UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VALDEMIR PEREIRA DE SOUSA

ASSOCIAÇÃO DO SNP C79G DO GENE *ADRB2* COM PARÂMETROS CLÍNICOS, DE FUNÇÃO PULMONAR E DE GRAVIDADE DA ASMA

VITÓRIA, ES

2019

VALDEMIR PEREIRA DE SOUSA

ASSOCIAÇÃO DO SNP C79G DO GENE *ADRB2* COM PARÂMETROS CLÍNICOS, DE FUNÇÃO PULMONAR E DE GRAVIDADE DA ASMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Drª Flávia Imbroisi Valle Errera

VITÓRIA, ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

Sousa, Valdemir Pereira de, 1979-
S725a Associação do SNP C79G do gene ADRB2 com parâmetros clínicos, de função pulmonar e de gravidade da asma / Valdemir Pereira de Sousa. - 2019.
70 f. : il.

Orientadora: Flávia Imbroisi Valle Errera.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Asma. 2. Gene. 3. ADRB2. 4. SNP. 5. C79G. 6. Gln27Glu. I. Errera, Flávia Imbroisi Valle. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

VALDEMIR PEREIRA DE SOUSA

ASSOCIAÇÃO DO SNP C79G DO GENE *ADRB2* COM PARÂMETROS CLÍNICOS, DE FUNÇÃO PULMONAR E DE GRAVIDADE DA ASMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

05 de junho de 2019.

Prof. Dr.ª Flávia Imbroisi Valle Errera
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr.ª Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno

Prof. Dr. Michel Satya Naslavsky
Universidade de São Paulo
Membro externo

VITÓRIA, ES

2019

DEDICATÓRIA

Aos três pilares da minha felicidade: minha amada, parceira, carinhosa e cúmplice esposa *Priscila Rosseto de Souza*, meu brilhante filho *João Pedro Rosseto de Sousa* e meu caçula-pimentinha *Vicente Rosseto de Sousa*.

AGRADECIMENTOS

Este foi um trabalho que exigiu muito esforço e dedicação, com a participação de muitas mãos e, principalmente, de muitas mentes. Inevitavelmente, envolveu muitas pessoas e instituições às quais sou imensamente grato por toda a contribuição que deram para torná-lo exequível. Deixo aqui, portanto, os meus mais sinceros agradecimentos:

à minha orientadora Flávia I.V. Errera, por me aceitar como orientando, por ser uma professora paciente, preocupada em abrir portas e, especialmente, por compartilhar comigo um pouco de seu conhecimento científico. Muito obrigado!

Aos alunos de iniciação científica: Bruna Anjos, Bruno Marcarini, Fabiano Barcellos, Gabriela Devens, Letícia Louzada, Henrique Sara e Mateus Possati. Todos trabalharam duro em várias etapas dessa pesquisa. Aprendi muito com todos vocês e espero um dia retribuir a toda cooperação que recebi.

Aos parceiros de laboratório e de pós-graduação: Estevão Barcelos, Iara Almeida, Laís Bridi, Paola Sossai e Simone Rodrigues, com quem pude trocar experiências, conhecimentos e angústias de pós-graduandos.

À professora Lucia H. S. Pimassoni por sua incomensurável contribuição com as análises estatísticas e por tentar abrir espaços em sua agenda apertada para me atender.

À Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM) e aos seus funcionários, em especial à Luciana e ao Luiz, pelo período em que pude utilizar as instalações do *Centro de Pesquisa Tesis* na condução do nosso trabalho.

Aos funcionários do HSCMV que sempre tentaram facilitar o meu acesso aos dados dos pacientes. Particularmente à Ana Paula, técnica da espirometria, por diversas vezes abdicar de sua sala para que eu pudesse trabalhar e à Michelly Filleti por sempre tentar arrumar um espaço para que eu pudesse me dedicar na compilação dos dados.

Aos médicos Faradiba S. Serpa e Firmino B. Neto pela parceria e condução dos seus pacientes para o nosso estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da UFES, e aos seus professores, pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional. Um especial agradecimento à secretária do programa, Miriam Assis, por sempre estar disposta a nos ajudar de alguma maneira.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e, particularmente, à FAPES, pelo apoio financeiro ao nosso projeto.

Por fim, um especial agradecimento a um amigo que, com um modesto presente, me fez desejar retornar para minha vocação: a Ciência. Obrigado ao amigo Mardoqueu de Oliveira Neto pelo livro de 10,00 reais!

Em algum lugar,
alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.

Carl Sagan

RESUMO

SOUSA, V.P. **ASSOCIAÇÃO DO SNP C79G DO GENE *ADRB2* COM PARÂMETROS CLÍNICOS, DE FUNÇÃO PULMONAR E DE GRAVIDADE DA ASMA.** 2019. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A asma está entre as doenças crônicas mais comuns em todo o mundo e é uma síndrome complexa e heterogênea. Contudo, não existem testes laboratoriais específicos para o diagnóstico ou prognóstico da asma até o momento. Nos últimos anos uma contribuição genética importante tem sido estabelecida e muitos estudos tentam elucidar os mecanismos moleculares que conduzem ao seu desenvolvimento e aos quadros clínicos de gravidade. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) C79G (rs1042714) do gene do receptor do beta-adrenérgico (*ADRB2*) tem sido relatado como relevante para uma suscetibilidade aumentada à asma, sua gravidade e à heterogeneidade da resposta ao tratamento com broncodilatadores. O objetivo desse estudo é verificar se o SNP C79G do gene *ADRB2* está associado a um conjunto de variáveis clínicas dos fenótipos de asma, com a reversibilidade da obstrução brônquica, função pulmonar e com diagnósticos de gravidade da doença (asma leve, moderada e grave). Foram entrevistados 313 pacientes com diagnóstico de asma do Ambulatório de Asma de um Hospital filantrópico de Vitória-ES. Além de dados sociodemográficos, da história familial dos pacientes, foram reunidos dados antropométricos, de diagnóstico, de gravidade da asma, comorbidades, resultados de espirometria, exames bioquímicos e testes cutâneos. O DNA dos pacientes foi obtido a partir de amostras de sangue periférico. A análise do polimorfismo C79G do gene *ADRB2* foi realizada para 281 pacientes, usando a reação em cadeia da polimerase alelo-específica (ARMS-PCR). As análises conduzidas não revelaram evidência de associação dos genótipos de C79G com as variáveis clínicas investigadas. Embora essa associação seja positiva em diversos estudos, ainda há muitas controvérsias e um número expressivo de estudos, incluindo meta-análises, com resultados negativos que apoiam os resultados apresentados nesse estudo. Os dados apresentados deixam evidente que ainda não existe um consenso sobre o papel desempenhado pelo SNP C79G com a gravidade da doença ou com a resposta farmacogenética.

Palavras-chave: Asma. Gene. *ADRB2*. SNP. C79G. Gln27Glu.

ABSTRACT

SOUSA, V.P. **ASSOCIATION OF C79G SNP, GENE *ADRB2*, WITH CLINICAL PARAMETERS, PULMONARY FUNCTION AND ASTHMA SEVERITY**. 2019. 60f. (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Asthma is among the most common chronic diseases worldwide and is a complex and heterogeneous syndrome. However, there are no specific laboratory tests for the diagnosis or prognosis of asthma to date. In recent years an important genetic contribution has been established and many studies have attempted to elucidate the molecular mechanisms that lead to its development and clinical severity. The single nucleotide polymorphism (SNP) C79G (rs1042714) of the beta-adrenergic receptor gene (*ADRB2*) has been reported to be relevant for increased susceptibility to asthma, its severity, and the heterogeneity of response to bronchodilator treatment. The aim of this study is to verify whether *ADRB2* gene SNP C79G is associated with a set of clinical variables of asthma phenotypes, reversibility of bronchial obstruction, pulmonary function, and diagnoses of disease severity (mild, moderate and severe asthma). We interviewed 313 patients diagnosed with asthma at the Asthma Ambulatory of a philanthropic hospital in Vitória-ES. In addition to sociodemographic data, family history of the patients, anthropometric, diagnostic, asthma severity, comorbidities, spirometry results, biochemical examinations and skin tests were collected. Patients' DNA was obtained from peripheral blood samples. Analysis of the ADRB2 gene C79G polymorphism was performed for 281 patients using the allele-specific polymerase chain reaction (ARMS-PCR). The analyzes conducted revealed no evidence of association of C79G genotypes with the clinical variables investigated. Although this association is positive in several studies, there are still many controversies and a significant number of studies, including meta-analyzes, with negative results supporting the results presented in this study. The data presented make it clear that there is still no consensus on the role played by SNP C79G with disease severity or pharmacogenetic response.

Key words: Asthma. Gene. *ADRB2*. SNP. C79G. Gln27Glu.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Abordagem de classificação por etapas de acordo com o nível de controle dos sintomas da asma 21

Figura 2 - Esquema mostrando as sete regiões transmembranares que abrangem os receptores β2-adrenérgicos com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) dentro de códons específicos que causam alterações de aminoácidos não sinônimos.....32

Figura 3 - Drogas que tem como alvo os receptores β2-adrenérgicos.....33

Figura 4 - Etapas de análise do SNP C79G do gene *ADRB2* 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção de pessoas de 18 anos ou mais de idade que referem diagnóstico médico de asma 18

Tabela 2 - Indicadores de asma para escolares de 13 a 17 anos de idade. 19

Tabela 3 - Os 30 principais genes por estudos de associação de genes candidatos em asma 28

Tabela 4 - Loci implicados na etiologia da asma através de estudos de associação genômica ampla 29

Tabela 5 - Perfil clínico dos pacientes quanto às variáveis categóricas 41

Tabela 6 - Perfil clínico dos pacientes quanto às variáveis contínuas 42

Tabela 7 - Perfil clínico dos pacientes quanto às variáveis de função pulmonar 43

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes quanto aos resultados dos testes alérgicos cutâneos de leitura imediata (prick test).. 44

Tabela 9 - Teste de associação das características clínicas categóricas com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2* 45

Tabela 10 - Teste de associação das características clínicas contínuas com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2* 46

Tabela 11 - Teste de associação das variáveis de função pulmonar com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2* 47

Tabela 12 - Teste de associação dos resultados dos testes alérgicos cutâneos de leitura imediata (prick test) com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2* 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRB2	Receptor do Beta-2-Adrenérgico (do inglês *β2-adrenergic receptor*)
ADAM33	Desintegrina e Metaloprotease 33 (do inglês *Disintegrin and Metalloprotease* 33)
ATS	American Thoracic Society
BIE	Broncoespasmo Induzido por Exercício
CI	Corticosteroides Inaláveis
CSF-GM	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
CVF	Capacidade Vital Forçada
CYFIP2	Proteína 2 de Interação Citoplasmática FMR1 (do inglês *Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 2*)
DPP10	Dipeptidil Peptidase 10 (do inglês *Dipeptidyl Peptidase Like 10*)
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ERS	European Respiratory Society
$FEF_{25-75\%}$	Fluxo Expiratório Forçado Médio na Faixa Intermediária
GINA	Global Initiative for Asthma
GSDMB	Gasdermina B (do inglês *Gasdermin B*)
GWAS	Estudos de Associação Genômica Ampla (do inglês *Genome-Wide Association Study*)

HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G (do inglês *Histocompatibility Antigen, Class I, G*)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IRAK3	Receptor de Interleucina 1 Associado a Quinase 3 (do inglês *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 3*)
LABA	Agonistas de Longa Duração (do inglês *Long-Acting β2-Agonists*)
LTRA	Antileucotrienos (do inglês *Leukotriene Receptor Antagonist*)
MMP-9	Matriz-metalopeptidade 9 (do inglês *Matrix Metallopeptidase 9*)
NPSR1	Receptor 1 de Neuropeptídio S (do inglês *Neuropeptide S Receptor 1*)
OPN3	Opsina 3 (do inglês *Opsin 3*)
ORMDL3	Regulador Orosomucosoide Tipo 3 de Biossíntese de Esfingolipídio (do inglês *Orosomucoid-like Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3*)
PENSE	Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar
PFE	Pico de Fluxo Expiratório
PHF11	Proteína-Dedo PHD 11 (do inglês *PHD Finger Protein 11*)
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
RNAm	Ácido Ribonucleico mensageiro
SABA	Agonista de Curta Duração (do inglês *Short-Acting β2-Agonists*)
SIHSUS	Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde
SMAD3	Membro 3 da família *SMAD* (do inglês *SMAD Family Member 3*)

SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*)
Th	linfócitos T auxiliares (do inglês *T helper*)
VEF_1	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
VEF_1/CVF	Razão entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada
VEGF	Fator Vascular de Crescimento Endotelial (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 DEFINIÇÃO e PATOGENIA 14
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA 16
1.3 CLASSIFICAÇÃO DA ASMA 20
1.4 DIAGNÓSTICO DA ASMA 21
1.5 GENÉTICA DA ASMA 23
1.5.1 **Gene *ADRB2*** 28
2 OBJETIVOS 34
2.1 OBJETIVO GERAL 34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34
3 MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1 PACIENTES 35
3.2 TESTES DE FUNÇÃO PULMONAR 35
3.3 DADOS ANTROPOMÉTRICOS 36
3.4 EXAMES BIOQUÍMICOS E CUTÂNEOS 36
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA 37
3.6 AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM 37
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 38
4 RESULTADOS 39
4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS PACIENTES DO ESTUDO 39
4.2 ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO SNP C79G DO GENE *ADRB2* COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS DOS PACIENTES ASMÁTICOS 40
5 DISCUSSÃO 49
5.1 ASPECTOS DA ANÁLISE DESCRITIVA DOS PACIENTES 49
5.2 SNP C79G DO GENE *ADRB2* E A ASMA 50
5.2 DIVERGÊNCIAS ENTRE DIFERENTES ESTUDOS 54
6 CONCLUSÃO 57
7 REFERÊNCIAS 58

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO e PATOGENIA

A asma está entre as doenças crônicas mais comuns em todo o mundo (Campos, 2007). É uma síndrome complexa (Eder *et al*., 2006; Wenzel, 2012, Kersten & Koppelman, 2017) e heterogênea (Bateman *et al*., 2008), caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, hipersecreção de muco e hiperresponsividade brônquica a vários estímulos, resultando em obstrução intermitente do fluxo aéreo que é frequentemente reversível, espontaneamente ou com tratamento (Liang *et al*., 2013; Nakawah *et al*., 2013; Toraih *et al*., 2019). Essas alterações conduzem a um conjunto de sintomas típicos da doença, tais como: sibilos, falta de ar, aperto no peito, tosse, dispneia e opressão torácica (*Global Initiative for Asthma* - GINA, 2017).

A principal característica da asma é a limitação do fluxo aéreo que têm como fator fisiopatogênico central a inflamação brônquica (De Farias, 2007). A inflamação das vias aéreas é o principal mecanismo da asma e o principal alvo terapêutico (Holgate & Thomas, 2017). Como resultado da inflamação, as vias aéreas são hiperresponsivas e contraem-se facilmente em resposta a uma ampla gama de estímulos (Campos, 2007), entre os quais se destacam: infecções virais, mofo, fumo, atividade física, ácaros, pelos de animais, entre outros.

A inflamação crônica e persistente das vias aéreas é a característica fundamental da asma e é acompanhada por alterações estruturais referidas comumente como *remodelamento das vias aéreas* (Holgate & Thomas, 2017). O remodelamento brônquico é caracterizado pelo espessamento das paredes das vias aéreas e pode ter consequências na mecânica do estreitamento das vias respiratórias e contribuir para a progressão crônica da doença (Kudo *et al.,* 2013). As alterações anatomopatológicas incluem: a presença de células inflamatórias nas vias aéreas, exsudação de plasma, edema, hipertrofia da musculatura lisa peribrônquica, tampões mucosos e desnudamento do epitélio brônquico (Campos, 2007). A inflamação das vias aéreas é a anormalidade dominante, ocorrendo mesmo nos estágios iniciais da asma (Holgate & Thomas, 2017). Ao investigar características

patológicas em biópsias brônquicas de asmáticos graves, Ferreira *et al.* (2018) evidenciaram a existência de associação entre a inflamação brônquica, as alterações estruturais das vias aéreas e a obstrução persistente do fluxo aéreo.

À medida que as informações sobre a asma aumentaram, a mudança de paradigma na imunologia e na biologia molecular resultou em uma extensa avaliação de células inflamatórias e de mediadores envolvidos em sua fisiopatologia (Kudo *et al.,* 2013). A inflamação brônquica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença e é orquestrada principalmente por linfócitos Th2 (Gualdi *et al*., 2010). As características típicas da inflamação das vias aéreas são o aumento de eosinófilos, mastócitos, linfócitos e predominância de linfócitos T auxiliares tipo 2 (células Th2), o qual exerce suas funções efetoras através da produção dos mediadores interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-13 e o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Holgate & Thomas, 2017).

A heterogeneidade é um traço marcante da asma (Campos, 2015). A asma é heterogênea tanto em sua apresentação clínica quanto em seu prognóstico (Willis-Owen *et al*., 2018), com diferentes fenótipos e expressões clínicas que dependem da idade, gênero, características genéticas e exposições ambientais (Sales *et al*., 2012). O conhecimento da heterogeneidade da doença levou à definição de diferentes fenótipos, e a asma alérgica (asma atópica) é incluída entre os fenótipos mais comuns, representando 70% dos casos (Novak & Bieber, 2003).

A atopia é uma predisposição para o desenvolvimento de hipersensibilidade imediata contra antígenos ambientais comuns. Asma e atopia estão intimamente relacionadas e a maioria dos indivíduos asmáticos são também atópicos, embora o inverso não ocorra (Denham *et al.*, 2008). Pelo menos dois terços dos casos de asma têm características de alergia, geralmente acompanhada por níveis elevados de imunoglobulina E (IgE) e início ainda na infância (Holgate & Thomas, 2017). Em contraste, a asma não alérgica (ou intrínseca) não está associada à atopia e muitas vezes tem início tardio (Holgate & Thomas, 2017).

Existem vários fatores que influenciam o desenvolvimento da asma, incluindo genes que predispõem à atopia e à hiperreatividade das vias aéreas (De Paiva *et al*.,

2014). Na asma atópica há uma predisposição genética para o desenvolvimento de resposta mediada pela imunoglobulina E (IgE) a alérgenos comuns e a inflamação é caracterizada pela ação de eosinófilos (De Farias, 2007). A inflamação é coordenada por linfócitos Th2 que, após o reconhecimento antigênico dos alérgenos via complexo principal de histocompatibilidade tipo II ("*Major Histocompatibility Complex*" - MHCII), proliferam e se diferenciam em subtipos Th2 (Sales *et al*., 2012). Essas células secretam citocinas, como a IL-4, IL-5 e IL-13, características das células Th2, em detrimento de uma resposta mediada por Th1 (Meng & Rosenwasser, 2010). Atualmente sabe-se que as células Th9 e Th17 também modulam a resposta inflamatória na asma atópica através da ação citocinas que induzem a inflamação das vias aéreas (IL-17A, IL-17F e IL-22) e o aumento da contratilidade da musculatura lisa (IL-17A) (Kudo *et al*., 2013).

A compreensão dos diversos aspectos patogênicos da asma, incluindo nesse contexto a dimensão dos fatores moleculares e celulares envolvidos no desenvolvimento da doença e na resposta do paciente aos diferentes tratamentos, pode contribuir sobremaneira para o desenvolvimento de propostas terapêuticas que mitiguem de modo mais eficiente os efeitos da inflamação brônquica e/ou da broncoconstrição subjacente.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA

A asma afeta de 1 a 18% da população em diferentes países (GINA, 2017). Nas três últimas décadas, o número de casos aumentou em média 1% ao ano (Zöllner *et al*., 2005). A Organização Mundial da Saúde - OMS (World Health Organization - WHO, 2017) estima que atualmente cerca de 235 milhões de pessoas sofram com a asma em todo o mundo. A asma ocupa o primeiro lugar na prevalência de Doenças Respiratórias Crônicas e, em 2015, foi responsável por 383.000 mortes em nível global (WHO, 2017).

Doenças alérgicas, como a asma, aumentaram marcadamente no último meio século associadas à urbanização (Alfvén *et al*., 2006). Dessa forma, espera-se que o número de pacientes com asma aumente em mais de 100 milhões até 2025 (Behera & Sehgal, 2015; GINA, 2017). No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2013 pelo Ministério da Saúde e pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), a asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos (tabela 1). De acordo com essa pesquisa, o diagnóstico de pacientes asmáticos é tardio, sendo que a média de idade em que ocorre o diagnóstico é de 17 anos nas zonas urbanas e chega a mais de 21 anos nas zonas rurais. Esse fato evidencia a necessidade de alternativas diagnósticas mais céleres, uma vez que o diagnóstico tardio tem impacto direto no controle da doença e, por conseguinte, na qualidade de vida dos pacientes.

Dados da Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PENSE) revelaram a ocorrência de asma em mais de 15,0% dos estudantes de 13 a 17 anos (IBGE, 2015), não tendo sido registradas diferenças nas ocorrências de sintomas entre alunos das escolas públicas e privadas (tabela 2). Mais de 80% das pessoas entrevistadas nessas pesquisas relatam grau intenso ou muito intenso de limitações nas atividades habituais devido à asma. Se as exacerbações asmáticas são frequentes e recorrentes, causam insônia, fadiga diurna, níveis de atividade reduzidos e absenteísmo nas atividades laborais ou discentes.

Em 2013, 2.047 pessoas morreram de asma no Brasil, isto é, aproximadamente 5 óbitos/dia e mais de 120.000 hospitalizações por ano (Cardoso *et al*., 2017). Em uma revisão sistemática sobre os custos da asma grave no Brasil, Stirbulov *et al*. (2016) demonstraram que as principais despesas diretas estavam relacionadas com hospitalizações e medicamentos e que foram gastos US$ 733,00 por paciente por ano, ressaltando os elevados custos econômicos da asma. De acordo com o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIHSUS), apenas em 2014, as internações pela doença originaram um custo de R$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde.

Ao coligir os dados epidemiológicos da asma no Brasil e no mundo torna-se patente a necessidade de ampliar os esforços a fim de elucidar os variados aspectos da doença. Nesse contexto, destacam-se os mecanismos moleculares e celulares que conduzem ao desenvolvimento da asma, aos diferentes quadros clínicos de gravidade e aos processos inflamatórios subjacentes. Estudos dessa natureza têm o potencial de inovar nas estratégias diagnósticas, propor tratamentos mais adequados a cada caso, como inovação biotecnológica com o propósito alcançar uma medicina individualizada e, consequentemente, reduzir os efeitos adversos aos pacientes, assim como viabilizar o emprego mais eficiente e direcionado dos recursos.

Tabela 1 - Proporção de pessoas de 18 anos ou mais de idade que referem diagnóstico médico de asma, por sexo, com indicação do intervalo de confiança de 95%, e a situação do domicílio. Fonte: Pesquisa Nacional de Saúde 2013 (IBGE, 2014).

Situação de domicílio	Proporção de pessoas com 18 anos ou mais de idade que referem diagnóstico médico de asma (%)								
	Total			Sexo					
				Masculino			Feminino		
	Total	Intervalos de confiança de 95%		Total	Intervalos de confiança de 95%		Total	Intervalos de confiança de 95%	
		Limite inferior	Limite superior		Limite inferior	Limite superior		Limite inferior	Limite superior
Brasil	**4,4**	**4,1**	**4,7**	**3,6**	**3,2**	**4,0**	**5,1**	**4,7**	**5,5**
Urbana	4,6	4,3	4,9	3,8	3,4	4,3	5,3	4,8	5,8
Rural	3,1	2,5	3,8	2,4	1,8	3,0	4,0	2,9	5,0

Tabela 2 - Indicadores de asma para escolares de 13 a 17 anos de idade, com indicação do intervalo de confiança de 95%, por sexo, segundo os grupos de idade selecionados. Fonte: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar 2015 (IBGE, 2015).

Escolares que tiveram episódio de asma alguma vez na vida (%)	Escolares de 13 a 17 anos de idade								
	Total			Sexo					
				Masculino			Feminino		
	Total	Intervalos de confiança de 95%		Total	Intervalos de confiança de 95%		Total	Intervalos de confiança de 95%	
		Limite inferior	Limite superior		Limite inferior	Limite superior		Limite inferior	Limite superior
13 a 15 anos	16,2	14,6	17,7	16,7	15,0	18,3	15,6	13,8	17,4
16 a 17 anos	15,3	13,8	16,8	15,7	13,5	17,9	14,9	13,1	16,7

1.3 CLASSIFICAÇÃO DA ASMA

A grande variedade de apresentações clínicas e de evolução é um obstáculo para uma classificação única, passo importante para definições diagnósticas e terapêuticas (Campos, 2007). Existem diferentes fenótipos clínicos e os padrões de inflamação variam consideravelmente. Uma das formas de classificação para asma é a identificação de dois subgrupos: asma alérgica (atópica) e não alérgica. Esses dois fenótipos se distinguem pela presença ou ausência de anticorpos IgE a alérgenos ambientais comuns. Nos dois casos, as vias aéreas são infiltradas por eosinófilos, mastócitos e linfócitos Th (Prabhudas, 2013).

Um dos principais critérios de classificação da asma é quanto à gravidade. A gravidade da asma é avaliada pela análise da frequência e da intensidade dos sintomas e pelo exame da função pulmonar (De Paiva *et al*., 2014). A asma pode ser classificada como intermitente ou persistente (Fitzgerald, 2015). Por sua vez, a asma persistente pode ser avaliada como leve, moderada ou grave. Estima-se que 60% dos casos de asma sejam intermitentes ou persistentes leves, 25% a 30% moderados e 5% a 10% graves. (Stirbulov *et al*., 2016). Contudo, as diferentes conceituações de asma grave usadas no cotidiano médico dificultam a determinação precisa da sua prevalência (Campos, 2015).

A asma grave é caracterizada por exacerbações frequentes, limitação das atividades diárias e sintomas noturnos (Stirbulov *et al*., 2016). Entretanto, na prática clínica, a classificação de um paciente como portador de asma grave costuma ser modulada por subjetividade (Campos, 2015). A fim de proporcionar uma classificação mais precisa, as diretrizes para diagnóstico, avaliação e tratamento da asma grave elaboradas pela *European Respiratory Society* (ERS) e pela *American Thoracic Society* (ATS) (Chung *et al*., 2014), definem asma grave, para pacientes com idade igual ou superior a seis anos, como aquela que requer os medicamentos sugeridos pelo GINA (2017) nas etapas 4 e 5 (Figura 1). A classificação em etapas propostas pelo GINA (2017) é uma alternativa de estratificação que considera a gravidade sob o aspecto da dificuldade de controle da asma. Os asmáticos graves necessitam de

tratamento com altas doses de corticosteroides inalados, além de outras medicações de controle, incluindo corticosteroides sistêmicos (Chung *et al*., 2014).

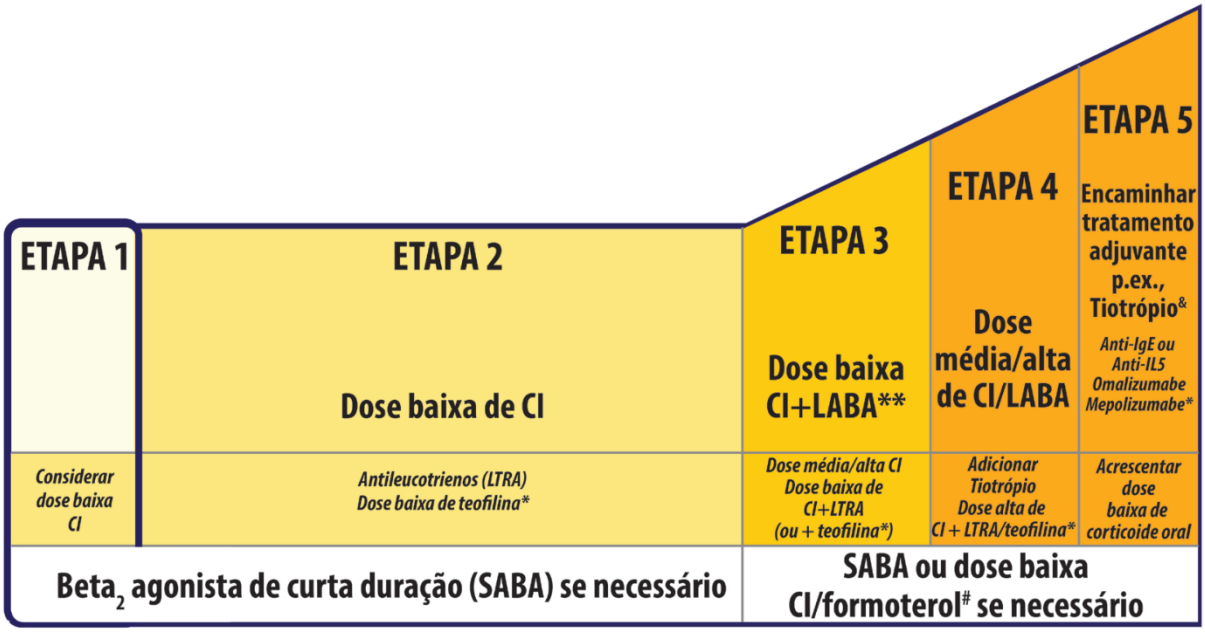

Figura 1. Abordagem de classificação por etapas de acordo com o nível de controle dos sintomas da asma. CI: Corticosteroides inaláveis; LABA: agonistas de longa duração; LTRA: antileucotrienos; SABA: agonistas de curta duração. Fonte: GINA (2017).

1.4 DIAGNÓSTICO DA ASMA

A despeito de ser a principal doença crônica não transmissível dos pulmões (Ghani *et al*., 2017), não existem testes laboratoriais específicos para o diagnóstico ou prognóstico da asma até o momento. O diagnóstico da asma é predominantemente clínico. Não obstante, a asma ainda é subdiagnosticada e subtratada e a maioria dos pacientes permanece com a doença não controlada (SOPTERJ, 2018). O grau de controle da asma é o principal fator associado à morbidade e à mortalidade da doença (GINA, 2017). Inevitavelmente, casos mal diagnosticados levam ao excesso de tratamento ou a tratamentos inapropriados (Lucas *et al*., 2008) e, por conseguinte, aumentam-se os riscos de efeitos colaterais na ausência de qualquer benefício farmacológico (Contoli & Papi, 2010).

De acordo com as diretrizes propostas pelo GINA (2017), pacientes com sintomas compatíveis com o diagnóstico devem ser submetidos a uma espirometria com prova broncodilatadora empregando β2-agonistas na dosagem de 400 mcg. Caso a espirometria não sugira diagnóstico de asma é recomendado a repetição do exame em outra ocasião ou a realização de espirometria com teste de broncoprovocação (SOPTERJ, 2018). Há ainda a possibilidade de tratamento empírico para asma por 1 a 3 meses seguido de nova espirometria (GINA, 2017). Caso seja observado, após esse período de tratamento preliminar, uma melhora significativa da função pulmonar (correspondente a um aumento no '*volume expiratório forçado no primeiro segundo'* - VEF1 > 12% ou 200ml), o diagnóstico de asma é considerado provável. Se a espirometria estiver dentro dos parâmetros de normalidade e o quadro clínico for compatível com asma, o tratamento poderá ser iniciado, enquanto possíveis diagnósticos diferenciais possam ser pesquisados (SOPTERJ, 2018)

Existem, no entanto, barreiras para a realização de testes de função pulmonar e, nessas circunstâncias, pode-se tentar iniciar a medicação em pacientes com sintomas de asma, sem se empenhar em investigações diagnósticas adicionais (Contoli & Papi, 2010). Nas últimas três décadas, diversos estudos têm reportado casos em que, após criteriosa reavaliação, a doença não pôde ser confirmada em pacientes que já se encontravam em tratamento para controle de asma (Marklund *et al*., 1999; Lindensmith *et al.,* 2004; Aaron *et al*., 2008; Shaw *et al*., 2012). Por outro lado, Luks *et al*. (2010) demonstraram que 30% dos pacientes negativos para asma, avaliados através de broncoprovocação, experimentaram sintomas de asma que necessitaram de intervenção médica nos 6 meses seguintes. Pavord *et al.* (2015) alertam para casos de negligência diagnóstica em todos os níveis de atenção, levando a prescrições inadequadas de tratamentos caros e à banalização de um diagnóstico potencialmente letal.

Uma abordagem alternativa, e potencialmente promissora, que talvez possa contribuir para aperfeiçoar o diagnóstico e o prognóstico da asma, talvez esteja voltada para os estudos moleculares e crescente uso da biotecnologia voltada tanto para fins de diagnóstico e prognóstico, quanto para fins de predição da resposta terapêutica. A asma é conhecidamente uma doença multifatorial complexa para a

qual uma forte contribuição genética tem sido estabelecida (Kaneko *et al*., 2013). Dessa forma, a identificação de genes e de vias moleculares envolvidos na patogênese da asma poderá ser de grande valor em prever os resultados da doença, assim como em estabelecer abordagens terapêuticas (Hussein *et al*., 2016). A identificação de genes relacionados à asma é somente o começo de um longo processo através do entendimento de suas funções na patogenia da doença (Holloway & Koppelman, 2007). Posteriormente, a dissecação de perfis genéticos suscetíveis pode fornecer uma visão sobre a patogênese, permitindo-nos identificar diferentes subfenótipos e contribuir para identificar formas mais objetivas de realizar o diagnóstico e encontrar novas terapias direcionadas (Resende *et al*., 2017).

1.5 GENÉTICA DA ASMA

A etiologia e a progressão da asma dependem de muitos fatores, incluindo a herança genética e epigenética (Dhondalay *et al*., 2019). A busca por elucidar esses fatores envolveu uma miríade de estudos com objetivos e abordagens muito diversos. Uma dessas abordagens foi o emprego de modelos animais a fim de compreender aspectos da expressão gênica e das respostas imunológicas na inflamação brônquica da asma. Desde o início da década de 1990 foram estabelecidos modelos animais para estudar aspectos específicos da asma (Keir & Page, 2008; Gualdi *et al*., 2010) e, com esse enfoque, muitas características fisiopatológicas na asma atópica foram inicialmente reveladas (Torres *et al*., 2005).

Estudos com o uso de camundongos *knockout*, onde o animal mutante não expressa um gene particular, permitiram estudar a função específica de alguns genes no desenvolvimento da asma (Gualdi *et al*., 2010). Estudos que aplicaram essa abordagem foram capazes de revelar a inibição de fenótipos de asma como resultado da deficiência de certos genes, tais como: *IL-4* (Pauwels *et al*.,1997); *MMP-9* (Cataldo *et al*., 2002; Lim *et al*., 2006), *ADAM8* (Naus *et al*., 2010) e *SMAD3* (Le *et al*., 2007). Por sua vez, estudos realizados com animais transgênicos revelaram, por exemplo, a importância da expressão de certos genes, como os das

interleucinas *IL-4, IL-5* e *IL-13* (Foster *et al*., 1996; Elias *et al.*, 2003; Fish e*t al*., 2005; Taube e*t al*., 2004) na fisiopatogenia da asma alérgica. A mesma abordagem também possibilitou revelar a participação de alguns genes no remodelamento e na hiperreatividade brônquica na asma, como foram os casos dos genes: *ADAM8* (King *et al* , 2004), *VEGF* (Lee e*t al*., 2004), *ORMDL3* (Miller *et al*., 2014) e *GSDMB* (Das *et al*., 2016).

É reconhecido, portanto, que a asma tem um componente genético substancial. A herdabilidade da asma foi estimada em 35% a 95% (Ober & Yao, 2011). Resultados de um recente estudo de meta-análise, abrangendo uma coorte com 71 gêmeos, estimou a herdabilidade da asma em 54% (Polderman *et al*., 2015). Não por acaso, tais evidências fizeram com que a era genômica trouxesse consigo a esperança de subtipagem molecular e de personalização de planos de tratamento para a asma (Willis-Owen *et al*., 2018), uma vez que a identificação de marcadores genéticos associados à asma tem o potencial de possibilitar o desenvolvimento de inovações nas estratégias diagnósticas, prognósticas e terapêuticas

Os primeiros estudos em genética da asma foram baseados em análises de ligação genética seguida de clonagem posicional (Los *et al*., 1999; Denham *et al*., 2008; Bouzigon *et al*., 2010). Esses estudos foram realizados com famílias contendo múltiplos indivíduos afetados e evidenciaram sítios ao longo do genoma como potenciais marcadores para a asma, permitindo a identificação de regiões contíguas que apresentavam cotransmissão com o traço de interesse (Willis-Owen *et al*., 2018). Análises de ligação, usando pequenas repetições em tandem (microssatélites) para acompanhar a transferência de informação genética entre gerações, foram usadas para identificar regiões cromossômicas que potencialmente contêm genes da asma (Denham *et al*., 2008).

A abordagem em análises de ligação genética seguida de clonagem posicional resultou na identificação de oito genes que, supostamente, contribuem para a etiologia genética da asma: *ADAM33* (Van Eerdewegh *et al*., 2002), *DPP10* (Allen *et al*., 2003), *PHF11* (Zhang *et al*., 2003), *NPSR1* (Laitinen, *et al*., 2004), *HLA-G*

(Nicolae *et al*., 2005), *CYFIP2* (Noguchi *et al*., 2005), *IRAK3* (Balaci *et al*., 2007) e *OPN3* (White *et al.*, 2008). Infelizmente, como em muitos outros traços chamados de complexos (ou multifatoriais), a clonagem posicional de potenciais genes de susceptibilidade à asma foi dificultada por problemas de inconsistências de replicação (Willis-Owen *et al*., 2018).

Um grande avanço na identificação dos genes foi conseguido por estudos de associação genética, isto é, estudos de genes candidatos e de associação genômica ampla (*Genome-Wide Association Study - GWAS*) (Sakamoto & Hizawa, 2019). Na era pré-genoma, a grande maioria dos estudos de alta resolução foi limitada a genes individuais cuja candidatura foi sugerida por linhas de evidência convergentes (Willis-Owen *et al*., 2018). Em estudos de associação de genes candidatos, os genes são geralmente selecionados com base na sua função conhecida, sua participação na fisiologia, que supostamente influencia a suscetibilidade à asma, ou com base em sua posição cromossômica identificada por estudos de ligação anteriores (Sakamoto & Hizawa, 2019). Até 2006, antes da publicação do primeiro estudo de *GWAS*, estudos de genes candidatos implicaram mais de 100 genes na etiologia da asma (Ober & Hoffjan, 2006). Entre eles, o gene do receptor beta-2-adrenérgico (*ADRB2*) destaca-se como um dos mais importantes e amplamente estudado (Tabela 3).

Atualmente, muitos estudos de associação têm investigado a participação de diversos genes, e de seus polimorfismos, na suscetibilidade à asma (Martínez-Aguilar *et al*., 2015; Ghani *et al*., 2017; Almomani *et al*., 2019), no diagnóstico de gravidade (De Paiva *et al*., 2014; Carr *et al*., 2016; Liang *et al*., 2016), nos traços fenotípicos característicos da doença (Karaca *et al*., 2016) ou na resposta diferencial às terapias (Shah *et al*., 2015; Jovicic *et al*., 2018; Sood *et al*., 2018; Yang & Guo *et al*., 2018). Entretanto, essa abordagem impede a identificação de componentes realmente novos da patobiologia da doença, embora, por outro lado, forneça uma ferramenta para ratificar ou refutar os candidatos existentes (Willis-Owen *et al*., 2018).

Estudos de *GWAS* produziram resultados empolgantes e identificaram novos alelos e loci de risco (Ober, 2016). Os *GWAS's* aproveitam a abundância de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism - SNP*) em todo o genoma, conforme definido por meio de sequenciamento, para permitir a aplicação de associação alélica em escala genômica ampla (Willis-Owen *et al*., 2018). O primeiro estudo a empregar essa abordagem para a asma foi realizado em 2007 com a caracterização de mais de 317.000 *SNP's* ao longo do genoma de casos e de controles (Moffatt *et al*., 2007). Até o momento, os *GWAS's* produziram pelo menos 38 loci genômicos que mostraram associação com a asma (Willis-Owen *et al*., 2018) (Tabela 4). Além disso, os *GWAS's* têm identificado SNP's associados à asma em níveis genômicos de significância ($p<10^{-8}$) (Ober, 2016). Como resultado das diferentes abordagens estabelecidas, nas últimas décadas a busca por genes associados à asma foi rigorosamente realizada, e quase 700 genes foram relatados (Sakamoto & Hizawa, 2019).

Dada a heterogeneidade clínica e o importante papel das exposições ambientais no desenvolvimento da asma (Ober, 2016), o componente genético para essa doença tem uma contribuição complexa e ainda pouco compreendida. Em adição, estudos recentes buscam elucidar a influência das variáveis ambientais na expressão dos genes e sua participação nos desfechos clínicos da asma. O aumento dramático na prevalência de asma no último meio século sugere um importante papel das exposições ambientais (Stein *et al.*, 2016) sobre os padrões epigenéticos e consequente aumento sobre a suscetibilidade à asma (Joubert *et al*., 2016; Xu *et al*., 2017).

A importância das mudanças epigenéticas para asma foi reforçada pela observação de alterações epigenéticas em loci genômicos específicos, incluindo metilação do DNA em sítios CpG (Liang *et al*., 2015; Yang *et al*., 2015; Yang *et al*., 2017; DeVries *et al*., 2017), de RNAs não-codificantes (Austin *et al*., 2017) e de micro-RNAs. (Maes *et al*., 2016). Contudo, a despeito do recente progresso da compreensão do aspectos epigenéticos da asma, muitas questões permanecem sem respostas (Xu *et al*., 2018), tais como: quais os sítios de metilação do DNA ao longo do genoma estão fortemente associados à asma; se os padrões de metilação já estão presentes ao

nascimento ou se são desenvolvidos durante a infância (Xu *et al*., 2017); e se existem padrões idade-específicos em crianças de diferentes países frente as variação das exposições ambientais e de estilos de vida (Xu *et al*., 2018). Como essas outras questões ainda precisam ser mais bem exploradas a fim de elucidar o papel das variantes epigenéticas no desenvolvimento da asma.

Décadas de evidências clínicas sugerem que a asma deve ser vista como uma doença genética multifatorial complexa (Yang & Guo *et al*., 2018). Como outras doenças complexas comuns, os alelos associados à asma têm efeitos pequenos e são responsáveis por pouco da prevalência da asma (Ober, 2016). Embora esses efeitos sejam individualmente responsáveis por apenas uma minoria da variância fenotípica, eles fornecem novos *insights* sobre os processos patogênicos subjacentes, bem como fontes potenciais de interação com o ambiente (Willis-Owen *et al*., 2018). Portanto, estabelecer os perfis genéticos associados à suscetibilidade, progressão, gravidade e resposta terapêutica da asma pode contribuir significativamente para modificar a progressão da doença, prevenir a gravidade da doença e desenvolver medicamentos personalizados (Sakamoto & Hizawa, 2019).

Tabela 3 – Os 30 principais genes por estudos de associação de genes candidatos em asma. A lista inclui os genes associados à asma em pelo menos 15 estudos independentes que foram selecionados através da pesquisa no banco de dados público DisGeNET (http:/ http://www.disgenet.org). *ADAM33* e *NPSR1* foram excluídos porque as associações desses dois genes com asma foram relatadas pela primeira vez por análise de ligação livre de hipóteses seguida de clonagem posicional. Fonte: Sakamoto & Hizawa (2018).

Região cromossômica	**Genes**
5q32	*ADRB2*
6p21.33	*TNF*
5q31.1	*IL13*
5q31.1	*IL4*
16p12.1	*IL4R*
11q13.2	*GSTP1*
1p13.3	*GSTM1*
5q31.3	*CD14*
19q13.2	*TGFB1*
17q12	*CCL5*
5q35.3	*LTC4S*
1q32.1	*IL10*
11q12.1	*MS4A2*
11q12.3	*SCGB1A1*
9q33.1	*TLR4*
22q11.23	*GSTT1*
1q21.3	*FLG*
6p21.33	*LTA*
Xq21.1	*CYSLTR1*
6p21.32	*HLA-DRB1*
10q11.21	*ALOX5*
6p21.32	*HLA-DQB1*
11q23.1	*IL18*
17q23.3	*ACE*
12q15	*IFNG*
2q33.2	*CTLA4*
5q33.3	*IL12B*
2q14.1	*IL1RN*
3p21.31	*CCR5*
7p15.3	*IL6*

Tabela 4 - *Loci* implicados na etiologia da asma através de estudos de associação genômica ampla (GWAS) com valor de $p < 5 \times 10^{-8}$. Fonte: Willis-Owen *et al.* (2018).

Região cromossômica	**Genes reportados**
1p36.22	*PEX14*
1q21.3	*IL6R*
1q23.1	*PYHIN1*
1q23.3	*B4GALT3, ADAMTS4*
1q24.2	*CD247*
1q25.1	*TNFSF18, TNFSF4*
1q31.3	*DENND1B, CRB1*
1q32.1	*ADORA1*
2p25.1	*ID2*
2q12	*IL18R1, IL1RL1, IL1RL2*
2q37.3	*D2HGDH*
3q28	*LPP*
4p14	*TLR1*
4q31.21	*LOC729675*
5q12.1	*PDE4D*
5q22.1	*SLC25A46, TSLP*
5q31	*RAD50, NDFIP1*
6p21.31	*GRM4, HGMA1*
6p21.32	*PBX2, NOTCH4, C6orf10, BTNL2, HLA-DRA, HLA-DRB5, HLA-DQA1, HLA-DQ, HLA-DQB1, HLA-DQA2, HLA-DOA, HLA-DPB1*
6p21.33	*HLA-C, MICA*
6q15	*BACH2*
7q22.3	*CDHR3*
8q21.13	*TPD52, ZBTB10*
8q24.11	*SLC30A8*
9p21.2	*EQTN, TEK, MOB3B*
9p24.1	*RANBP6, IL33*
9q34.11	*PTGES*
10p14	*LOC338591, GATA3*
10q21.3	*JMJD1C*
11q13.5	*C11orf30, LRRC32*
12q13.2	*CDK2, IKZF4*
12q13.3	*STAT6, LRP1*
14q24.1	*RAD51B*
15q22.2	*RORA*
15q22.33	*SMAD3*
16p13.13	*CLEC16A*
17q12–21	*GRB7, IKZF3, ZPBP2, GSDMB, ORMDL3, GSDMA*
22q12.3	*IL2RB*

1.5.1 **Gene *ADRB2***

O gene *ADRB2* está localizado no cromossomo 5q31-q32 (Chung *et al*., 2011), uma região geneticamente ligada a asma (Hawkins *et al.*, 2008). Consiste em um único éxon de 2015 nucleotídeos (Danielewicz, 2014) que codifica um receptor com sete regiões transmembranares (receptores β2 ou β2-AR) e 413 aminoácidos (Kobilka *et al.*,1987) (Figura 2). Os receptores β2, membros da família de receptores acoplados à proteína G (Toraih *et al*., 2019), são amplamente expressos no trato respiratório, particularmente nos músculos lisos da via aérea (Thakkinstian *et al.*, 2005; Litonjua *et al*., 2010). Esse receptor participa de várias respostas fisiológicas das vias aéreas, incluindo broncodilatação, vasodilatação e depuração mucociliar, bem como várias ações anti-inflamatórias (Staus *et al*., 2014; Hussein *et al.*, 2017).

O efeito clinicamente relevante dos β2 no músculo liso pulmonar é o relaxamento, que pode ser causado por agonistas de β2 (De Paiva *et al*., 2014). Os β2-agonistas inaláveis foram estabelecidos como tratamento de primeira linha para o controle de asma aguda (Chung *et al*., 2011; Plazinska *et al*., 2015) devido aos seus excelentes efeitos broncodilatadores (Figura 3). Nas últimas duas décadas, como os corticosteroides inaláveis tornaram-se o principal agente de tratamento da asma, houve um decréscimo de mortalidade pela doença (Wijesinghe *et al*., 2009). Contudo, a resposta do paciente ao tratamento com β2-agonistas é altamente variável e difícil de ser predita (Martin *et al*., 2008).

O gene *ADRB2* foi sequenciado em múltiplas populações e mais de 80 polimorfismos foram identificados, dos quais 45 SNP's (Litonjua *et al*., 2010). Nove destes causam alterações não-sinônimas, levando a uma substituição de aminoácidos, sendo os mais estudados: A46G (Arg16Gly, rs1042713), C79G (Gln27Glu, rs1042714), G100A (Val34Met, rs990810566) e C491T (Thr164Ile, rs1800888) (Figura 2). Tem sido relatado que os SNP's Arg16Gly e Gln27Glu, além de potencialmente resultarem em uma suscetibilidade aumentada para a asma, estão também relacionados com uma heterogeneidade quanto à resposta ao tratamento com broncodilatadores (Gao *et al.*, 2000; De Paiva *et al*., 2014).

Em particular, o SNP C79G (também identificado como Gln27Glu, Q27E e rs1042714) resulta da substituição de uma glutamina (Gln; “Q”) por um ácido glutâmico (Glu; "E") no códon 27 devido à mudança de citosina para guanina (C>G) no nucleotídeo 79 (Toraih *et al*., 2019). Foi verificado que este SNP altera a sequência de aminoácidos do β2-AR na área que flanqueia o local de ligação do receptor causando uma regulação negativa e, com isso, uma dessensibilização (Hussein *et al.*, 2017). Consequentemente, observa-se que um subgrupo de pacientes asmáticos apresenta uma baixa resposta ao tratamento com essa classe de medicação.

Existem, contudo, resultados inconsistentes e conflitantes que foram relatados em várias populações étnicas na Ásia, América do Sul e Europa (Contopoulos-Ioannidis *et al*., 2005). Alguns estudos que testaram a associação dos polimorfismos do gene β2AR à resposta ao SABA não puderam definir a força dessa relação e produziram resultados discordantes (Martinez *et al*., 1997; Fu *et al*., 2002; Choudhry *et al*., 2005; Palmer *et al*., 2006; Giubergia *et al*., 2008; Martin *et al*., 2008; Carrol *et al*., 2009; Wang *et al.*, 2018). Adicionalmente, em uma coorte composta por em crianças Sérvias, Jovicic *et al* (2018) não encontraram correlação entre as variantes do SNP C79G e a gravidade da asma ou a resposta ao tratamento com salbutamol. Resultado semelhante foi reportado por Toraih *et al*. (2019), o qual também não evidenciou correlação entre as variantes do SNP C79G e o desenvolvimento da asma, a gravidade ou mesmo com a resposta ao tratamento em um grupo de crianças e adolescentes do Egito.

Relativamente, poucos estudos têm examinado os aspectos genéticos da asma em latino-americanos (Forno *et al*., 2015). São ainda mais raros os estudos que objetivaram elucidar o papel do SNP C79G do gene *ADRB2* e que, para isso, empregaram coortes provenientes da população brasileira. Em um desses raros estudos, De Paiva *et al*. (2014) investigaram os SNP’s A46G (rs1042713) e C79G em uma coorte constituída por 88 crianças e adolescentes asmáticos e, dessa forma, concluíram que ambos polimorfismos estariam associados tanto à ocorrência de asma quanto a sua gravidade. Nesse mesmo contexto, Leite *et al.* (2015) investigaram os SNP’s A46G e C79G do gene *ADRB2* com a ocorrência de asma e sobrepeso em 206 crianças e adolescentes provenientes da Região Sul do Brasil. Esse estudo revelou que o alelo G foi mais frequentemente encontrado no grupo de sobrepeso asmático

comparado com o grupo de peso normal não asmático. Em contrapartida, Genov *et al*. (2015) investigaram 16 SNP's de 11 genes (*TNF*, *IL6*, *IFNG*, *TGFB1*, *IL10*, *CD14*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *FLG* e *ADRB2)* em 311 trios familiares (n = 944) e não evidenciaram associação entre os SNP's A46G e C79G do gene *ADRB2* com a suscetibilidade ao desenvolvimento de asma. Da mesma forma, a fim de compreender a influência dos polimorfismos *ADRB2* no desencadeamento de broncoespasmo induzido pelo exercício (BIE) em adolescentes asmáticos, Consentino *et al*. (2016) também não evidenciaram associação entre esse fenótipo e as variantes do SNP C79G.

O contexto apresentado, no qual resultados de diferentes estudos se contradizem, reitera a necessidade de investigações adicionais sobre os efeitos de SNP's no gene *ADRB2* no desenvolvimento e no tratamento dos variados fenótipos de asma. A capacidade de predizer, através de testes laboratoriais, a predisposição à asma, a um dado fenótipo da doença ou mesmo capaz de prever os pacientes asmáticos potencialmente resistentes ao tratamento com β2-agonistas, seria um marco importante no diagnóstico e no prognóstico dessa doença, com potencial para viabilizar vias terapêuticas alternativas, direcionadas e mais eficazes.

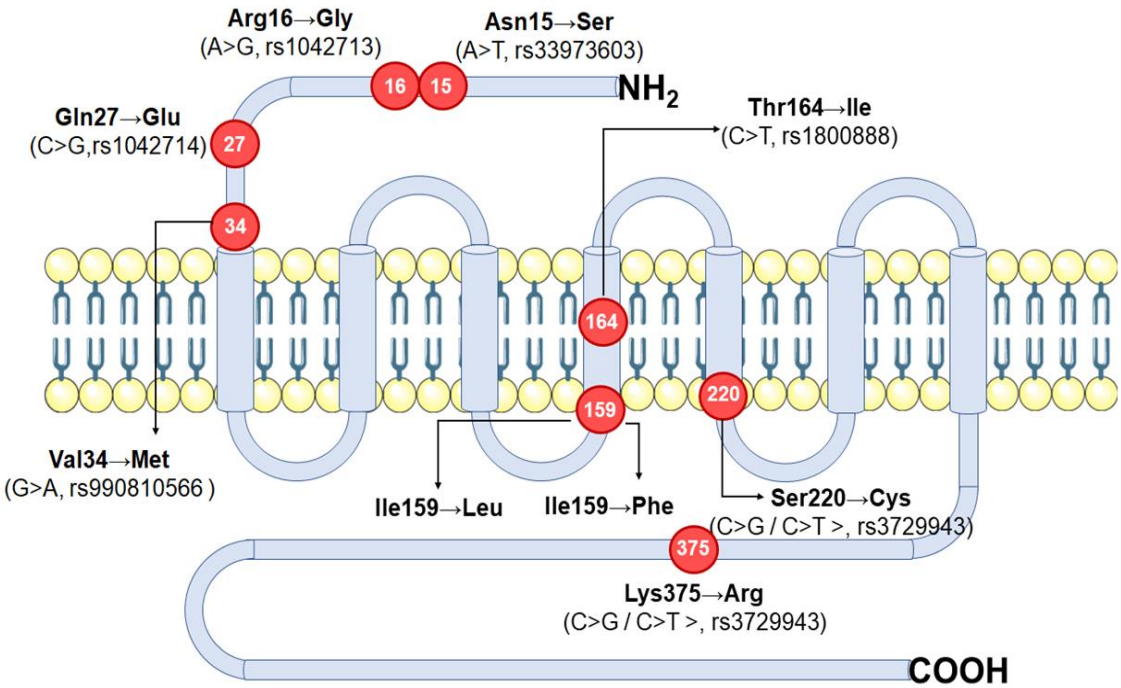

Figura 2 - Esquema mostrando as sete regiões transmembranares que abrangem os receptores β2-adrenérgicos com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) dentro de códons específicos que causam alterações de aminoácidos não sinônimos.

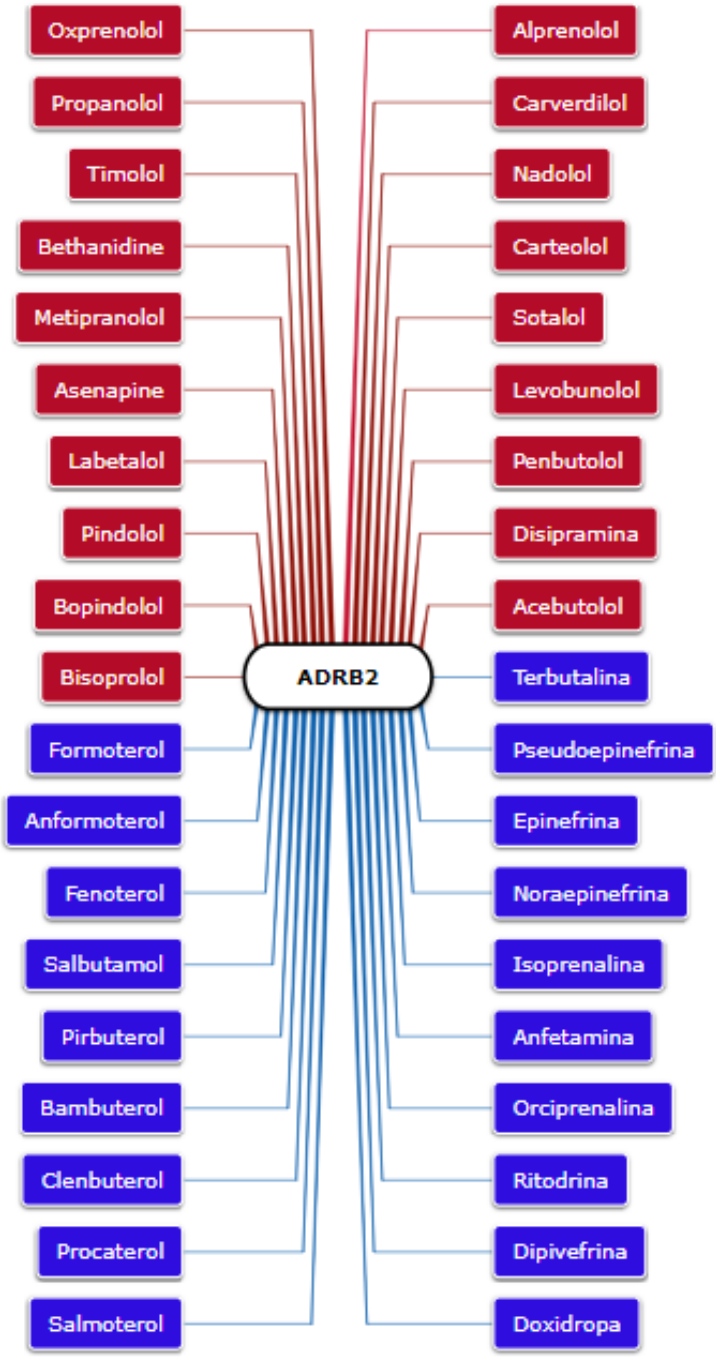

Figura 3 - Drogas que tem como alvo os receptores β2-adrenérgicos. Retângulos em vermelho: antagonistas do β2-AR; retângulos em azul: agonistas do β2-AR. Fonte dos dados: The BioGRID interaction database Version 3.5.167 (https://thebiogrid.org/)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o SNP C79G do gene *ADRB2* está associado a um conjunto de variáveis clínicas dos fenótipos de asma, com a reversibilidade da obstrução brônquica e com a gravidade da doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estruturar um banco de dados de pacientes asmáticos contendo informações sociodemográficas, clínicas e genéticas.
- Realizar a genotipagem das amostras de DNA dos pacientes asmáticos para o polimorfismo C79G (rs1042714) do gene *ADRB2*;
- Verificar se há associação entre os genótipos dos pacientes e as variáveis clínicas, incluindo os exames bioquímicos, cutâneos e de função pulmonar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram entrevistados, de forma aleatória, de acordo com a chegada ao atendimento, 381 pacientes com diagnóstico de asma do Ambulatório de Asma de um Hospital filantrópico de Vitória, ES, Brasil. Durante a entrevista com os pacientes, foram obtidos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o histórico familiar quanto à asma e à comorbidades. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir do exame físico e de seus respectivos prontuários médicos. Foram excluídos das análises os sujeitos com dados clínicos incompletos, de modo que as análises incluíram 313 pacientes. Dentro dessa coorte, foi possível a análise dos genótipos de 281 pacientes. O grupo foi estratificado segundo o diagnóstico de gravidade em: asma leve, moderada e grave, segundo os critérios do GINA (Fitzgerald, 2015). Foram reunidos dados das seguintes comorbidades: rinite alérgica, hipertensão, diabetes e doença do refluxo gastroesofágico (DRGE).

3.2 TESTES DE FUNÇÃO PULMONAR

Os parâmetros empregados para avaliar a função pulmonar foram obtidos a partir dos resultados dos testes de espirometria. As provas de função pulmonar foram realizadas por técnicos especializados no Centro de Referência em Asma com o emprego do espirômetro *Koko*® (KoKo PFT; nSpire Health, Longmont, CO, EUA). A espirometria foi realizada de acordo com as diretrizes da American Thoracic Society (ATS) e da European Respiratory Society (ERS) (Miller, *et al*., 2005).

Os parâmetros pulmonares selecionados para análise foram a *Capacidade Vital Forçada* (CVF), *Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo* (VEF_1), Razão entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada (VEF_1/ CVF) e o *Fluxo Expiratório Forçado Médio na faixa intermediária* ($FEF_{25-75\%}$). As medições foram registradas antes e após o uso do broncodilatador agonista do β2AR, com o objetivo de aferir a reversibilidade da obstrução brônquica. A determinação da reversibilidade da limitação do fluxo aéreo com a administração de

drogas é comumente realizada como parte do teste de função pulmonar (Miller *et al*., 2005). A reversibilidade foi realizada com o uso de 400 mcg do broncodilatador β-agonista Salbutamol. Outro parâmetro utilizado para mensurar a função pulmonar foi o *Pico do Fluxo Expiratório* (PFE), o qual foi obtido através do teste com o aparelho portátil de *Peak Flow*. Esse teste também foi conduzido por técnicos do hospital. Foram adotadas as médias dos valores das três últimas mensurações.de cada parâmetro.

3.3 DADOS ANTROPOMÉTRICOS

O índice de massa corporal (IMC), calculado como Kg/m^2, foi extraído diretamente do prontuário dos pacientes. Novamente, foram adotadas as médias dos valores das três últimas mensurações dessas variáveis.

3.4 EXAMES BIOQUÍMICOS E CUTÂNEOS

Foram compilados dados de exames laboratoriais diretamente do prontuário eletrônico dos pacientes. Entre esses, foram reunidos resultados de exames de hemograma, particularmente, o percentual de eosinófilos. Foram também obtidos dados de testes de IgE total e de IgE específico. Tendo em vista que existe variação temporal desses valores, e para obter uma aproximação mais fidedigna dessas medições, também foram adotadas as médias das três últimas mensurações dessas variáveis.

Os resultados de testes cutâneos de alergia de leitura imediata, chamado de *Prick Test* ou teste de puntura, também foram reunidos para análise como variável resposta, uma vez que constituem uma ferramenta auxiliar importante no diagnóstico de doenças alérgicas (Motta *et al*., 2005). Esse teste foi conduzido com a utilização de antígenos de: ácaros (*Blomia tropicallis, Dermatophagoides pteronissynus* e *Dermatophagoides farinae*), fungos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus* e

Cladosporium herbarum), barata, epitélio de cão e epitélio de gato. Todos esses exames foram conduzidos por equipe técnica especializada e os resultados estão armazenados nos registros do Ambulatório de Asma do hospital.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletadas amostras de 3mL de sangue total em tubos de coleta estéreis do tipo a vácuo contendo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 5% como anticoagulante. A obtenção do DNA foi realizada através do protocolo de extração de DNA proposto por Miller *et al.* (1988) com adequações. A quantificação do DNA nas amostras foi realizada através da análise de 0,2µL de cada amostra no espectrofotômetro UV NanoDrop 1000® (Thermo Scientific, Wilmington, MA).

3.6 AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM

A análise do polimorfismo C79G do gene *ADRB2* foi realizada através da reação de reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) alelo-específica (ARMS-*Amplification-Refractory Mutation System*) (Tan *et al*., 1997; Marson *et al*., 2012; De Paiva *et al*., 2014). Para cada amostra, foram realizadas duas reações de PCR empregando os seguintes iniciadores (primers):
Primer comum: **5′-AGG CCC ATG ACC AGA TCA GCA CAG GCC AG-3′**
Primer ARMS 1B: **5′-GCC ATG CGC CGG ACC ACG ACG TCA CGC ATC-3′**
Primer ARMS 2B: **5′-GCC ATG CGC CGG ACC ACG ACG TCA CGC AAG-3′**

As duas reações de PCR foram realizadas sob as mesmas condições. Para cada reação de 10 µL, 200 µM de cada nucleotídeo (dNTPs), 5,0 nM de Cloreto de Magnésio (MgCl2), 0,4 U de Taq polimerase, 0,2 pmol de cada primer e 1,0 µL (aproximadamente cerca de 50 ng) de DNA genômico. As condições de amplificação por PCR consistiram em desnaturação inicial de 5 minutos à 94°C, seguido por 35 ciclos de: 94°C durante 1 minuto; 67°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; finalizando com 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados para análise

através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado em nitrato de prata 2% (Figura 6).

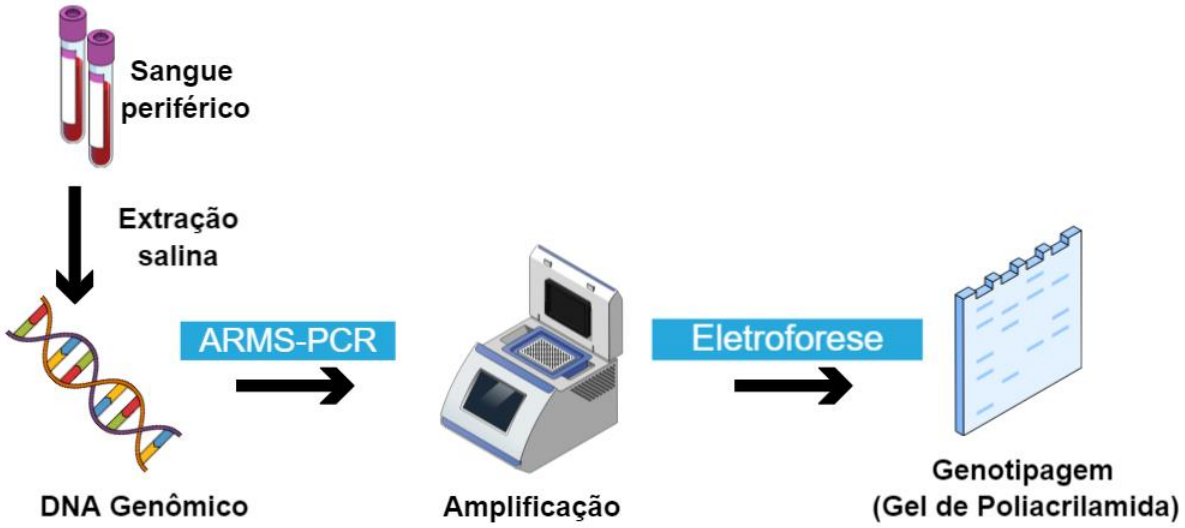

Figura 4 - Etapas de análise do SNP C79G do gene *ADRB2*. Para cada amostra foram realizadas duas amplificações na PCR, uma para cada alelo. O produto de PCR do gene *ADRB2* é diretamente conduzido ao processo de eletroforese em gel de poliacrilamida e corado em nitrato de prata a 12%. Figura criada na plataforma Mind the Graph (www.mindthegraph.com)

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software "*Statistical Package for the Social Sciences for windows"* (SPSS®), versão 25.0. Os testes estatísticos foram conduzidos a fim de testar a associação dos genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2* e os fenótipos de gravidade da asma, as variáveis antropométricas e as variáveis clínicas (incluindo os parâmetros de reversibilidade da obstrução brônquica).

Os dados foram descritos como números absolutos ou percentuais. As frequências alélicas foram obtidas por contagem gênica. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado on-line (http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html) e testado pelo Teste Qui-Quadrado ($\chi 2$) para comparar a distribuição esperada dos genótipos versus a observada. A estatística de Kolmogorov–Smirnov foi conduzida para ajustar os dados contínuos que não apresentaram distribuição normal. A associação entre essas variáveis e os genótipos foi realizado utilizando o teste não-paramétrico de

Kruskal-Wallis. O teste ANOVA foi aplicado às variáveis contínuas com distribuição normal. O teste de associação entre os genótipos e as variáveis categóricas foi realizado através de teste $\chi 2$. Um valor de $p<0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS PACIENTES DO ESTUDO

O estudo foi conduzido com a análise dos dados de 313 pacientes diagnosticados com asma, sendo 254 mulheres (81,2%) e 59 homens (18,8%) (tabela 5). Quando estratificados pelo critério de diagnóstico de gravidade da asma, a distribuição dos fenótipos foram 143 pacientes (45,7%) com fenótipo de asma grave, 116 (37,1%) moderada e 54 (17,3%) leve (tabela 5). Dessa coorte, 68 (21,7%) pacientes não respondem às terapias convencionais mesmo com elevadas doses de corticosteroides, tendo sido escolhidos para tratamentos com anticorpos monoclonais (tabela 5). A mediana da idade foi de 52 anos (8-82) (Tabela 6).

Em relação à remissão da doença, caracterizada por um intervalo temporal sem manifestações de sintomas, 181 (58%) não tiveram interrupção dos sintomas desde a primeira crise, enquanto 131 (42%) apresentaram remissão em algum momento (tabela 5). Cerca de 60% dos pacientes (187) apresenta asma desde a infância, enquanto 40% (126) desenvolveram a doença ao longo da vida adulta (tabela 5). A mediana de idade da primeira crise asmática foi de 8 anos (0-71) (Tabela 6).

Os dados relativos aos testes de função pulmonar (*Peak Flow* relativo, CVF, VEF_1, VEF_1/CVF e $FEF_{25-75\%}$) estão resumidos na tabela 7. Quanto aos testes alérgicos cutâneos de leitura imediata, 121 pacientes (58,5%) apresentaram resposta a algum dos alérgenos testados, enquanto 86 (41,5%) não demonstraram nenhuma sensibilização a esses antígenos (tabela 5). O alérgeno que resultou no maior índice de resposta atópica entre os pacientes, 100 (47,8%), foi a do ácaro *Blomia tropicallis* (tabela 8).

Do total (n=313), 240 (76,7%) sofrem de rinite alérgica, (45,4%) são hipertensos, 54 (17,3%) são diabéticos e 164 (52,4%) apresentam doença do refluxo gastroesofágico (tabela 5). A mediana de IMC foi de, aproximadamente, 28,9 (14,3-57,5) (tabela 6).

4.2 ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO SNP C79G DO GENE *ADRB2* COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS DOS PACIENTES ASMÁTICOS

De 281 pacientes, para os quais as amostras de DNA foram genotipadas, 139 (49,5%) apresentaram o genótipo homozigoto CC (Gln_{27}-Gln_{27}), 131 CG (Gln_{27}-Glu_{27}) e 11 o genótipo homozigoto GG (Glu_{27}-Glu_{27}). Essa distribuição genotípica não foi consistente com o equilíbrio de Hardy – Weinberg (X^2 = 8,754; p = 0,003). Não foi encontrada associação significativa de nenhum dos genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2* com os fenótipos de gravidade da asma, com as características da doença ou com os achados laboratoriais (tabelas 9 e 10). Também não foram encontradas associação dos genótipos com as quatro comorbidades incluídas na análise (rinite, hipertensão, diabetes e DRGE) (tabela 9) ou com parâmetros de função pulmonar e de reversibilidade da broncoconstrição (tabela 11). A resposta alérgica a três antígenos utilizados do teste cutâneo de leitura imediata (prick test) mostrou-se significativamente associada ao SNP C79G: *Cladosporum herbarum* (p=0,025), *epitélio de cão* (p=0,019) e *epitélio de gato* (p=0,012). As demais variáveis desse teste não apresentaram associação significativa (tabela 12).

Tabela 5 - Perfil clínico dos pacientes quanto às variáveis categóricas. DRGE: Doença do refluxo gastroesofágico

Variáveis categóricas	**N**	**%**
Gênero		
F	254	81,2
M	59	18,8
Gravidade da asma		
Asma Grave	143	45,7
Asma Moderada	116	37,1
Asma Leve	54	17,3
Não responsivos aos tratamentos convencionais (usuários ou elegíveis para uso de anticorpos monoclonais)		
Sim	245	78,3
Não	68	21,7
Remissão de sintomas da asma		
Presente	131	42,0
Ausente	181	58,0
Asma na infância		
Presente	187	59,7
Ausente	126	40,3
Rinite alérgica		
Presente	240	76,7
Ausente	73	23,3
Teste cutâneo de leitura imediata (Prick Test)		
Positivo	121	58,5
Negativo	86	41,5
Hipertensão		
Presente	142	45,4
Ausente	171	54,6
Diabetes		
Presente	54	17,3
Ausente	259	82,7
DRGE		
Presente	164	52,4
Ausente	149	47,6

Tabela 6 - Perfil clínico dos pacientes quanto às variáveis contínuas.

Variáveis contínuas	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**Mediana**	**σ**
Idade	8	86	50	52	15
Idade da primeira crise	0	71	17	8	19
IMC	14,33	57,48	29,78	28,93	6,95
Eosinófilos (%)	0,0	37,0	4,7	3,0	4,9
IgE total (KU/L)	3,9	3.000,0	445,5	228,0	599,9

σ: desvio padrão.
Valores de referência: IMC (índice de massa corporal): baixo peso (<18,5), intervalo normal (18,5 e 24,9), sobrepeso (25-29,9), obesidade classe I (30-34,9), obesidade classe II (35-39,9), obesidade classe III (>40). Fonte: Ministério da Saúde (2006); Eosinófilos relativo (%) em adultos: 1-5%. IgE total: 7-10 anos: até 116,0 KU/L; >10 anos: até 140,0 KU/L (Fonte: Failace, 2015).

Tabela 7 - Perfil clínico dos pacientes quanto às variáveis de função pulmonar. CVF: capacidade vital forçada; VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo; VEF1/ CVF: razão entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada; FEF25-75%: fluxo expiratório forçado médio na faixa intermediária; Pré: valores antes do uso do broncodilatador agonista do β2AR; Pós: valores após o uso do broncodilatador agonista do β2AR.

Provas de função pulmonar (%)	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	σ
***Peak flow* relativo**	0,0	146,3	56,6	54,7	30,6
Pré-CVF	36,3	124,3	76,8	77,6	17,3
Pré-VEF_1	13,3	113,0	63,0	64,4	20,1
Pré-VEF_1/CVF	34,0	112,0	79,4	80,7	14,1
Pré-FEF_{25-75}	1,19	134,00	43,67	39,00	25,08
Pós-CVF	37,0	125,0	80,5	82,2	17,1
Pós- Pré-VEF_1	14,3	122,0	68,3	70,3	20,7
Pós-VEF_1/CVF	34,7	114,0	82,3	83,9	14,5
Pós-FEF_{25-75}	1,75	138,00	51,16	47,30	29,62

σ: desvio padrão

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes quanto aos resultados dos testes alérgicos cutâneos de leitura imediata (prick test). Testes para alérgenos de: ácaros (*Blomia tropicallis*, *Dermatophagoides pteronissynus*, *Dermatophagoides farinae*), fungos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, Cladosporium *herbarum*), barata, epitélio de cão e epitélio de gato.

Alérgenos testados no prick test	**N**	**%**
Blomia tropicallis		
Positivo	100	47,8
Negativo	109	52,2
Dermatophagoides pteronissynus		
Positivo	87	41,6
Negativo	122	58,4
Dermatophagoides farinae		
Positivo	95	45,5
Negativo	114	54,5
Alternaria alternata		
Positivo	9	4,3
Negativo	200	95,7
Aspergillus fumigatus		
Positivo	10	4,8
Negativo	199	95,2
Cladosporium herbarum		
Positivo	3	1,4
Negativo	206	98,6
Barata		
Positivo	32	15,3
Negativo	177	84,7
Epitélio de cão		
Positivo	21	10,1
Negativo	187	89,9
Epitélio de gato		
Positivo	9	4,3
Negativo	199	95,7

Tabela 9 - Teste de associação das características clínicas categóricas com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2*. Foi utilizado o teste Qui-quadrado para essas variáveis. Os valores são mostrados como número de cada genótipo por categoria e (%). Valor de p <0,05 foi considerado significativo.

	Genótipos do SNP **C79G** do gene *ADRB2* (rs1042714)			
	CC (Gln_{27}-Gln_{27})	**CG** (Gln_{27}-Glu_{27})	**GG** (Glu_{27}-Glu_{27})	***p***
Gênero				
F	114 (49,8)	107 (46,7)	8 (3,5)	**0,745**
M	25 (48,1)	24 (46,2)	3 (6,8)	
Classificação diagnóstica da asma				
Asma Grave	65 (23,1)	55 (19,6)	3 (1,1)	
Asma Moderada	49 (17,4)	54 (19,2)	5 (1,8)	**0,650**
Asma Leve	25 (8,9)	22 (7,8)	3 (1,1)	
Remissão de sintomas da asma				
Presente	57 (20,4)	52 (18,6)	6 (2,1)	**0,642**
Ausente	82 (29,3)	78 (27,9)	5 (1,8)	
Asma na infância				
Presente	81 (28,8)	81 (28,8)	5 (1,8)	**0,527**
Ausente	58 (20,6)	50 (17,8)	6 (2,1)	
Rinite alérgica				
Presente	105 (37,4)	105 (37,4)	11 (3,9)	**0,138**
Ausente	34 (12,1)	26 (9,3)	0 (0,0)	
Teste cutâneo de leitura imediata (Prick Test)				
Positivo	61 (33,3)	45 (24,6)	5 (2,7)	**0,422**
Negativo	34 (18,6)	36 (19,7)	2 (1,1)	
Hipertensão				
Presente	63 (22,4)	57 (20,3)	7 (2,5)	**0,436**
Ausente	76 (27,0)	74 (26,3)	4 (1,4)	
Diabetes				
Presente	22 (7,8)	26 (9,3)	0 (0,0)	**0,209**
Ausente	117 (41,6)	105 (37,4)	11 (3,9)	
DRGE				
Presente	70 (24,9)	67 (23,8)	8 (2,8)	**0,357**
Ausente	69 (24,6)	64 (22,8)	3 (1,1)	

Tabela 10 - Teste de associação das características clínicas contínuas com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2*. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para essas variáveis. Os valores são mostrados como média, ± desvio padrão e número (N) de casos válidos. Valor de p <0,05 foi considerado significativo.

	Genótipos do SNP **C79G** do gene *ADRB2* (rs1042714)			
	CC (Gln_{27}-Gln_{27})	**CG** (Gln_{27}-Glu_{27})	**GG** (Glu_{27}-Glu_{27})	***p***
Idade	49 (±13)	50 (±16)	51 (±15)	**0,731**
N	139	131	11	
Idade da primeira crise	17 (±18)	16 (±20)	20 (±22)	**0,587**
N	137	130	11	
IMC	30,34 (±7,41)	29,32 (±6,48)	30,43 (±6,86)	**0,847**
N	138	130	11	
Eosinófilos (%)	4,8 (±4,8)	4,6 (±4,6)	7,3 (±10,6)	**0,856**
N	130	113	10	
IgE total (%)	401,0 (±569,8)	510,3 (±683,2)	334,0 (±249,2)	**0,289**
N	128	117	8	

Valores de referência: **IMC** (índice de massa corporal): baixo peso (<18,5), intervalo normal (18,5 e 24,9), sobrepeso (25-29,9), obesidade classe I (30-34,9), obesidade classe II (35-39,9), obesidade classe III (>40). Fonte: Ministério da Saúde (2006); **Eosinófilos relativo** (%) em adultos: 1-5%. **IgE total**: 7-10 anos: até 116,0 KU/L; >10 anos: até 140,0 KU/L (Fonte: Failace, 2015).

Tabela 11 - Teste de associação das variáveis de função pulmonar com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2*. Os valores são mostrados como média, ± desvio padrão e número (N) de casos válidos. CVF: capacidade vital forçada; VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo; VEF1/CVF: razão entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada; FEF25-75%: fluxo expiratório forçado médio na faixa intermediária; Pré: valores antes do uso do broncodilatador agonista do β2AR; Pós: valores após o uso do broncodilatador agonista do β2AR. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para essas variáveis, exceto para Pré-CVF e Pós-CVF para os quais foi conduzido teste ANOVA. Valor de p <0,05 foi considerado significativo.

	Genótipos do SNP **C79G** do gene *ADRB2* (rs1042714)			
	CC (Gln_{27}-Gln_{27})	**CG** (Gln_{27}-Glu_{27})	**GG** (Glu_{27}-Glu_{27})	***p***
***Peak flow* relativo**	54,9 (±29,7)	57,3 (±31,9)	55,9 (±28,5)	**0,800**
N	139	131	11	
Pré-CVF	77,4 (± 16,9)	76,1 (± 16,8)	83,7 (±23,5)	**0,604**
N	132	126	11	
Pré-VEF_1	63,4 (±20,3)	62,9 (±19,6)	66,3 (±24,4)	**0,857**
N	134	126	11	
Pré-VEF_1/CVF	79 (±14,4)	79,9 (±14,1)	78 (±10,3)	**0,888**
N	132	126	11	
Pré-FEF_{25-75}	43,49 (±25,17)	44,59 (±25,17)	41,61 (±21,43)	**0,895**
N	133	126	11	
Pós-CVF	80,5 (±17,00)	79,6 (±16,5)	89,2 (±22,8)	**0,737**
N	131	125	11	
Pós- Pré-VEF_1	68,2 (±20,7)	68,1 (±20,2)	74,2 (±26,2)	**0,893**
N	133	125	11	
Pós-VEF_1/CVF	81,8 (±14,8)	83,0 (±14,5)	81,7 (±11,4)	**0,892**
N	131	125	11	
Pós-FEF_{25-75}	50,05 (±29,23)	52,92 (±30,16)	50,16 (±26,44)	**0,829**
N	132	125	11	

Tabela 12 - Teste de associação dos resultados dos testes alérgicos cutâneos de leitura imediata (prick test) com os genótipos do SNP C79G do gene *ADRB2*. Foi utilizado o teste Qui-quadrado para essas variáveis. Os valores são mostrados como número de cada genótipo por categoria e (%). Valor de p <0,05 foi considerado significativo.

	Genótipos do SNP **C79G** do gene *ADRB2* (rs1042714)			
	CC (Gln_{27}-Gln_{27})	**CG** (Gln_{27}-Glu_{27})	**GG** (Glu_{27}-Glu_{27})	***p***
Blomia tropicallis				
Positivo	52 (28,1)	36 (19,5)	5 (2,7)	**0,339**
Negativo	44 (23,8)	45 (24,3)	3 (1,6)	
D.pteronissynus				
Positivo	42 (22,7)	32 (17,3)	6 (3,2)	**0,153**
Negativo	54 (29,2)	49 (26,5)	2 (1,1)	
D. farinae				
Positivo	46 (24,9)	36 (19,5)	5 (2,7)	**0,602**
Negativo	50 (27,0)	45 (24,3)	3 (1,6)	
Alternaria alternata				
Positivo	6 (3,2)	2 (1,1)	1 (0,5)	**0,300**
Negativo	90 (48,6)	79 (42,7)	7 (3,8)	
Aspergillus fumigatus				
Positivo	6 (3,2)	2 (1,1)	1 (0,5)	**0,300**
Negativo	90 (48,6)	79 (42,7)	7 (3,8)	
Cladosporium herbarum				
Positivo	2 (1,1)	0 (0,0)	1 (0,5)	**0,025**
Negativo	94 (50,8)	81 (43,8)	7 (3,8)	
Barata				
Positivo	20 (10,8)	7 (3,8)	2 (1,1)	**0,064**
Negativo	76 (41,1)	74 (40,0)	6 (3,2)	
Epitélio de cão				
Positivo	11 (6,0)	5 (2,7)	3 (1,6)	**0,019**
Negativo	85 (46,2)	75 (40,8)	5 (2,7)	
Epitélio de gato				
Positivo	4 (2,2)	2 (1,1)	2 (1,1)	**0,012**
Negativo	92 (50,0)	78 (42,4)	6 (3,3)	

6.DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado a associação entre o SNP C79G (rs1042714) do gene *ADRB2* e um conjunto de variáveis clínicas de pacientes asmáticos. Também foi testada a associação entre esses polimorfismos e a gravidade da asma. Não foram analisadas associações entre os diferentes genótipos e a suscetibilidade à asma, uma vez que não empregamos uma abordagem caso-controle. A despeito dessa limitação, de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo dessa natureza conduzido com uma amostra de pacientes asmáticos do Estado do Espírito Santo.

5.1 ASPECTOS DA ANÁLISE DESCRITIVA DOS PACIENTES

A análise evidenciou uma amostra constituída majoritariamente por mulheres, mas com uma distribuição etária bastante heterogênea. Embora mais da metade dos indivíduos tenham idade superior a 50 anos, a amostra estudada não foi uniforme quanto à faixa etária. É comum a diversos estudos de associação uma amostra na qual os sujeitos de estudo são selecionados pela idade (De Paiva *et al*., 2014; Shah *et al*., 2015; Jovicic e*t al*., 2018; Toraih *et al*., 2019). Essa delimitação não foi estabelecida aqui, uma vez que a amostra foi de conveniência, coletada de forma aleatória, de acordo com a ordem de chegada para o atendimento e o estudo também não se propunha a investigar se a associação da variável genética com a asma seria, ou não, uniforme em relação à idade.

Devido à enorme diversidade étnica no Brasil e a subjetividade inerente a uma classificação dos indivíduos por etnia, há uma dificuldade real de se estratificar os pacientes quanto a esse critério. Esse fato pode levar a identificações fenotípicas equivocadas. A fim de dirimir esse efeito, optou-se por não considerar essa variável nas análises realizadas. Embora a coorte estudada seja etnicamente heterogênea, é importante ressaltar que todos provém de um *background* socioeconômico e, portanto, condições de saúde e de acesso semelhantes.

O estudo também revelou que mais de metade dos pacientes manifestaram os sintomas da asma ainda na infância, tendo a primeira crise por volta dos 8 anos de idade (Tabela 6). Esse fato denota a relevância de se tentar estabelecer instrumentos alternativos para o diagnóstico precoce da doença e a individualização das terapias. A predição de resposta a uma terapia específica é de grande importância no tratamento das exacerbações da asma em crianças (Jovicic *et al*., 2018) e tem ainda mais impacto quanto mais precocemente iniciada. Além disso, em muitos casos, os sintomas de asma iniciados em adultos podem ter se originado na infância (Li *et al*., 2019). Uma vez que a asma é uma doença incurável, o principal objetivo do manejo é aliviar os sintomas, prevenir a progressão da doença e alcançar uma melhor qualidade de vida (Gina, 2017). Portanto, potenciais inovações biotecnológicas que propiciarem diagnósticos precoces e prognósticos precisos poderão ter grande valor nas decisões das intervenções terapêuticas adotadas.

5.2 SNP C79G DO GENE *ADRB2* E A ASMA

A recente compreensão da genética já reconheceu que a asma não segue o modo mendeliano de herança, mas sim é vista como um distúrbio multifatorial das vias aéreas causada pela interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (Bandaru *et al*., 2015). Vários genes foram validados como fatores de risco para a suscetibilidade e para a receptividade das terapias de controle da asma (De Paiva *et al*., 2014).

O gene *ADRB2* é um dos genes de suscetibilidade à asma mais amplamente estudado (Liu *et al*., 2014; Khan *et al*., 2018). Muitos estudos têm investigado a possível associação entre os fenótipos da asma e os polimorfismos do gene *ADRB2*, destacando-se os voltados para os SNP's A46G (rs1042713) e C79G (rs1042714) (De Paiva *et al.*, 2014; Bandaru *et al*., 2015; Karaca *et al*., 2016; Feng *et al*., 2018; Sood *et al.*, 2018; Almomani *et al*., 2019; Scaparrotta *et al*., 2019; Toraih *et al*., 2019).

Em particular, o polimorfismo C79G não tem sido foco apenas dos estudos sobre o desenvolvimento, gravidade e tratamento da asma, mas também de investigações

quanto a sua associação a uma ampla variedade de outros distúrbios, como: dermatite atópica (Roguedas *et al*., 2006), doença pulmonar obstrutiva crônica (Nielsen *et al.,* 2017; Zhao *et al.,* 2017), fibrose cística (Marson *et al*., 2012), hipertensão (Lou *et al*., 2010), entre outros. Embora seja objeto de incontáveis estudos, o papel do SNP C79G especificamente sobre a asma ainda é controverso, uma vez que os resultados das pesquisas são conflitantes em diferentes amostras, populações e etnias.

As análises conduzidas aqui não revelaram evidência de associação dos genótipos de C79G com as variáveis clínicas investigadas, excetuando-se com a resposta alérgica ao fungo *Cladosporum herbarum* e aos epitélios de cão e de gato. Da mesma forma, não foi revelada associação desse SNP com a reversibilidade da obstrução brônquica ou com os fenótipos de gravidade de asma. Esses resultados vão ao encontro de estudos prévios, os quais, da mesma forma, não encontraram associação significativa dos genótipos do SNP C79G com aspectos de suscetibilidade, parâmetros clínicos, reversibilidade ou fenótipos de gravidade da asma em diferentes populações (Reihsaus *et al*., 1993; Wang *et al*., 2009; Szczepankiewicz *et al*., 2009; Al-Rubaish *et al*., 2011; Birbian *et al*., 2012; Shah *et al.*, 2015; Karaca *et al.*, 2016; Feng *et al*., 2018; Jovicic *et al*., 2018, Scaparrotta *et al.,* 2019; Toraih *et al*., 2019).

Os resultados de outros estudos, entretanto, apontam na direção contrária. Pesquisas sobre a associação do SNP C79G com a asma têm sido amplamente conduzidos em diferentes populações. Desde a década de 1990, a variante alélica G (Glu_{27}) tem sido apontada como relevante fator de proteção contra a dessensibilização do receptor aos broncodilatadores β-agonistas (Green *et al*. 1994; Green *et al*. 1995; Hall, 1996) e, contraditoriamente, como fator de risco para esse fenótipo (Tan *et al*., 1997). Além disso, essa variante tem sido relatada como importante fator de redução no *downregulation* do receptor após exposição prolongada a agonista (Hall *et al*., 1995), como fator de proteção contra a hiperreatividade brônquica (Hall *et al*., 1995), associada ao menor nível sérico de IgE (Dewar *et al*., 1997), à menor gravidade da asma (Weir *et al*., 1998) e a favor da menor incidência de chiado em indivíduos atópicos (Kim *et al.*, 2002).

Estudos mais recentes também apontam um suposto efeito do SNP C79G sobre a asma em coortes provenientes de diferentes etnias. A variante alélica G (Glu_{27}) foi associada com uma resposta mais rápida ao tratamento com β2-agonistas em crianças na Austrália (Martin *et al*., 2008) e Taiwan (Lee *et al*., 2011). Essa variante também foi associada ao menor risco de asma em um estudo envolvendo crianças chinesas (Tian *et al*., 2016) e à menor incidência de exarcebações asmáticas em crianças norte-americanas com ancestralidade africana e europeia (Sood *et al*., 2018). Ao investigar a potencial influência de oito SNP's, de cinco genes, sobre o nível de controle da asma em adultos de descendência árabe, Almomani *et al*. (2019) encontraram uma associação significativa entre a variante alélica C (Gln_{27}) e o fenótipo de asma não controlada. No Brasil, em um estudo com uma amostra de crianças do Estado de São Paulo, De Paiva *et al*. (2014) apontaram o genótipo homozigoto CC (Gln_{27}-Gln_{27}) como um fator de risco para asma grave e o genótipo heterozigoto CG (Gln_{27}-Glu_{27}) como um fator de proteção para os fenótipos de asma moderada e grave.

Os dados apresentados deixam evidente que ainda não existe um consenso sobre o papel desempenhado pelo SNP C79G com a suscetibilidade à asma, com os fenótipos de gravidade da doença ou com a resposta farmacogenética. Os resultados aqui apresentados sustentam a hipótese de que o SNP C79G não desempenha papel relevante na gravidade da asma ou nos fenótipos clínicos subjacentes. Contudo, resultados obtidos em estudos com diferentes populações têm sido bastante divergentes.

Considerando que o tamanho das amostras é uma limitação na maioria dos estudos, uma opção na tentativa de conceber conclusões mais consistentes a partir do acervo de trabalhos publicados são os estudos de meta-análise. A meta-análise é um instrumento útil para identificar variantes com efeitos genéticos modestos (Lohmueller *et al*., 2003). No contexto da asma e dos polimorfismos do gene *ADRB2*, aos menos oito estudos dessa natureza são conhecidos até o momento (Migita *et al*., 2004; Contopoulos-Ioannidis *et al*., 2005; Thakkinstian *et al*., 2005; Finkelstein *et al.*, 2009; Liang *et al.,* 2014; Guo *et al.,* 2016, Khan *et al*., 2018 e Yu *et al*., 2019).

As meta-análises capazes de fornecer uma síntese mais clara de todos os dados disponíveis ainda são poucas e distantes entre si, devido à diversidade das populações e ambientes estudados (Willis-Owen *et al*., 2018). Além disso, em se tratando da asma, os trabalhos dessa natureza são variáveis quanto aos fenótipos a que se propuseram investigar: gravidade e hiperreatividade brônquica (Contopoulos-Ioannidis *et al*., 2005; Khan *et al*., 2018), suscetibilidade à asma (Migita *et al*., 2004; Thakkinstian *et al*., 2005; Liang *et al.,* 2014 e Guo *et al.,* 2016, Khan *et al*., 2018; Yu *et al*., 2019) e resposta à inalantes β-agonistas (Finkelstein *et al.*, 2009).

São reconhecidas divergências envolvendo o papel do SNP C79G na asma, mesmo quando são considerados apenas os estudos de meta-análise que investigaram os mesmos tipos de respostas fenotípicas. Por exemplo, entre as seis meta-análises que se propuseram a examinar a associação desse SNP com a suscetibilidade à asma, quatro não encontraram associações entre os alelos do polimorfismo C79G e a suscetibilidade (Migita *et al*., 2004; Liang *et al.,* 2014, Guo *et al.,* 2016 e Khan *et al*., 2018), enquanto duas delas apontaram evidências de genótipos que estariam associados com o risco da asma (Thakkinstian *et al*., 2005 e Yu *et al*., 2019). Consistente com os resultados aqui apresentados, das oito meta-análises citadas, seis não encontraram associação significativa do SNP C79G com nenhum dos diferentes aspectos fenotípicos relacionados com a asma em vários grupos étnicos (Migita *et al*., 2004; Contopoulos-Ioannidis *et al*., 2005; Finkelstein *et al.*, 2009; Liang *et al.,* 2014; Guo *et al.,* 2016 e Khan *et al*., 2018). A compilação de estudos apresentada, juntamente com os resultados obtidos nesse estudo, deixa evidente que o papel das variantes alélicas do SNP C79G sobre a asma permanece elusivo.

Um dos resultados obtidos que chama atenção é o fato de haver um expressivo contingente de pacientes asmáticos em sobrepeso na amostra analisada. A asma é frequentemente diagnosticada juntamente com a obesidade (Lima *et al*., 2007; Danielewicz, 2014; Rasmussen & Hancox, 2014; Ettinger, 2016). Tem sido demonstrado que a variante G (Glu_{27}) pode estar associada com a obesidade (Jalba *et al*., 2008; Danielewicz., 2014). Em um estudo com crianças e adolescentes, Leite *et al.* (2015) sugerem que o alelo G (Glu_{27}) pode ser mais comum em jovens em sobrepeso e asmáticos do que em pessoas com peso normal e não asmáticas. Como já descrito, o presente estudo não empregou a abordagem caso-controle e, por esse

motivo, não há como refutar consistentemente essa hipótese. A associação foi negativa à despeito de uma alta proporção de pacientes com sobrepeso/obesidade nessa amostra, o que pode ser um fator de confusão. Contudo, a não evidência de associação dos genótipos do SNP C79G com o IMC sugerem que essa hipótese pode não ser sustentada em uma análise mais detalhada.

Um achado aparentemente inédito foi a associação encontrada entre os genótipos do SNP C79G e a resposta alérgica ao *Prick Test*. Três dos nove antígenos utilizados nesse teste (os do fungo *Cladosporum herbarum* e os de epitélio de cão e de gato) revelaram-se associados aos genótipos do SNP C79G. É necessário ressaltar que o número reduzido de indivíduos na amostra com resultados positivos no *Prick Test* para esses três antígenos, provavelmente, compromete a validade dessa associação. Essa observação é particularmente importante para os resultados da associação com a resposta alérgica ao fungo *Cladosporum herbarum*, uma vez que apenas três pacientes da coorte apresentaram reação positiva a esse alérgeno. Caso contrário, essa associação poderia sugerir uma associação do SNP C79G com a atopia. Como não há outros relatos como esse na literatura, sugere-se estudos adicionais a fim de refutar ou não essa hipótese.

5.2 DIVERGÊNCIAS ENTRE DIFERENTES ESTUDOS

A asma é uma doença comum, clinicamente heterogênea, com forte evidência de herdabilidade. O progresso na definição dos fundamentos genéticos da asma, no entanto, tem sido lento e dificultado por questões de inconsistência (Willis-Owen *et al.*, 2018). As inconsistências encontradas nos níveis de associação entre os diversos estudos, incluindo as aqui apresentadas, podem ser explicadas pelas diferenças nos desenhos dos estudos, na quantidade de indivíduos estudados, na idade e na etnia dos participantes. Outros fatores que devem ser elencados são: a relação gene-ambiente e gene-gene, específica para cada população; as diferenças entre os fenótipos selecionados nos estudos e o alinhamento e correção dos múltiplos testes estatísticos (Almomani *et al.*, 2019). A participação de fatores ambientais na etiologia

da asma torna a interação gene x ambiente uma explicação plausível para a replicação inconsistente entre as coortes (Willis-Owen *et al*., 2018).

A diferença étnica entre as coortes dos diferentes estudos é o fator mais evidente por trás das divergências encontradas. Contudo, a replicação de estudos de associação genética em diferentes populações é imprescindível ao se tentar elucidar o papel das variantes alélicas na fisiopatologia da asma. São necessários estudos de associação genética que incluam populações com diversas histórias ancestrais e origens étnicas (Toraih *et al*., 2019). Por outro lado, a replicação de estudos com as mesmas populações anteriormente estudadas poderia resultar em novas informações capazes de mitigar as contradições atualmente conhecidas.

O método é um dos principais pontos a serem observados, tanto na abordagem empregada quanto nas técnicas de genotipagem adotadas. Muitos estudos empregam a abordagem caso-controle, mas esse método de investigação não foi utilizado nesse estudo. É reconhecido que estruturas populacionais podem invalidar a abordagem caso-controle, levando a aparentes associações falso-positivas (Migita *et al*., 2004). Com isso, o desconhecimento da subestrutura da população poderia resultar em diferenças nas frequências de alelos entre casos e controles que não estão relacionados ao status de doença (Ober & Hoffjan, 2006). A despeito dessa crítica histórica, são conhecidos métodos estatísticos que permitem a detecção e correção de desequilíbrios dessa natureza (Pritchard *et al*., 2000; Novembre *et al*., 2016). Portanto, a abordagem caso-controle seria uma opção viável para replicar esse estudo a fim de testar a validade dos achados apresentados.

A técnica de genotipagem é também um dos fatores que varia bastante de um estudo para outro. Nesse estudo foi utilizada uma técnica de amplificação de DNA reconhecidamente muito sensível para amplificar regiões específicas do genoma: a ARMS-PCR. Ainda assim, é reconhecida a possibilidade de anelamento dos iniciadores em um locus diferente do esperado, o que poderia acarretar uma amplificação de um produto não-específico (Pompanon *et al*., 2005) e, consequentemente, levar a erros de genotipagem. Além disso, é reconhecida a possibilidade de ocorrer, durante as etapas da PCR, a amplificação preferencial de um alelo em relação a outro (Weissensteiner & Lanchbury, 1996), o que poderia

resultar em uma genotipagem incorreta ou ambígua da amostra (Walsh *et al*.,1992), justificando o fato da população não estar em EHW.

Os erros de genotipagem podem influenciar marcadamente as conclusões biológicas de um estudo (Pompanon *et al*., 2005), mas poucos estudos quantificam a taxa de erros de genotipagem (Bonin *et al*., 2004; Hoffman & Amos, 2005). Os erros de genotipagem devem-se, basicamente, a quatro fatores: à própria sequência do DNA, à baixa qualidade ou quantidade do DNA, aos artefatos bioquímicos e aos fatores humanos (Pompanon *et al*., 2005). Não obstante, a despeito do rigor metodológico, com a adoção de replicatas em caso de genótipos obtidos sem qualidade, adotado nesse estudo, não é possível descartar completamente a hipótese da ocorrência de falhas de nenhum desses tipos durante a condução dos procedimentos de laboratório, especialmente em estudos cuja amostra não se encontra em EHW.

A obtenção de informações em estudos com um volume vultuoso de dados como esse depende da participação de muitas pessoas: desde o diagnóstico e a realização dos exames, até o registro e a compilação dos dados. Com isso, é inevitável a ocorrência de algum tipo de falha humana ao longo de todo o processo. Portanto, esse fato reforça a necessidade de estudos de replicação que visem confirmar ou não os achados não somente desse estudo, mas de qualquer outro que se proponha a fornecer subsídios para novas diretrizes prognósticas e terapêuticas através de inovações biotecnológicas. Os fatores de risco genéticos relacionados a asma devem ser identificados para ajudar a diagnosticar seus subtipos e implementar opções terapêuticas satisfatórias (Liang *et al*., 2014). Há uma necessidade urgente de identificar alguns biomarcadores significativos que podem prever esta doença e guiar as estratégias terapêuticas (Li *et al*., 2019).

6. CONCLUSÃO

A asma é reconhecidamente uma doença multifatorial complexa. Nos últimos anos uma forte base genética tem sido estabelecida para essa doença e muitos estudos tentam desvendar os mecanismos moleculares que conduzem ao desenvolvimento da asma e aos quadros clínicos de gravidade. Nesse contexto, esse estudo se propôs a verificar a existência de associação entre o SNP C79G do gene *ADRB2* e um conjunto de variáveis clínicas dos fenótipos de asma, a reversibilidade da obstrução brônquica e os diagnósticos de gravidade da doença (asma leve, moderada e grave). Entretanto, as análises realizadas não revelaram evidência de associação dos genótipos de C79G e nenhuma das variáveis clínicas investigadas.

Existe, contudo, um número expressivo de estudos que apoiam os resultados apresentados nesse estudo. A despeito de ser a principal doença crônica dos pulmões, não existem testes laboratoriais específicos para o diagnóstico ou prognóstico da asma até o momento. Estudos como o aqui apresentado têm o potencial de inovar nas estratégias diagnósticas com a identificação de marcadores genéticos associados à asma. Elucidar o papel dos polimorfismos genéticos associados à asma pode levar a inovações biotecnológicas que, possibilitarão a implementação de novas diretrizes prognósticas e terapêuticas, de modo a propor tratamentos personalizados. Com isso, pode-se reduzir os efeitos adversos dos tratamentos aos pacientes, assim como viabilizar o emprego mais eficiente e direcionado dos recursos.

7. REFERÊNCIAS

AARON, S. D. et al. Overdiagnosis of asthma in obese and nonobese adults. **CMAJ**, v. 179, n. 11, p. 1121-1131, 2008.

ALFVÉN, T. et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle–the PARSIFAL study. **Allergy**, v. 61, n. 4, p. 414-421, 2006.

ALLEN, M. et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. **Nature Genetics**, v. 35, n. 3, p. 258, 2003.

ALMOMANI, B. A. et al. Association of genetic variants with level of asthma control in the Arab population. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 12, p. 35, 2019.

AL-RUBAISH, A. β2-adrenergic receptor gene polymorphisms in normal and asthmatic individuals in the Eastern Province of Saudi Arabia. **Annals of Saudi medicine**, v. 31, n. 6, p. 586-590, 2011.

AUSTIN, P. J. et al. Transcriptional profiling identifies the long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation (PVT1) as a novel regulator of the asthmatic phenotype in human airway smooth muscle. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 3, p. 780-789, 2017.

BALACI, L. et al. IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 6, p. 1103-1114, 2007.

BANDARU, S. et al. Analysis of *ADRB2* (Arg16Gly) gene variant with susceptibility, pharmacogenetic response and disease severity in south Indian asthmatics. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p. 2146-2155, 2015.

BATEMAN, E. D. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **European Respiratory Journal**, v. 31, n. 1, p. 143-178, 2008.

BEHERA, D.; SEHGAL, I. S. Bronchial asthma-Issues for the developing world. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 141, n. 4, p. 380, 2015.

BIRBIAN, N. et al. Association of β 2-Adrenergic Receptor Polymorphisms with Asthma in a North Indian Population. **Lung**, v. 190, n. 5, p. 497-504, 2012.

BONIN, A. et al. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 11, p. 3261-3273, 2004.

BOUZIGON, E. et al. Meta-analysis of 20 genome-wide linkage studies evidenced new regions linked to asthma and atopy. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. 6, p. 700, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 12 (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: 2006. 108 p.

CAMPOS, H. S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. **Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária**. 15(1): 47 – 60. 2007.

CAMPOS, H. S. Asma grave. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 103, n. 2, 2015.

CARDOSO, T. A. et al. Impacto da asma no Brasil: análise longitudinal de dados extraídos de um banco de dados governamental brasileiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 163-168, 2017.

CARR, T. F.; BLEECKER, E. Asthma heterogeneity and severity. **World Allergy Organization Journal**, v. 9, n. 1, p. 41, 2016.

CARROLL, C. L. et al. β2-adrenergic receptor polymorphisms affect response to treatment in children with severe asthma exacerbations. **Chest**, v. 135, n. 5, p. 1186-1192, 2009.

CATALDO, D. D. et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 2, p. 491-498, 2002.

CHOUDHRY, S. et al. Pharmacogenetic differences in response to albuterol between Puerto Ricans and Mexicans with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 6, p. 563-570, 2005.

CHUNG, L. P.; WATERER, G.; THOMPSON, P. J. Pharmacogenetics of *β2* adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting β-agonists and asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, n. 3, p. 312-326, 2011.

CHUNG, K. F. et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. **European Respiratory Journal**, v. 43, n. 2, p. 343-373, 2014.

CONSENTINO, C. L. M. et al. Influência dos polimorfismos no receptor beta 2 adrenérgico na presença de broncoespasmo induzido pelo exercício em adolescentes. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 34, n. 1, p. 24-29, 2016.

CONTOLI, M.; PAPI, A. When asthma diagnosis becomes a challenge. **European Respiratory Journal**, 36:255–260, 2010.

CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. G.; MANOLI, E. N.; IOANNIDIS, J. P. A. Meta-analysis of the association of β2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 963-972, 2005.

DANIELEWICZ, H. What the Genetic Background of Individuals with Asthma and Obesity Can Reveal: Is β2-Adrenergic Receptor Gene Polymorphism Important?. **Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology**, v. 27, n. 3, p. 104-110, 2014.

DAS, S. et al. GSDMB induces an asthma phenotype characterized by increased airway responsiveness and remodeling without lung inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 46, p. 13132-13137, 2016.

DE FARIAS, I. C. J. **Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes: TGFB1, CD14, IL4, IL4-Ra, e ADAM33 com a gravidade da asma atopica entre crianças e adolescentes**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

DENHAM, S. et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. **Respiratory Research**, v. 9, n. 1, p. 38, 2008.

DE PAIVA, A. C. Z. et al. Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 10, n. 1, p. 8, 2014.

DEVRIES, A. et al. Epigenome-wide analysis links *SMAD3* methylation at birth to asthma in children of asthmatic mothers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 2, p. 534-542, 2017.

DEWAR, J. C. et al. The glutamine 27 β2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 2, p. 261-265, 1997.

DHONDALAY, G. K. et al. Multi-omic profiling of asthma using high-throughput sequencing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. AB203, 2019.

EDER, W.; EGE, M. J.; VON MUTIUS, E. The asthma epidemic. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 21, p. 2226-2235, 2006.

ELIAS, J. A. et al. New insights into the pathogenesis of asthma. **The Journal of Clinical Investigatio**n, v. 111, n. 3, p. 291-297, 2003.

ETTINGER, S. Asthma and Obesity. In: ETTINGER, S. *Nutritional Pathophysiology of Obesity and Its Comorbidities: A Case-study Approach*. Academic Press, 2016. p.191-208.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

FENG, Y. et al. Correlation between *ADRB2* gene polymorphism and childhood bronchial asthma susceptibility and drug resistance. **Journal of Applied Clinical Pediatrics**, v. 33, n. 16, p. 1237-1241, 2018.

FERREIRA, D. S. et al. Airway pathology in severe asthma is related to airflow obstruction but not symptom control. **Allergy**, v. 73, n. 3, p. 635-643, 2018.

FINKELSTEIN, Y. et al. Polymorphism of the *ADRB2* gene and response to inhaled beta-agonists in children with asthma: a meta-analysis. **Journal of Asthm**a, v. 46, n. 9, p. 900-905, 2009.

FISH, S. C. et al. IgE generation and mast cell effector function in mice deficient in IL-4 and IL-13. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 7716-7724, 2005.

FITZGERALD, M. et al. **Pocket guide for asthma management and Prevention. For adults and children**, v. 5, 2015. Disponível em: http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/01/GINA_Pocket_2015.pdf Acesso em: 06 ago. 2019.

FORNO, E. et al. Asthma in Latin America. **Thorax**, v. 70, n. 9, p. 898-905, 2015.

FOSTER, P, S. et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 1, p. 195-201, 1996.

FU, J. et al. Association between the genetic polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene and the asthma susceptibility and clinical phenotypes in a Chinese population. **Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese Journal of Medical Genetics**, v. 19, n. 1, p. 41-45, 2002.

GAO, G.; WANG, S.; ZHANG, J. Study on beta 2 adrenergic receptor genetic polymorphisms in asthmatics in the people of the Han nationality of northern China. **Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 23, n. 2, p. 93-97, 2000.

GENOV, I. R. et al. Gene polymorphisms as susceptibility factors in Brazilian asthmatic children and adolescents. In: **World Allergy Organization Journal**. BioMed Central, 2015. p. A235-A235.

GHANI, M. U. et al. A report on asthma genetics studies in Pakistani population. **Advancements in Life Sciences**, v. 4, n. 2, p. 33-38, 2017.

GIUBERGIA, V. et al. Influence of β2-adrenoceptor polymorphisms on the response to chronic use of albuterol in asthmatic children. **Pediatric Pulmonology**, v. 43, n. 5, p. 421-425, 2008.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA). **Global Strategy for the Asthma Management and Prevention**, 2017. Disponível em: < https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/04/wmsGINA-2017-main-report-final_V2.pdf > Acesso em: 06 ago. 2019.

GREEN, S. A. et al. Amino-terminal polymorphisms of the human. Beta. 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. **Biochemistry**, v. 33, n. 32, p. 9414-9419, 1994.

GREEN, S. A. et al. Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells**. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 25-33, 1995.

GUALDI, L. P. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, 2010.

GUO, X. et al. An association and meta-analysis study of 4 SNPs from beta-2 adrenergic receptor (*ADRB2*) gene with risk of asthma in children. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 34, n. 1, p. 11-20, 2016.

HALL, I. P. et al. Association of Glu 27 β2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. **The Lancet**, v. 345, n. 8959, p. 1213-1214, 1995.

HALL, I. P. Beta 2 adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important?. **Thorax**, v. 51, n. 4, p. 351, 1996.
HAWKINS, G. A.; WEISS, S. T.; BLEECKER, E. R. Clinical consequences of ADRβ2 polymorphisms. **Pharmacogenomics**, v.9, n.3, p.349–358, 2008.

HOFFMAN, J. I.; AMOS, W. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 599-612, 2005.

HOLGATE S. T.; THOMAS, M. Asthma. In: **Middleton's Allergy Essentials**. Elsevier, 2017. p. 73-116.

HOLLOWAY, J. W.; KOPPELMAN, G. H. Identifying novel genes contributing to asthma pathogenesis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 7, n. 1, p. 69-74, 2007.

HUSSEIN, M. H. et al. A passenger strand variant in miR-196a2 contributes to asthma severity in children and adolescents: a preliminary study. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 94, n. 4, p. 347-357, 2016.

HUSSEIN, M. H. et al. Beta2-adrenergic receptor gene haplotypes and bronchodilator response in Egyptian patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Advances in Medical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 193-201, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013:** percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas - Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar, (PENSE), 2015**. Rio de Janeiro, 2015.

JALBA, M. S.; RHOADS, G.; DEMISSIE, K. Association of Codon 16 and Codon 27 β2-Adrenergic Receptor Gene Polymorphisms with Obesity: A Meta-analysis. **Obesity**, v. 16, n. 9, p. 2096-2106, 2008.

JOUBERT, B. R. et al. DNA methylation in newborns and maternal smoking in pregnancy: genome-wide consortium meta-analysis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 98, n. 4, p. 680-696, 2016.

JOVICIC, N. et al. *ADRB2* gene polymorphisms and salbutamol responsiveness in Serbian children with asthma. **Balkan Journal of Medical Genetics**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2018.

KANEKO, Y. et al. Asthma phenotypes in Japanese adults-their associations with the CCL5 and *ADRB2* genotypes. **Allergology International**, v. 62, n. 1, p. 113-121, 2013.

KARACA, S. et al. Allergy-specific phenome-wide association study for Immunogenes in Turkish children. **Scientific Reports**, v. 6, p. 33152, 2016.

KEIR, S.; PAGE, C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 721-730, 2008.

KERSTEN, E. T. G..; KOPPELMAN, G. H. Pharmacogenetics of asthma: toward precision medicine. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 23, n. 1, p. 12-20, 2017.

KHAN, I. et al. Association of Arg16Gly and Gln27Glu, β2-adrenergic receptor gene polymorphism with asthma. A systematic review and meta-analysis of case control studies. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 68, n. 1, p. 90-97, 2018.

KIM, S. H. et al. Association of β2-adrenoreceptor polymorphisms with nocturnal cough among atopic subjects but not with atopy and nonspecific bronchial hyperresponsiveness. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 4, p. 630-635, 2002.

KING, N. E. et al. Expression and regulation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 8 in experimental asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 257-265, 2004.

KOBILKA, B. K. et al. Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta-2-adrenergic receptor and their putative promoter regions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 15, p. 7321-7327, 1987.

KUDO, M.; ISHIGATSUBO, Y.; AOKI, I. Pathology of asthma. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 263, 2013.

LAITINEN, T. et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 300-304, 2004.

LE, A. V. et al. Inhibition of allergen-induced airway remodeling in *SMAD3*-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 7310-7316, 2007.

LEE, C. G. et al. Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. **Nature Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1095, 2004.

LEE, M. Y. et al. Polymorphisms of the β2-adrenergic receptor correlated to nocturnal asthma and the response of terbutaline nebulizer. **Pediatrics & Neonatology**, v. 52, n. 1, p. 18-23, 2011.

LEITE, N. et al. Associação do gene *ADRB2* com sobrepeso e asma em crianças e adolescentes e sua relação com a aptidão física. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n. 4, p. 381-386, 2015.

LI, H.F. et al. Association between *ADAM33* polymorphisms and asthma risk: a systematic review and meta-analysis. **Respiratory Research**, v. 20, n. 1, p. 38, 2019.

LIANG, R.; LEI, W.; GANG, W. New insight into genes in association with asthma: literature-based mining and network centrality analysis. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 13, p. 2472-2479, 2013.

LIANG, S. Beta-2 adrenergic receptor (*ADRB2*) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e104488, 2014.

LIANG, L. et al. An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 670, 2015.

LIANG, S. et al. S2 and T2 *ADAM33* polymorphisms and haplotype associated with asthma in the Zhuang population in Guangxi, China. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 12, p. 23691-23696, 2016.

LIM, D. H. et al. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged *MMP-9*-deficient mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 291, n. 2, p. L265-L271, 2006.

LIMA, J. J. et al. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. **Metabolism**, v. 56, n. 6, p. 757-765, 2007.

LINDENSMITH, J. et al. Overdiagnosis of asthma in the community. **Canadian Respiratory Journal**, v. 11, n. 2, p. 111-116, 2004.

LITONJUA, A. A. et al. Very important pharmacogene summary *ADRB2*. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 20, n. 1, p. 64, 2010.

LIU, Z. Q. et al. Association between polymorphisms and haplotypes of the beta-2 adrenergic receptor gene and asthma in a Chinese Han population. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 10, p. 3812, 2014.

LOHMUELLER, K. E. et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. **Nature Genetics**, v. 33, n. 2, p. 177, 2003.

LOS, H.; KOPPELMAN, G. H.; POSTMA, D. S. The importance of genetic influences in asthma**. European Respiratory Journal**, v. 14, n. 5, p. 1210-1227, 1999.

LOU, Y. et al. A46G and C79G polymorphisms in the β2-adrenergic receptor gene (*ADRB2*) and essential hypertension risk: a meta-analysis. **Hypertension Research**, v. 33, n. 11, p. 1114, 2010.

LUCAS, A. E. M. et al. Overtreatment with inhaled corticosteroids and diagnostic problems in primary care patients, an exploratory study. **Family Practice**, v. 25, n. 2, p. 86-91, 2008.

LUKS, V. P.; VANDEMHEEN, K. L.; AARON, S. D. Confirmation of asthma in an era of overdiagnosis. **European Respiratory Journal**, v. 36, n. 2, p. 255-260, 2010.

MAES, T. et al. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1433-1446, 2016.

MARKLUND, B.; TUNSÄTER, A.; BENGTSSON, C. How often is the diagnosis bronchial asthma correct? **Family Practice**, v. 16, n. 2, p. 112-116, 1999.

MARSON, F.A.L. et al. Polymorphisms in *ADRB2* gene can modulate the response to bronchodilators and the severity of cystic fibrosis. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 12, n. 1, p. 50, 2012.

MARTIN, A.C. et al. β 2-adrenoceptor polymorphisms predict response to β 2-agonists in children with acute asthma. **Journal of Asthma**, v. 45, n. 5, p. 383-388, 2008.

MARTINEZ, F. D. et al. Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 12, p. 3184-3188, 1997.

MARTÍNEZ-AGUILAR, N. E. et al. SPINK5 and ADRB2 haplotypes are risk factors for asthma in Mexican pediatric patients. **Journal of Asthma**, v. 52, n. 3, p. 232-239, 2015.

MENG, J. F. ROSENWASSER, L. J. Unraveling the genetic basis of asthma and allergic diseases**. Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 2, n. 4, p. 215-227, 2010.

MIGITA, O. et al. *ADRB2* polymorphisms and asthma susceptibility: transmission disequilibrium test and meta-analysis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 134, n. 2, p. 150-157, 2004.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. R. N. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MILLER, M. R. et al. Standardisation of spirometry. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 2, p. 319-338, 2005.

MILLER, M. et al. *ORMDL3* transgenic mice have increased airway remodeling and airway responsiveness characteristic of asthma. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3475-3487, 2014.

MOTTA, A. A.; KALIL, J.; BARROS, M. T. Testes cutâneos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 28, n. 2, p. 73-83, 2005.

NAKAWAH, M. O.; HAWKINS, C.; BARBANDI, F. Asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and the overlap syndrome. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 26, n. 4, p. 470-477, 2013.

NAUS, S. et al. The metalloprotease-disintegrin *ADAM8* is essential for the development of experimental asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 12, p. 1318-1328, 2010.

NICOLAE, D. et al. Fine mapping and positional candidate studies identify *HLA-G* as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. **The American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 2, p. 349-357, 2005.

NIELSEN, A. O. et al. Variants of the *ADRB2* Gene in COPD: Systematic Review and Meta-Analyses of Disease Risk and Treatment Response. COPD: **Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 14, n. 4, p. 451-460, 2017.

NOGUCHI, E. et al. Positional identification of an asthma susceptibility gene on human chromosome 5q33. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 2, p. 183-188, 2005.

NOVAK, N.; BIEBER, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 2, p. 252-262, 2003.

NOVEMBRE, J. Pritchard, Stephens, and Donnelly on population structure. **Genetics**, v. 204, n. 2, p. 391, 2016.

OBER, C.; HOFFJAN, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 95, 2006.

OBER, C.; YAO, T. C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. **Immunological Reviews**, v. 242, n. 1, p. 10-30, 2011.

OBER, C. Asthma genetics in the post-GWAS era. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 13, n. Supplement 1, p. S85-S90, 2016.

PALMER, C. NA et al. Arginine-16 β2 adrenoceptor genotype predisposes to exacerbations in young asthmatics taking regular salmeterol. **Thorax**, v. 61, n. 11, p. 940-944, 2006.

PAUWELS, R. A.; BRUSSELLE, G. J.; KIPS, J. C. Cytokine manipulation in animal models of asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 4, p. S78-S81, 1997.

PAVORD, I. D.; BUSH, A.; HOLGATE, S. Asthma diagnosis: addressing the challenges. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 5, p. 339-341, 2015.

PLAZINSKA, A.; PLAZINSKI, W.; JOZWIAK, K. Agonist binding by the β2-adrenergic receptor: an effect of receptor conformation on ligand association–dissociation characteristics. **European Biophysics Journal**, v. 44, n. 3, p. 149-163, 2015.

POLDERMAN, T. J. C. et al. Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. **Nature Genetics**, v. 47, n. 7, p. 702, 2015.

POMPANON, F. et al. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 847, 2005.

PRABHUDAS, R. R. **Determinantes genéticos na fisiopatologia da asma**. 2013. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Biologia Molecular e Genética) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RASMUSSEN, F.; HANCOX, R. J. Mechanisms of obesity in asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 14, n. 1, p. 35-43, 2014.

REIHSAUS, E. et al. Mutations in the gene encoding for the 132-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 8, n. 3, p. 334-339, 1993.

RESENDE, E. P. et al. Asthma and rhinitis have different genetic profiles for *IL13*, *IL17A* and *GSTP1* polymorphisms. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 23, n. 1, p. 10-16, 2017.

ROGUEDAS, A. M. et al. Intrinsic atopic dermatitis is associated with a beta-2 adrenergic receptor polymorphism. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 86, n. 5, p. 447-448, 2006.

SAKAMOTO, T.; HIZAWA, N. Genetics in Asthma. In: YOKOYAMA, A. (Ed.). **Advances in Asthma**. Singapore: Springer, 2019. p. 3-14.

SALES, I. R. F. et al. Associação dos polimorfismos nos genes da *IL-4*, *IL-5*, *IL-13* e *IL-10* e a asma infantil: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 35, p. 89-97, 2012.

SCAPARROTTA, A. et al. Role of *THRB*, *ARG1*, and *ADRB2* genetic variants on bronchodilators response in asthmatic children. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, 2019.

SHAH, N. J. et al. Effect of *ADRB2* (adrenergic receptor β 2) gene polymorphisms on the occurrence of asthma and on the response to nebulized salbutamol in South Indian patients with bronchial asthma. **Journal of Asthma**, v. 52, n. 8, p. 755-762, 2015.

SHAW, D. et al. A cross-sectional study of patterns of airway dysfunction, symptoms and morbidity in primary care asthma. **Respiratory Journal**, v. 21, n. 3, p. 283, 2012.

SOCIEDADE DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (SOPTERJ). **Protocolo de Diagnóstico e Tratamento de Asma da Sociedade do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2018. 10 p.

SOOD, N. et al. Leveraging electronic health records to assess the role of *ADRB2* single nucleotide polymorphisms in predicting exacerbation frequency in asthma patients. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 28, n. 11, p. 256-259, 2018.

STAUS, D. P. et al. Regulation of β2-adrenergic receptor function by conformationally selective single-domain intrabodies. **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 3, p. 472-481, 2014.

STEIN, M. M. et al. Innate immunity and asthma risk in Amish and Hutterite farm children. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 411-421, 2016.

STIRBULOV, R. et al. Cost of severe asthma in Brazil — systematic review. **Journal of Asthma**, v. 53, n. 10, p. 1063-1070, 2016.

SZCZEPANKIEWICZ, A. et al. Role ofADRB2 gene polymorphism in asthma and response to β 2-agonists in Polish children. **Journal of applied genetics**, v. 50, n. 3, p. 275-281, 2009.

TAN, S. et al. Association between β2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. **The Lancet**, v. 350, n. 9083, p. 995-999, 1997.

TAUBE, C.; DAKHAMA, A.; GELFAND, E. W. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models**. International Archives of Allergy and Immunology**, v. 135, n. 2, p. 173-186, 2004.

THAKKINSTIAN, A. et al. Systematic review and meta-analysis of the association between β2-adrenoceptor polymorphisms and asthma: a HuGE review. **American Journal of Epidemiology,** v. 162, n. 3, p. 201-211, 2005.

TIAN, M. et al. ADRB2 polymorphisms in allergic asthma in Han Chinese children. In: **International forum of allergy & rhinology**. 2016. p. 367-372.

TORAIH, E. A. et al. Beta2-adrenergic receptor variants in children and adolescents with bronchial asthma. **Frontiers in bioscience** (Elite edition), v. 11, p. 61-78, 2019.

TORRES, R.; PICADO, C.; DE MORA, F. Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans. **Archivos de Bronconeumología**, v. 41, n. 3, p. 141-152, 2005.

VAN EERDEWEGH, P. et al. Association of the *ADAM33* gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature**, v. 418, n. 6896, p. 426, 2002.

WALSH, P. S.; ERLICH, H. A.; HIGUCHI, R. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. **Genome Research**, v. 1, n. 4, p. 241-250, 1992.

WANG, J. Y. et al. An association study of 13 SNPs from seven candidate genes with pediatric asthma and a preliminary study for genetic testing by multiple variants in Taiwanese population. **Journal of Clinical Immunology**, v. 29, n. 2, p. 205-209, 2009.

WANG, X. et al. *ADRB2* Arg16Gly polymorphism and pulmonary function response of inhaled corticosteroids plus long-acting beta agonists for asthma treatment: a systematic review and meta-analysis. **Canadian Respiratory Journal**, v. 2018, 2018.

WEIR, T. D. et al. β2-Adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, n. 3, p. 787-791, 1998.

WEISSENSTEINER, T.; LANCHBURY, J.S. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. **Biotechniques**, v. 21, n. 6, p. 1102-1108, 1996.

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

WHO - World Health Organization. **Chronic Respiratory Diseases**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/respiratory/asthma/e>. Acesso em: 09 dez. 2017.

WIJESINGHE et al. International trends in asthma mortality rates in the 5-to 34-year age group. **Chest**, v. 135, n. 4, p. 1045-1049, 2009.

WILLIS-OWEN, S. A. G.; COOKSON, W. O. C.; MOFFATT, M. F. The genetics and genomics of asthma. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, p. 223-246, 2018.

WHITE, J. H. et al. Identification of a novel asthma susceptibility gene on chromosome 1qter and its functional evaluation. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 13, p. 1890-1903, 2008.

XU, C. J. et al. The emerging landscape of dynamic DNA methylation in early childhood. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 25, 2017.

XU, C. J. et al. DNA methylation in childhood asthma: an epigenome-wide meta-analysis. **The lancet Respiratory medicine**, v. 6, n. 5, p. 379-388, 2018.

YANG, I. V. et al. DNA methylation and childhood asthma in the inner city. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 1, p. 69-80, 2015.

YANG, I. V. et al. The nasal methylome: a key to understanding allergic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 195, n. 6, p. 829-831, 2017.

YANG, Q. J.; GUO, C. Pharmacogenetic Study in Asthma. In: Wang, X; Chen, Z. (Eds.). **Genomic Approach to Asthma**. Singapore: Springer, 2018. p. 201-219.

YU, X. et al. Correlation study on β2-adrenergic receptor gene polymorphisms and asthma susceptibility: evidence based on 57 case-control studies. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 9, p. 3908-3925, 2019.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 181, 2003.

ZHAO, H. et al. Association between *ADRB2* genetic polymorphisms and the risk of chronic obstructive pulmonary disease: a case–control study in a Chinese population. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 21, n. 8, p. 491-496, 2017.

ZÖLLNER, I. K. et al. No increase in the prevalence of asthma, allergies, and atopic sensitisation among children in Germany: 1992–2001. **Thorax**, v. 60, n. 7, p. 545-548, 2005.