOKINE LIGAND 5); CD14 (MONOCYTE DIFFERENTIATION ANTIGEN 14); CMA1 (CHYMASE 1, MAST CELL); CTLA4 (CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE ANTIGEN 4); FCERIB, (HIGH-AFFINITY Fc RECEPTOR FOR IGE B-CHAIN); FLG (FILAGGRIN); GPRA (G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR FOR ASTHMA SUSCEPTIBILITY); GSTM1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE M1); GSTP1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1); GSTT1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE T1); HAVCR1 (HEPATITIS A VIRUS CELLULAR RECEPTOR 1); IL (INTERLEUKIN); IL4R (INTERLEUKIN-4 RECEPTOR – CADEIA-Α); LTA (LYMPHOTOXIN-Α, TAMBÉM CONHECIDO COMO TNFβ); LTC4S (LEUKOTRIENE C4 SYNTHASE); NAT2 (N-ACETYLTRANSFERASE 2); NOS1 (NITRIC OXIDE SYNTHASE 1); SPINK5 (SERINE PROTEASE INHIBITOR KAZAL-TYPE, 5); STAT6 (SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 6); TBXA2R (THROMBOXANE A2 RECEPTOR); TGFB1 (TRANSFORMING GROWTH FACTOR-B1); TNF (TUMORAL NECROSIS FACTOR). (FONTE: ADAPTADO DE VERCELLI, 2008).

1.2. O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

O MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, MHC) humano é a região com maior densidade gênica e alto polimorfismo de todo o genoma humano. O MHC estendido humano, encontrado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) (**Figura 5**), abrange região de aproximadamente 7,6 Mb, contendo 421 *loci* com 252 genes (HORTON *et al.*, 2004), representando cerca de 2,5% do genoma humano (KLEIN & SATO, 2000; HORTON, *et al.*, 2004).

Esta região engloba o complexo de antígenos leucocitários humanos (do inglês *Human Leucocyte Antigen*, HLA), os quais se dividem em HLA de classe I e II. A maioria dos genes desse complexo codifica proteínas transmembranárias que se associam a fragmentos peptídicos, oriundos de antígenos proteicos fagocitados e processados pelas APCs, sendo apresentados às células do sistema imune, principalmente linfócitos T: HLA de classe I para os linfócitos TCD8⁺ e HLA de classe II para os linfócitos TCD4, desempenhando papel importante na resposta adaptativa (FISHER & MAYR, 2001; SULLIVAN *et al.*, 2010).

A família dos genes HLA de classe I engloba os *loci* HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G (**Figura 5**) além de outros genes não destacados aqui por serem pseudogenes. Três genes de classe I, HLA-A, -B e -C (**Figura 5**), denominados de genes clássicos ou classe Ia, são altamente polimórficos com grande número de variantes alélicas em cada *locus* e apresentam expressão tecidual generalizada. Outros três genes conhecidos como não-clássicos (ou genes de classe Ib) HLA-E, -F e -G (**Figura 5**) têm sido identificados por serem altamente homólogos aos genes HLA clássicos, porém, são menos polimórficos e possuem padrões de expressão tecidual restrita. Existem três *loci* de genes HLA de classe II ditos como clássicos, denominados -DP, -DQ e -DR, mas esta região possui muitos outros genes envolvidos não somente na apresentação mas também no processamento de antígenos. O conjunto de alelos do MHC presente em cada cromossomo é denominado haplótipo. Certas combinações de haplótipos de *loci* MHC são conhecidos por conferirem proteção contra, ou susceptibilidade a, muitas doenças, incluindo a maioria das doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas. Em relação à função dos HLA não clássicos, o seu papel tem sido associado com a regulação do sistema imune e não com a apresentação de antígenos (FISHER & MAYR, 2001; SULLIVAN *et al.*, 2010; HORTON *et al.*, 2004).

FIGURA 5: MAPA DO MHC HUMANO (FONTE: KLEIN & SATO, 2000).

1.2.1. O HLA-G: Estrutura, Expressão e Função.

O gene que codifica o antígeno leucocitário humano G (HLA-G) foi primeiramente descrito por Geraghty e colaboradores em 1987, sendo a sua expressão inicialmente descrita na interface materno-fetal no citotrofoblasto, contribuindo para o processo de tolerância imunológica do feto pela mãe (KLEIN & SATO, 2000a, KLEIN & SATO, 2000b). Atualmente, além destas células, sabe-se que o HLA-G é expresso também, nas células fetais endoteliais (BLASCHITZ *et al.*, 2011) e no fluido amniótico (HAMMER *et al.*, 1997), conferindo proteção imunológica (BLASCHITZ *et al.*, 2011).

A nomenclatura do gene *HLA-G*, segue àquela descrita para os genes de histocompatibilidade, sendo composta de quatro, seis ou oito dígitos. Os primeiros dois dígitos referem-se à família do alelo, o terceiro e quarto, à ordem que as sequências foram descobertas. Portanto, um alelo que difere nesses primeiros quatro dígitos apresenta substituições de nucleotídeos não-sinônimas, modificando a proteína codificada. Por outro lado, os alelos que possuem variações silenciosas na

sequência codificadora exônica, não produzindo, portanto, modificações na sequência de aminoácidos da proteína codificada, são diferenciados pelo uso do quinto e sexto dígitos (ex: *HLA-G*01:04:01* e *HLA-G*01:04:04*). O sétimo e oitavo dígitos são utilizados para distinguir sequências nucleotídicas observadas em íntrons ou nas regiões regulatórias do gene (ex: *HLA-G*01:01:01:04* e *HLA-G*01:01:01:05*) (Disponível em <http://hla.alleles.org>, junho de 2016).

O *HLA-G* difere dos outros genes de classe I por ser pouco polimórfico, possuir distribuição limitada a certos tecidos e ser transcrito de forma alternativa, apresentando propriedades biológicas de imunotolerância (CAROSELLA et al., 2008). Em condições normais, nível basal de transcrição do gene *HLA-G* é observado na maioria das células e órgãos adultos, incluindo o timo (MALLET et al., 1999), córnea (LE DISCORDE et al., 2003), células mesenquimatosas (MSCs) (SELMANI et al., 2008), células dendríticas (ITO et al., 2005), células pancreáticas β (CIRULLI et al., 2006), eritoblastos, precursores endoteliais (MENIER et al., 2004) e tecidos do sistema reprodutivo masculino (LARSEN et al., 2011). Mas, tais moléculas também podem ser expressas em condições patológicas.

Os transcritos primários (**Figura 7**) do *HLA-G* sofrem edição alternativa, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas distintas. Quatro dessas são ligadas à membrana (*HLA-G1*, *HLA-G2*, *HLA-G3* e *HLA-G4*) e as outras três são proteínas solúveis (*HLA-G5*, *HLA-G6* e *HLA-G7*) (**Figura 6**) (ISHITANI & GERAGHTY, 1992; DONADI et al., 2011). As isoformas *HLA-G1* (transmembrana) e *HLA-G5* (solúvel) são estruturalmente semelhantes às moléculas HLA de classe I: uma cadeia pesada com três domínios globulares, associada a uma β 2-microglobulina. As demais isoformas não estão associadas a β 2-microglobulina. O gene também é similar, exibindo sete íntrons e oito éxons codificando apenas a cadeia pesada da molécula, enquanto que β 2-microglobulina é codificada por um gene no cromossomo 15. O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, os éxons 2, 3 e 4 os domínios extracelulares α 1, α 2 e α 3, respectivamente (onde: α 1 e α 2 contribuem para fenda de ligação peptídica), e os éxons 5 e 6, os domínios transmembrana e citoplasmático da cadeia pesada (**Figura 6**). No éxon 6 há um códon de parada, o que resulta na não transcrição do éxon 7. Assim, o éxon 7 é sempre ausente no RNA mensageiro maduro (mRNA) e o éxon 8 não é traduzido, sendo chamado de região 3' não traduzida (do inglês 3' *Untranslated Region*, 3'UTR). O RNAm das isoformas *HLA-G5* e *-G6* conservam o íntron 4 que causa a inserção de um códon de parada levando à interrupção prematura do RNAm, e a tradução é interrompida

prematuramente. Como resultado, essas isoformas do HLA-G são secretadas com um domínio citoplasmático menor correspondente à fração traduzida do éxon 4. (**Figura 09**) (CAROSELLA *et al.*, 2008; DONADI *et al.*, 2011).

FIGURA 6: AS SETE ISOFORMAS DA MOLÉCULA HLA-G PRODUZIDAS POR EDIÇÃO ALTERNATIVA. AS ISOFORMAS SOLÚVEIS SÃO GERADAS POR EXCISÃO DE UM OU DOIS EXONS QUE CODIFICAM DOMÍNIOS QUE NÃO POSSUEM O DOMÍNIO TRANSMEMBRANA (ADAPTADO DE DONADI *ET AL.*, 2011).

A molécula de HLA-G apresenta um resíduo de Cisteína na posição 42 do domínio $\alpha 1$ e outro na posição 147 no domínio $\alpha 2$ que contribuem para a formação de pontes e dímeros. Essas estruturas foram encontradas em quase todas as isoformas de HLA-G, com exceção do HLA-G3. Cerca de 40% das moléculas de HLA-G expressas na superfície de trofoblastos são dímeros, entretanto, somente uma pequena fração de HLA-G solúvel constitui dímeros. Uma vez formado, o dímero de HLA-G expõe os sítios de ligação a receptores de células do sistema imune e de outras células, onde a afinidade de um receptor a um dímero de HLA-G é maior quando comparado a um monômero, pois dímeros ligam-se com maior afinidade e a taxa de dissociação é mais lenta em comparação com os monômeros. Além disso, a dimerização facilita a sinalização intracelular mediada por

determinados receptores (SHIROISHI *et al.*, 2006; HOWANGYIN *et al.*, 2012; ALEGRE *et al.*, 2014).

Como as demais moléculas de HLA de classe I e II, o HLA-G também forma um complexo HLA-G peptídeo, porém, com repertório menor de peptídeos. Este complexo é semelhante ao observado para as moléculas clássicas, entretanto, o peptídeo fica localizado em parte mais profunda da fenda de ligação entre os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Além dessas características, o fato de não existir relatos de células T restritas ao HLA-G tornam improvável que esta molécula tenha como principal função a apresentação de antígenos. O baixo polimorfismo do HLA-G é distribuído ao longo dos três domínios da cadeia α , enquanto que nas moléculas clássicas a quase totalidade do polimorfismo está concentrada em torno do sítio de ligação com os peptídeos, porém, a estrutura molecular das proteínas distintas do HLA-G e os diferentes peptídeos ainda não foram totalmente elucidados (DONADI, *et al.*, 2011; CLEMENTS *et al.*, 2012).

Uma vez que a molécula de HLA-G foi inicialmente descrita participando da tolerância imunológica na interface materno-fetal, ela tem sido associada a regulação do sistema imune através da sua interação com receptores inibitórios presentes nas células, incluindo células T CD4 e CD8, linfócitos B, células NK, macrófagos e células dendríticas. Os receptores LILRB1 (do inglês, *Leukocyte immunoglobulin-like Receptor B1*, também chamado de ILT2) e o LILRB2 (do inglês, *Leukocyte immunoglobulin-like Receptor B2*, também chamado de ILT4) são compartilhados tanto pelos macrófagos como as células dendríticas, mas o primeiro também é expresso por células NK, células B e células T (CD4 e CD8) (COLONNA *et al.*, 1998; LE BOUTEILLER, 2015). O KIR2DL4 (do inglês, *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*) tem o HLA-G como seu único ligante e tem sua expressão restrita principalmente às células NK e algumas células TCD8 (RAJAGOPALAN & LONG, 1999; COPER *et al.*, 2001; GOODRIDGE *et al.*, 2003), além de ter papel na ativação de citocinas e quimiocinas, mas não na atividade citolítica (RAJAGOPALAN *et al.*, 2001). No caso da interação do LILRB1 com o HLA-G, a presença de resíduos de Fenilalamina e Tirosina nas posições 195 e 197, respectivamente, do domínio $\alpha 3$ na molécula de HLA-G contribui para ligação de alta afinidade do HLA-G a este receptor quando comparado a outras moléculas do MHC de classe I que possuem uma Serina e uma Histidina nas posições citadas. Tanto LILRB1 e LIRB2 ligam-se com maior afinidade a dímeros de HLA-G do que estruturas monoméricas, embora possuam especificidades diferentes: o LILBR1

reconhece moléculas associadas a β 2-microglobulina, enquanto que o LILBR2 pode reconhecer tanto moléculas associadas como não associadas. Há relatos de que o HLA-G também se liga a algumas células endoteliais que expressam CD160 (GONEN-GROSS *et al.*, 2005; SHIROISHI *et al.*, 2006; LE BOUTEILLER, 2015).

A interação do HLA-G com estes receptores inibitórios podem resultar em dois efeitos: (1) Inibição em curto prazo de células efectoras e da resposta imune: células NK (RITEAU *et al.*, 2001), linfócitos T citotóxicos (CTL) (LE GAL *et al.*, 1999), células dendríticas (HORUZSKO *et al.*, 2001) e células B (RITEAU *et al.*, 2001; HORUZSKO *et al.*, 2001; NAJI *et al.*, 2014). Por exemplo, em células T, a interação de HLA-G com o seu receptor LILRB1 inibitório atua em ciclinas e quinases para induzir bloqueio do ciclo celular na fase G1 (CAROSELLA, 2011); ou (2) indução a longo prazo de células supressoras da resposta imune, as células T reguladoras (Treg) (GREGORI *et al.*, 2009).

Embora qualquer tecido possa expressar HLA-G, a sua expressão fisiológica é restrita a alguns tecidos. A razão pela qual ele é expresso de forma tecidual restrita ainda não foi elucidado. Porém, o HLA-G pode ser encontrado também em condições patológicas, como após transplante de órgãos, infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes. Nos processos patológicos, o HLA-G pode ser expresso pelo tumor, pelas células enxertadas ou infectadas por vírus, sugerindo que vários níveis de regulação relacionados com o controle genético e associados com fatores microambientais controlam a expressão de HLA-G nas células e tecidos lesados (CAROSELLA *et al.*, 2008; DONADI *et al.*, 2011).

A expressão de HLA-G induzida de uma forma não fisiológica pode ser benéfica ou não. No caso das doenças autoimunes e transplantes, a produção de HLA-G é benéfica pois poderia suprimir as respostas imunes desencadeadas nestes dois casos. Já em infecções virais e câncer, tanto os vírus quanto as células tumorais podem usufruir dos mecanismos imunomodulatórios do HLA-G para escapar do sistema imunológico. As células tumorais induzem a apoptose de células imunes pela interação de receptores das células NK e de células TCD8 com o HLA-G produzido pela célula tumoral, inibindo a função citolítica dessas células. Ainda, HLA-G pode: i) induzir a formação de célula Treg a partir da estimulação de células T CD4 e CD8 que perderam a sua capacidade de responder a antígenos quando na presença de HLA-G solúvel; e ii) suprimir a resposta imunológica durante o contato célula-célula, onde moléculas de HLA-G ligadas a membrana de células tumorais

são adquiridas por células NK ativadas, células T e/ou células dendríticas, através de processo chamado trogocitose (CURIGLIANO *et al.*, 2013).

1.2.2. Polimorfismos da região 3' não traduzida do gene HLA-G

Como dito anteriormente, o gene *HLA-G* apresenta baixo número de variantes quando comparado com os genes *HLA* de classe I clássicos, que possuem centenas de alelos. Segundo, o IMGT (do inglês *International ImMunoGenetics Information System*, disponível em <http://www.imgt.org>, março de 2016), o gene *HLA-G* possui 53 alelos que codificam 18 proteínas. As frequências destes diferentes alelos *HLA-G* variam entre as diferentes populações étnicas. Os polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) definem o maior grupo de alelos *HLA-G*. Contudo, a maioria das mutações desse gene é silenciosa e são poucas as mutações que geram mudanças de aminoácidos na proteína HLA-G (MOREAU *et al.*, 2009). Alguns sítios polimórficos nas regiões promotora (do inglês *Upstream Regulatory Region*, 5'URR) e 3'UTR estão envolvidos na regulação transcricional e pós-transcricional do gene *HLA-G* afetando a expressão da molécula. Até agora, pelo menos 35 polimorfismos na 5'URR, 75 na região codificadora e 16 na 3'UTR foram descritos (CASTELLI *et al.*, 2014).

FIGURA 7: ILUSTRAÇÃO COM OS PRINCIPAIS POLIMORFISMOS PRESENTES NAS REGIÕES 3'UTR. A REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA INFLUENCIA NA EXPRESSÃO DE HLA-G DEVIDO A VÁRIOS MOTIVOS: I) ALGUNS SÍTIOS POLIMÓRFICOS PODEM SER ALVOS DE MIRNAS (+3142), II) OUTROS ALTERAM A ESTABILIDADE DO MRNA (+3187) E/OU EDIÇÃO ALTERNATIVA DO TRANSCRITO PRIMÁRIO (14 PB INS/DEL).

A região 3'UTR possui diversos elementos reguladores, incluindo sinais de poliadenilação (KUERSTEN, GOODWIN, 2003), regiões ricas de elementos AU (YIE, *et al.*, 2008) e sítios polimórficos que podem potencialmente influenciar a transcrição

e a tradução, através de ligação com microRNAs (miRNA) (CASTELLI *et al.*, 2009; PORTO *et al.*, 2015). Os polimorfismos da 3'UTR (**Figura 7**) alteram a estabilidade do RNAm, sua tradução, localização, degradação, bem como a expressão do HLA-G (DONADI *et al.*, 2011).

Entre os polimorfismos da 3'UTR, aqueles que apresentarem indícios de terem relação com a regulação dos níveis de expressão da molécula são: (1) a presença (inserção) ou ausência (deleção) de um fragmento de 14 pares de base (pb), o mais estudado polimorfismo do gene. A inserção tem sido associada com a redução da produção e aumento da estabilidade do RNAm do *HLA-G* (CASTELLI *et al.*, 2011); (2) o SNP na posição +3142C/G, no qual o alelo G está envolvido na regulação pós transcricional por ser alvo de miRNAs (TAN *et al.*, 2008) e (3) o SNP na posição +3187A/G, posicionado próximo ao elemento rico em AU, no qual o alelo +3187 A está associado com maior estabilidade do RNAm (YIE *et al.*, 2008). Diversos outros SNPs, como +3001 T/C, +3003 G/C, +3010 G/C, +3027 C/A, +3035 C/T e +3196 C/G, têm sido apontados como potenciais alvos de ligação de miRNAs e, assim, poderiam regular a expressão de *HLA-G* (CASTELLI *et al.*, 2009; PORTO *et al.*, 2015).

A presença da sequência de 14pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') tem sido associados em amostras de trofoblasto à menor produção de RNAm tanto para as isoformas ligadas à membrana quanto para as solúveis. Os RNAm do *HLA-G* que apresentam a inserção 14pb são associados à produção de transcritos alternativos com deleção de 92pb, portanto menores e por isso mais estáveis do que a forma com a deleção 14pb. Essa edição alternativa é, provavelmente, não só dirigido pela presença da inserção dos 14pb no transcrito primário como pode ser consequência da presença de outros polimorfismos que estejam em desequilíbrio de ligação com a referida inserção (HVIID *et al.*, 2006; DONADI *et al.*, 2011; ROUSSEAU *et al.*, 2003).

Além disso, a 3'UTR de um determinado gene pode ser alvo para miRNA, que são pequenos RNAs não codificantes com cerca de 22 nucleotídeos. Os miRNAs podem regular negativamente a expressão do gene através da supressão da tradução, da degradação do mRNA ou ambos (VEIT & CHIES, 2009). A variação de nucleotídeos na posição +3142 influencia a expressão do HLA-G e foi relacionada à susceptibilidade à asma. A presença de uma Guanina na posição +3142 aumenta a afinidade dessa região com os miRNAs (miR-148a, miR-148b e miR-152), diminuindo a disponibilidade de RNAm (TAN *et al.*, 2008).

Os polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* formam ao menos 18 diferentes haplótipos já identificados em populações brasileiras (CASTELLI *et al.*, 2010; LUCENA-SILVA *et al.*, 2012). Os alelos do SNP de 14 pb inserção/deleção (Ins/Del ou I/D) estão em forte desequilíbrio de ligação com alelos dos SNPs +3142 G/C e +3187 G/A (CASTELLI *et al.*, 2010). Os haplótipos denominados UTR-2 e UTR-5, os quais contêm os alelos 14 pb Ins, +3142 G e 3187 G, estão associados com a baixa expressão de *HLA-G* solúvel, enquanto que o haplótipo UTR-1, que contém o alelo 14 pb Deleção (Del ou D), +3142 C e +3187 G, está associado com elevada expressão de *HLA-G* (MARTELLI-PALOMINO *et al.*, 2013).

Além dos polimorfismos presentes na 3'UTR estarem envolvidos na regulação da expressão do gene *HLA-G*, os polimorfismos presentes na região promotora também influenciam na expressão da molécula por conta de seus sítios polimórficos coincidirem com sítios de ligação para fatores de transcrição ou simplesmente por estarem próximos a eles (CASTELLI *et al.*, 2014). Assim, estudos de correlação considerando os polimorfismos ao longo de todo o gene podem ser importantes para elucidar a influência dos haplótipos estendidos do gene *HLA-G* na expressão proteica.

1.2.3. O gene *HLA-G* e Asma Brônquica

A evidência de associação do *HLA-G* com asma e hiperreatividade brônquica foi observada em estudo realizado em famílias de 4 populações distintas. Nesse trabalho, também, foi observada associação diferencial de alelos de *HLA-G* com asma na criança no caso de as mães apresentarem hiperreatividade brônquica. (NICOLAE *et al.*, 2005).

Quanto à expressão de *HLA-G* em asmáticos, um trabalho sugeriu a secreção de IL-10 em doentes com asma se encontra deficitária, podendo estar relacionado com a diminuição da expressão de *HLA-G* nesses doentes, o que contribui para a persistência de inflamação crônica na asma (Rizzo, *et al.*, 2005), uma vez que a IL-10 induz a expressão de *HLA-G*. Foi relatado que as células epiteliais e caliciformes do trato respiratório são capazes de expressar *HLA-G* (NICOLAE *et al.*, 2005; WHITE *et al.*, 2013) e detectaram a presença de *HLA-G* solúvel no fluido broncoalveolar (WHITE *et al.*, 2010; NICODEMIS-JOHNSON *et al.*, 2013), plasma e soro (TAHAN & PATIROGLU, 2006; CIPRANDI *et al.*, 2010; CIPRANDI *et al.*, 2014) de pacientes asmáticos.

De fato, como já mencionado, o gene do *HLA-G* apresenta regiões regulatórias, como a 3'UTR, contendo diversos sítios polimórficos potencialmente relacionados com a capacidade de produção dessa molécula imunossupressora. Dessa forma, tais sítios polimórficos poderiam contribuir para a susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da asma brônquica.

Justificativa

---

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que a asma brônquica é doença inflamatória crônica, modulada pelas células do sistema imune, a identificação de fatores genéticos relacionados com susceptibilidade ou gravidade da doença podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, ou mesmo, terapêuticas. Considerando que existe análise prévia, identificando a região do gene *HLA-G* como possível candidata à susceptibilidade à asma brônquica e, considerando que a molécula *HLA-G* tenha papel imunomodulador, neste estudo avaliamos a diversidade do segmento 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com asma brônquica, estratificados segundo a gravidade da doença.

Objetivos

---

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Uma vez que existe análise prévia, identificando a região do gene *HLA-G* como possível candidata à susceptibilidade à asma brônquica e, que a molécula HLA-G tenha papel imunomodulador, neste estudo avaliamos as regiões regulatórias da expressão da molécula, a região 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com asma brônquica, estratificados segundo a gravidade da doença.

3.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos, analisamos:

1. O polimorfismo inserção/deleção de 14 pb no éxon 8;
2. Polimorfismo +3142C/G e +3187 A/G, já associados com a magnitude de expressão da molécula HLA-G;
3. Outros sítios polimórficos da região 3'UTR, ainda não associados com a magnitude de expressão de HLA-G.

Metodología

---

4. METODOLOGIA

4.1. População de estudo

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, conforme processo HCFMRP nº: 6323/2011. As amostras dos pacientes já haviam sido coletadas em estudo anterior e seu DNA extraído (Processo HCFMR USP nº2125/2004- Polimorfismos do gene de resistência múltipla a drogas -1 (MDR-1) e dos microssatélites do TNF em pacientes com asma brônquica grave – Termo de consentimento encontra-se em anexos) armazenados no Banco de Amostras do Núcleo de Pesquisa em Imunogenética (BANPI) (processo HCFMRP USP nº 7581/2007). Um total de 118 pacientes asmáticos (72% mulheres), maioria brancos (79%), com idades entre 9 a 82 anos (média de 46,13 anos, desvio padrão - DP $\pm$ 16,94), seguidos no Ambulatório de Alergia Respiratória do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, foram estratificados de acordo com a gravidade da doença em asma leve ou moderada (n=52) e asma grave (n=66).

A classificação da gravidade da asma foi realizada de acordo com os sintomas clínicos e avaliação da espirometria. Para asma grave foram considerados os seguintes parâmetros: i) VEF1 (volume expiratório forçado no primeiro segundo) <60% (BATEMAN, *et al*, 2008), ii) FEF 25-75% (Fluxo expiratório forçado médio) <30%, iii) VEF1/CVF <70% e iv) apresentação de crises graves de exacerbação dos sintomas respiratórios (**Tabela 2**, página 07). Para identificação da presença de atopia foram realizados testes cutâneos no antebraço dos pacientes (*prick tes*), utilizando painel de extratos de alérgenos inalantes (FDA alergénicos, Rio de Janeiro, Brasil), onde controles positivos (cloridrato de histamina de 10 mg/mL) e negativos (solução salina) foram utilizados. A quantificação da IgE total superior a 100 ng/mL foi também considerada para identificar a presença de asma alérgica. Informações como resultados da espirometria, sintomas clínicos, resultados do teste cutâneo, dosagem de IgE total e hábito de fumar, foram revisados dos prontuários de cada paciente e as diferenças entre os grupos estudados para cada um destes dados estão organizados na **Tabela 4**.

Um total de 236 indivíduos saudáveis da mesma região geográfica (71% homens), maioria étnica branca (72%), com idade entre 18 e 60 anos de idade e uma média de 35, 83 (DP $\pm$ 11,38) anos de idade, que tiveram seus DNAs anteriormente extraídos e tipificados (Processo número. HCRP 12398/2004), foram utilizados neste estudo como controle para comparação com os nossos pacientes asmáticos (CASTELLI *et al.*, 2010; CASTELLI *et al.*, 2011). Os controles não foram tipificados novamente.

Tabela 4: **Características clínicas e laboratoriais dos pacientes:**

	ASMA TOTAL N=118	ASMA GRAVE N=66	ASMA LEVE/MODERADA N=52
Média da Idade ($\pm$DP)	46,13 ($\pm$ 16,94)	49,24 ($\pm$ 14,97)	42,17 ($\pm$ 18,54)
Sexo			
Feminino	85 (72%)	44 (67%)	41 (79%)
Masculino	33 (28%)	22 (33%)	11 (21%)
Etnia			
Branco	93 (79%)	50 (76)	43 (83%)
Mulato	14 (12%)	8 (12%)	6 (12%)
Negro	11 (9%)	8 (12%)	3 (6%)
Atópico			
Sim	86 (73%)	49 (74%)	37 (71%)
Não	16 (14%)	12 (18%)	4 (8%)
N/A	16 (14%)	5 (8%)	11 (21%)
Teste cutâneo			
Positivo	75 (64%)	41 (62%)	34 (65%)
Negativo	21 (25%)	15 (10%)	6 (3%)
N/A	22 (26%)	10 (7%)	12 (6%)
Média da IgE Total (ng/mL) ($\pm$DP) *	513,56 ($\pm$ 992,14)	503,15 ($\pm$ 988,28)	534,39 ($\pm$ 1020,81)
Média de CVF (% previsto) ($\pm$DP)**	85,61 ($\pm$ 19,62)	77,350 ($\pm$ 19,02)	96,79 ($\pm$ 14,25)
Média de VEF1 (% previsto) ($\pm$DP)**	66,08 ($\pm$ 22,81)	54,250 ($\pm$ 19,76)	82,11 ($\pm$ 15,88)
Média de FEF 25-75 (% previsto) ($\pm$DP)**	38,36 ($\pm$ 25,74)	27,607 ($\pm$ 23,22)	52,93 ($\pm$ 21,63)
Média de VEF1/CVF (% observado) ($\pm$DP)**	61,04 ($\pm$ 18,96)	54,688 ($\pm$ 17,85)	71,14 ($\pm$ 18,14)
Tabagismo**			
Sim	10 (8%)	6 (9%)	4 (8%)
Não	76 (64%)	38(58%)	38 (73%)
Ex	27 (23%)	19 (29%)	8 (15%)
N/A	5 (4%)	3 (5%)	2 (4%)

DP: Desvio Padrão; CVF: Capacidade vital forçada; VEF1: Volume expiratório no primeiro segundo; FEF 25-75: Fluxo expiratório forçado médio; N/A: informação não consta nos registros médicos;

N: Amostra populacional; * 46 pacientes não apresentaram esta informação nos prontuários médicos; ** 05 pacientes não apresentaram tais informações nos prontuários médicos.

4.2. Extração de DNA

Os DNAs foram previamente extraídos por método *salting-out* a partir de células do sangue periférico (WIENDEL *et al.*, 2002) (Protocolo e reagentes em anexo). O DNA foi quantificado por espectrofotometria em 260 e 280 nm e o grau de pureza foi calculado pela razão entre as absorbâncias obtidas em 260 e 280 nm, sendo considerados aceitáveis valores entre 1,6 e 2,0.

4.3. Amplificação da região 3' UTR do gene *HLA-G*

A região 3' UTR foi inicialmente amplificada, utilizando a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), com os seguintes iniciadores: HLAG8R – GTCTTCCATTTATTTGTCTCT e HLAG8F – TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo água ultra-pura desionizada, 1 X tampão de amplificação (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl), 0,2 mM de DNTP, 5 pmol de cada iniciador, 1,50 mM de MgCl₂, 0,5 U de DNA polimerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 200 ng de DNA genômico. O perfil de ciclagem utilizado foi constituído por ciclo inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos. A presença de um fragmento de 345-pb ou de 359-pb indica a presença da deleção ou inserção do polimorfismo de 14-pb, respectivamente (**Figura 8**) (CASTELLI *et al.*, 2010).

FIGURA 8: GEL DE POLIACRILAMIDA 7% CORADO PELA PRATA, ILUSTRANDO A DETECÇÃO DO POLIMORFISMO DE 14-PB DO GENE HLA-G. NESTE CASO, AS COLUNAS 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 E 11 SÃO HETEROZIGOTOS (INSERÇÃO E DELEÇÃO DE 14 PB), E AS COLUNAS 5, 6 E 10 SÃO HOMOZIGOTOS PARA A INSERÇÃO DE 14 PB.

O produto de cada reação foi avaliado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 7%, corado por impregnação pela prata. Somente as reações que apresentaram padrão de amplificação adequado seguiram as etapas posteriores (**Figura 8**). O gel foi preparado misturando-se o glicerol, água, solução de bis-acrilamida e o TBE (Tris borato EDTA) (10X), formando uma mistura de gel previamente preparada e armazenada. Os catalisadores da reação de polimerização, TEMED (Tetrametiletilenodiamino) e persulfato de potássio foram adicionados à mistura de gel imediatamente antes de vertê-la em um cassete montado, composto de duas placas de vidro de tamanho 14 cm x 16,5 cm, separadas por espaçadores de *teflon* e presas com grampos. Logo após, um pente de *teflon* era colocado na borda superior, formando poços no gel, aonde posteriormente foram aplicadas as amostras de DNA amplificado por PCR. Aguardou-se a polimerização por no mínimo 20 minutos.

Após a polimerização do gel, o pente foi retirado e os poços foram lavados com água. O gel polimerizado foi montado em cuba de eletroforese vertical, contendo tampão TBE (1X) em ambos os polos (porção inferior e superior). Em seguida, 6 μ L do produto da amplificação, misturados com 4 μ L do marcador de corrida foram aplicados diretamente no gel. A cuba foi então conectada a uma fonte de voltagem, por aproximadamente uma hora e meia a 250V. Com o término da corrida eletroforética, o gel era cuidadosamente retirado das placas de vidro e submetido aos procedimentos de coloração e secagem.

Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores, o gel era colocado em recipiente de vidro contendo 100 mL de solução fixadora por aproximadamente três minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução de nitrato de prata, e agitou-se por cinco minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado com água quente por cerca de dez segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água. Um total de 100 mL de solução reveladora era pré-aquecida em microondas a 65°C para facilitar a reação de coloração, e então, era despejada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. Após, a solução reveladora foi descartada e a reação foi bloqueada com lavagem direta do gel em 100 mL de solução fixadora.

Reagentes e soluções:

- **Solução fixadora:** 166,67 mL de álcool etílico; 6,67 mL de ácido acético glacial e 826,66 mL de água (volume final: 1 L).
- **Solução reveladora:** 22,5g de NaOH; 1 L de água. Adicionar 1 mL de formaldeído para cada 100 mL de solução reveladora, somente no momento do uso (volume final 1 L).
- **Solução de nitrato de prata:** 10g de Nitrato de prata; 100 mL de água. Armazenar em tubo de vidro escuro coberto com papel alumínio para evitar contato com a luz (volume final 100 mL).

4.4. Sequenciamento da região 3' UTR do *HLA-G*

Cada produto de amplificação foi diretamente sequenciado com o iniciador HLAG8R – GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT, em sequenciador automático ABI PRISM® 310 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, Foster City – CA, EUA), usando BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing kit (Applied Biosystems). A cada microtubo de 0,2 mL, devidamente identificado, foram acrescentados 5,5 uL de água, 1,5 uL de tampão BigDye®, 0,5 uL do iniciador HLA-G8R e 1 uL de BigDye® por amostra. O perfil de ciclagem utilizado foi constituído por 1 ciclo de 96°C por 10 segundos, seguido por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos e 1 ciclo de 4°C indefinidamente. Após a reação de sequenciamento, todo o conteúdo, cerca de 10 µL, foi transferido para um microtubo

de volume 1,5 mL e a este acrescentou-se 60 µL de isopropanol 100% e 5 µL de EDTA 2,5 mM pH=8. Posteriormente, essa mistura foi deixada em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Passados 15 minutos, centrifugou-se o amplificado por 20 minutos a 900g, e descartou-se o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 60 µL de etanol 75% e centrifugou-se por cinco minutos a 900g. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante. Os microtubos foram então centrifugados à vácuo por cerca de 20 minutos até a sua secagem total. Foram estudados os nove polimorfismos já descritos para a região 3' não traduzida do gene HLA-G (14pb Del/Ins, +3001C C/T +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035C/T, +3142 C/G + 3187 A/G e + 3196 C/G) (CASTELLI et al., 2010). A leitura e alinhamento do sequenciamento foram feitos pelo programa Lasergene SeqMan 7,0 (DNASTAR, Madison, WI) (**Figura 9**).

FIGURA 9: CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DE SEQUENCIAMENTO DIRETO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO. NESTE EXEMPLO, ILUSTRAMOS O SÍTIO 14 PB D/I, ONDE O INDIVÍDUO “A” APRESENTA O GENÓTIPO 14 PB II, O “B” APRESENTA O GENÓTIPO 14 PB ID E O “C” APRESENTA O GENÓTIPO 14 PB DD.

4.5. Análises Estatísticas

4.5.1. Estimativas das frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas (x_i) e genotípicas (X_i), para cada *locus* nas quatro populações de estudo (grupos: asma total, asma leve ou moderada, asma grave e controle), foram estimadas no Microsoft Excel® por contagem direta, seguindo as equações abaixo:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad \text{e} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Em que:

- x_i é a frequência do alelo “i”;
- X_{ii} é a frequência do genótipo “ii”;
- n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente. n corresponde a amostra populacional.

4.5.2. Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

Em que:

- x_i^2 é a frequência esperada dos homozigotos do alelo i;
- $2 x_i x_j$ é a frequência esperada do heterozigoto ij;
- $2x_j^2$ é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo j.

A aderências de proporções genotípicas as expectativas teóricas de Hardy-Weinberg (HWE) para cada *locus* foram estimadas pelo teste exato de Guo e Thompson usando o software ARLEQUIN 3.5.1.2 (LEVENE, 1949; GUO & THOMPSON, 1992; EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

4.5.3. Desequilíbrio de ligação entre os loci

O software ARLEQUIN 3.5.1.2 também foi utilizado para avaliar o desequilíbrio de ligação (do inglês *Linkage Disequilibrium*, LD) entre cada par de *loci* para cada grupo (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Esta análise foi aplicada para

verificar a associação não aleatória de alelos em diferentes *loci*. Os *loci* apresentando um $P \leq 0,05$ indicam desequilíbrio de ligação entre eles (LD positivo).

4.5.4. Reconstrução de haplótipos

Dado o LD positivo, mas com fase gamética desconhecida, os haplótipos para cada indivíduo foram reconstruídos para cada grupo de pacientes e de controle. Para tal, foram utilizados dois métodos computacionais distintos: primeiro, o algoritmo EM (EXCLOFFIER & SLATKIN, 1995) implementado com o software PL-EM (QIN *et al* 2002), em segundo, um método baseado em coalescência implementado no software PHASE v2 (STEPHENS *et al.*, 2001). Um script Perl chamado HaploRunner (disponível em www.castelli-lab.net, último acesso 23 de agosto de 2015) foi usado para auxiliar a inferência computacional dos haplótipos e comparar os resultados entre os dois métodos, o PHASE e o PL-EM. O script realizou 10 corridas para ambos PHASE e PL-EM, e a seguinte configuração foi utilizada: para o PHASE, o número de interações (*interactions*) foi definido para 1000, ajuste do intervalo (*thinning interval*) a 1, e o valor do *burn-in* definido para 100; para PL-EM, os parâmetros utilizados foram para o valor *Top* definido para zero, o valor *Pair size* (tamanho do par) definido para 2, o *buffer* definido para 118 para os pacientes asmáticos e 183 para os indivíduos saudáveis, e o valor do *Round* definido para 200 (SANTOS *et al.*, 2013).

A frequência haplotípica intrapopulacional para cada grupo de pacientes e controle foi estimado por contagem direta no Microsoft Excel®, obtida dividindo-se o número de haplótipos em questão pela amostra populacional. Somente os haplótipos inferidos igualmente por ambos os métodos (PHASE e PL-EM) e apresentando frequência maior que 2% foram utilizados nas análises comparativas.

4.5.5. Teste exato de Fisher para identificação de frequências significativamente distintas

Para identificação de frequências significativamente distintas entre os grupos estudados, comparamos a frequência de cada alelo, genótipo, ou haplótipos entre os pacientes e os controles através da construção de tabelas de contingência 2x2. Os p-valores (P) foram calculados pelo teste exato de Fisher, com o software GraphPad

Prism 5.0, que também foi utilizado para estimar o *odds ratio* (OR) e o Intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para todas as análises, foram considerados significativos os valores de P a um nível de significância de 0,05 ($\alpha=0,05$). A correção do p-valor (P_c) foi feita pelo procedimento de Bonferroni, o qual nível de significância para os genótipos foi corrigido para $P_c<0,0019$, para os alelos $P_c<0,0056$ e para os haplótipos $P_c<0,0063$, segundo a equação abaixo:

$$P_{\text{corrigido}} = \frac{\alpha}{n}$$

Em que:

- α é o nível de significância estipulado (0,05);
- n é o total de genótipos (27), alelos (9) ou haplótipos (8) analisados.

Dado um p-valor significativo, o *odds ratio* (OR) foi a medida utilizada como fator de associação (razão de chance ao desenvolvimento ou não) a asma brônquica e as diferentes formas da doença. Dessa forma, um genótipo, alelo ou haplótipo apresentando um $OR>1,0$ confere susceptibilidade e um $OR<1,0$ confere proteção a um determinado desfecho (WAGNER, 1998).

Resultados

---

5. RESULTADOS

Nove sítios polimórficos do gene *HLA-G* foram observados: a presença ou ausência do fragmento de 14 pares de bases (I/D) (rs66554220) e os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nas posições +3001 C/T (rs não disponível), +3003 T/C (rs115689421), +3010 C/G (rs116152775), + 3027 A/C (rs115810666), +3035 C/T (rs115100128), +3142 G/C (rs115928989), +3187 A/G (rs114317070) e +3196 C/G (rs115045214). A partir disso, foram feitas as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg, das frequências genotípicas e alélicas, do desequilíbrio de ligação e, finalmente, a reconstrução de todos os haplótipos englobando todos os sítios polimórficos citados acima.

5.1. Análise das frequências genotípicas e alélicas para os sítios polimórficos da 3' UTR do *HLA-G*

As análises revelaram que a maioria dos polimorfismos estudados aderiu às expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (pHWE), (**Tabela 5**), exceto o 14pb I/D no grupo controle, +3010 G/C em pacientes asmáticos (grupos: asma total e asma leve/moderada) e +3142 G/C no grupo de pacientes com asma leve ou moderada, exibindo déficit de heterozigose (todos *loci* em negrito na Tabela 5). Esse teste não foi realizado no +3001 C/G no grupo controle por se tratar de sítio monomórfico, com total homozigose para o alelo +3001C.

Quanto às frequências genotípicas e alélicas para os nove sítios polimórficos estudados, o alelo +3001 T esteve ausente nos indivíduos saudáveis e em todos os pacientes asmáticos, já o genótipo +3003 CC não foi observado no grupo controle. O genótipo +3027 AA não foi observado nos pacientes asmáticos e o genótipo +3035 TT estava ausente no grupo com asma leve ou moderada. As frequências de todos os alelos e genótipos dos grupos estudados são mostradas na **Tabela 5**.

TABELA 5: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SÍTIOS POLIMÓRFICOS NA REGIÃO 3 'NÃO TRADUZIDA (3'UTR) DO GENE *HLA-G* EM PACIENTES ASMÁTICOS ESTRATIFICADOS DE ACORDO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.

Sítios Polimórficos	Grupos							
	AT		AG		ALM		C	
	N=118	FR	N=66	FR	N=52	FR	N=236	FR
14 PB								
DD	35	0,2966	22	0,3333	13	0,2500	96	0,4068
ID	68	0,5763	38	0,5758	30	0,5769	91	0,3856
II	15	0,1271	6	0,0909	9	0,1731	49	0,2076
Alelo D	138	0,5847	82	0,6212	56	0,5385	283	0,5996
Alelo I	98	0,4153	50	0,3788	48	0,4615	189	0,4004
PHWE		0,0595		0,1156		0,4003		0,0027
+3001								
CC	116	0,9831	65	0,9848	51	0,9808	236	1,0000
CT	2	0,0169	1	0,0152	1	0,0192	0	0,0000
TT	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000
Alelo C	234	0,9915	131	0,9924	103	0,9904	472	1,0000
Alelo T	2	0,0085	1	0,0076	1	0,0096	0	0,0000
PHWE		1,0000		1,0000		1,0000		*
+3003								
CC	3	0,0254	2	0,0303	1	0,0192	0	0,0000
CT	17	0,1441	12	0,1818	5	0,0962	53	0,2246
TT	98	0,8305	52	0,7879	46	0,8846	183	0,7754
Alelo C	23	0,0975	16	0,1212	7	0,0673	53	0,1123
Alelo T	213	0,9025	116	0,8788	97	0,9327	419	0,8877
PHWE		0,7592		0,2246		0,1934		0,0522
+3010**								
CC	43	0,3644	16	0,2424	27	0,5192	73	0,3106
CG	41	0,3475	25	0,3788	16	0,3077	106	0,4511
GG	34	0,2881	25	0,3788	9	0,1731	56	0,2383
Alelo C	127	0,5381	57	0,4318	70	0,6731	252	0,5362
Alelo G	109	0,4619	75	0,5682	34	0,3269	218	0,4638
PHWE		0,0015		0,0794		0,0316		0,1511
+3027								
AA	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0042
AC	6	0,0508	3	0,0455	3	0,0577	25	0,1059
CC	112	0,9492	63	0,9545	49	0,9423	210	0,8898
Alelo A	6	0,0254	3	0,0227	3	0,0288	27	0,0572
Alelo C	230	0,9746	129	0,9773	101	0,9712	445	0,9428
PHWE		1,0000		1,0000		1,0000		0,5441
+3035								
CC	85	0,7203	49	0,7424	36	0,6923	173	0,7331
CT	32	0,2712	16	0,2424	16	0,3077	57	0,2415
TT	1	0,0085	1	0,0152	0	0,0000	6	0,0254

Continuação tabela 5

Sítios Polimórficos	Grupos							
	AT		AG		ALM		C	
	N=118	FR	N=66	FR	N=52	FR	N=236	FR
+3035								
Alelo C	202	0,8559	114	0,8636	88	0,8462	403	0,8538
Alelo T	34	0,1441	18	0,1364	16	0,1538	69	0,1462
PHWE		0,4606		1,0000		0,5852		0,6025
+3142								
CC	24	0,2034	12	0,1818	12	0,2308	51	0,2161
CG	55	0,4661	38	0,5758	17	0,3269	112	0,4746
GG	39	0,3305	16	0,2424	23	0,4423	73	0,3093
Alelo C	103	0,4364	62	0,4697	41	0,3942	214	0,4534
Alelo G	133	0,5636	70	0,5303	63	0,6058	258	0,5466
PHWE		0,5778		0,3206		0,0230		0,5138
+3187								
AA	67	0,5678	34	0,5152	33	0,6346	121	0,5127
AG	45	0,3814	31	0,4697	14	0,2692	100	0,4237
GG	6	0,0508	1	0,0152	5	0,0962	15	0,0636
Alelo A	179	0,7585	99	0,7500	80	0,7692	342	0,7246
Alelo G	57	0,2415	33	0,2500	24	0,2308	130	0,2754
PHWE		0,8045		0,0520		0,1095		0,4146
+3196***								
CC	59	0,5000	35	0,5303	24	0,4615	107	0,5815
CG	52	0,4407	27	0,4091	25	0,4808	64	0,3478
GG	7	0,0593	4	0,0606	3	0,0577	13	0,0707
Alelo C	170	0,7203	97	0,7348	73	0,7019	278	0,7554
Alelo G	66	0,2797	35	0,2652	31	0,2981	90	0,2446
PHWE		0,3688		1,0000		0,5033		0,4275

Grupos: AT: Grupo total de pacientes com asma; AG: Asma Grave; ALM: Asma Leve ou Moderada; C: Controles.
 HLA-G: Antígeno Leucocitário Humano; FR: Frequência *p*HW: Probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg; 14 pb I/D: 14 pb inserção/deleção;

*Teste não realizado por se tratar de um *locus* monomórfico;

** *locus* não anotado em 01 indivíduo saudável;

*** *locus* não anotado para 52 indivíduos saudáveis.

Para avaliar se os genótipos e alelos estudados estavam associados com a gravidade da asma, aplicamos o teste exato de Fisher e comparamos as frequências genotípicas e alélicas entre os grupos de asmáticos estratificados segundo a gravidade da doença e o grupo de indivíduos saudáveis e, também, realizamos essa comparação entre os pacientes com asma leve ou moderada, confrontando-os com pacientes apresentando asma grave (**Tabela 6**).

Nossos dados mostraram diferenças significantes nas frequências genotípicas e alélicas na maioria dos sítios polimórficos da região 3'UTR do *HLA-G* (14 pb I/D, +3001 T/C, +3003 T/C, +3010 C/G, +3035 G/C, +3142 G/C, +3187 A/G e +3196

G/C), com exceção do *locus* +3027 A/C. Quanto ao polimorfismo de 14 pares de base I/D, a frequência do genótipo 14 pb DI estava aumentada em todos os grupos de pacientes asmáticos analisados: asma total ($P=0,001$, OR= 2,167), asma grave ($P=0,0073$, OR= 2,162) e asma leve e moderada ($P=0,0132$, OR= 2,173) quando comparado com o controle. O genótipo 14 pb DD foi menos frequente nos pacientes asmáticos com a forma leve ou moderada da doença ($P=0,0401$, OR=0,4861) e no grupo total de pacientes ($P=0,0475$, OR: 0,6150) em comparação com o grupo de indivíduos saudáveis. Por outro lado, o homozigoto 14 pb II foi menos representado nos pacientes com asma grave *versus* controles ($P=0,0306$, OR=0,3816). Após a correção de Bonferroni, apenas o genótipo 14 pb DI permaneceu significativo, com um $P_c<0,0019$, o qual se mostrou associado ao desenvolvimento da asma brônquica.

No sítio polimórfico +3001 C/T, o alelo +3001 C foi o mais frequente em todos os grupos de pacientes *versus* grupo controle: asma total ($P<0,0001$, OR=88640,0) e asma grave ($P<0,0001$, OR=82850,0) e asma leve ($P<0,0001$, OR=65210,0). Em contraste, o alelo +3001 T foi menos representado em todos os grupos de pacientes asmáticos ($P<0,0001$ e OR=0,00001128 para asma total, $P<0,0001$ e OR=0,00001207 para asma grave e $P<0,0001$ e OR=0,00001534 para asma leve ou moderada, respectivamente). A associação dos genótipos do sítio +3001 C/T com as diferentes formas de gravidade da asma brônquica foi confirmada após aplicação da correção de Bonferroni ($P_c<0,0019$).

Em relação ao sítio polimórfico +3003 C/T, após comparar os indivíduos saudáveis, observamos maior frequência do homozigoto +3003 CC nos pacientes asmáticos com a forma grave da doença ($P=0,0472$, OR=18,33) e no grupo total de asmáticos ($P=0,0364$, OR=14,33). O heterozigoto +3003 CT foi significativo apenas no grupo de asmáticos com a forma leve ou moderada da doença, sendo menos representado nestes pacientes em relação aos indivíduos saudáveis ($P=0,0366$, OR=0,3673). O alelo +3003 T está associado ao desenvolvimento da asma brônquica, ao se comparar o grupo de asma total com os indivíduos saudáveis ($P<0,0001$, OR=73,21), mas quando estratificamos os pacientes segundo a gravidade da doença, este alelo foi mais frequente tanto nos pacientes com asma leve ou moderada ($P<0,0001$, OR=109,5) quanto nos asmáticos com a forma grave ($P<0,0001$, OR=57,32). Em oposição, o alelo +3003 C apresentou menor frequência nestas mesmas comparações do que o alelo +3003 T (**Tabela 5 e 6**). O valor

significativo destes alelos permaneceu após a correção de Bonferroni, demonstrando a associação existente entre os alelos do sítio +3003 C/T e a asma brônquica.

TABELA 6: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA (3'UTR) DO GENE *HLA-G*. SOMENTE OS SÍTIOS POLIMÓRFICOS COM SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA SÃO MOSTRADOS.

Genótipos e alelos	Comparações	P-valor	OR	IC 95%
14 pb ID	AG <i>versus</i> C	0,0073	2,162	1,242 - 3,764
	ALM <i>versus</i> C	0,0132	2,173	1,181 - 3,997
	AT <i>versus</i> C	<0,0001*	2,167	1,382 - 3,397
14 pb DD	ALM <i>versus</i> C	0,0401	0,4861	0,2464 - 0,9590
	AT <i>versus</i> C	0,0475	0,6150	0,3833 - 0,9868
14 pb II	AG <i>versus</i> C	0,0306	0,3816	0,1557 - 0,9353
+3001 C	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	82850	3353 – 2047000
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	65210	2636 – 1613000
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	88640	4235 – 1855000
+3001 T	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	0,00001207	0,0000004885 - 0,0002983
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	0,00001534	0,0000006199 - 0,0003794
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	0,00001128	0,0000005390 - 0,0002361
+3003 CC	AG <i>versus</i> C	0,0472	18,33	0,8686 - 387,0
	AT <i>versus</i> C	0,0364	14,33	0,7337 - 280,0
+3003 CT	ALM <i>versus</i> C	0,3660	0,3673	0,1390 - 0,9705
+3003 C	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	0,01745	0,009615 - 0,03166
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	0,009128	0,004025 - 0,02070
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	0,01366	0,008148 - 0,02290
+3003 T	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	57,32	31,59 - 104,0
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	109,5	48,31 - 248,4
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	73,21	43,68 - 122,7
+3010 CC	ALM <i>versus</i> C	0,0060	2,397	1,302 - 4,412
	AG <i>versus</i> ALM	0,0022	0,2963	0,1354 - 0,6483
+3010 GG	AG <i>versus</i> C	0,0280	1,949	1,090 - 3,485
	AG <i>versus</i> ALM	0,0153	2,913	1,216 - 6,982
+3010 C	AG <i>versus</i> C	0,0388	0,6605	0,4475 - 0,9747
	ALM <i>versus</i> C	0,0119	1,789	1,143 - 2,801
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	1,854	1,373 - 2,504
	AG <i>versus</i> ALM	0,0002**	0,3691	0,2161 - 0,6305
+3010 G	AG <i>versus</i> C	0,0388	1,514	1,026 - 2,234
	ALM <i>versus</i> C	0,0119	0,5589	0,3571 - 0,8748
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	1,713	1,265 - 2,319
	AG <i>versus</i> ALM	0,0002**	2,709	1,586 - 4,627
+3035C	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	36,99	21,15 - 64,69
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	32,12	17,79 - 58,00

Continuação tabela 6

Genótipos e alelos	Comparações	P-valor	OR	IC 95%
+3035 C	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	34,70	22,25 - 54,11
+3035 G	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	0,02703	0,01546 - 0,04727
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	0,03113	0,01724 - 0,05621
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	0,02882	0,01848 - 0,04493
+3142 CG	AG <i>versus</i> ALM	0,0093	2,794	1,310 - 5,962
+3142 GG	AG <i>versus</i> ALM	0,0300	0,4035	0,1840 - 0,8849
+3142 G	ALM <i>versus</i> C	0,0065**	0,5398	0,3501 - 0,8324
	AT <i>versus</i> C	0,0067**	0,6424	0,4689 - 0,8800
+3142 C	ALM <i>versus</i> C	0,0065**	1,853	1,201 - 2,857
	AT <i>versus</i> C	0,0067**	1,557	1,136 - 2,133
+3187 AG	ALM <i>versus</i> C	0,0425	0,5011	0,2577 - 0,9744
	AG <i>versus</i> ALM	0,0355	2,404	1,101 - 5,248
+3196 C	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	8,561	5,438 - 13,48
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	7,274	4,488 - 11,79
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	7,956	5,492 - 11,53
+3196 G	AG <i>versus</i> C	<0,0001**	0,1168	0,07420 - 0,1839
	ALM <i>versus</i> C	<0,0001**	0,1375	0,08483 - 0,2228
	AT <i>versus</i> C	<0,0001**	0,1257	0,08676 - 0,1821

HLA-G: Antígeno Leucocitário Humano;

Grupos: AT: Grupo Total de pacientes com asma; AG: Asma Grave; ALM: Asma Leve ou Moderada; C: Controles.

Valor significativo $p \leq 0,05$; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança em 95%;P-valor corrigido (Bonferroni): * $P < 0,0019$ para genótipos e ** $P < 0,0056$ para alelos.

Quando analisamos as diferenças significativas no SNP +3010 G/C após comparação com o grupo de indivíduos saudáveis observamos: (1) o homozigoto +3010 GG foi menos representado em pacientes asmáticos com doença grave em relação ao grupo controle ($P=0,0280$, $OR=1,949$), mas quando confrontado com o grupo de asmáticos com doença leve ou moderada, este está menos representado no segundo grupo ($P=0,0153$, $OR=2,913$); (2) o homozigoto +3010 CC estava aumentado no grupo de asmáticos com a forma leve ou moderada da doença, quando comparado ao grupo controle ($P=0,006$, $OR=2,397$) e ao grupo de asmáticos graves ($P=0,0022$, $OR=0,2963$), mostrando que é um genótipo susceptível à asma leve ou moderada e, ao mesmo tempo, protetor ao desenvolvimento da forma grave da doença, respectivamente; (3) a frequência do alelo +3010 G está aumentada no grupo de pacientes apresentando a forma grave da doença após a comparação com os controles ($P=0,0388$, $OR=1,514$) e com o grupo de asma leve ou moderada ($P=0,0002$, $OR=2,709$). Este alelo também está mais representado no grupo total de pacientes asmáticos *versus* grupo controle ($P < 0,0001$, $OR=1,713$). Além disso, o alelo +3010 G se encontra menos representado confrontando o grupo de asmáticos

com asma leve e moderado com os indivíduos saudáveis ($P=0,0119$, $OR=0,5589$). Consequentemente, o alelo +3010 C foi menos frequente no grupo com asma grave quando comparado com os grupos controle ($P=0,0388$, $OR=0,6605$) e asmáticos leve ou moderado ($P=0,0002$, $OR=0,3691$) e, também, esteve diminuído no grupo total asmáticos *versus* grupo controle ($P<0,0001$, $OR=1,854$), e mais frequente nos pacientes com asma leve ou moderada *versus* o grupo controle saudável ($P=0,0119$, $OR=1,789$).

No SNP +3035 C/T, em comparação com os indivíduos saudáveis, o alelo +3035 T teve sua frequência aumentada tanto no grupo total de pacientes asmáticos ($P<0,0001$, $OR=34,70$) quanto nos grupos de pacientes com a forma leve ou moderada ($P<0,0001$, $OR=32,12$) e grave ($P<0,0001$, $OR=36,99$), o qual, posteriormente, continuou significativo com a correção de Bonferroni ($P_c<0,0056$). Em relação ao sítio +3142 G/C, que já foi previamente associado com o controle da expressão do HLA-G, ao comparar grupo controle com os demais grupos, observamos aumento na frequência do alelo +3142 G no grupo total de pacientes asmáticos ($P=0,0067$, $OR=1,557$) e nos pacientes com a forma leve ou moderada da doença ($P=0,0065$, $OR=1,853$). E, como já esperado, o alelo +3142 C é o oposto dos achados para o alelo +3142 G, apresentando menor frequência no grupo total de pacientes ($P=0,0067$, $OR=0,6424$) e em asmáticos leves ou moderados ($P=0,0065$, $OR=0,5398$) em relação aos indivíduos saudáveis. O heterozigoto +3142 GC foi mais frequente no grupo de pacientes com asma grave do que os asmáticos com asma leve ou moderada ($P=0,0093$, $OR=2,794$), já o homozigoto +3142 GG foi menos representado nos pacientes com asma grave após tal comparação ($P=0,0300$, $OR=0,4035$).

No sítio +3187A/G apenas um genótipo se mostrou significativo, o heterozigoto +3187 AG, com baixa frequência nos pacientes com asma leve ou moderada em relação aos indivíduos saudáveis ($P=0,0425$, $OR=0,5011$) e pacientes com asma grave ($P=0,0355$, $OR=2,404$). Por fim, quanto ao SNP +3196 C/G, o alelo +3196 C está mais representado tanto no grupo total de pacientes asmáticos ($P<0,0001$, $OR=7,956$) quanto os grupos estratificados segundo a gravidade da doença, asma leve ou moderada ($P<0,0001$, $OR=7,274$) e asma grave ($P<0,0001$, $OR=8,561$) em comparação com os indivíduos saudáveis. Consequentemente, o alelo +3196 G demonstrou frequência oposta ao alelo +3196 C para tais grupos. Ambos os alelos apresentaram significância após aplicar a correção de Bonferroni ($P_c<0,0056$) para os grupos analisados (**Tabela 5 e 6**).

5.2. Análise das frequências haplotípicas da 3'UTR do gene *HLA-G*

Afim de analisar a probabilidade de segregação entre os sítios polimórficos, foi feito um teste para avaliar o desequilíbrio de ligação (LD). Considerando-se que a maioria dos polimorfismos estudados da 3'UTR estavam em desequilíbrio de ligação entre cada par de *loci*, ou seja, apresentam LD positivo ($P \leq 0,05$) (**Ver apêndice**), é possível a aplicação do processo de inferência haplotípica por métodos computacionais (ver metodologia). A inferência dos haplótipos foi igualmente inferida por dez corridas individuais do PHASE e PL-EM em 116 das 118 amostras (98,3%) de pacientes, com uma probabilidade média de 0,9825 (PHASE) e 1,0 (PL-EM). Duas amostras de pacientes asmáticos apresentaram pares de haplótipos inferidos de maneira não consensual pelo PHASE e PL-EM e, portanto, foram excluídas das análises estatísticas restantes. Em relação aos indivíduos saudáveis, todos os pares de haplótipos foram igualmente inferidos pelo PHASE com probabilidade média de 1,0. Assim, 116 amostras de asmáticos juntamente com os 236 indivíduos controles foram consideradas para posterior análise de haplótipos.

Um haplótipo corresponde a uma combinação de um grupo de alelos dos sítios polimórficos estudados e, no caso da região 3'UTR do *HLA-G*, vinte diferentes haplótipos foram observados na amostra total de pacientes, dos quais oito haplótipos apresentando frequência maior ou igual a 2% na população de estudo são mostrados nas análises comparativas. A nomeação destes haplótipos obedeceu a nomenclatura proposta por CASTELLI *et al.* (2010). Os oito haplótipos estão descritos na **Tabela 7** bem como as frequências entre os grupos estudados e os resultados das comparações com diferença estatística.

A análise dos haplótipos resultantes mostrou maior frequência do haplótipo UTR-8 (14 pb I/+3001 C/+3003 T/+3010 G/+3027 C/+3035 C/+3142 G/+3187 A/+3196 G) em pacientes apresentando asma grave ($P=0,0019$, OR=6,125) e no grupo de asmáticos totais ($P=0,0187$, OR=3,770) em comparação com os indivíduos saudáveis, o qual foi confirmado posteriormente pela correção de Bonferroni ($P_c < 0,0062$) para o grupo de asmáticos graves *versus* controles. A UTR-7 foi menos representada no grupo de asmáticos totais ao comparar com os indivíduos saudáveis ($P=0,0496$, OR=0,3778). O haplótipo significativamente estatístico para os pacientes com a forma grave apresentou o alelo +3010 G que foi associado com a gravidade da asma conforme mostrado na **Tabela 6**.

TABELA 7: FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS EM PACIENTES ASMÁTICOS ESTRATIFICADOS DE ACORDO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA E EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (CONTROLE).

Haplótipos	Sequência 3'UTR <i>HLA-G</i>									Grupos							
	14 pb	+3001	+3003	+3010	+3027	+3035	+3142	+3187	+3196	AT		AG		ALM		C	
	D/I	C/T	T/C	C/G	A/C	C/T	G/C	A/G	C/G	2n=232	FR	2n=130	FR	2n=102	FR	2n=472	FR
UTR-1	Del	C	T	G	C	C	C	G	C	54	0,2328	33	0,2538	21	0,2059	130	0,2754
UTR-2	Ins	C	T	C	C	C	G	A	G	49	0,2112	23	0,1769	26	0,2549	115	0,2436
UTR-3	Del	C	T	C	C	C	G	A	C	34	0,1466	15	0,1154	19	0,1863	69	0,1462
UTR-4	Del	C	C	G	C	C	C	A	C	23	0,0991	16	0,1231	7	0,0686	53	0,1123
UTR-5	Ins	C	T	C	C	T	G	A	C	19	0,0819	10	0,0769	09	0,0882	42	0,0890
UTR-6	Del	C	T	G	C	C	C	A	C	14	0,0603	10	0,0769	04	0,0392	31	0,0657
UTR-7	Ins	C	T	C	A	T	G	A	C	05	0,0216 ²	03	0,0231	02	0,0196	26	0,0551 ²
UTR-8	Ins	C	T	G	C	C	G	A	G	09	0,0388 ²	08	0,0615 ²	01	0,0098	05	0,0106 ²
Haplótipos raros¹										25	0,1078	12	0,0923	13	0,1275	0	0,0000

HLA-G: Antígeno Leucocitário Humano; Grupos: AT: Total asmáticos; AG: Asma Grave; AM: Asma Leve ou Moderada; C: Controles.

FR: frequência

¹Haplótipos com frequência menor que 2% nas amostras populacionais.

²Haplótipos estatisticamente significativos após comparações entre os grupos, como mostrado abaixo:

UTR-8 -> AG *versus* C: $P=0,0019^3$, OR=6,125, IC 95%=1,968 -19,06;

AT *versus* C: $P=0,0187$ 3,770, OR=1,248-11,38.

UTR-7-> AT *versus* C: $P=0,0496$, OR=0,3778, IC 95%:0,1431-0,9973.

Valor significativo $p \leq 0,05$; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confiança em 95%;

³ P -valor corrigido (Bonferroni): $P < 0,0063$ para haplótipo.

Discussão

---

6. DISCUSSÃO

HLA-G é uma molécula não clássica do MHC caracterizada por baixo polimorfismo, distribuição tecidual limitada e presença de isorformas acopladas a membrana e solúveis originadas pela edição alternativa do transcrito primário, as quais interagem com receptores leucocitários, acarretando efeitos inibitórios em diversas células do sistema imune. Essa modulação está relacionada, principalmente, com a tolerância materno-fetal, protegendo o feto do sistema imunológico da mãe evitando o reconhecimento de aloantígenos paternos.

Fora do contexto da gravidez, HLA-G é bem reconhecida como molécula tolerogênicas, podendo exercer efeitos benéficos ou maléficos, dependendo da situação clínica subjacente. Assim, em processo não fisiológico, a não produção da proteína HLA-G ou redução da sua expressão, por meio de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, podem modular a inflamação decorrente de processos imunológicos ou não. De fato, a expressão do HLA-G pode ser benéfica em transplantes e em doenças autoimunes, diminuindo a ação das células do sistema imune, mas torna-se maléfica nos cânceres e nas infecções virais, devido à supressão da resposta imune (CAROSELLA, *et al.* 2008; DONADI, *et al.* 2011). No entanto, o papel do HLA-G na asma brônquica ainda é pouco estudado. Em adultos com asma brônquica, a molécula já foi detectada no fluido broncoalveolar (WHITE *et al.*, 2010; NICODEMIS-JOHNSON *et al.*, 2013) e, também, em células epiteliais brônquicas *in vitro* (WHITE *et al.*, 2013). Ainda, a molécula foi detectada no plasma e soro de crianças (TAHAN & PATIROGLU, 2006; CIPRANDI *et al.*, 2010) e adultos com asma brônquica atópica (CIPRANDI *et al.*, 2014).

O gene do *HLA-G* apresenta regiões regulatórias contendo diversos sítios polimórficos, potencialmente, relacionados com a capacidade de produção dessa molécula imunossupressora que poderiam contribuir para a susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da asma, ou ainda, para a gravidade da doença. De fato, os polimorfismos de uma determinada região regulatória do gene *HLA-G*, a região 3' não traduzida (3'UTR), tem sido extensivamente analisados em várias doenças como doenças autoimunes (LUCENA-SILVA *et al.*, 2013), transplante (PIANCATELLI *et al.*, 2009; CILIAO ALVES *et al.*, 2012; DI CRISTOFARO *et al.*, 2015), infecções virais (SEGAT *et al.*, 2009; CORDERO *et al.*, 2009; HADDAD *et al.*, 2011), distúrbios parasitários (GARCIA *et al.*, 2013) e câncer (GHANDRI *et al.*, 2011), (LAU *et al.*, 2011), mas a associação da asma brônquica com estes

polimorfismos foi pouco explorada. Então, neste estudo, avaliamos os sítios polimórficos da 3'UTR do *HLA-G*, associando-os com a asma brônquica e com a gravidade da doença.

A decisão acerca do estudo dessa região gênica embasou-se em estudo prévio, avaliando todo o genoma de crianças nascidas de mães com asma, relatando a presença de região gênica no MHC (cromossoma 6p21) próxima ao *HLA-G* que conferia susceptibilidade à asma brônquica (NICOLAE *et al.*, 2005). Considerando que: i) ocorre inflamação importante nas vias aéreas de pacientes com asma brônquica, ii) pacientes com asma brônquica leve/moderada podem apresentar mecanismos patogênicos distintos (predomínio polarização para perfil Th2) daqueles pacientes apresentando asma grave (polarização adicional para Th1 e Th17); iii) *HLA-G* modula as respostas inflamatórias, mediadas por diversos tipos de células do sistema imune, avaliamos os sítios polimórficos da 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com asma estratificados segundo diversos parâmetros clínicos e laboratoriais.

Em relação ao *locus* 14 pares de base (pb) Inserção/Deleção (I/D), os nossos resultados demonstraram que o genótipo 14 pb DI está associado com susceptibilidade à asma como vimos após comparação do grupo total de pacientes asmáticos com os indivíduos saudáveis ($P=0,001$, $OR=2,167$), mas não foram observadas diferenças quando os pacientes foram estratificados de acordo com a gravidade da doença. Este genótipo está aumentado tanto na forma grave ($P=0,0073$, $OR=2,162$) quanto nas formas leve ou moderada ($P=0,0132$, $OR=2,173$). Tal fenômeno também é observado para outros *loci* da 3'UTR e seus alelos, como os alelos +3001 C, +3003 T, +3035 C e +3196 C, os quais apresentaram frequências elevadas nos três grupos de pacientes analisados: total, asma leve/moderada e asma grave.

Ainda acerca do sítio 14 pb, o genótipo 14 pb DD apresentou frequência reduzida nos pacientes com asma, quando o grupo foi considerado como um todo ($P=0,0475$, $OR=0,6150$) e também naqueles pacientes estratificados como asma leve ou moderada ($P=0,0401$, $OR=0,4861$) em comparação com o grupo controle. Posto que a frequência desse alelo em pacientes apresentando as formas leve ou moderada está diminuído em relação aos indivíduos saudáveis, podemos inferir que o genótipo confere proteção contra o desenvolvimento da forma leve/moderada da doença. Já o homozigoto 14 pb II, conferiu resistência a forma grave da asma, com baixa frequência em pacientes com asma grave em relação ao grupo controle

($P=0,0306$, $OR=0,3816$). Esse genótipo está associado com menor expressão da molécula e níveis mais baixos de HLA-G solúvel (sHLA-G), por possuir os alelos *HLA-G* que apresentam a sequência de 14 pb no éxon 8, via mecanismos transcricionais, ao contrário do 14 pb DD que não possui tal alelo (HIIVD *et al.*, 2003; HIIVD *et al.*, 2006). Zheng *et al.* (2010) em seu estudo não encontrou associação entre o sítio 14 pb I/D e susceptibilidade a asma, tão pouco com a produção de HLA-G solúvel (sHLA-G) em crianças atópicas asmáticas em relação a crianças saudáveis. Porém, nosso estudo não apenas demonstrou que há susceptibilidade a asma brônquica acerca do genótipo 14 pb DI, como identificamos genótipos protetores as diferentes formas da doença (14 pb DD a asma leve/moderada e 14 pb II a asma grave). A atopia pode não ser sido o principal diferencial na causa dessa contradição, uma vez que a maioria de nossos pacientes asmáticos também eram atópicos (73%). Talvez, a diferença na população de estudo possa ter causado a contradição nestes dois trabalhos, uma vez que o primeiro (ZHENG *et al.*, 2010) tinha como predomínio crianças asmáticas (média de 5 anos de idade) em comparação com o presente estudo, o qual a maioria era adultos asmáticos (média de 46,13 anos de idade).

Uma vez que o homozigoto 14 pb II está associado com baixa produção da molécula e o homozigoto 14 pb DD relacionado com alta expressão de HLA-G, sugere-se que nível mais alto de HLA-G poderia prevenir o desenvolvimento de asma brônquica do tipo leve ou moderada e, em contraste, uma menor expressão da molécula evitaria o agravamento da doença. Mas dados na literatura não suportam essa hipótese, os quais altos níveis de sHLA-G no fluido broncoalveolar de asmáticos leves *versus* indivíduos saudáveis foi descrito por White *et al* (2010). Além disso, um déficit de produção de IL-10 em pacientes com asma grave em relação aqueles com asma leve (TOMITA *et al.*, 2002; RIZZO *et al.*, 2005; MAPP *et al.*, 2009) poderia prevenir a produção de sHLA-G (RIZZO *et al.*, 2005) e, assim, reduzir a atividade imunossupressora da molécula contribuindo para a inflamação neutrofílica característica da forma grave da doença.

Ainda, outros *loci* da 3'UTR do gene *HLA-G* despertam atenção, como os *loci* +3010 C/G e +3142 C/G. Os genótipos e alelos +3010 CC ($P=0,006$, $OR=2,397$) bem como os alelos +3010 C ($P=0,0119$, $OR=1,789$) e +3142 G ($P=0,0065$, $OR=1,853$) estão associados com a forma leve/moderada da doença em relação aos indivíduos saudáveis. Por sua vez, quando analisado os asmáticos leves ou moderados *versus* asmáticos graves, os genótipos +3010 CC e +3142 GG, e alelo

+3010 C conferiram proteção contra a forma grave da doença ($P=0,0022$, $OR=0,2963$ para o genótipo +3010 CC; $P=0,03$, $OR=0,4035$ para o genótipo +3142 GG; $P=0,0002$, $OR=0,3691$ para o alelo +3010 C, respectivamente), já o genótipo +3142 CG foi susceptível a asma grave ($P=0,0093$, $OR=2,794$). Além disso, o genótipo +3010 GG e o alelo +3010 G estão associados ao desenvolvimento de asma grave, quando comparamos os asmáticos graves com os indivíduos saudáveis ($P=0,028$, $OR=1,949$ para o genótipo e $P=0,0388$, $OR=1,514$ para o alelo) e com os pacientes asmáticos leves ou moderados ($P=0,0153$, $OR=2,913$ para o genótipo e $P=0,0002$, $OR=2,709$ para alelo).

As observações acerca dos sítios +3010 C/G e +3142 C/G indicam que a susceptibilidade para as formas leve ou moderada e grave da doença são diferentes, mas nenhum mecanismo de regulação específico foi relatado envolvendo o sítio polimórfico +3010 C/G. No entanto, uma análise *in silico* mostrou ambos os SNPs como alvos para microRNAs (miRNA). No caso do sítio +3010 C/G, seis miRNAs (miR-5703, miR-193a-5p, miR-5001-5p e miR-6510-5p para o alelo +3010 C, e miR-5787 para o alelo +3010 G) foram identificados com possibilidade de ação sobre este sítio (PORTO *et al.*, 2015). Em especial, o genótipo +3142 GG confere proteção a asma em crianças de mães asmáticas através da interação com a família miRNA-152, incluindo o miR-148a, miR-148b, e miR-152 (TAN *et al.*, 2008; NICODEMUS-JOHNSON *et al.*, 2013; PORTO *et al.*, 2015). A presença de uma guanina na posição +3142 aumenta a afinidade desta região por estes miRNAs, induzindo a degradação do RNAm e supressão da tradução, o que diminui a expressão do HLA-G (CASTELLI *et al.*, 2010). De fato, o genótipo +3142 GG e, também, o +3010 CC estão relacionados a menor expressão de sHLA-G em indivíduos saudáveis, já o +3010 GG está ligado a uma maior expressão da molécula (PALOMINO-MARTELLI *et al.*, 2013). Esta observação sugere que um déficit na produção da molécula conduziria a inflamação das vias aéreas inferiores na asma leve e poderia prevenir o desenvolvimento de asma grave, por outro lado, a maior produção de HLA-G conduziria a forma grave da doença.

Dessa forma, verificamos na literatura o perfil de miRNA expressos no epitélio brônquico de acordo com a gravidade da asma na tentativa de esclarecer o que poderia estar acontecendo acerca dos sítios polimórficos da 3'UTR do gene *HLA-G* e a expressão diferencial da molécula na gravidade da doença descrita na literatura (WHITE *et al.*, 2010; RIZZO *et al.*, 2005). Dos miRNAs detectados como diferencialmente expressos em asmáticos leves em comparação com indivíduos

saudáveis (JARDINS *et al.*, 2012), nenhum desses têm como alvo de ligação os alelos +3010 C e +3142 G do gene *HLA-G*, susceptíveis a forma leve/moderada da doença (PORTO *et al.*, 2015). É certo de que a presença de um miRNA cujo o alvo seja, por exemplo, um determinado alelo, resulta na supressão da transcrição e consequente diminuição da proteína, logo, uma vez que não há miRNAs interagindo com o sítio alvo, não há inibição da transcrição, permitindo a produção da proteína, o que poderia explicar a alta concentração de sHLA-G em asmáticos leves (WHITE *et al.*, 2010). Em relação a asma grave, o miRNA-19a está aumentado em células epiteliais brônquicas de pacientes asmáticos com a forma grave da doença em relação aqueles com a forma leve e indivíduos saudáveis, porém, esse não tem interação com nenhum sítio da 3'UTR do *HLA-G* (SALEM *et al.*, 2015, PORTO *et al.*, 2015). Assim, talvez outros sítios polimórficos presentes dentro do *HLA-G* ainda não relacionados com a baixa produção da molécula na asma grave (RIZZO *et al.*, 2005) possam favorecer a inflamação das vias aéreas.

O heterozigoto +3187 AG mostrou-se um genótipo protetor à forma leve ou moderada da asma apresentando frequência menor no grupo de asmáticos com esta forma da doença após comparação com os indivíduos saudáveis ($P=0,0425$, $OR=0,5011$). Por sua vez, este também se mostrou associado a forma grave da doença quando se comparou pacientes asmáticos graves com aqueles apresentando asma leve/moderada ($P=0,0355$, $OR=2,404$). Este genótipo se relacionou a uma produção intermediária de sHLA-G, sendo os genótipos apresentando o alelo +3187 A relacionados a diminuição *in vitro* da estabilidade do mRNA ocasionando menor expressão de HLA-G (MARTELLI-PALOMINO *et al.*, 2013; YIE *et al.*, 2008).

Feita a análise isolada dos genótipos e alelos dos sítios polimórficos da 3'UTR do gene *HLA-G* significativos para promoção ou proteção da asma grave, ainda podemos analisar as características da associação dos sítios polimórficos da 3'UTR ao observar os haplótipos. Dado um desequilíbrio de ligação positivo entre a maioria dos *loci* estudados, foi realizada a análise dos efeitos dos haplótipos nestes pacientes. Assim, as análises haplotípicas revelaram um haplótipo associado ao desenvolvimento da asma brônquica e outro conferindo proteção a mesma: 14 pb Ins/+3001 C/+3003 T/+3010 C/+3027 A/+3035 T/+3142 G/+3187 A/+3196 C (**UTR-7**) e 14 pb Ins/+3001 C /+3003 T/+3010 G/+ 3027 C/+3035 C/+3142 G/+3187 A/+3196 G (**UTR -8**), respectivamente. O haplótipo UTR-8 também está associado com risco aumentado de aparecimento de asma na forma grave. Este haplótipo tem como

principal diferença na sequência de alelos o sítio polimórfico +3010 C/G. Talvez este sítio seja importante na etiologia da asma grave, uma vez que o UTR-8 é um haplótipo susceptível a asma grave e apresentou o alelo +3010 G (sublinhado) também associado à susceptibilidade a asma grave. Na categoria de haplótipo relacionados a expressão de HLA-G, a UTR-7 exibiu baixos níveis da proteína (MARTELLI-PALOMINO *et al.*, 2013). De fato, ou a susceptibilidade a asma grave ocorre de uma maneira alelo específica acerca do sítio polimórfico +3010 C/G, ou, ainda, outros sítios polimórficos presentes dentro do gene *HLA-G* poderiam estar contribuindo para tal. Como, por exemplo, o UTR-7 e UTR-8, ambos associados com o mesmo haplótipo da região promotora, o PROMO-G010102a, diferindo apenas nos haplótipos associados a região codificadora: a UTR-7 aos alelos *G**01:01:03:01, *G**01:01:05 e *G**01:01:03:01b, e a UTR-8 aos alelos *G**01:06. (CASTELLI *et al.*, 2011). Dessa forma, é necessário analisar os sítios polimórficos existentes nas outras regiões do gene *HLA-G*, promotora e codificadora, e os relacionar com a gravidade da doença.

Em resumo, os alelos e genótipos da 3'UTR do *HLA-G* associados a uma baixa expressão de HLA-G foram protetores ao desenvolvimento da asma grave (genótipos 14 pb II, +3010 CC e +3142 GG e o alelo +3010 C) e susceptíveis a asma leve/moderada (genótipos +3010 CC e alelos +3010 C e +3142 G). Em contraste, os genótipos e alelos correlacionados a uma alta ou intermediária produção da molécula apresentaram um maior risco ao desenvolvimento da asma grave (genótipos +3010 GG, +3142 CG e +3187 AG e alelo +3010 G) e protetor contra a asma leve/moderada (genótipos 14 pb DD e +3187 AG). Se considerarmos o tipo de resposta em cada uma das diferentes formas de gravidade da doença, a asma leve/moderada pode apresentar predomínio de polarização para um perfil Th2, já na asma grave, há uma polarização adicional para Th1 ou Th17 com presença de neutrófilos. O papel do HLA-G no equilíbrio Th1/Th2 foi melhor elucidado na gravidez, onde a diminuição da expressão de HLA-G favoreceria uma resposta do tipo Th1, e não Th2, levando a uma reação inflamatória que resulta em aborto espontâneo. Isso poderia estar ocorrendo com os asmáticos onde os baixos níveis de HLA-G conduziria a uma resposta Th1, ocasionando uma inflamação neutrofílica característica da asma grave. Da mesma forma, o aumento de HLA-G direciona para uma resposta Th2, característico da asma leve e moderada, tornando improvável que o aumento da molécula possa resultar em não desenvolvimento dessa forma da doença (KAPASI *et al.*, 2000; CAROSELLA *et al.*, 2001; RIZZO *et al.*, 2005; BERRY

et al., 2006). Além disso, esse fato pode explicar porque uma alta concentração de sHLA-G foi encontrada no fluido broncoalveolar de asmáticos leves (WHITE *et al.*, 2010), enquanto que em asmáticos graves há uma queda na expressão de HLA-G (RIZZO *et al.*, 2005). Uma explicação plausível é que outros sítios no gene *HLA-G*, ou genes, possam estar refletindo na expressão da molécula em cada uma das formas de gravidade da asma.

Por fim, os achados desse estudo mostraram dados suficientes da associação do gene *HLA-G* no desenvolvimento de asma, tais como a sua relação com formas graves da doença pela associação de polimorfismos da 3'UTR *HLA-G* e a gravidade da asma. Mas ainda assim, é possível que somente os sítios polimórficos da 3'UTR não sejam suficientes para traçar perfis de susceptibilidade e proteção havendo a necessidade de estudar outras regiões do gene, como a promotora e a codificadora, para uma conclusão final. Além de elucidar os níveis de expressão de *HLA-G* nas diferentes formas de gravidade da asma comparando-os com os genótipos, alelos e haplótipos do gene afim de entender a inflamação característica de cada forma da doença.

Conclusão

---

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, observamos frequências diferenciais de sítios polimórficos do segmento 3'UTR do *HLA-G* associados com predisposição à asma brônquica e, também, com a gravidade da doença. Considerando que, i) cada forma de apresentação da asma pode apresentar microambiente diferencial conforme a gravidade e ii) a variabilidade genética contribua para a patogenia da asma, os estudos de outras regiões controladoras do gene *HLA-G*, assim como de outros genes associados com a patogenia da asma, podem contribuir para o entendimento do papel da susceptibilidade genética no desenvolvimento da asma brônquica nas suas diversas formas de apresentação.

*Referências
bibliográficas*

---

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. LICHTMAN, A. H.; PILLAI, SHIV. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 399-415.

ALEGRE, E., RIZZO, R., BORTOLOTTI, D., FERNANDEZ-LANDÁZURI, S., FAINARDI, E., GONZÁLEZ, A. Some basic aspects of HLA-G biology. *Journal of Immunol Res*, p.657625, 2014.

ALLEN, M., HEINZMANN, A., NOGUCHI, E., ABECASIS, G., BROXHOLME, J., PONTING, C.P. *ET AL*. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet*, v. 35, p.258-63, 2003.

ARRUDA, L. K., VIANNA, E. O. Asma sim, mortes por asma não!. *Braz J Allergy Immunol*, v. 1, n. 6, p.291-296, 2013.

ASTHMA AUSTRALIA. Statistics. Disponível em: <http://www.asthmaaustralia.org.au/national/about-asthma/what-is-asthma-/statistics>. Acesso em 15/02/16.

BELL, G .M., REYNOLDS, G. & ISAACS, J. D. Biologic therapies in non-rheumatic diseases: lessons for rheumatologists?. *Nature reviews. Rheumatology*, v.7, n.9, p.507–516, 2011.

BERRY, H. M. A., HARGADON, B., SHELLEY, M., PARKER, D., SHAW, D. E., GREEN, R. H., BRADDING, P., BRIGHTLING, C. E., WARDLAW, A. J., PAVORD, I. D. Evidence of a role of tumor necrosis factor- α in refractory asthma. *The New England Journal of Medicine*, v.354, n.7, p.697–708, 2006.

BLASCHITZ, A., GAUSTER, M., FUCHS, D., LANG, I., MASCHKE, P., ULRICH, D., KARPFF, E., TAKIKAWA, O., SCHIMEK, M. G., DOHR, G., SEDLMAYR, P. Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface. *PLoS One*, v.6, n.7, p.e21774, 2011.

BATEMAN, E.D., HURD, S.S., BARNES, P.J., BOUSQUET, J., DRAZEN, J. M., FITZGERALD, M., GIBSON, P., OHTA, K., O'BYRNE, P., PEDERSEN, S. E., *et al*. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*, v. 31, p.143–178, 2008.

BRUSSELLE, G. G., MAES, T., BRACKE, K. R. Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nature Medicine*, v.19, n.8, p.977–979, 2013.

BRYANT-STEPHENS, T. Asthma disparities in urban environments. *J Allergy Clin Immunol*, v.123, p.1199–1206, 2009.

BUSSE, W. W., LEMANSKE, R. F. Asthma. *N Engl J Med*, v.344, p.350-62, 2001.

BUSSE, W.W., HOLGATE, S., KERWIN, E. *et al.* Randomized, double- blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti- IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, v.188, n.11, p.1294–1302, 2013.

CAMPBELL, D.J., ZIEGLER, S. F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, v.7, n.4, p.305-100, 2007.

CAROSELLA, E. D. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunol Lett*, v.138, n.1, p.22-4, Julho, 2011.

CAROSELLA, E.D., MOREAU, P., LEMAOULT, J., ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in Immunology*, v.29, n.3, p.125–132, 2008.

CARROL, N. G., MUTAVDZIC, S., JAMES, A. L. Distribution and degranulation of airway mast cell in normal and asthmatic subjects. *Eu Respir J*, v.19, p.879-885, 2012.

CASTELLI EC, MENDES-JUNIOR CT, VEIGA-CASTELLI LC, ROGER M, MOREAU P, DONADI EA. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol*, v. 28, n.11, p.3069-86, Novembro, 2011.

CASTELLI EC, MOREAU P, OYA E CHIROMATZO A, MENDES-JUNIOR CT, VEIGA-CASTELLI LC, YAGHI L, GIULIATTI S, CAROSELLA ED, DONADI EA. In silico analysis of microRNAS targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Human Immunology*, v.70, n.12, p.1020–1025, 2009.

CASTELLI EC, VEIGA-CASTELLI LC, YAGHI L, MOREAU P, DONADI EA. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res*, p.734068, 2014.

CASTELLI, E. C., MENDES-JUNIOR, C. T., DEGHAIDE, N. H. S., DE ALBUQUERQUE, R. S., MUNIZ, Y. C. N., SIMÕES, R. T., CAROSELLA, E. D., MOREAU, P., DONADI, E. A. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes and immunity*, v.11, n.2, p.134-141, 2010.

CASTELLI, E. C., MENDES-JUNIOR, C. T., VEIGA-CASTELLI, L. C., ROGER, M., MOREAU, P. DONADI, E. A. A Comprehensive Study of Polymorphic Sites along the HLA-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution. *Mol Biol Evol*,v. 28, n.11, p.3069-86, 2011.

CASTELLI, E.C. , MOREAU, P., OYA E CHIROMATZO, A., MENDES-JUNIOR, C.T., VEIGA-CASTELLI, L.C., YAGHI, L., GIULIATTI, S., CAROSELLA, E.D., DONADI, E.A. In silico analysis of

microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Human Immunology*, v. 70, n.12, p.1020–1025, 2009.

CDC (a) - Center of disease control and prevention, Disponível em: <http://www.cdc.gov/asthma/asthmaadata.htm>. Acesso em: 15/02/16.

CDC (b) - Center of disease control and prevention, Disponível em: http://www.cdc.gov/asthma/impacts_nation/asthmafactsheet.pdf. Acesso em: 02/05/16

CHAN-YEUNG, M. & MALO, J. L. Occupational Asthma. *N. Engl J Med*, v.333, n.2, p. 107-12, 1995.

CILIAO ALVES, D.C., CRISPIM, J.C.O., CASTELLI, E.C., MENDES-JUNIOR, C.T., DEGHAIDE, N.H.S., SILVA, G.E.B., COSTA, R.S., SABER, L.T., MOREAU, P., DONADI, E.A. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. *Hum Immunol*, v.73, n.1, p.52–59, 2012.

CIPRANDI, G., DE AMICI, M., CAIMMI, S. MARSEGLIA, A., MARCHI, A., CASTELLAZZI, A.M., MARSEGLIA, G. Soluble serum HLA-G in children with allergic rhinitis and asthma. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, v.24, n.2, p.221–224, 2010.

CIPRANDI, G., CORSICO, A. & PISATI, P. Serum-Soluble HLA-G Is Associated with Specific IgE in Patients with Allergic Rhinitis and Asthma. *Inflammation*, v.37, n.5, p.1630–1634, 2014.

CIRULLI, V., ZALATAN J, MCMASTER M, PRINSEN R, SALOMON DR, RICORDI C, TORBETT BE, MEDA P, CRISA L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes*, v.55, n.5, p.1214-22, Maio, 2006.

CLEMENTS, C. S., KJER-NIELSEN, L., MCCLUSKEY, J., ROSSJOHN, J. Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding. *Hum Immunol*, v.68, n.4, p.220-6, 2007.

COLONNA M, SAMARIDIS J, CELLA M, ANGMAN L, ALLEN RL, O'CALLAGHAN CA, DUNBAR R, OGG GS, CERUNDOLO V, ROLINK A. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol*, v.160, n.7, p.3096-100, Abril, 1998.

COPER, M. A., FEHNIGER, T. A., CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer- cell subsets. *Trends Immunol*, v.22, p.633-640, 2001.

CORDERO, E.A.A., VEIT, T.D., DA SILVA, M.A., JACQUES, S.M., SILLA, L.M., CHIES, J.A. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens*, v.74, n.4, p.308–313, 2009.

- COX, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *Am Assoc Immunologists*, v.154, p. 4719-25, 1995.
- CURIGLIANO G, CRISCITIELLO C, GELAO L, GOLDBIRSCHE A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res*, v.19, n.20, p.5564-71, 2013.
- DE SOUZA- MACHADO, C., SOUZA-MACHADO, A., CRUZ, A. A. Asthma mortality inequalities in Brazil: tolerating the unbearable. *Scientific World Journal*, p.625829, 2012.
- DI CRISTOFARO, J., REYNAUD-GAUBERT, M., CARLINI, F., ROUBERTOUX, P., LOUNDOU, A., BASIRE, A., FRASSATI, C., THOMAS, P., GOMEZ, C., PICARD, C. HLA-G*01:04~UTR3 Recipient Correlates With Lower Survival and Higher Frequency of Chronic Rejection After Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation*, v.15, n.9, p.2413–2420, 2015.
- DONADI, E., CASTELLI, E.C., ARNAIZ-VILLENA, A., ROGER, M., REY, D., MOREAU, P. Implications of the polymorphism of *HLA-G* on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.68, n.3, p.369–395, 2011.
- DOUGHERTY, R. H., FAHY, J. V. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clinical and Experimental Allergy*, v.39, n.2, p.193–202, 2009.
- DURAN-TAULERIA E, RONA RJ. Geographical and socioeconomic variation in the prevalence of asthma symptoms in English and Scottish children. *Thorax*, v.54, p.476, 1999.
- EUROPEAN COMMUNITY RESPIRATORY HEALTH SURVEY. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *European Respiratory Journal*, v.9, p.687-695, 1996.
- EVANS, R., MULALLY, D. I., WILSON, R. W. *et al.* National trends in the morbidity and mortality of asthma in the United States. *Chest*, v.91 (Suppl), p.65S-74S, 1987.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v.10, n.3, p. 564–567, 2010.
- EXCOFFIER, L. & SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular biology and evolution*, v.12, n.5, p. 921–927, 1995.
- FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology*, v.15, p.57–65, 2015.

FISCHER, G. F., MAYR, W. R. Molecular genetics, of the HLA complex. *Wien Klin Wochenschr*, v.113, p.814-24, 2001.

FOLKERTS, G., BUSSE, W., NIJKAMP, F.P., SORKNESS, R., GERN, J. E. State of the art: virus-induced airway hiperresposiveness and ashtma. *Am J Respir Crit Care*, v.157, p.1708-20, 1998.

FUZZI, B., RIZZO, R., CRISCUOLI, L., NOCI, I., MELCHIORRI, L., SCARSELLI, B., BENCINI, E., MENICUCCI, A., BARICORDI, O.R. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol*, v.32, n.2, p.311-5, 2002.

GARCIA, A., MILET, J., COURTIN, D., SABBAGH, A., MASSARO, J.D., CASTELLI, E.C., MIGOT-NABIAS, F., FAVIER, B., ROUAS-FREISS, N., DONADI, E.A., MOREAU, P. Association of *HLA-G* 3'UTR polymorphisms with response to malaria infection: A first insight. *Infection, Genetics and Evolution*, v.16, p. 263–269, 2013.

GENTILE, D.A., SCHREIBER, R., HOWE-ADAMS, J., TRECKI, J. et al. Diminished dendritic cell interleukin 10 production in atopic children. *Ann Allergy Immunol*, v.92, p.538–544, 2004.

GEREDA, J., LEUNG, D., THATAYATIKOM, S. et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation In infants at high risk of asthma. *Lancet*, v.355, p.1680-83, 2000.

GHANDRI, N. et al.. Association of HLA-G polymorphisms with nasopharyngeal carcinoma risk and clinical outcome. *Human Immunology*, v.72, n.2, p.150–158, 2011.

GIBSON, P. G, SIMPSON, J. L., HANKIN, R., POWELL, H. & HENRY, R. L. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax*, v.58, p.116–121, 2003.

GLOBAL INITATIVE FOR ASTHMA (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2015.

GONEN-GROSS, T., ACHDOUT, H., ARNON, T.I., GAZIT, R., STERN, N., HOREJSÍ, V., GOLDMAN-WOHL, D., YAGEL, S., MANDELBOIM, O.. The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules. *J Immunol*, v.175, n.8, p.4866-74, 2005.

GOODRIDGE, J.P., WITT, C.S., CHRISTIANSEN, F.T., WARREN, H.S. KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J Immunol*, v.171, n.4, p.1768-74, 2003.

GREEN, R. H. *et al.* Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*, v.57, p.875–879, 2002.

GREEN, R. H. *et al.* Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*, v.360, p.1715–172, 2002.

GREGORI, S., MAGNANI, C.F., RONCAROLO, M.G. Role of human leukocyte antigen-G in the induction of adaptive type 1 regulatory T cells. *Hum Immunol*, v.70, n.12, p.966-9, 2009.

GUILL, M. F. Asthma update: epidemiology and pathophysiology. *Pediatr Rev*, v.25, n.9, p.299-305, 2004.

GUO, S. W. & THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, v.48, p.361-372, 1992.

HADDAD, R., CILIÃO ALVES, D.C., ROCHA-JUNIOR, M.C., AZEVEDO, R., POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S., TAKAYANAGUI, O.M., DONADI, E.A., COVAS, D.T., KASHIMA, S. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. *AIDS research and human retroviruses*, v.27, n.3, p.283–288, 2011.

HAJ-SALEM, I., FAKHFAKH, R., BÉRUBÉ, J.C., JACQUES, E., PLANTE, S., SIMARD, M.J., BOSSÉ, Y., CHAKIR, J. MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGF β R2 gene in severe asthma. *Allergy*, v.70, n.2, p.212-9, 2015.

HAMMAD, H., PLANTINGA, M., DESWARTE, K., POULIOT, P., WILLART, M.A., KOOL, M., MUSKENS, F., LAMBRECHT, B.N. *et al.* Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J. Exp. Med*, v.207, p.2097–2111, 2010.

HAMMER, A, HUTTER, H., DOHR, G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. *Am J Reprod Immunol*, v.38, n.3, p.150-7, 1997.

HOLGATE, S. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat med*, v.18, n.5, p.673-683, 2012.

HOLGATE, S. T., WENZEL, S., POSTMA, D.S., WEISS, S.T., RENZ, H., SLY, P.D. Asthma. *Nat. Rev. Dis. Primers*. Setembro, 2015.

HOLGATE, S. T. The epidemic of allergy and asthma. *Nature*. 1999, 402:B2-4.

HORTON, R., WILMING, L., RAND, V., LOVERING, R. C., BRUFORD, E. A., KHODIYAR, V. K., LUSH, M. J., TALBOT JR, S. P. C. C., WRIGHT, M. W., MAIN, H. M., TROWSDALE, J., ZIEGLER, A., BECK, S. Gene map of the extended human major histocompatibility complex. *Nature reviews genetics*, v. 5, n.12, Dezembro, 2004.

HORUZSKO, A., LENFANT, F., MUNN, D.H., MELLOR, A.L. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. *Int Immunol*, v.13, n.3, p.385-94, 2001.

HVIID, T.V., RIZZO, R., MELCHIORRI, L., STIGNANI, M., BARICORDI, O.R. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the *HLA-G* gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol*, v.67, n.1-2, p.53-62, 2006.

HVIID, T.V., HYLENIUS, S., RØRBYE, C., NIELSEN, L.G. *HLA-G* allelic variants are associated with differences in the *HLA-G* mRNA isoform profile and *HLA-G* mRNA levels. *Immunogenetics*, v.55, n.2, p.63–79, 2003.

HVIID, T.V., RIZZO, R., MELCHIORRI, L., STIGNANI, M., BARICORDI, O.R. Polymorphism in the 5' Upstream Regulatory and 3' Untranslated Regions of the *HLA-G* Gene in Relation to Soluble HLA-G and IL-10 Expression. *Human Immunology*, v.67, n.1-2, p.53–62, 2006.

ISHITANI, A., GERAGHTY, D. E. Alternative splicing of *HLA-G* transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.89, p.3947-3951, 1992.

ITO, T., ITO, N., SAATHOFF, M., STAMPACHIACCHIERE, B., BETTERMANN, A., BULFONE-PAUS, S., TAKIGAWA, M., NICKOLOFF, B. J., PAUS, R. Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. *J Invest Dermatol*, v.125, n.6, p.1139-48, 2005.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK M. J. *Imunobiologia*. Porto Alegre: ArtMed, 6ª edição. 2005, p. 170-171.

JARDIM, M.J., DAILEY, L., SILBAJORIS, R., DIAZ-SANCHEZ, D. Distinct microRNA expression in human airway cells of asthmatic donors identifies a novel asthma-associated gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.47, n.4, p.536-42, 2012.

JATAKANON, A., UASUF, C., MAZIAK, W., LIM, S., CHUNG, K. F., BARNES, P. J. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J. Respir Crit Med*, v.160, p.1532-9, 1999.

JAYARAM, L. *et al.* Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J*, v.27, p.483–494, 2006.

- KAIKO, G. E., FOSTER, P.S. New insights into the generation of Th2 immunity and potential therapeutic targets for the treatment of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, v.1, n.1, p.39–45, 2011.
- KAPASI, K., ALBERT, S. E., YIE, S. M., ZAVAZAVA, N., LIBRACH, C. L. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology*, v.101, n.2, p.191–200, 2000.
- KLEIN, J., SATO, A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, v.343, n.10, p.702-9, 2000.
- KLEIN, J., SATO, A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med*, v.343, n.11, p.782-6, 2000.
- KUHLEN, J.L. *et al.* Identification of Asthma Phenotypes in a Tertiary Care Medical Center. *Am J Med Sci*, v.348, n.6, p.480–485, 2014.
- KUMAR, R. K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. *Pharmacol Ther*, v.91, p.93-104, 2001.
- LAITINEN, T., POLVI, A., RYDMAN, P., VENDELIN, J., PULKKINEN, V., SALMIKANGAS, P., *ET AL.* Characterization of a common susceptibility *locus* for asthma-related traits. *Science*, v.304, p.300-4, 2004.
- LAMBRECHT, B. N., HAMMAD, B. N. The immunology of asthma. *Nature Immunology*, v.16, n.1, p.45–56, 2014.
- LARCHÉ, M., AKDIS, C. A. & VALENTA RUDOLF. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6:761–771.
- LARSEN MH, BZOREK M, PASS MB, LARSEN LG, NIELSEN MW, SVENDSEN SG, LAU, D.T. *et al.* HLA-G polymorphisms, genetic susceptibility, and clinical outcome in childhood neuroblastoma. *Tissue Antigens*, v.78, n.6, p.421–427, 2011.
- LE BOUTEILLER, P. HLA-G in human early pregnancy: control of uterine immune cell activation and likely vascular remodeling. *Biomed J*. 2015 Jan-Feb;38(1):32-8.
- LE DISCORDE, M., MOREAU, P., SABATIER, P., LEGEAIS, J. M., CAROSELLA, E. D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol*, v. 64, n.11, p.1039-44, 2003.
- LEE, J., KIM, J.D. & PARK, C. Gene-Environment Interactions in Asthma: Genetic and Epigenetic Effects. *Yonsei Med J*, v.56, n.4, p.877–886, 2015.

LE GAL, F.A., RITEAU, B., SEDLIK, C., KHALIL-DAHER, I., MENIER, C., DAUSSET, J., GUILLET, J.G., CAROSELLA, E.D., ROUAS-FREISS, N. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*, v.11, n.8, p.1351-6, 1999.

LEVENE, H. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematical Statistics*, v.20, p. 91-94, 1949.

LINDHARD A, HVIID TV. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod*, v.17, n.12, p.727-38, Dezembro, 2011.

LIM, S., CARAMORI, G., TOMITA, K. et al. Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy*, v.59, p.505–514, 2004.

LOUIS, R., LAU, L. C. K., BRON, A. O. et al., The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*, v.161, p. 9-16, 2000.

LOUTEN, J., BONIFACE, K & MALEFYT WALL DE, R. Development and function of Th17 cells in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol*, v.123, p.1004–1011, 2009.

LUCENA-SILVA, N., MONTEIRO, A.R., DE ALBUQUERQUE, R.S., GOMES, R.G., MENDES-JUNIOR, C.T., CASTELLI, E.C., DONADI, E.A. Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. *Tissue Antigens*, v.79, n.4, p.272-8, Abril, 2012.

LUCENA-SILVA, N. DE SOUZA, V.S., GOMES, R.G., FANTINATTI, A., MUNIZ, Y.C., DE ALBUQUERQUE, R.S., MONTEIRO, A.L., DINIZ, G.T., COELHO, M.R., MENDES-JUNIOR, C.T., CASTELLI, E.C., DONADI, E.A. et al. HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus in 2 Brazilian Populations. *The Journal of rheumatology*, v.40, n.7, p.1104–1113, 2013.

LUCZAK, M. W.; JAGODZINSKI, P. P. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia histochemica et cytobiologica, Warszawa*, v.44, p.143-154, 2006.

MADDOX, L., SCHWARTZ, D. A. The pathophysiology of Asthma. *Ann Reviews Med*, v.53, p.477-98, 2002.

MAIO, S., BALDACCI, S., CARROZZI, L. et al. Respiratory symptoms/diseases prevalence is still increasing: a 25-yr population study. *Respir Med*, v.100, p.58–65, 2015.

MALLET, V., BLASCHITZ, A., CRISA, L., SCHMITT, C., FOURNEL, S., KING, A., LOKE, Y. W., DOHR, G., LE BOUTEILLER, P. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial

but not CD83 (+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol*, v.11, n.6, p.889-98, 1999.

MAPP, C. E., FERRAZZONI, S., RIZZO, R., MIOTTO, D., STIGNANI, M., BOSCHETTO, P., MAESTRELLI, P., BARICORDI, O. R. Soluble human leucocyte antigen-G and interleukin-10 levels in isocyanate-induced asthma. *Clin Exp Allergy*, v.39, n.6, p.812-9, 2009.

MARTELLI-PALOMINO, G., PANCOTTO, J.A., MUNIZ, Y.C., MENDES-JUNIOR, C.T., CASTELLI, E.C., MASSARO, J.D., KRAWICE-RADANNE, I., PORAS, I., REBMANN, V., CAROSELLA, E.D., ROUAS-FREISS, N., MOREAU, P., DONADI, E.A. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS One*, v.8, n.10, p.e71742, 2013.

MATSUMOTO, K., INOUE, H., FUKUYAMA, S., TSUDA, M., IKEGAMI, T. et al. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol*, v.134, p.295–302, 2004.

MCKENZIE, A. N., SPITS, H., EBERL, G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity. *Immunity*, v.41, n.3, p.366–374, 2014.

MENIER, C., RABREAU, M., CHALLIER, J.C., LE DISCORDE, M., CAROSELLA, E.D., ROUAS-FREISS, N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood*, v.104, n.10, p.3153-60, Novembro, 2004.

MICHEL, O., KIPS, J. DUCHATEUA, J. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med*, v.21 p.441-448, 1991.

MIRANDA, C. BUSACKER, A. BALZAR, C., TRUDEU, J. & WENZEL, S. E. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, v.113, p.101–108, 2004.

MOREAU, P., FLAJOLLET, S., CAROSELLA, E.D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med*, v.13, n.9B, p.2973-89, 2009.

NAJI, A., MENIER, C., MORANDI, F., AGAUGUÉ, S., MAKI, G., FERRETTI, E., BRUEL, S., PISTOIA, V., CAROSELLA, E.D., ROUAS-FREISS, N. Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses. *J Immunol*, v.192, n.4, p.1536-46, 2014.

NEWCOMB, D. C., PEEBLES, R. S., Th17-mediated inflammation in asthma. *Current Opinion in Immunology*, v.25, n.6, p. 755–760, 2013.

NHLBI (NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE). National Asthma Education and prevention Program. Expert Panel Report 3: Guidelines for the diagnosis and management of asthma – Full report 2007. p. 380 August, 2007. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/asthgdln.pdf>. Acesso em: 23 Fev. 2016

NICODEMUS-JOHNSON, J. *et al.* Maternal asthma and microRNA regulation of soluble HLA-G in the airway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.131, n.6, 2013.

NICOLAE, D., COX, N.J., LESTER, L.A., SCHNEIDER, D., TAN, Z., BILLSTRAND, C., KULDANEK, S., DONFACK, J., KOGUT, P., PATEL, N.M., GOODENBOUR, J., HOWARD, T., WOLF, R., KOPPELMAN, G.H., WHITE, S.R., PARRY, R., POSTMA, D.S., MEYERS, D., BLEECKER, E.R., HUNT, J.S., SOLWAY J., OBER C. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet*, v.76, n.2, p.349-57, 2005.

OBER C, ALDRICH CL, CHERVONEVA I, BILLSTRAND C, RAHIMOV F, GRAY HL, HYSLOP T. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet*, v.72, n.6, p.1425-35, 2003.

OBER C, BILLSTRAND C, KULDANEK S, TAN Z. The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Hum Reprod*, v. 21, n.7, p.1743-8, 2006.

OGUMA, T., PALMER, L. J., BIRBEN, .E, SONNA, L.A., ASANO, K., LILLY, C. M. Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *N Engl J Med*, v.351, p.1752-63, 2004.

PAPIRIS, S., KOTANIDOU, A. MALAGARI, K, ROUSSOS, C. Clinical Reviews: Severe asthma. *Critical Care*, v.6, n.1, p.30-44, 2002.

PARK, J. H., GOLD, D. R., SPIEGELMAN, D. L. *et al.* House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care*, v.163, n.2, p.322-28, 2001.

PIANCATELLI, D. *et al.* HLA-G 14-bp Insertion/Deletion Polymorphism in Kidney Transplant Patients With Metabolic Complications. *Transplantation Proceedings*, v.41, n.4, p.1187–1188, 2009.

POLOSA, R., THOMSON, N. C. Smoking and asthma: dangerous liaisons. *Eur Respir J*, v.41, n.3, p.716– 725, 2013.

PORTAL BRASIL. Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/01/asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>. Acesso em: 15/02/16.

PORTO IO, MENDES-JUNIOR CT, FELÍCIO LP, GEORG RC, MOREAU P, DONADI EA, CHIES JA, CASTELLI EC. MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. *Mol Immunol*, v.65, n.2, p.230-41, 2015.

POSTMA, D. S., KERKHOF, M., BOEZEN, H. M., KOPPELMAN, G. H. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: common genes, common environments? *Am J Respir Crit Care Med*, v.183, n.12, p.1588-94, 2011.

QIN, Z.S., NIU, T. & LIU, J.S. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. *American journal of human genetics*, v.71, n.5, p.1242–1247, 2002.

RAJAGOPALAN, S., BRYCESON, Y.T., KUPPUSAMY, S.P., GERAGHTY, D.E., VAN, D.E.R., MEER, A., JOOSTEN, I., LONG, E.O. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol*, v.4, n.1, p.e9, 2006.

RAJAGOPALAN, S., FU, J., LONG, E.O. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol*, v.167, n.4, p.1877-81, 2001.

RAJAGOPALAN, S., LONG, E. O.A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*, v.189, n.7, p.1093-100, 1999.

RITEAU B, ROUAS-FREISS N, MENIER C, PAUL P, DAUSSET J, CAROSELLA ED. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol*, v.166, n.8, p.5018-26, 2001.

RIZZO R, MAPP CE, MELCHIORRI L, MAESTRELLI P, VISENTIN A, FERRETTI S, BONONI I, MIOTTO D, BARICORDI OR. Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, v.115, n.3, p.508-13, 2005.

ROUAS-FREISS N, GONÇALVES RM, MENIER C, DAUSSET J, CAROSELLA ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci*, v.94, n.21, p.11520-5, 1997.

ROUAS-FREISS, N., BRUEL, S., MENIER, C., MARCOU, C. MOREAU, P., CAROSELLA, E. D. Shitc of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. *Int J Cancer*, v.117, p.114-122, 2005.

ROUSSEAU, P., LE DISCORDE, M., MOUILLOT, G., MARCOU, C., CAROSELLA. E.D., MOREAU, P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol*, v.64, n.11, p.1005-10, Novembro, 2003.

SAFFAR, A. S., ASHDOWN, H., GOUNNI, A. S. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Current Drug Targets*, v.12, n.4, p.556–562, 2011.

SAIJAN, U. *et al.* Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, v.178, p.1271–1281, 2008.

SAMET, J. M. & LAMBERT, W. E. Epidemiologic approaches for assessing health risks from complex mixtures in indoor air. *Environ Health Perspect*, v.95, p.71-74, 1991.

SCHWARTZ, D. A., DONHAM, K. J., OLENCHOCK, S. A. Determinant of longitudinal changes in spirometric functions among swine confinement operators and farmers. *Am J Respir Crit Care*, v.151, p.47-53, 1995.

SEGAT, L. *et al.* HLA-G 3' UTR haplotypes and HIV vertical transmission. *AIDS*. v.23, n.14, p.1916–1918, 2009.

SELMANI, Z., NAJI, A., ZIDI, I., FAVIER, B., GAIFFE, E., OBERT, L., BORG, C., SAAS, P., TIBERGHIEN, P., ROUAS-FREISS, N., CAROSELLA, E. D., DESCHASEAUX, F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*, v. 26, n.1, p.212-22, 2008.

SHIROISHI, M., KUROKI K., OSE, T., RASUBALA, L., SHIRATORI, I., ARASE, H., TSUMOTO, K., KUMAGAI, I., KOHDA, D., MAENAKA, K. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and Crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *J Biol Chem*, v.281, p.10439-10447, 2006.

SIERSTED, H. C., MOSTGAARD G, HYLDEBRANT, N., HANSEN, H. S., BOLDSSEN, J., OXHOJ, H. Interrelationship between diagnosed asthma, asthma like symptoms, and abnormal airway behavior in adolescence: the Odense Schoolchild Study. *Thorax*, v.51, p.503-9, 2006.

SIMPSON, A. *et al.* Beyond atopy: multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. *Am. J. Respir. Crit. Care Me*, v.181, p.1200–1206, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da asma. *J Bras Pneumol*. v.38, p. S1-S46, Abril, 2012. (Disponível em <http://sbpt.org.br/consensos-e-diretrizes-da-sbpt/>)

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol*, v.32, Supl 7, p.S 447-S 474, 2006.

SPORIK, R., HOLGATE, S. T., PLATTS-MILLS, T. A., COGSWELL, J. J. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. *N Engl J Med*, v.323, n.8, p.502-7, 1990.

STEPHENS, M., SMITH, N.J. & DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American journal of human genetics*, v.68, n.4, p.978–989, 2001.

SUISSA, S. ERNST, P. Inhaled corticosteroids: impact on asthma morbidity and mortality. *J Allergy Clin Immunol*, v.107, n.6, p.937-44. 2001.

SULLIVAN, L. C., HOARE, H. L., MCCLUSKEY, J. ROSSJOHN, J., BROOKS, A. G. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunol*, v.27, p.413-420, 2006.

TAHAN, F. & PATIROGLU, T. Plasma soluble human leukocyte antigen G levels in asthmatic children. *International Archives of Allergy and Immunology*, v.141, n.3, p.213–216, 2006.

TAN Z, RANDALL G, FAN J, CAMORETTI-MERCADO B, BROCKMAN-SCHNEIDER R, PAN L, SOLWAY J, GERN JE, LEMANSKE RF, NICOLAE D, OBER C. Allele-Specific Targeting of microRNAs to HLA-G and Risk of Asthma. *American Journal of Human Genetics*, v.82, n.1, p.251, 2008.

TOMITA, K., LIM, S., HANAZAWA, T., USMANI, O., STIRLING, R., CHUNG, K. F. *et al.* Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. *Clin Immunol*, v.103, p.258–266, 2002.

TERR ABBA I. In *Imunologia Médica*. DANIEL P STITES, TRISTAN G PARSLow, ABBA I TERR. 9ª Edição. Guanabara Koogan, p.308-313, 2000.

THE INTERNATIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGIES IN CHILDHOOD (ISAAC) STEERING COMMITTEE. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet* v.351, p.1225-1232, 1998.

THOMSON, N. C., CHAUDHURI, R., LIVINGSTON, E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J*, v.24, n.5, p.822–833, 2004.

TRINDADE, H., VIDEIRA, P., BORREGO, L. M. Os Fatores Genéticos da Asma. *Rev. Port. Pneumol*, v.XII, n.6, p.683-708, 2006

VAN EERDEWEGH, P., LITTLE, R. D., DUPUIS, J., DEL MASTRO, R. G, FALLS K, SIMON, J., *et al.* Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, v.418, p.426-30, 2002.

VEIT TD, CHIES JA. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol*, v.20, n.4, p.229-31, Março, 2009.

VERCELLI, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*, v.8, n.3, p.169-82, Março, 2008.

VOLTARELLI, J. C., DONADI, E. A., MARTINEZ, J. A. B., VIANNA, E. O., SARTI, W. Bronchial Asthma and Idiopathic Pulmonary Fibrosis as Potential Targets for Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease*, p.91-100, 2003.

VROMAN, B., BLINK, V. D., KOOL, M. Mode of dendritic cell activation: the decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? *Immunobiology*, v.220, n.2, p.254–261, 2015.

YIE, S.M., LI, L.H., XIAO, R., LIBRACH, C.L. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*, v.14, p.649–653, 2008.

WAGNER, B, M. Medidas de associação em estudos epidemiológicos: risco relativo e *odds ratio*. *Jornal de Pediatria*. v.74, p.247-251, 1998.

WALKER, J. A., BARLOW, J. L., MCKENZIE, A. N. J. Innate lymphoid cells-how did we miss them?. *Nature Reviews Immunology*, v.13, n.2, p.75–87, 2013.

WEISS, S. T. Genetics of Asthma, Asthma-Susceptibility Genes. 2015. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/2068244-overview>. Acesso em: 17/04/2016.

WENZEL, S. E., SCWARTZ, L. B., LANGMACK, E. L. *et al*. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*, v.160, p.1001-1008, 1999.

WENZEL, S. E., SZEFLER, S. J., LEUNG, D. Y. M. *et al*. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*, v.156, p.737-743, 1997.

WENZEL, S. Severe Asthma in Adults. *Am J Respir Crit Care Med*, v.172, p.149–160, 2005.

WENZEL, S.E.. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine*, v.18, n.5, p.716–725, 2012.

WHITE, R. S., LOISEL, D. A., MCCONVILLE, J. F., STERN R., TU, Y. L., MARROQUIN, B. A., NOTH, I. AND OBER, C. Levels of soluble HLA-G are increased in asthmatic airways. *Eur Respir J*, v.35, n.4, p.925–927, 2010.

WHITE, S.R. *et al.* Human leukocyte antigen-G expression in differentiated human airway epithelial cells: lack of modulation by Th2-associated cytokines. *Respiratory research*, v.14, n.1, p.4, 2013.

WILLS-KARP, M. Immunologic Basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual Reviews of Immunology*, v.7, p.255-81, 1999.

WILSON, R. H. *et al.* Allergic sensitization through the airway primes TH17- dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, v.180, p.720–730, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Bronchial Asthma, Factsheet nº206. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/en/>. Acesso em:15/02/16.

XUE, L., SALIMI, M., PANSE, I. *et al.* Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.133, n.4, p.1184.e7– 1194.e7, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases. A comprehensive approach. 2007. p. 155. Disponível em: http://www.who.int/respiratory/publications/global_surveillance/en/. Acesso em 15/02/16.

YIE, S.M. *et al.*, 2008. A single base-pair mutation in the 3' untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Molecular Human Reproduction*, v.14, n.11, p.649–653, 2008.

YOUNG, S., LE SOUEF, P. N., GEELHOED, G. C. *et al.* The influence of a family history of asthma and parental smoking on airways responsiveness in early infancy. *N Engl J Med*, 1991, 324 (17): 1168-73. Erratum. 1991. *N J Med*, v.325, n.10, p.747, 1991.

YU, S., KIM, H. Y., CHANG, Y. J., DEKRUYFF, F. R., UMETSU, D. T. Innate lymphoid cells and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.133, n.4, p.943–950, 2014.

ZHANG, Y., LEAVES, N. I., ANDERSON, G. G., PONTING, C. P., BROXHOLME, J., HOLT, R. *ET AL.* Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet*, v.34, p.181-6, 2003.

ZHENG, X.Q. *et al.* Analysis of the plasma soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels in childhood atopic asthma. *Human Immunology*, v.71, n.10, p.982–987, 2010.

Apêndice

APÊNDICE I

TABELA 8: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE CADA PACIENTE

Paciente	Sexo	Etnia	Idade	Gravidade da doença	CVF (%previsto)	VEF1 (%previsto)	FEF 25-75% (%previsto)	VEF1/CVF (%observado)	Atópico	Teste cutâneo	IgE Total	Tabagista
001	M	Branco	55	GRAVE	68,00	49,00	21,00	72,00	Não	N/A	93,70	Ex
002	F	Branco	52	GRAVE	58,10	46,10	28,40	39,90	Sim	Positivo	24,60	Ex
003	F	Mulato	22	GRAVE	68,00	56,00	32,00	67,00	Sim	Positivo	160,00	N/A
004	M	Branco	52	GRAVE	65,00	30,00	10,00	47,00	Sim	N/A	363,00	Ex
005	F	Negro	48	GRAVE	101,70	66,53	26,45	54,64	Sim	Positivo	1458,00	Não
006	M	Branco	57	GRAVE	118,30	68,69	22,39	46,94	Sim	Negativo	628,00	Sim
007	F	Branco	52	GRAVE	67,50	45,85	20,00	58,02	Sim	Negativo	1565,00	Não
008	F	Branco	45	GRAVE	69,60	45,20	24,10	35,50	Sim	Positivo	186,00	Não
009	F	Branco	70	GRAVE	117,30	114,50	145,90	76,59	Não	Negativo	N/A	Ex
010	F	Negro	35	GRAVE	70,42	41,13	12,67	51,00	Sim	Positivo	1274,00	Não
011	F	Branco	51	GRAVE	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
012	M	Branco	32	GRAVE	59,19	38,83	16,14	54,61	Sim	Positivo	612,00	Não
013	F	Mulato	51	GRAVE	101,00	90,50	62,70	100,20	Sim	Positivo	121,00	Ex
014	M	Branco	33	GRAVE	103,00	92,00	67,00	90,00	Não	Negativo	17,60	Não
015	F	Branco	47	GRAVE	88,69	42,50	9,12	40,64	Sim	Positivo	70,40	Não
016	F	Branco	21	GRAVE	91,77	61,05	25,44	57,07	Sim	Positivo	63,70	Não
017	F	Branco	47	GRAVE	80,00	48,00	16,00	60,00	Não	Negativo	57,50	Ex
018	M	Branco	60	GRAVE	91,30	78,40	41,30	69,10	Sim	Positivo	N/A	Não
019	M	Branco	33	GRAVE	64,90	47,00	22,50	35,10	Sim	Positivo	1131,00	Não
020	F	Branco	58	GRAVE	49,20	42,93	24,32	71,54	Sim	Positivo	N/A	Não
021	F	Branco	53	GRAVE	62,99	38,46	16,28	50,85	Sim	Positivo	143,00	Não
022	F	Mulato	38	GRAVE	89,20	71,10	41,50	85,50	Sim	Positivo	N/A	Não

Paciente	Sexo	Etnia	Idade	Gravidade da doença	CVF (%previsto)	VEF1 (%previsto)	FEF 25-75% (%previsto)	VEF1/CVF (%observado)	Atópico	Teste cutâneo	IgE Total	Tabagista
023	F	Branco	50	GRAVE	76,23	28,71	6,48	32,26	Sim	Positivo	123,00	Não
024	F	Mulato	36	GRAVE	80,79	46,15	16,02	48,25	N/A	N/A	N/A	Ex
025	F	Branco	34	GRAVE	91,22	81,45	59,38	76,98	N/A	N/A	N/A	Não
026	M	Mulato	54	GRAVE	42,82	25,70	9,51	48,99	Sim	Positivo	137,00	Não
027	F	Negro	61	GRAVE	45,30	21,21	8,02	37,69	N/A	N/A	N/A	Não
028	F	Mulato	20	GRAVE	67,20	46,20	24,80	N/A	Sim	Positivo	690,00	Não
029	M	Branco	45	GRAVE	104,90	72,00	30,10	57,40	Não	Negativo	N/A	Ex
030	F	Branco	82	GRAVE	105,80	50,82	13,13	36,22	Não	Negativo	9,66	Não
031	F	Branco	37	GRAVE	94,50	56,60	25,90	51,60	N/A	N/A	N/A	Ex
032	M	Branco	47	GRAVE	91,00	48,45	21,16	46,99	Sim	Positivo	335,00	Não
033	M	Mulato	37	GRAVE	56,90	29,65	10,93	43,40	Sim	Positivo	N/A	Não
034	F	Branco	53	GRAVE	64,06	37,40	13,00	47,80	Sim	Negativo	198,00	Não
035	M	Branco	58	GRAVE	105,90	49,37	14,33	37,59	Sim	Positivo	N/A	Ex
036	M	Branco	33	GRAVE	106,40	97,83	78,35	76,33	Não	Negativo	N/A	Sim
037	M	Branco	34	GRAVE	100,00	74,00	40,00	59,00	Sim	Positivo	48,50	Não
038	F	Branco	54	GRAVE	74,33	50,45	20,11	55,05	Sim	Negativo	166,00	Ex
039	M	Branco	24	GRAVE	65,15	31,70	10,93	40,86	Não	N/A	17,50	Ex
040	F	Branco	53	GRAVE	82,00	76,00	44,00	93,00	Sim	Positivo	575,00	Não
041	F	Mulato	29	GRAVE	55,14	35,00	13,95	55,37	Sim	Positivo	391,00	Não
042	F	Branco	79	GRAVE	42,96	74,59	15,60	45,19	Não	Negativo	N/A	Ex
043	F	Branco	62	GRAVE	75,97	52,15	16,51	55,61	Sim	Positivo	2155,00	Não
044	F	Branco	37	GRAVE	80,40	64,23	32,69	69,01	Sim	Negativo	405,00	Não
045	F	Branco	26	GRAVE	85,95	59,74	26,43	59,94	Sim	Positivo	89,30	Não
046	M	Branco	57	GRAVE	77,86	56,45	21,74	58,53	Sim	Positivo	239,00	N/A
047	F	Branco	67	GRAVE	112,80	55,85	12,76	39,77	Não	Negativo	57,30	Ex
048	F	Branco	55	GRAVE	76,02	55,85	29,09	62,50	Sim	Negativo	1080,00	Sim

Paciente	Sexo	Etnia	Idade	Gravidade da doença	CVF (%previsto)	VEF1 (%previsto)	FEF 25-75% (%previsto)	VEF1/CVF (%observado)	Atópico	Teste cutâneo	IgE Total	Tabagista
049	F	Branco	46	LEVE	93,18	74,78	36,23	68,70	Sim	Positivo	N/A	Não
050	M	Branco	15	LEVE	105,00	99,22	79,38	80,83	N/A	N/A	N/A	Não
051	M	Branco	51	LEVE	107,10	90,38	61,06	69,46	Sim	Positivo	420,00	Não
052	F	Negro	74	GRAVE	63,00	37,44	8,12	45,93	Sim	Positivo	50,40	Não
053	F	Branco	64	GRAVE	42,90	42,90	12,50	60,00	Sim	Positivo	N/A	Não
054	F	Branco	34	LEVE	104,90	92,02	61,62	73,35	N/A	N/A	N/A	Não
055	F	Branco	67	LEVE	106,20	92,44	54,55	75,04	Sim	Negativo	101,00	Ex
056	F	Mulato	21	LEVE	81,00	73,00	47,00	73,00	N/A	N/A	N/A	Não
057	F	Branco	54	LEVE	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Sim
058	F	Branco	37	LEVE	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
059	F	Branco	46	LEVE	93,60	81,20	43,70	71,80	Sim	Positivo	27,90	Não
060	F	Branco	58	LEVE	77,80	90,30	49,10	N/A	Sim	Negativo	278,00	Não
061	F	Branco	22	LEVE	99,69	78,40	44,97	70,09	Sim	Positivo	467,00	Não
062	M	Negro	14	LEVE	N/A	N/A	N/A	N/A	Sim	Positivo	N/A	Não
063	F	Branco	34	LEVE	120,60	109,40	73,67	78,86	Sim	Positivo	N/A	Não
064	F	Branco	68	LEVE	90,44	82,41	56,28	72,36	Sim	Positivo	N/A	Não
065	F	Branco	56	LEVE	126,10	98,19	60,25	64,20	Sim	Positivo	N/A	Sim
066	F	Mulato	35	LEVE	101,90	87,96	61,68	74,15	Não	Negativo	N/A	Não
067	F	Branco	41	LEVE	104,70	65,68	23,86	52,82	Sim	Positivo	134,00	Ex
068	F	Branco	45	GRAVE	77,57	48,50	18,82	53,55	Sim	Positivo	386,00	Não
069	F	Branco	50	LEVE	90,90	106,00	113,90	100,80	Sim	Positivo	685,00	Não
070	F	Branco	46	LEVE	123,10	84,98	33,81	57,64	Sim	N/A	N/A	Ex
071	F	Negro	36	GRAVE	53,60	41,90	25,30	28,20	Sim	Positivo	N/A	Sim
072	F	Branco	72	GRAVE	61,90	52,30	35,70	27,90	Sim	Positivo	27,70	Sim
073	F	Mulato	21	LEVE	97,90	89,70	66,80	95,90	Sim	Positivo	N/A	N/A
074	F	Branco	38	LEVE	112,20	87,50	42,25	65,40	N/A	N/A	N/A	Não

Paciente	Sexo	Etnia	Idade	Gravidade da doença	CVF (%previsto)	VEF1 (%previsto)	FEF 25-75% (%previsto)	VEF1/CVF (%observado)	Atópico	Teste cutâneo	IgE Total	Tabagista
075	F	Branco	28	GRAVE	76,08	41,14	15,14	46,59	Sim	Positivo	N/A	Não
076	F	Branco	54	MODERADA	111,80	104,40	87,98	78,18	N/A	N/A	N/A	Não
077	F	Branco	24	MODERADA	80,77	51,18	18,73	55,68	N/A	N/A	N/A	Não
078	M	Branco	38	MODERADA	75,90	63,70	42,20	62,50	Sim	Positivo	122,00	Sim
079	M	Branco	44	MODERADA	99,00	75,00	40,00	59,00	Sim	Positivo	N/A	Ex
080	F	Mulato	21	MODERADA	95,50	89,49	69,40	83,02	Sim	Positivo	N/A	Não
081	F	Branco	48	MODERADA	113,20	70,85	25,45	52,40	Não	Negativo	97,10	Sim
082	F	Branco	33	MODERADA	75,20	56,52	30,53	63,19	Sim	Positivo	103,00	Não
083	F	Branco	77	GRAVE	83,75	51,66	17,20	46,98	Sim	N/A	509,00	Não
084	F	Branco	49	GRAVE	86,27	55,23	22,22	53,88	Sim	Positivo	63,00	Não
085	F	Branco	21	MODERADA	81,94	66,67	39,28	70,29	Sim	Positivo	621,00	Não
086	F	Negro	36	MODERADA	98,43	80,15	52,68	69,65	Não	Negativo	N/A	Não
087	F	Branco	72	MODERADA	90,69	65,98	26,98	57,14	Não	Negativo	N/A	Não
088	F	Branco	57	MODERADA	112,00	108,00	71,00	97,00	Sim	Positivo	163,00	Não
089	F	Branco	64	MODERADA	92,75	72,17	31,82	62,96	Sim	Positivo	85,20	Não
090	M	Branco	53	MODERADA	86,00	85,00	69,00	99,00	Sim	Positivo	7,06	Ex
091	F	Branco	71	MODERADA	100,00	65,75	22,22	52,46	Sim	Positivo	40,30	Não
092	F	Mulato	54	LEVE	72,00	70,50	57,20	69,00	Sim	Positivo	170,00	Não
093	F	Negro	68	GRAVE	69,95	34,68	13,51	40,27	Não	N/A	97,20	Não
094	M	Negro	46	GRAVE	62,60	58,20	45,50	53,90	Sim	Positivo	45,10	Ex
095	M	Branco	75	GRAVE	88,86	52,26	19,08	46,15	Sim	Positivo	6340,00	Sim
096	M	Branco	39	LEVE	93,56	80,77	56,91	72,22	Sim	Positivo	N/A	Ex
097	M	Branco	81	LEVE	103,10	93,91	57,93	70,62	Sim	Positivo	326,00	Ex
098	F	Negro	56	GRAVE	90,00	107,00	98,00	119,00	Sim	Postivo	124,00	Não
099	F	Negro	51	MODERADA	115,20	98,70	61,72	71,47	Sim	Positivo	3010,00	Não
100	F	Mulato	39	MODERADA	88,00	69,20	35,46	66,78	Sim	Positivo	128,00	Não

Paciente	Sexo	Etnia	Idade	Gravidade da doença	CVF (%previsto)	VEF1 (%previsto)	FEF 25-75% (%previsto)	VEF1/CVF (%observado)	Atópico	Teste cutâneo	IgE Total	Tabagista
101	F	Branco	46	LEVE	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não
102	F	Branco	40	GRAVE	55,00	30,17	4,48	35,96	Sim	Positivo	392,00	Não
103	F	Branco	46	LEVE	100,00	96,70	86,50	91,50	Sim	Positivo	N/A	Não
104	F	Branco	23	MODERADA	77,68	50,83	21,15	57,09	Sim	Positivo	813,00	Não
105	M	Branco	57	LEVE	124,30	112,90	88,55	73,43	Sim	Positivo	N/A	Ex
106	F	Branco	47	MODERADA	65,90	57,20	38,30	54,80	Sim	Positivo	364,00	Não
107	M	Branco	47	GRAVE	58,80	44,80	22,90	64,30	Sim	Positivo	1235,00	Ex
108	F	Branco	19	LEVE	98,64	88,20	69,07	78,24	N/A	N/A	N/A	Não
109	F	Branco	51	GRAVE	79,01	46,36	16,53	49,28	Sim	Positivo	159,00	Não
110	F	Branco	71	LEVE	102,00	90,77	47,42	70,52	N/A	N/A	N/A	Não
111	M	Branco	65	GRAVE	99,00	95,00	57,00	67,00	Não	Negativo	25,80	Ex
112	M	Branco	15	LEVE	80,70	64,40	37,50	69,30	Sim	Positivo	4396,00	Não
113	M	Branco	57	GRAVE	68,50	55,40	45,00	28,80	Sim	Positivo	N/A	Ex
114	M	Branco	13	MODERADA	90,90	87,90	75,40	100,20	Sim	Positivo	255,00	Não
115	F	Branco	9	LEVE	103,40	104,40	94,10	91,70	Sim	Positivo	N/A	Não
116	F	Branco	16	MODERADA	82,10	72,50	55,00	50,20	Sim	Positivo	N/A	Não
117	F	Branco	77	MODERADA	99,19	63,68	21,02	49,59	Sim	Positivo	11,90	Não
118	M	Branco	64	GRAVE	64,20	40,00	17,30	36,20	Sim	Positivo	12,10	Ex

M: Masculino; F: Feminino, CVF: Capacidade Vital Forçada; VEF1: Fluxo expiratório no primeiro segundo; FEF 25-75%: Fluxo expiratório forçado médio; N/A: Informação não consta nos registros médicos;

TABELA 9 BANCO DE GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS DA 3'UTR DO GENE *HLA-G* DE CADA PACIENTE.

Paciente	14bp	3001	3003	3010	3027	3035	3142	3187	3196	Haplótipo 01	Haplótipo 02	pPHASE	pPL-EM
001	ID	CC	CT	GG	CC	CT	CG	AA	CC	ICTGCTGAC	UTR-4	0,9948	0,9997
002	II	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	GG	UTR-2	UTR-2	1,0000	1,0000
003	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-8	UTR-1	0,9993	1,0000
004	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-8	UTR-1	0,9993	1,0000
005	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
006	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
007	ID	CT	TT	GG	CC	CT	CG	AA	CC	**	**	**	**
008	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CC	UTR-1	DCTGCCGAC	0,9901	1,0000
009	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-8	UTR-1	0,9993	1,0000
010	ID	CC	TT	CG	CC	CT	CG	AG	CC	UTR-5	UTR-1	0,9960	1,0000
011	ID	CC	CT	GG	CC	CT	CG	AA	CC	ICTGCTGAC	UTR-4	0,9948	0,9997
012	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-8	UTR-6	0,9990	1,0000
013	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CC	ICTCCCGAC	UTR-1	0,7852	0,8608
014	DD	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CC	UTR-1	UTR-3	0,9890	0,9917
015	DD	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CC	UTR-1	UTR-3	0,9890	0,9917
016	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CC	AA	CG	ICTCCCCAG	UTR-6	0,9952	1,0000
017	DD	CC	CC	GG	CC	CC	CC	AA	CC	UTR-4	UTR-4	1,0000	1,0000
018	II	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	GG	UTR-2	UTR-2	1,0000	1,0000
019	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-4	UTR-1	0,9970	1,0000
020	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-4	UTR-1	0,9970	1,0000
021	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
022	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CG	AA	CC	UTR-4	DCTGCCGAC	0,9719	1,0000
023	ID	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-13	0,4991	0,6310
024	DD	CC	CC	GG	CC	CC	CC	AA	CC	UTR-4	UTR-4	1,0000	1,0000
025	DD	CC	CT	CG	CC	CC	CG	AA	CC	UTR-4	UTR-3	0,9990	1,0000

Paciente	14bp	3001	3003	3010	3027	3035	3142	3187	3196	Haplótipo 01	Haplótipo 02	pPHASE	pPL-EM
026	ID	CC	TT	CG	CC	CT	CG	AG	CC	UTR-5	UTR-1	0,9960	1,0000
027	ID	CC	CT	GG	CC	CT	CG	AA	CC	ICTGCTGAC	UTR-4	0,9946	0,9997
028	II	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	GG	UTR-2	UTR-2	1,0000	1,0000
029	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-8	UTR-1	0,9993	1,0000
031	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-8	UTR-1	0,9993	1,0000
032	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-8	UTR-6	0,9990	1,0000
033	ID	CC	TT	CG	AC	CT	CG	AG	CC	UTR-7	UTR-1	0,9531	0,9974
034	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-8	UTR-1	0,9993	1,0000
035	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-6	UTR-1	1,0000	1,0000
036	II	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-5	0,9990	1,0000
037	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
038	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
039	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
040	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-2	UTR-6	0,9469	0,9576
041	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
042	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
043	DD	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CC	UTR-3	UTR-3	1,0000	1,0000
044	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-2	UTR-6	0,9469	0,9576
045	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CC	UTR-1	DCTGCCGAC	0,9901	1,0000
046	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CC	AA	CC	UTR-6	UTR-6	1,0000	1,0000
047	II	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-5	0,9990	1,0000
048	II	CC	TT	CC	CC	TT	GG	AA	CC	UTR-5	UTR-5	1,0000	1,0000
049	ID	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CC	UTR-5	UTR-3	0,9930	0,9952
050	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
051	II	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-5	0,9990	1,0000
052	ID	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CC	UTR-5	UTR-3	0,9930	0,9952
053	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-4	UTR-1	0,9970	1,0000

Paciente	14bp	3001	3003	3010	3027	3035	3142	3187	3196	Haplótipo 01	Haplótipo 02	pPHASE	pPL-EM
054	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CC	GG	CC	UTR-1	UTR-1	1,0000	1,0000
055	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AA	CC	UTR-4	UTR-6	1,0000	1,0000
056	II	CC	TT	CC	CC	CT	CC	AA	CG	ICTCCCCAG	ICTCCTCAC	0,9989	1,0000
057	ID	CC	TT	CC	CC	CT	CC	AA	CC	ICTCCTCAC	DCTCCCCAC	0,9895	1,0000
059	ID	CC	TT	CC	CC	CT	CC	AA	CC	ICTCCTCAC	DCTCCCCAC	0,9894	1,0000
060	ID	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CC	UTR-5	UTR-3	0,9930	0,9952
061	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-2	UTR-6	0,9468	0,9576
062	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-2	UTR-6	0,9468	0,9576
063	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
064	ID	CC	TT	CG	CC	CT	CG	AG	CC	UTR-5	UTR-1	0,9960	1,0000
065	DD	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CC	UTR-3	UTR-3	1,0000	1,0000
066	II	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	GG	UTR-2	UTR-2	1,0000	1,0000
067	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
068	DD	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CC	UTR-3	UTR-3	1,0000	1,0000
069	ID	CC	TT	GG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-8	UTR-1	0,9993	1,0000
070	ID	CC	TT	CG	AC	CT	CG	AA	CC	UTR-7	UTR-6	0,9897	0,9988
071	II	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-5	0,9990	1,0000
072	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
073	ID	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CC	UTR-5	UTR-3	0,9930	0,9952
074	DD	CC	CT	CG	CC	CC	CG	AA	CC	UTR-4	UTR-3	0,9990	1,0000
075	DD	CC	CT	CG	CC	CC	CG	AA	CC	UTR-4	UTR-3	0,9990	1,0000
076	DD	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CC	UTR-1	UTR-3	0,9890	0,9917
077	ID	CC	TT	CG	CC	CT	CG	AG	CC	UTR-5	UTR-1	0,9960	1,0000
078	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CC	GG	CC	UTR-1	UTR-1	1,0000	1,0000
079	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
080	II	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	GG	UTR-2	UTR-2	1,0000	1,0000
081	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972

Paciente	14bp	3001	3003	3010	3027	3035	3142	3187	3196	Haplótipo 01	Haplótipo 02	pPHASE	pPL-EM
082	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
083	II	CC	TT	CC	AC	CT	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-5	0,9990	1,0000
084	II	CC	TT	CC	CC	CC	CC	AA	GG	ICTCCCCAG	ICTCCCCAG	1,0000	1,0000
085	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
086	ID	CC	CT	CG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-2	UTR-4	0,9989	1,0000
087	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	ICTCACGAG	UTR-1	0,5128	0,9701
088	ID	CC	CT	CG	AC	CT	CG	AA	CC	UTR-7	UTR-4	0,9959	1,0000
089	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
090	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-4	UTR-1	0,9970	1,0000
091	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
092	ID	CC	TT	CG	CC	CT	CG	AG	CC	UTR-5	UTR-1	0,9960	1,0000
093	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CC	GG	CC	UTR-1	UTR-1	1,0000	1,0000
094	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
095	DD	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CC	UTR-1	UTR-3	0,9890	0,9917
096	DD	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	GG	UTR-10	UTR-10	1,0000	1,0000
097	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
098	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
099	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
100	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-4	UTR-1	0,9970	1,0000
101	II	CC	TT	CC	AC	CT	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-7	0,9475	0,9213
102	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-4	UTR-1	0,9970	1,0000
103	ID	CT	TT	CG	CC	CT	CG	AG	CC	**	**	**	**
104	ID	CC	TT	CG	AC	CT	CG	AA	CC	UTR-7	UTR-6	0,9897	0,9988
105	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	GG	CC	ICTCCCGGC	DCTCCCGGC	1,0000	1,0000
106	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
107	ID	CC	TT	CC	CC	CC	GG	AA	CG	UTR-2	UTR-3	0,9950	0,9972
108	II	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CC	ICTCCCGAC	UTR-5	1,0000	1,0000

Paciente	14bp	3001	3003	3010	3027	3035	3142	3187	3196	Haplótipo 01	Haplótipo 02	pPHASE	pPL-EM
109	DD	CC	TT	CG	CC	CC	CC	AG	CG	UTR-1	DCTCCCCAG	0,9036	1,0000
110	ID	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CC	UTR-5	UTR-3	0,9930	0,9952
111	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
112	DD	CC	TT	CC	CC	CT	GG	AA	CC	UTR-3	UTR-13	1,0000	1,0000
113	DD	CC	CT	GG	CC	CC	CC	AG	CC	UTR-4	UTR-1	0,9970	1,0000
114	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CG	UTR-2	UTR-1	0,9980	1,0000
115	DD	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AG	CC	UTR-1	UTR-3	0,9890	0,9917
116	DD	CC	CC	GG	CC	CC	CC	AA	CC	UTR-4	UTR-4	1,0000	1,0000
117	ID	CC	TT	CG	CC	CC	CG	AA	CG	UTR-2	UTR-6	0,9469	0,9576
118	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CC	GG	CC	UTR-1	UTR-1	1,0000	1,0000
119	DD	CC	TT	GG	CC	CC	CC	GG	CC	UTR-1	UTR-1	1,0000	1,0000
120	ID	CC	TT	CG	CC	CT	CG	AG	CC	UTR-5	UTR-1	0,9960	1,0000

** Pacientes não tiveram seu par de haplótipos inferido de maneira consensual pelo PHASE e PL-EM (Ver resultados pág.50)

Pacientes 30 e 58 não tinham amostras de DNA suficientes para os experimentos.

APÊNDICE II

TABELA 10 PROBABILIDADES DO TESTE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD) PARA OS SÍTIOS POLIMÓRFICOS DETECTADOS DA 3'UTR DO *HLA-G* NA POPULAÇÃO GERAL DE PACIENTES ASMÁTICOS:

SNPs	14 pb D/I	+3001 C/T	+3003 C/T	+3010 C/G	+3027 A/C	+3035 C/T	+3142 C/G	+3187 A/G	+3196 C/G
14 pb D/I	-								
+3001 C/T	0,38116	-							
+3003 C/T	0,00001	0,52096	-						
+3010 C/G	0,00000	0,18924	0,00000	-					
+3027 A/G	0,07345	0,94959	0,90206	0,36336	-				
+3035 C/T	0,00000	0,02420	0,15555	0,00223	0,00035	-			
+3142 C/G	0,00000	0,45189	0,00000	0,00000	0,48249	0,01289	-		
+3187 A/G	0,00000	0,96127	0,05171	0,00000	0,37147	0,00209	0,00000	-	
+3196 C/G	0,00000	0,25081	0,00013	0,00001	0,21589	0,00026	0,00000	0,00011	-

LD: Desequilíbrio de ligação (ARLEQUIN 3.5.1.2); $P \leq 0,05$ (LD positivo entre os SNPs em negrito).

TABELA 11: PROBABILIDADES DO TESTE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD) PARA OS SÍTIOS POLIMÓRFICOS DETECTADOS DA 3'UTR DO *HLA-G* NA POPULAÇÃO GERAL DE PACIENTES ASMÁTICOS GRAVES:

SNPs	14 pb D/I	+3001 C/T	+3003 C/T	+3010 C/G	+3027 A/C	+3035 C/T	+3142 C/G	+3187 A/G	+3196 C/G
14 pb D/I	-								
+3001 C/T	0,45113	-							
+3003 C/T	0,00090	0,61048	-						
+3010 C/G	0,00008	0,28641	0,00008	-					
+3027 A/G	0,18205	0,82989	0,37567	0,32427	-				
+3035 C/T	0,00001	0,10371	0,35087	0,06393	0,00406	-			
+3142 C/G	0,00000	0,71467	0,00004	0,00000	0,50045	0,00148	-		
+3187 A/G	0,00032	0,44713	0,08383	0,00000	0,54688	0,03718	0,00000	-	
+3196 C/G	0,00000	0,43144	0,00236	0,00099	0,17106	0,00487	0,00006	0,01393	-

LD: Desequilíbrio de ligação (ARLEQUIN 3.5.1.2); $P \leq 0,05$ (LD positivo entre os SNPs em negrito)

TABELA 12: PROBABILIDADE DO TESTE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD) PARA OS SÍTIOS POLIMÓRFICOS DETECTADOS NA 3'UTR DO *HLA-G* NA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM ASMA LEVE OU MODERADA:

SNPs	14 pb D/I	+3001 C/T	+3003 C/T	+3010 C/G	+3027 A/C	+3035 C/T	+3142 C/G	+3187 A/G	+3196 C/G
14 pb D/I	-								
+3001 C/T	0,67886	-							
+3003 C/T	0,00549	0,70822	-						
+3010 C/G	0,00000	0,35100	0,00019	-					
+3027 A/G	0,18665	0,97101	0,41636	0,59686	-				
+3035 C/T	0,00453	0,12045	0,30723	0,00356	0,02253	-			
+3142 C/G	0,00073	0,48380	0,00089	0,00000	0,43192	0,36942	-		
+3187 A/G	0,00044	0,20891	0,30560	0,00000	0,44916	0,02426	0,00000	-	
+3196 C/G	0,00000	0,39879	0,02302	0,00235	0,57215	0,01805	0,01329	0,00300	-

LD: Desequilíbrio de ligação (ARLEQUIN 3.5.1.2); $P \leq 0,05$ (LD positivo entre os SNPs em negrito)

TABELA 13: PROBABILIDADE DO TESTE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD) PARA OS SÍTIOS POLIMÓRFICOS DETECTADOS NA 3'UTR DO *HLA-G* NA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS:

SNPs	14 pb D/I	+3001 C/T	+3003 C/T	+3010 C/G	+3027 A/C	+3035 C/T	+3142 C/G	+3187 A/G	+3196 C/G
14 pb D/I	-								
+3001 C/T	-1,0000	-							
+3003 C/T	0,00000	0,00000	-						
+3010 C/G	0,00000	0,00000	0,00000	-					
+3027 A/G	0,00000	0,00000	0,28738	0,00002	-				
+3035 C/T	0,00000	0,00000	0,00926	0,00000	0,00000	-			
+3142 C/G	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000	-		
+3187 A/G	0,00000	0,00000	0,00063	0,00000	0,00087	0,00000	0,00000	-	
+3196 C/G	0,00000	0,00000	0,00102	0,00000	0,63594	0,04314	0,00000	0,00000	-

LD: Desequilíbrio de ligação (ARLEQUIN 3.5.1.2); $P \leq 0,05$ (LD positivo entre os SNPs em negrito)

*Sítio monomórfico.

Anexos

ANEXO I

Certificado de Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa do HCRP-USP

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO					
Ofício nº 2515/2014 CEP/MGV	Ribeirão Preto, 24 de julho de 2014					
<u>PROCESSO HCRP nº 6323/2011</u> "SÍTIOS POLIMÓRFICOS DO GENE HLA-G NA ASMA BRÔNQUICA"						
Prezado Senhor,						
O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 390ª Reunião Ordinária, realizada em 21/07/2014, tomou ciência do relatório parcial do projeto de pesquisa acima citado, bem como analisou e aprovou a emenda ao projeto de pesquisa solicitando a inclusão da aluna CINTHIA CAROLINE ALVES como pesquisadora responsável em substituição da pesquisadora BEATRIZ JUNQUEIRA DE AQUINO.						
Atenciosamente,						
DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP						
Ilustríssimo Senhor PROF.DR. EDUARDO ANTÔNIO DONADI Depto. de Clínica Médica						
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; text-align: right;"> Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440 (16) 3602-2228 cep@hcrp.usp.br </td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center; padding-top: 10px;"> www.hcrp.usp.br </td> </tr> </table>			Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP	Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440 (16) 3602-2228 cep@hcrp.usp.br	www.hcrp.usp.br	
Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP	Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440 (16) 3602-2228 cep@hcrp.usp.br					
www.hcrp.usp.br						

ANEXO II

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre – Fone: 602-1000 – Fax: 633-1144

CEP 14048-900 Ribeirão Preto - São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto de pesquisa: “Polimorfismos do Gene de Resistência Múltipla a Drogas-1 (MDR-1) e dos Microssatélites do TNF em Pacientes com Asma Grave”

Pesquisador responsável: Luiz Otávio de Oliveira Guideroli

Departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

ESCLARECIMENTO AO PACIENTE DA PESQUISA

Prezado Sr/Sra,

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo intitulado Polimorfismos do Gene de Resistência Múltipla às Drogas-1 (MDR1) e dos Microssatélites do TNF em Pacientes com Asma Brônquica Grave. Antes de decidir se quer participar, é importante que o (a) senhor (a) entenda a razão desse estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos. Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto e faça qualquer pergunta se tiver dúvidas.

A asma é uma doença crônica do pulmão que causa falta de ar, tosse crônica e chiadeira no peito, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã. Pacientes com asma leve apresentam poucas crises de falta de ar e chiadeira no peito, enquanto que, pacientes com asma grave apresentam crises mais frequentes de falta de ar e chiadeira, mesmo quando tratados adequadamente pelos médicos. Nesse estudo, estamos avaliando os fatores que podem causar as formas graves de asma. Para realizar esse estudo, precisamos colher cerca de 20 ml de sangue (correspondente à cerca de uma colher das de sopa) de pacientes com asma leve ou asma grave. Os desconfortos relacionados com essa pesquisa são referentes à picada da agulha para retirar o sangue. Os benefícios estão relacionados com a possível melhora do entendimento dos fatores que facilitam o desenvolvimento da asma grave e, assim, possivelmente, poder prevenir o aparecimento das crises graves.

Caso o Sr (a) concorde em participar do estudo serão utilizadas informações constantes no seu prontuário médico, sobre a sua doença e dos resultados de exames laboratoriais. Contudo seu nome não será incluído, pois o senhor (a) receberá um número de identificação para representá-lo.

O Sr (a) poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento sem que essa decisão prejudique o seu acompanhamento ou o seu tratamento nesse hospital.

Caso haja algum dano decorrente do estudo o Sr (a) terá assegurado os direitos à indenização conforme as leis vigentes no país.

Eu,.....

(nome do paciente em letra de forma)

li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre minha participação no presente estudo e tive a oportunidade de discutir e tirar dúvidas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo voluntariamente em participar do presente estudo. Entendo que receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

Autorizo a divulgação dos resultados dos meus exames, sem que meu nome seja identificado. Entendi que toda informação que eu fornecer será processada e analisada de maneira confidencial.

PACIENTE

.....
Nome

.....
Data   Assinatura

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

.....
Nome

Telefones: (16) 3602-2622/639-4774 ou 81150658

.....
Data   Assinatura

Se aplicável,

TTESTEMUNHA (1): Eu testemunhei a explicação e o propósito deste estudo para o paciente acima denominado.

.....

Nome

.....

Data

Assinatura

TTESTEMUNHA (2): Eu testemunhei a explicação e o propósito deste estudo para o paciente acima denominado.

.....

Nome

.....

Data

Assinatura

ANEXO III

EXTRAÇÃO DNA – MÉTODO “SALTING-OUT”

- 1- Coletar 10 ml de sangue com EDTA como anticoagulante. Não utilizar sangue heparinizado.
- 2- Transferir o sangue total para um tubo de 50 ml e adicionar o **tampão de lise I** gelado, até o volume final de 50 ml. Misturar e centrifugar por 5 minutos a 2400g.
- 3- Derramar cuidadosamente o sobrenadante e ressuspender o precipitado em:
4,5ml de tampão de lise II
125ul SDS 10%
1,1 ml de perclorato de sódio 5,0M
Agitar vigorosamente por 10 segundos, a temperatura ambiente.
- 4- Para extração de proteínas, adicionar 2 ml de NaCl 6M e agitar vigorosamente, por 15 seg. Centrifugar por 5 min., a 2400g, a temperatura ambiente.
- 5- Cuidadosamente, derramar o sobrenadante num tubo de 50 ml, limpo evitando o “pellet”. Adicionar 7 ml de **isopropanol absoluto**. Fechar o tubo e misturar gentilmente.
- 6- Remover o DNA precipitado com uma pipeta Pasteur selada e retirar o excesso de isopropanol.
- 7- Lavar duas vezes o DNA com **etanol a 70%** e redissolve-lo em 100 a 300ul de água.
- 8- Quantificar o DNA em 260nm(UV), diluído 1/100. Se necessário, ajustar a concentração do DNA para 0,5 a 1,0 ug/ul com água.

Reagentes:

1- TAMPÃO DE LISE I

0,3M SACAROSE

10Mm TRIS-HCL (ph7, 5)

5Mm MgCl

TRITON X-100 1% (PM= 646,87 g/mol)

ESTOCAR EM LOCAL ESCURO, A 4°C.

PARA 1 LITRO DE SOLUÇÃO PESAR:

- 1) 1,21g DE TRIS-BASE E ADICIONAR +OU - 800 ml DE ÁGUA DESTILADA E AUTOCLAVADA EM UM BEQUER, DISSOLVER E ACERTAR O ph PARA 7,5 COM ÁCIDO CLORÍDRICO FUMEGANTE.
- 2) 102,69g DE SACAROSE
- 3) 0,48g DE MgCl
- 4) 10 ml DE TRITON-X

-Após acertar o ph da solução, colocar toda a solução num balão volumétrico e completar com água até a marca de aferição (1litro).

-Passar + ou – 700 ml da solução para um béquer junto com a sacarose e com o MgCl.

-A solução que sobrar no balão volumétrico, reservar num frasco.

-Deixar homogeneizar até dissolver, passar a solução para um balão volumétrico, colocar o TRITON-X e completar com a solução de ph 7,5 que estava reservada até a marca de aferição.

-Homogeneizar novamente, colocar em frascos cobertos por papel alumínio e colocar na geladeira.

2- TAMPÃO DE LISE II

0,075M NaCl

0,024M Na-EDTA

AJUSTAR O ph EM 8,0 COM NaOH, E ESTOCAR A TEMPERATURA AMBIENTE.

PARA 1 LITRO DE SOLUÇÃO PESAR:

- 1) 4,35g DE NaCl
- 2) 8,92g DE Na-EDTA

Colocar os dois reagentes num béquer com + ou – 700 ml de água destilada e autoclavada, acertar o ph para 8,0 com NaOH, passar a solução para um balão volumétrico e acertar o volume com água até a marca de aferição (1 litro).

3- SDS A 10%

ESTOCAR A TEMPERATURA AMBIENTE

PARA 1 LITRO DE SOLUÇÃO PESAR:

100g DE SDS, COM 800 ml de água destilada e autoclavada, aquecer a 68°C overnight, ajustar na manhã seguinte o ph para 7,2 (poucas gotas de HCl concentrado) e ajustar o volume para 1 litro.

4- PERCLORATO DE SÓDIO 5.0M

ESTOCAR A TEMPERATURA AMBIENTE

PARA CADA 1 LITRO DE SOLUÇÃO PESAR:

702g DE PERCLORATO, COLOCAR NUM BALÃO VOLUMÉTRICO E COMPLETAR PARA 1 LITRO DE ÁGUA AUTOCLAVADA E DESTILADA.

5- NaCl 6,0M (SATURADO)

ESTOCAR A TEMPERATURA AMBIENTE

PARA CADA 1 LITRO DE ÁGUA PESAR 351g DE NaCl. COLOCAR O SAL NUM BALÃO VOLUMÉTRICO E COMPLETAR COM ÁGUA ATÉ A MARCA DE AFERIÇÃO.

OBS: O VOLUME FICARÁ MENOR QUE 1 LITRO, POIS A SOLUÇÃO SUPER SATURADA (O SAL) IRÁ ABSORVER A ÁGUA.