

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR



**A INFLUÊNCIA DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA, ASSOCIADA A
POLIMORFISMOS NO GENE DO RECEPTOR DA IL-13 (IL-13RA1) E A
SUSCEPTIBILIDADE PARA ASMA EM UMA AMOSTRA MISCIGENADA DO SUL
DA BAHIA**

SONIA MARIA TORQUATO DOS REIS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2014

SONIA MARIA TORQUATO DOS REIS

**A INFLUÊNCIA DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA, ASSOCIADA A
POLIMORFISMOS NO GENE DO RECEPTOR DA IL-13 (IL-13RA1) E A
SUSCEPTIBILIDADE PARA ASMA EM UMA AMOSTRA MISCIGENADA DO SUL
DA BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2014

R375

Reis, Sônia Maria Torquato dos.

A influência da ancestralidade genômica, associada a polimorfismos no gene do receptor da IL-13 (IL-13RA1) e a susceptibilidade para asma em uma amostra miscigenada do Sul da Bahia / Sônia Maria Torquato dos Reis. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

xii, 67 f. : il. ; anexos.

Orientador: Marco Antônio Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Asma. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Marcadores genéticos. I. Título.

CDD 616.238

SONIA MARIA TORQUATO DOS REIS

**A INFLUÊNCIA DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA, ASSOCIADA A
POLIMORFISMOS NO GENE DO RECEPTOR DA IL-13 (IL-13RA1) E A
SUSCEPTIBILIDADE PARA ASMA EM UMA AMOSTRA MISCIGENADA DO SUL
DA BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Prof. Dr. Marco Antônio Costa
(UESC - Orientador)

Prof. (a) Dra. Jane Lima Santos
(UESC)

Prof. (a) Dra. Patrícia Santos Pereira Lima
(UESB)

Prof (a). Dra. Luciana Carvalho
(UESC)

AGRADECIMENTOS

- A Deus, meu grande mestre que me dá todos os dias da minha vida forças e coragem para seguir em frente, obrigado senhor;

- A Luciano Gama, o grande idealizador deste trabalho, por sua amizade e ajuda constante em todo percurso;

- Ao meu orientador Marco Antônio e minhas co-orientadoras Sandra Mara e Sandra Gadelha, que me ajudaram a encontrar o caminho, me acolheram e me deram todo apoio e confiança;

- A minha IC e amiga Ohana, que ao meu lado fez tudo acontecer de fato;

- A todos os profissionais pneumologistas e pacientes que colaboraram com minha pesquisa, sem eles nada disso seria possível;

- A UESC e a CAPES pela concessão da bolsa e incentivo a pesquisa;

- Aos amigos do PPGGBM e do LAFEM, a todos vocês a minha gratidão.

... pela grandeza de um momento já se pode medir a grandeza de uma vida.

.... em absolutamente nada existe que capacite tão bem o homem para superação de dificuldades como a consciência de ter uma tarefa a cumprir.

Vicktor E. Frankl

ÍNDICE

EXTRATO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
INTRODUÇÃO	15
Objetivos da pesquisa	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
A Fisiopatologia da Asma	20
Genética da asma: associação de genes candidatos.....	22
Asma e os grupos “étnicos”	24
A ancestralidade em populações miscigenadas	26
Marcadores Informativos de Ancestralidade	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
Delineamento do estudo	29
Caracterização sócio-demográfica dos indivíduos participantes (amostragem).....	30
Extração e quantificação de DNA genômico	31
Marcadores informativos de ancestralidade (MIAs).....	31
Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	32
Reação de restrição.....	32
Genotipagem dos MIAs e IL-13RA1.....	33
Análise estatística	37
RESULTADOS	39
Frequências alélicas	39
Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg	41
Associação par a par entre loci.....	44
Diferenciação genética das populações.....	44

Mistura étnica.....	44
Polimorfismo no IL-13RA1 e sua associação com a asma	45
DISCUSSÃO	48
Frequências alélicas	48
Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg	49
Associação par a par entre loci.....	51
Diferenciação genética das populações.....	51
Mistura étnica.....	51
Polimorfismo no IL-13RA1 e sua associação com a asma	52
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	60
Termos de consentimento livre e esclarecido.....	60
Questionário	66

REIS, Sonia Maria Torquato dos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2014. **A influência da ancestralidade genômica, associada a polimorfismos no gene do receptor da IL-13 (IL-13RA1) e a susceptibilidade para asma em uma amostra miscigenada do sul da Bahia.** Orientador: Marco Antônio Costa. Co-orientadora: Sandra Mara Bispo Sousa e Sandra Rocha Gadelha Mello.

A asma é uma patologia inflamatória crônica das vias aéreas inferiores e, dentre fatores relacionados à sua etiologia, está o caráter hereditário. É uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo e resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais. A expressão aumentada ou diminuída de genes envolvidos no processo inflamatório define as alterações celulares e estruturais do aparelho respiratório enquanto o meio ambiente modula os diferentes fenótipos asmáticos. A exposição a fatores ambientais e infecções específicas do trato respiratório sobre um genoma predisposto levam a respostas celulares do tipo Th2, envolvendo ainda citocinas como a IL-13 e seu respectivo receptor que é uma proteína crítica para a patogênese dessa doença. Diversos estudos demonstram que SNPs na região promotora do gene do receptor de IL-13 (IL-13RA1), têm sido relacionado com valores elevados de IgE e com asma alérgica. Com o objetivo de estimar as contribuições africanas, europeias e ameríndias, utilizando sete MIAs (Sb19.3, APO, AT3, RB2003 e LPL, CKM e PV92), e analisar o polimorfismo no receptor de IL-13 (IL-13RA1) e sua associação com a asma em uma amostra caso/controle da região sul da Bahia. Foram selecionados 114 casos e 206 controles. Os resultados desse estudo mostraram-se significativos para os alelos*1 dos sete *loci* analisados (APO, SB19.3, PV92, AT3, LPL, RB2300 e CKM). Os desvios encontrados do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os *loci* SB19.3, PV92 e AT3 podem ser explicados pela falta de heterozigotos, apenas os *loci* RB2300 e CKMM podem ser explicados pelo excesso de heterozigotos. De 21 análises de associações par a par realizadas foram observados apenas uma para o *loci* AT3/LPL. A diferenciação genotípica e gênica foi significativa para os *loci* AT3, APO, Sb19.3 e LPL. As estimativas de mistura étnica mostraram que a maior contribuição foi ameríndia tanto para os casos (37,42%) como para os controles (50,52%), demonstrando que há diferenças nas contribuições étnicas das amostras da região sul quando comparadas as encontradas em amostra populacional de Salvador. O polimorfismo no receptor de IL-13 (IL-13RA) apresentou associação significativa com as variáveis: secreção nasal, espirros, rinite e história familiar. A diferenciação gênica populacional observada em quatro dos sete *loci* analisados, desvios no EHW, associações par a par entre *loci* não ligados, contribuições variáveis nas estimativas de mistura étnica entre as amostras indicam sub-estruturação populacional e a necessidade de realização do controle genômico.

Palavras-chave: asma, polimorfismo no gene IL-13RA1, marcadores informativos de ancestralidade. REIS, Sonia Maria Torquato of, MS, State University of Santa Cruz, Ilheus, February 2014. **The influence of genetic ancestry associated with polymorphisms in the IL-13 (IL-13RA1) receptor gene and susceptibility to asthma in a multiracial sample of southern Bahia.** Advisor: Marco Antonio Costa. Co-Advisor: Sandra Mara Bispo Sousa and Sandra Rocha Mello Gadelha.

Asthma is a chronic inflammatory disease of the lower airways and among factors related to etiology is hereditary . It is one of the most common worldwide and results from the interaction between genetic and environmental factors chronic diseases . Increased or decreased expression of genes involved in the inflammatory process defines cellular and structural alterations of the respiratory system while the environment modulate the different asthma phenotypes . Exposure to environmental factors and specific respiratory tract infections over a predisposed genome lead to Th2 cell responses , even involving cytokines such as IL -13 and its corresponding receptor is a protein critical to the pathogenesis of this disease . Several studies show that SNP in the promoter region of the IL -13 receptor (IL - 13RA1) gene has been associated with elevated IgE levels and allergic asthma. In order to estimate the African , European and Amerindian contributions , using seven MIAs (Sb19.3 , APO , AT3 , RB2003 and LPL , CKM and PV92) , and analyze the polymorphism in the IL -13 receptor (IL - 13RA1) and its association with asthma in a sample case / control of southern Bahia . 114 cases and 206 controls were selected . The results of this study showed the alleles * 1 for seven loci analyzed (PDB SB19.3 , PV92 , AT3 , LPL , RB2300 and CKM) . Deviations found in Hardy- Weinberg equilibrium for SB19.3 , PV92 and AT3 loci can be explained by the lack of heterozygotes , only the loci RB2300 CKMM and can be explained by the excess of heterozygotes . 21 analyzes performed alongside pair associations were observed only for the loci AT3/LPL . Genotypic and gene differentiation was significant for AT3 , APO , Sb19.3 and LPL loci . Estimates of ethnic mixture showed that the major contribution was to Amerindian cases (37.42 %) and for the controls (50.52 %) both , demonstrating that there are ethnic differences in the samples from southern contributions compared to those found in population sample of Salvador . Polymorphism in the IL -13 receptor (IL - 13RA) was significantly associated with the variables : nasal discharge , sneezing , rhinitis and family history . Population genetic differentiation observed in four of the seven loci analyzed , deviations in HWE , pairwise associations between unlinked loci , variable contributions in estimates of ethnic mix between samples indicate sub - population structure and the necessity of genomic control

Keywords: asthma, polymorphism in the IL-13RA1 gene of ancestry informative markers.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

- Figura 1.** Raias 1, 2, 3, 5 e 7 indivíduos homocigotos (+/+). Raia 6 indivíduo heterocigoto (+/-) . Raia 4 indivíduo homocigoto (-/-).....34
- Figura 2.** Nas raias 1, 8 e 9 encontram-se homocigotos para inserção (+/+), na raia 4, homocigotos para ausência da inserção (-/-), e nas raias 2, 3, 5, 6 e 7 heterocigotos (-/+).....34
- Figura 3.** Raia 1 indivíduo heterocigoto. Raia 2 indivíduo homocigoto. Raias 3, 4, 5, e 6 indivíduos homocigotos.....35
- Figura 4.** Raias 1, 2 e 5 indivíduos homocigotos. Raias 3, 4, 6, 7, 8 e 9 indivíduos heterocigotos35
- Figura 5.** Nas raias 1 e 3 encontram-se homocigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 4 , homocigoto para a presença do sítio de restrição (-/-), e na raia 2 heterocigoto (-/+).....36
- Figura 6.** Nas raias 2 e 5 encontram-se homocigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 1, 3 e 4 heterocigotos o sítio de restrição (-/+).....36
- Figura 7.** Nas raias 1 e 2 encontram-se homocigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 3 e 5, homocigotos para o sítio de restrição (-/-), e na raia 4, heterocigotos (-/+).....37
- Figura 8.** Nas raias 1, 2, 4 e 6 encontram-se homocigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 3 e 5, homocigotos para o sítio de restrição.
- Figura 9.** Comparação das frequências dos alelos *APO*1*, *PV92*1*, *RB2300*1*, *LPL*1*, *AT3*1*, *Sb19.3*1* e *CKM*1* nos casos e controles.....40
- Figura 10.** Diferencial de frequência (δ) dos alelos *Sb19.3*1*, *APO*1*, *PV92*1*, *AT3*1*, *LPL*1*, *RB2300*1*, *CKM*1* entre os grupos étnicos mundiais..... 41
- Figura 11.** Diferencial de frequência (δ) dos alelos *Sb19.3*1*, *APO*1*, *PV92*1*, *AT3*1*, *LPL*1*, *RB2300*1*, *CKM*1* nos grupos casos e controles.....42
- Figura 12.** Comparação gráfica das estimativas de mistura étnica obtida a partir de sete *loci* (*Sb19.3*, *APO*, *PV92*, *AT3*, *LPL*, *DRD2*, *RB2300* e *CKM*).....45
- Tabela 1.** Localização citogenética, enzimas de restrição e sequencia dos primers dos oito MIAs analisados.....31
- Tabela 2.** Enzima de restrição e sequência do *primer* do SNP para asma a ser analisado.....31
- Tabela 3.** Condições de PCR para os *loci* analisados no presente trabalho. Quantidade em μ L suficiente para uma reação.....32
- Tabela 4.** Frequências genotípicas e alélicas dos sete *loci* nas duas amostras analisadas.....39
- Tabela 5.** Diferencial de frequência (δ) dos *loci* AIMs entre grupos étnicos mundiais – Africano (AFR), Europeu (EUR) e Ameríndio (AMR) e os casos e controles. Os valores >50% estão destacados em negrito.....40

Tabela 6. Probabilidades de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson. 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy- Weinberg. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.....	43
Tabela 7. Probabilidades de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson. 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy- Weinberg (déficit de heterozigotos). Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.....	43
Tabela 8. Probabilidades de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson. 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy- Weinberg (excesso de heterozigotos). Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.....	43
Tabela 9. Diferenciação gênica genotípica baseada nos sete <i>loci</i> AIMs. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.....	44
Tabela 10. Estimativa de mistura étnica nas amostras analisadas, segundo o método de identidade gênica. Valores em percentuais.....	45
Tabela 11. Associações (X^2) e fatores de risco (OR) entre acometimentos frequentes na asma e os diferentes genótipos para o polimorfismo IL-13RA1. Os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MIAs	do inglês <i>Ancestry informative markers</i>
AFLP	do inglês <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DIEESE	Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos
DP	Desvio padrão
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GINA	do inglês <i>Global Initiative for Asthma</i>
GWS	do inglês <i>Genome Wide Scan</i>
IC	Intervalo de confiança
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
IL10	Interleucina 10
IL13	Interleucina 13
ISSR	do inglês <i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
OR	do inglês <i>Odds Ratio</i> (ou Razão de Chance)
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RAST	do inglês <i>Radioallergosorbent test</i>
RFLP	do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROC	do inglês <i>Receiver Operating Characteristic</i>
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SPSS	do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Ta	Temperatura de anelamento do <i>primer</i>

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	do ingles T- <i>helper</i> 1
Th2	de ingles T- <i>helper</i> 2
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IL-4R	Receptor de Interleucina 4
IL-13RA1	Cadeia alfa 1 do receptor de Interleucina 13
PSA	Population Especific Alleles

INTRODUÇÃO

A asma é um relevante problema de saúde pública e aparece entre as doenças mais frequentemente relacionadas com atendimentos em emergências e hospitalizações. É uma doença inflamatória crônica que provoca hiperresponsividade das vias aéreas inferiores, limitando o fluxo aéreo (SOLÉ et al., 2006). Essa inflamação leva o paciente a ter episódios de tosse, aumento da pressão torácica, sibilos e dispnéia (SMELTZER et al., 2009).

A asma acomete, aproximadamente, 200 a 300 milhões de indivíduos e é particularmente comum nos países desenvolvidos, onde 10% a 30% das crianças e dos adultos são portadores da doença (ASHER et al., 2006). O marco no estudo da asma em todo o mundo, o *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) em levantamentos realizados no Brasil, constatou que a prevalência de asma é elevada e atinge estimativas de países desenvolvidos, sendo que, 19% e 25% dos adolescentes e crianças, respectivamente, apresentam diagnóstico dessa patologia (SOLÉ et al., 2006).

Os óbitos de crianças menores de cinco anos no país representam cerca de 10% do número total de mortes. A doença é hoje a terceira causa de internações entre crianças e adultos jovens e, a maioria destas internações acontece justamente com pacientes que não fazem uso regular de medicamentos de manutenção (BRASIL, 2010).

O levantamento da frequência de asma ativa, grave e diagnosticada entre escolares e adolescentes em vinte cidades brasileiras, entre estas, três localizadas no estado da Bahia, (Salvador, Feira de Santana e Vitória da Conquista) mostrou a incidência mais elevada da asma ativa entre adolescentes (19,0%), nas cidades de Salvador e Vitória da Conquista (SOLÉ et al., 2006).

A asma demonstra ser uma condição comum e complexa, com heterogeneidade considerável tanto no seu fenótipo quanto na fisiopatologia e aliada à sua elevada prevalência, sendo assim torna-se importante estudá-la visando o melhor entendimento dos fatores genéticos e ambientais desencadeantes que levam a variações na história natural desta doença.

Em seu estudo de revisão Malerba e Pignatti (2005), propuseram localizar na literatura atual publicações que abordassem a genética da asma, identificando genes candidatos que estariam envolvidos direta ou indiretamente no desenvolvimento desta condição. Os seus achados sugeriram que os genes estão ligados e não seguem o modelo tradicional de herança mendeliana, uma vez que a etiopatogênese da asma envolve a ativação de muitos tipos diferentes de células (células B e T, eosinófilos, células dendríticas, entre outros) e moléculas (citocinas, mediadores intracelulares), mostrando a quão complexa e heterogênea é esta doença.

Estudos mais recentes também ratificam a natureza hereditária da asma, por meio da análise de estudos anteriores, e revelam uma forte agregação familiar, com herdabilidade entre 36 a 79% (BAYE, 2011). Outras análises evidenciam a complicada genética dessa patologia por sua natureza poligênica e pela interação entre fatores genéticos e ambientais (BIERBAUM, 2007).

Os indivíduos portadores de asma apresentam diferentes fenótipos e expressões clínicas que dependem das características genéticas e exposições ambientais. Em relação às características genéticas, a literatura aponta uma tendência genética em genes candidatos e uma maior predisposição em indivíduos de etnia africana (CHOUDHRY et al., 2006). Assim a susceptibilidade de humanos para o desenvolvimento da asma depende, dentre outros fatores, de aspectos étnicos e de polimorfismos nos chamados genes candidatos. O receptor de IL-13 (IL-13RA1) contribui para o aparecimento e/ou gravidade da doença (KIM et al., 2006).

O gene IL-13R está localizado no cromossomo 5q31, e a IL-13 exerce a sua atividade através deste complexo de receptores, os quais consistem em proteínas heterodiméricas que apresentam-se em duas formas variantes IL-13R A1 e IL-13R A2. A IL-13RA1, assim como a IL-4R, exercem suas funções de sinalização tanto para a IL-13 quanto alternativamente para a IL-4 (MILOUX et al., 1997). Já a IL-13R A2, liga-se apenas a IL-13 com elevada afinidade, atuando de forma inibitória, levando a diminuição da atividade da IL-13 e de seus mediadores inflamatórios (KAWAKAMI et al., 2001).

Sabendo-se que a susceptibilidade genética colabora para o risco da asma, poucos estudos de associação genética foram realizados em populações não-européias, muito menos com populações sul-americanas (BARNES, 2007).

Por conta dos eventos antigos de migração populacional humana, aliados a grande migração em tempos de globalização, é difícil associar certos casos de variações genéticas em populações muito miscigenadas. Para tanto, é recomendado o uso de marcadores informativos de ancestralidade que permitam distinguir a origem ancestral do indivíduo, destes, os mais úteis para análise da miscigenação são aqueles que apresentam grandes diferenciais de frequências alélicas, denominados AIMs (do inglês *Ancestry Informative Markers*), marcadores informativos de ancestralidade. Leva-se em conta como um grande diferencial de frequência para que um marcador seja considerado um AIM um valor mínimo de 40% entre ao menos duas populações definidas geográfica e/ou etnicamente (PARRA et al., 1998; PARRA et al., 2001; SHRIVER et al., 2003).

Sendo assim, qualquer marcador molecular pode ser um AIM, desde que satisfaça a premissa de grande diferencial de frequência entre os grandes grupos populacionais humanos (africanos, europeus e asiáticos) como alguns marcadores do tipo SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*).

Como existem poucos dados no Brasil que avaliem a associação de polimorfismos no gene do receptor da IL-13 (IL-13R) e a susceptibilidade a asma ou qualquer aspecto relacionado a esta patologia e a sua associação com a ancestralidade dos indivíduos, este estudo torna-se de grande relevância. Considerando a formação da população brasileira, a qual tem na miscigenação sua principal característica, com origem tri-híbrida, é possível compreender a dificuldade de se obter dados sobre a associação entre a etnia e as diversas patologias. Deste modo é sustentada a hipótese que a asma é mais prevalente na etnia africana e apresenta ainda forte relação com o status socioeconômico dos indivíduos sintomáticos (CHOUDHRY et al., 2006).

Contudo, conhecendo a significativa contribuição da ancestralidade africana na formação da população brasileira (ANDRADE, 2005), particularmente na Bahia (Salvador), é necessário utilizar estratégias que permitam a reprodutibilidade destes estudos, avaliando se os resultados podem ser extrapolados para todas as populações, independente das diferentes características de formação das mesmas. Diante do exposto, o presente estudo será desenvolvido com amostras do município de Itabuna, que está inserido na mesorregião sul Baiana, microrregião Ilhéus-Itabuna.

O município juntamente com Ilhéus lidera cultural e economicamente a região. Os dois municípios estendem ainda sua influência para o baixo sul e extremo sul do estado.

Itabuna possuía uma população, em 2007, cerca de 210.604 distribuídos entre a zona rural e urbana. Vale ressaltar que com a crise do cacau houve importante migração campocidade, causando inchaços dos centros urbanos do sul da Bahia (IBGE, 2007).

Os negros, descendentes de escravos, foram atraídos à região pela necessidade de mão-de-obra nas roças para o cultivo do cacau e para os serviços domésticos dos fazendeiros. A miscigenação com o branco foi acontecendo vagarosamente e sua influência na cultura do povo de Itabuna é marcante. Os primeiros missionários que chegaram à região podem ser considerados os primeiros brancos a povoar essas terras. Outros brancos que chegaram a Itabuna foram alguns sergipanos, do nordeste da Bahia, e descendentes de europeus que se estabeleceram em Ilhéus no início do século XIX. Eles colaboraram com o processo de ocupação da terra e expansão da cultura do homem branco (ANDRADE, 2005).

Apesar de podermos estimar até que ponto a susceptibilidade genética contribui para o risco de asma, ainda demorará muito para que os loci específicos que influenciam os fenótipos clínicos sejam identificados (CHIANG et al., 2012). Uma quantidade significativa de estudos de associação genética descreve genes de susceptibilidade à asma, mas estes dados demonstram a extrema complexidade da doença (MALERBA, 2005; KIM et al., 2006). Assim, a identificação de polimorfismos em genes envolvidos na via de resposta dos mediadores inflamatórios, como IL-13RA1, ainda pode ser considerado um grande desafio, pois múltiplos genes podem estar envolvidos na patogênese da asma.

Sendo assim, levantamos no presente estudo a hipótese de que a manifestação da asma em sujeitos alérgicos e com histórico familiar, utilizando dados da composição e variabilidade genética da amostra, pode demonstrar a prevalência desta patologia em determinada etnia.

Objetivos da pesquisa

Objetivo Geral:

Avaliar a influência da ancestralidade, associada a polimorfismos no gene do receptor da IL-13 (IL-13R) e a susceptibilidade para asma.

Objetivos Específicos:

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo IL-13A1- +1398 A/G na população avaliada;
- Verificar a associação entre o polimorfismo estudado e a asma;
- Avaliar sete marcadores informativos de ancestralidade que caracterizam afro-descendentes, euro-descendentes e ameríndios e associá-los com a prevalência da asma;
- Verificar a associação entre sintomas frequentes no indivíduo asmático e o polimorfismo no IL-13RA1.

REVISÃO DE LITERATURA

A Fisiopatologia da Asma

A asma, uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo, é uma síndrome complexa, com diferentes fenótipos clínicos em adultos e em crianças. É uma doença inflamatória crônica, e tem como resultado a hiperresponsividade das vias aéreas, que se contraem facilmente em resposta a uma ampla gama de estímulos. Essa alteração pode causar tosse, sibilos, dispneia e opressão torácica (SMELTZER et al., 2009).

O estreitamento das vias aéreas é usualmente reversível, mas, em alguns asmáticos, a obstrução ao fluxo aéreo pode ser irreversível. As principais alterações anatomopatológicas incluem a presença de células inflamatórias, exsudação de plasma, edema, hipertrofia da musculatura lisa peribrônquica, tampões mucosos e desnudamento do epitélio brônquico (CAMPOS, 2007).

A inflamação é o aspecto central desta patologia, e envolve um emaranhado complexo de múltiplas células e mediadores. Uma forma de explicar como ocorre este processo é através da teoria da regulação imune, na qual o organismo humano vive em uma busca constante pela homeostase (KIDD, 2003).

Contudo, o padrão de resposta das células T-helper 1 (Th1) e Th2 são cruciais na manutenção deste equilíbrio. O tipo de resposta Th1 (imunidade celular) é direcionado especialmente contra vírus e outros patógenos intracelulares, e pode eliminar células cancerosas, por exemplo. O tipo Th2 (imunidade humoral) está relacionado à produção de anticorpos, principalmente contra patógenos extracelulares (KIDD, 2003).

Jennelman, et al (2001) corroboram com a teoria acima citada, ao afirmar que a crescente compreensão da multiplicidade e da superposição das citocinas envolvidas na patogenia da asma envolvem diretamente as respostas do Th1/Th2, através da estimulação alérgica das vias aéreas, levando a um aumento dos linfócitos Th2 e reforçando a base imunológica da asma. As fortes associações com a alergia, aliadas às evidências da participação das citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) no desenvolvimento da inflamação característica desta doença, constituem fundamentos importantes para o papel do Th2 no desenvolvimento da mesma.

Deste modo, a inflamação das vias aéreas é o primeiro mecanismo ocorrente, no indivíduo predisposto, que acarreta em resposta broncoconstritora expressiva, estimulada por diversos tipos de antígenos encadeadores. Dentre esses mediadores estão as citocinas, moléculas proteicas, nesse caso pró-inflamatórias, e produzidas por diversos tipos celulares, como: mastócitos, linfócitos T, eosinófilos, células epiteliais do trato respiratório e macrófagos (BARNES, 2007). Algumas dessas citocinas, como Interleucina 5 (IL-5), IL-6, IL-8, IL-10, IL-4 e IL-13, promovem a diferenciação e a ativação de eosinófilos e levam a produção de imunoglobulina E (IgE) por parte das células B (PAUL & SEDER, 1994).

A IgE é uma imunoglobulina de extrema importância na resposta inflamatória alérgica. Tem sido demonstrado que o nível de IgE é maior em pessoas alérgicas, sobretudo nas que possuem asma brônquica e dermatite atópica, quando comparado com pessoas não alérgicas (WYNN, 2003). O caráter dessa resposta alérgica mediada pelo complexo IgE e seu receptor presente na membrana dos mastócitos e outras células apresentadoras de antígeno é de hipersensibilidade imediata. Isto se revela em sinais e sintomas característicos nos diferentes órgãos como pele (dermatite atópica ou eczema), no nariz (rinite), nos pulmões (asma) e no intestino (reações alérgicas alimentares) (WYNN, 2003). Por conta desse complicado sistema, estudiosos da área tem sugerido uma mudança de paradigma, sendo esses acometimentos citados como consequência de uma única doença, a asma (CAMARGOS, 2002).

Sendo assim, todas as características observadas na inflamação pulmonar e a desregulação fisiológica observada na asma são o resultado final dos eventos moleculares e celulares envolvidos na sensibilização, no desenvolvimento de células Th2, na elaboração de citocinas e na ativação dos mecanismos efetores dessas citocinas. Como a inflamação pulmonar envolve o recrutamento e a ativação de células inflamatórias e mudanças estruturais do pulmão, as alterações durante esse período crítico tornam as vias aéreas mais susceptíveis a poluentes ambientais e as predisõem a sensibilização em contato com aeroalérgenos (KNISZ; ROTHMAN, 2007).

Na patogênese desta doença, a interação entre fatores genéticos e ambientais é crucial para o desenvolvimento de diversos tipos de resposta do organismo. São citados na literatura diversos fatores de risco relacionados ao ambiente e seu grau de envolvimento com a asma. Em seu estudo de revisão de literatura para avaliação crítica de artigos nacionais que abordassem a temática, Angnes, et al (2012), observaram a prevalência de

vários fatores de risco que estão fortemente relacionados com o desenvolvimento desta patologia, como: mudanças de temperatura, alergênicos, quebra do ciclo da amamentação materna exclusiva, prevalência de sibilância no primeiro ano de vida, história de rinite alérgica na infância e hábitos de vida do paciente.

No estudo de Macêdo, et al (2007) a história familiar de asma foi o fator de risco mais relevante entre todos os fatores analisados pelo autor, mantendo forte associação com a prevalência da doença. Nos casos em que os dois pais apresentavam história de asma, o risco foi cinco vezes maior do que para aqueles que não possuíam história familiar.

Em um levantamento realizado por Solé, et al (2006) foi possível determinar a prevalência de sintomas relacionados à asma em escolares (EC) entre 6 e 7 anos e adolescentes (AD) entre 13 e 14 anos. Seus achados revelaram uma prevalência de asma ativa e rinite alérgica nas cidades de Salvador e Vitória da Conquista muito maior do que nas outras regiões estudadas, revelando assim que a exposição a fatores de risco como, latitude, temperatura, poluição e umidade do ar tornam o indivíduo propenso ao desenvolvimento de doenças alérgicas, e como é sabido a não identificação de fatores de risco podem maximizar as exacerbações graves da asma.

Genética da asma: associação de genes candidatos

Diversos genes candidatos (mais de 100 loci) são citados pela literatura como fortemente relacionados com o desenvolvimento da asma. Uma ampla gama de fatores contribui para esta abundância de candidatos, como evidências de associação em múltiplos locais no genoma e uma grande variedade de mediadores inflamatórios, como as citocinas e as quimiocinas envolvidas no processo. Foram identificadas cinco regiões do genoma humano que acomodam a maior quantidade de genes relacionados a esta patologia: 5q31-32, 6p21, 11q12-13, 16p11-12 e 20p13 (SALES et al., 2012).

No Cromossomo 5 estão localizados os genes ADRB2, IL13 e IL4, no cromossomo 16 o IL4R, entre outros. O gene IL4R codifica o receptor IL4, a proteína transmembranal que pode ligar o IL4 e a IL13 para regular a produção de IgE. A ligação do IL13 ou IL4 ao receptor de IL4 (IL4R) induz a resposta inicial para a polarização do linfócito Th2. Ambos IL13 e IL4 são produzidos por células Th2 e são capazes de induzir a produção de classe isotípica de células B para produzir IgE após exposição ao alérgeno (PINTO et al., 2008).

Em seu estudo tipo caso-controle na população de Taiwan Chiang et al (2012) identificaram três genes que estariam envolvidos no desenvolvimento da asma: a interleucina - 4 (IL - 4); o b2 receptor adrenérgico (ADRB2) e a desintegrina metaloprotease 33 (ADAM33). Estes três genes desempenham papéis diferentes na patogênese da doença, e a variação polimórfica demonstrou um efeito aditivo sobre o risco de ter asma.

O *splicing* alternativo do gene que codifica a ADAM33, uma proteína transmembranal implicada na hiperresponsividade brônquica, condiciona a duas variantes de transcrição. Este foi o primeiro gene candidato para a asma a ser detectado por clonagem posicional (PINTO et al., 2008). Ainda, variações alélicas no gene IL-13R que codifica o receptor da interleucina 13, muitas vezes estudado em conjunto com o gene da própria IL-13, foram associadas à atopia (PINTO et al., 2008).

A IL-4 tem como função primordial promover a diferenciação do Th2, e que, por conseguinte, atua em um local crítico na resposta alérgica. O IL-4 é crucial para a síntese de IgE pelos linfócitos B e também está envolvida no recrutamento de eosinófilos. Por isso, variantes genéticas na região promotora do gene IL-4 têm sido relacionadas com níveis elevados de IgE sérica e são capazes de gerar diferentes fenótipos (CHIANG et al., 2012).

É de extrema importância conhecer o papel da citocina IL-13 e do seu receptor IL-13R em processos relevantes para o desenvolvimento da alergia e inflamação. O gene IL-13 está localizado no cromossomo 5q31, em um mesmo agrupamento de genes que codificam a IL-3, IL-4, IL-5 e a IL-9 (VRIES, 1998). Esta citocina é produzida principalmente pelas células T CD4⁺ do subconjunto Th2, apesar de haver uma parcela importante de produção por outras células como T CD8⁺, NK-T (no início da resposta alérgica), basófilos e eosinófilos (KIM et al., 2006).

O IL - 13R está presente em 200-3000 locais por células que compõem o sistema imune e liga-se com elevada afinidade a IL-13, é expressa em células B, monócitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células endoteliais, entre outras. Apresenta-se em duas formas variantes IL-13R α 1 e IL-13R α 2. A IL-13R α 1, é uma proteína composta de 427 aminoácidos, assim como a IL-4R, exerce suas funções de sinalização tanto para a IL-13 quanto alternativamente para a IL-4 (MILOUX et al., 1997). Já a IL-13R α 2, consiste em 380 aminoácidos, liga-se apenas a IL-13 com elevada afinidade, atuando

de forma inibitória, levando a diminuição da atividade da IL-13 e de seus mediadores inflamatórios (KAWAKAMI et al., 2001).

Assim, como a pesquisa da genética da asma, tem avançado em larga escala, é provável que muito mais genes venham a serem identificados e associados a tal patologia. Além disso, pesquisa na área da hereditariedade desta doença, que não seguem os padrões mendelianos clássicos, tem se mostrado promissora auxiliando no desenvolvimento de pesquisas na área.

Pinto, et al (2008) em seu estudo realizado com familiares portadores desta patologia, evidenciaram um forte padrão de agregação familiar, mas afirmam que a genética da doença é especialmente complicada por sua natureza poligênica e pela interação entre fatores genéticos e ambientais. De acordo aos seus achados, afirma que apesar de podermos estimar até que ponto a susceptibilidade genética contribui para o risco da doença, ainda demorará muito para que os *loci* específicos que influenciam os fenótipos clínicos sejam identificados e uma quantidade significativa de estudos de associação genética de genes de susceptibilidade à asma, demonstrando a extrema complexidade da doença.

Asma e os grupos “étnicos”

As pesquisas de associação da asma e a ancestralidade têm sido demonstradas em diversos estudos com base nos AIMs, selecionados por serem altamente divergentes entre as populações européia, africana e ameríndia. Porém a discrepância entre os estudos pode ocorrer devido a composição genética de cada grupo ancestral, na qual diferentes genes podem estar envolvidos em diferentes grupos étnicos .

Um estudo caso-controle, desenvolvido em uma população de origem afro-americana nos EUA, constataram consistente associação entre ascendência africana com risco de asma e apoiado com os dados da literatura atual de que os indivíduos de ancestralidade africana tem demonstrado elevado número de internações, mortalidade e sintomas respiratórios (FLORES et al., 2012).

Rumpel, et al (2012) corroboram com esses achados, na avaliação de 392 indivíduos de origem afro-americana com diagnóstico de asma e sua relação com a

variável sexo. Foi identificada uma interação significativa entre ascetralidade e sexo em exacerbações graves de asma, de tal forma que o risco era significativamente maior com o aumento da ascendência africana em indivíduos do sexo masculino, mas não do sexo feminino.

Os dados observados no estudo caso-controle realizado na população de Porto Rico divergem com o dos autores anteriormente citados. Foram analisadas as variáveis ancestralidade genômica e sua correlação com o nível socioeconômico dos participantes, buscando uma interação entre gene-ambiente e o risco para asma. Foi encontrada uma significativa interação entre nível de renda, ascendência e risco para asma nos indivíduos de ancestralidade européia e uma menor associação com os de ancestralidade africana (CHOUDHRY et al., 2006).

A partir desses achados é possível sugerir que não há um único gene de susceptibilidade para asma em todas as populações humanas. Diferenças étnicas tornam as populações mais ou menos vulneráveis a determinadas doenças, isso pode ser explicado pelas diferenças de frequência para alelos de risco, o que pode ser substancialmente aumentado em populações específicas em relação a outras (TANG et al., 2005). Como ainda é pouco conhecido os motivos que levam aos diferentes desfechos da asma nos diferentes grupos “raciais”, acredita-se que existam diferenças genéticas, na resposta imunológica e inflamatória entre estes grupos que influenciem significativamente o curso da doença e sua evolução clínica (SALES et al., 2012).

A ancestralidade em populações miscigenadas

A população brasileira apresenta grande diversidade genética, resultado da miscigenação entre ameríndios, negros (africanos) e brancos (europeus). Considerando os mais de 500 anos de mistura genética, utilizar apenas a cor da pele ou autodenominação como meio de classificação étnico-racial não abrange todas as nuances dessa mistura. Diferente da Europa, Estados Unidos e mesmo da África, onde há associação entre “raça” e a origem, a classificação dos diferentes grupos populacionais no Brasil está mais relacionada com os caracteres morfológicos dos indivíduos, que seria um pobre indicador de ancestralidade por conta da mistura étnica existente nesta população (PARRA, 2003; TELLES, 2002).

Essa idéia é confirmada por Schwartzman (1999) ao se questionar brasileiros sobre a sua origem e menos de 10% das pessoas negras terem citado África em sua resposta. Assim, fatos históricos do nosso país ratificam a história de miscigenação entre povos de diferentes origens, especialmente os nativos indígenas (ameríndios), negros africanos e brancos europeus, contextualizando estes fatos com marcos sociais, políticos e culturais.

Os primeiros habitantes do Brasil foram os ameríndios, que podem ter chegado às Américas em uma única onda migratória há cerca de 12.000 a 19.000 anos (SILVA JR., 2002). Em 1500, eles formavam uma população de aproximadamente 2,4 milhões de ameríndios (IBGE, 2000), época em que a colonização européia foi iniciada com a chegada de aproximadamente 500.000 portugueses, a grande maioria do sexo masculino (ABESANDES, 2004).

A partir da metade do século XVI, milhares de escravos foram trazidos para o Brasil (IBGE, 2000) provenientes de diferentes regiões da África, como Congo, Moçambique e, principalmente, de Angola (CURTIN, 1969). A Bahia foi a primeira capital do Brasil, local de grande movimentação econômica, sendo foco importante do tráfico de escravos negros africanos, importantes para produção de riquezas e “moeda” na economia da época.

Em 1982, Azevêdo, et al. demonstraram a diversidade na distribuição dos negros no estado da Bahia, sendo observado que, no litoral e outras regiões economicamente importantes, devido à exploração de minérios, cultivo do cacau e cana-de-açúcar, havia maior concentração de indivíduos com características fenotípicas e culturais africanas, além do aumento progressivo de indivíduos fenotipicamente brancos à medida que se afasta do litoral da Bahia. Contudo, a grande maioria dos escravos permaneceu no litoral até a abolição da escravatura. É possível observar, então, que a miscigenação entre estes grupos na Bahia é compatível com a história migratória, à qual demonstra que quanto maior a distância do litoral, menor é a mistura com negros (AZEVEDO, 1982).

Entre 1820 e 1975 cerca de seis milhões de imigrantes chegaram ao Brasil, sendo 70% portugueses e italianos, além de espanhóis, alemães, sírios, libaneses e japoneses. Segundo Callegari-Jacques e Salzano (1999), no período compreendido entre 1500 e 1972, 59% dos imigrantes que chegaram ao Brasil eram europeus, 47% africanos e 2% asiáticos.

Em estudos realizados na Bahia utilizando marcadores moleculares, observou-se que as contribuições africana, européia e ameríndia (em afro descendentes) estimadas pelo DNA mitocondrial variaram de 76%-94%, 0%-4% e 6%-22%, respectivamente, e para o cromossomo Y esta variação foi de 47%-77%, 23%-53% e 0%-4%, respectivamente

(ABE-SANDES, 2010). Estes achados concordam com dados históricos que mostram a insignificante contribuição europeia feminina no início da colonização do Brasil.

Marcadores Informativos de Ancestralidade

Por conta dos eventos antigos de migração populacionais humanos aliados a grande migração em tempos de globalização, é difícil associar certos casos de variações genéticas em populações muito miscigenadas. Para tanto, é recomendado o uso de marcadores informativos de ancestralidade. Destes, os mais úteis para análise da miscigenação são aqueles que apresentam grandes diferenciais de frequências alélicas. Estes são denominados AIMS (do inglês *Ancestry Informative Markers*, BONILLA et al., 2004), marcadores informativos de ancestralidade. Qualquer marcador molecular pode ser um AIM, desde que satisfaça a premissa de grande diferencial de frequência entre os grandes grupos populacionais humanos (africanos, europeus e asiáticos) como alguns marcadores do tipo SNPs. Leva-se em conta como um grande diferencial de frequência para que um marcador seja considerado um AIM um valor mínimo de 40% entre ao menos duas populações definidas geográfica e/ou etnicamente, (PARRA et al., 2001; SHRIVER et al., 2003; BONILLA et al., 2004).

Esses marcadores são representados por diferentes variantes genéticas, como polimorfismos de único nucleotídeo (SNP), inserções e deleções de nucleotídeos ou inserções Alu. As variantes genéticas que são encontradas apenas em uma população foram chamadas de “alelos únicos” por Chakraborty (1991) e tanto os alelos únicos quanto os alelos específicos de população ou marcadores informativos de ancestralidade alelos específicos de população são polimorfismos úteis para investigação forense, estimativa de mistura étnica e estudo de mapeamento (STEPHENS, 1994; PARRA, 1998; PARRA, 2001)

Como já descrito, realizar classificação étnico-racial em populações miscigenadas não é uma tarefa simples, devido sua grande diversidade. Métodos subjetivos ou mesmo caracteres morfológicos fenotípicos isoladamente apresentam uma elevada margem de erro, não sendo meios eficazes para definir esses grupos. Assim, a associação de caracteres morfológicos e moleculares podem ser a forma de maior acurácia e precisão para “mensurar” esta diversidade.

A análise dos alelos específicos de população (PSA), antiga designação dos AIMS, em populações afro-americanas revelou que PSAs (SHRIVER, 1997), constituem uma categoria de marcadores étnicos de grande capacidade de informação e que, portanto, podem fornecer estimativas mais precisas da composição étnica de populações tri-híbridas como a brasileira (PARRA, 2001).

Em 2003, Flavia Parra et al, utilizando dez alelos específicos de populações, analisaram 200 indivíduos das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil que se autodenominaram como brancos e 173 indivíduos da comunidade rural de Queixadinha (Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais) classificados fenotipicamente como brancos, negros e intermediários. Ao analisar o índice de ancestralidade africana dos indivíduos comparando com frequências de alelos observadas nas populações ancestrais, observaram larga variação e extensas sobreposições entre os três grupos étnicos. Ao calcular o índice de ancestralidade africana, encontraram resultados intermediários entre europeus e africanos, sendo encontrados os mais baixos índices entre os indivíduos com mais características fenotípicas africanas e maior índice de ancestralidade africana entre aqueles considerados como mulatos (fenótipo intermediário). Concluíram, então, que a classificação morfológica fenotípica, no Brasil, é um pobre marcador de ancestralidade genômica.

Ao contrário dos resultados de Parra (2003), diversos estudos têm demonstrado concordância entre características morfológicas fenotípicas e ancestralidade genômica. Machado et al (2007) estudaram uma amostra da população da cidade de Salvador, a fim de estimar a contribuição dos grupos ancestrais (africanos, europeus e ameríndios) nesta população. Foram analisados os marcadores informativos de ancestralidade AT3-I/D, APO, SB19.3, PV92, FY-null, LPL, CKMM, GC e CYP3A4 em 1.312 indivíduos. A estimativa de mistura populacional obtida, mostrou contribuição africana de 49,17%, 36,34% européia e 14,49% ameríndia demonstrando a miscigenação em amostras de Salvador, capital do estado.

Ao se comparar a estimativa da contribuição africana do IBGE (2000) por autodenominação, onde 79,8% dos indivíduos de Salvador se auto declararam negros, com os dados moleculares desse trabalho, concluiu-se que a autodenominação é um critério impreciso na avaliação da contribuição parental dentro desta população.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo

O presente trabalho é um estudo tipo caso-controle. O grupo, caso, foi formado por pessoas portadoras de uma condição específica, nesse caso asma, e outro grupo, controle, composto por pessoas que não sofrem dessa condição. O propósito desse tipo de estudo foi identificar variáveis que ocorrem com maior ou menor frequência nos casos do que nos controles e podem ser fatores de risco ou proteção para a condição avaliada.

Caracterização sócio-demográfica dos indivíduos participantes (amostragem)

Foi utilizada amostra previamente coletada pelo Msc. Luciano Gama da Silva Gomes durante seu projeto de mestrado (GOMES, 2013), intitulado “Análise da correlação de aspectos clínico-laboratoriais, epidemiológicos e genéticos com a asma em uma população do sul da Bahia”. Posteriormente, outras análises moleculares foram realizadas.

Apesar de ter sido coletado sangue periférico e dados via questionário de 320 indivíduos (114 caso e 206 controle), devido a fatores de exclusão (tabagismo) foi avaliado um total de 304 indivíduos, com média de idade de $40,19 \pm 19,11$ (DP) anos, com mínimo de 6 e máximo de 88 anos, sendo 192 indivíduos do grupo controle e 112 indivíduos do grupo caso (asmáticos).

As proporções (em porcentagem) de indivíduos segundo o gênero, foi observado que houve maior participação de indivíduos do gênero feminino (73,4%). Entretanto, as proporções de ambos os gêneros estão distribuídas de forma homogênea entre casos e controles e a variável gênero não representou um fator de risco para a asma (χ^2 p-valor = 0,165; $r = 0,08$; OR = 1,443, IC = [0,858;2,424], OR p-valor = 0,166).

Os indivíduos-controle foram recrutados nos Laboratórios LAP e LIDI da cidade de Itabuna, no momento que esses faziam exames laboratoriais de rotina. Nenhum dos indivíduos tidos como controle relatou problemas que indicassem direta ou indiretamente a

asma. Ainda, foi tido como critério de exclusão o tabagismo, excluindo-se pacientes que fumaram mais de 100 cigarros em sua vida e/ou atualmente fuma diariamente ou ocasionalmente.

Todos os indivíduos que participaram da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) exigido pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), com número de protocolo 253/2011, além de responderem ao questionário padronizado (Anexo 2).

Nesse mesmo momento, como atividade do projeto de Gomes (2013), foi coletado aproximadamente 10 ml de sangue periférico, dividido em dois tubos: um com EDTA (para análises genéticas) e outro tubo de soro (para dosagem de IgE total).

Extração e quantificação de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi feita a partir do *buffy coat*, na tentativa de obter maior concentração de DNA por microlitro. Dessa forma, antes de serem armazenadas em freezer, as amostras de *buffy coat* eram separadas do plasma e da papa de hemácias mediante centrifugação, 3.000 rpm durante 6 minutos. Após centrifugação, eram coletados 200µL de *buffy coat* e esses acondicionados em microtubos devidamente marcados, e armazenados a -20° C até o momento da extração de DNA. A partir disso, foi usado o QIAamp® DNA Mini Kit para a extração de DNA genômico segundo seu protocolo próprio para extração de DNA em coluna QIAamp Mini Spin.

A quantificação foi feita por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho GeneQuant, diluindo-se 2 µL de DNA molde com 68 µL de água destilada, para que por fim, obtivéssemos 70 µL da mistura, para chegarmos a um fator de diluição igual a 35 (GOMES, 2013).

Marcadores informativos de ancestralidade (MIAs)

Neste trabalho foram analisados sete marcadores que se enquadram na definição de MIAs, cinco (RB2300, LPL, AT3-I/D, Sb19.3 e APO) com valores de $\square > 40\%$ entre Africanos e Europeus ou Ameríndios (PARRA et al., 1998, SHRIVER et al., 2003) e dois (PV92 e CKMM) com $\square > 40\%$ entre Ameríndios e Africanos ou Europeus (SHRIVER et al., 2003).

Para os *loci* dos marcadores analisados no presente estudo, foi denominado de alelo *1 (ex., APO * 1) o fragmento correspondente à banda de maior peso molecular observada no gel de agarose, devido à presença de uma inserção (para os *loci* AT3-I/D, APO, PV92 e Sb19.3) ou à ausência de um sítio de restrição (para os *loci*, RB2300, CKMM e LPL), seguindo a convenção estabelecida em Parra *et al.* (1998).

Os *primers*, enzimas de restrição utilizados, a localização citogenética dos loci analisados no presente estudo estão relacionados na Tabela 1 e 2 (PARRA et al., 1998, SHRIVER et al., 2003).

Tabela 1: Localização citogenética, enzimas de restrição e sequência dos primers dos oito MIAs analisados.

<i>Locus</i>	Tipo	LOCALIZAÇÃO	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS
AT3-I/D	76pb indel	1q25.1	CCACAGGTGTAACATTGTGT GAGATAGTGTGATCTGAGGC
LPL	<i>PvuII</i>	8p21.3	AGGCTTCACTCATCCGTGCCTCC TTATGCTGCTTTAGACTCTTGTC
RB2300	<i>BamHI</i>	13q14.2	CAGGACAGCGGCCCGGAG CTGCAGACGCTCCGCCGT
Sb19.3	Inserção <i>Alu</i>	19p12	TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG AAGCACAATTGGTTATTTCTGAC
APO	Inserção <i>Alu</i>	11q23	AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA
PV92	Inserção <i>Alu</i>	16q23.3	AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG
CKMM	<i>TaqI</i>	19q13.32	GCAGGCGCCTACTTCTGG AGCTCATGGTGAAATGGAG CACCAGCAGCCCTGCCTATC

Tabela 2 – Enzima de restrição e sequência do *primer* do SNP para asma a ser analisado.

Locus	Tipo	Localização	Sequência dos Primers
IL-13RA1	<i>MseI</i>	5q31	TCA GTG ATG GAG ATA ATT TA TGA GCT GCC TGT TTA TAA AT

Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Os ensaios da PCR foram realizados em um volume total de 25 μ L. Todos os reagentes (Água, Tampão, dNTP – solução trabalho, *primers* – solução trabalho, MgCl₂ e a Taq DNA polimerase), com exceção do DNA, foram misturados em quantidade específica para cada *locus* em um único tubo (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. Foram utilizados 14 pares de *primers* para os sete marcadores.

Tabela 3. Condições de PCR para os loci analisados no presente trabalho. Quantidade em μ L suficiente para uma reação.

<i>Locus</i>	Água	Tampão PCR livre de cloreto	DMSO	MgCl (50mM)	dNTP (20mM)	<i>Primers</i> (solução trabalho)	<i>Taq</i> 5u
Sb19.3	14,2	2,5	-	1,0	0,25	3,0	0,05
APO	14,2	2,5	-	1,0	0,25	3,0	0,05
PV92	14,2	2,5	-	1,0	0,25	3,0	0,05
AT3 I/D	14,2	2,5	-	1,0	0,25	3,0	0,05
LPL	14,2	2,5	-	1,0	0,25	3,0	0,05
DRD2	14,2	2,5	-	1,0	0,25	3,0	0,05
RB 2300	11,9	2,5	2,5	0,75	0,25	3,0	0,05
CKMM	14,2	2,5	-	1,0	0,25	3,0	0,05

Em cada microtubo de 0,2 mL foram pipetados 4 μ L do DNA genômico, previamente extraído. Para cada análise foi usado controle negativo contendo água no lugar do DNA genômico. Em cada microtubo, sob a amostra, foram pipetados 21 μ L da

mistura de reação. O termociclador utilizado foi o Biocycler. A este passo seguiu-se o programa correspondente a cada *locus*. Após o término da reação de PCR o produto da PCR foi guardado em geladeira (4°C) até sua utilização.

Reação de restrição

Para a detecção dos SNPs analisados no presente estudo (LPL, CKM, RB2300,) foi utilizada a técnica da PCR-RFLP. Esta consiste basicamente de um ensaio onde o produto da PCR é posteriormente submetido à ação de endonuclease de restrição. Os *primers* utilizados na PCR flanqueiam a região do gene que contém, ou não, o sítio de restrição específico da enzima utilizada na reação de restrição para cada *locus*.

O indivíduo pode ser homozigoto para a presença do sítio de restrição da enzima (genótipo *2/*2), heterozigoto (genótipo *1/*2), ou homozigoto para a ausência do sítio de restrição (genótipo *1/*1).

A reação de restrição foi feita em microtubos tipo *ependorf* de 500µL para cada amostra, ambas as séries contendo 5 µL de DNA previamente amplificado. O controle de reação foi o DNA amplificado de um indivíduo ao qual foi submetido somente água e o tampão comercial específico da enzima. O controle de leitura é o DNA amplificado de um indivíduo de genótipo conhecido.

Em microtubos tipo *ependorf* de 1,5mL foi preparada a mistura de reação, onde o volume de cada componente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras utilizadas na reação. A mistura de reação foi constituída por 0,3 µL (3U) da enzima de restrição (10U/µL), 1,0 µL do tampão de reação (específico para cada enzima) e 5,7 µL de água deionizada autoclavada. O tampão de reação continha as condições de pH e salinidade ótimas para a atividade da enzima de restrição, sendo estas condições específicas para cada enzima.

Aplicou-se 7 µL da mistura de Reação em cada *ependorf* com o auxílio de uma micropipeta e ponteiros estéreis. Estes foram então levados a um banho Maria ou ao Termociclador, à temperatura de atividade específica para a enzima de restrição utilizada (geralmente 37°C), por um período de 1 a 2 horas.

Após este período os tubos foram retirados do banho Maria e realizou-se um choque térmico para inativação da enzima com água e gelo e conservou-se os tubos em geladeira, sendo os fragmentos resultantes da reação de Restrição submetidos à eletroforese para detecção da presença ou ausência do sítio de restrição investigado.

Polimorfismo no receptor da IL-13 (IL-13RA1)

Foram utilizados os primers: forward - 5'- TCA GTG ATG GAG ATA ATT TA-3' e reverse - 5'-TGA GCT GCC TGT TTA TAA AT-3', que amplificam um fragmento de 130 pb. Na PCR, utilizou-se 1X de tampão a 10X, 0,2mM de dNTPs a 2mM, 1,5mM de MgCl₂ a 50mM, 8pM de cada oligonucleotídeo, 0,7U de Taq polimerase (5U/μl), 0,1μg de DNA genômico a 20 μg/ml e q.s.q. 20μl de água ultra-pura. A reação seguiu com 35 ciclos no termociclador, sendo 95° C por 30 segundos, 62° C por 30 segundos e 70° C por 15 segundos, cada ciclo. A detecção dos SNPs do gene IL-13RA1, por meio da análise dos fragmentos de restrição, foi realizada pela mistura de 4 μl do produto de PCR e 6μl da mistura de solução para RFLP. Esta mistura continha tampão e a endonuclease de restrição, *MseI* 5U, a qual têm temperatura de incubação de 37° C, por 4 horas. Os fragmento de 85 e 45 pb foram visualizados em gel de agarose 1,5% (KIM et al, 2006).

Genotipagem dos MIAs

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 2 e 3%. Após serem retirados da eletroforese os géis foram visualizados no foto-documentador para análise do perfil eletroforético.

APO

O *locus* para a inserção *Alu* APO se situa no braço longo do cromossomo 11 (BATZER et al, 1999), na região não codificadora próxima ao complexo de genes da apolipoproteína AI-CIII-AIV (KARATHANASIS, 1985). Sua amplificação pela PCR produz um fragmento de 400pb (presença da inserção) e outro de 110pb (ausência da inserção) (NOVICK et al, 1995).

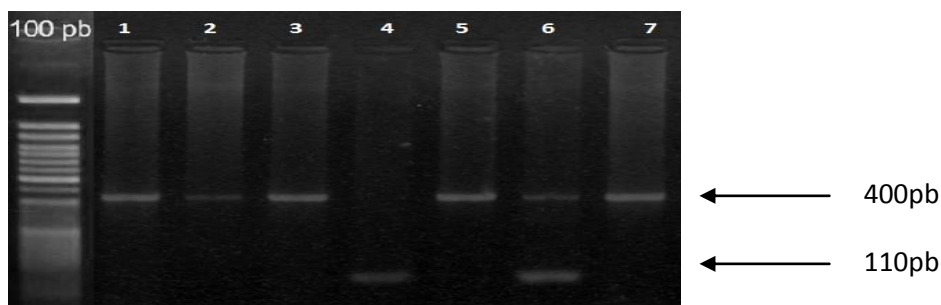


Figura 1. Raias 1, 2, 3, 5 e 7 indivíduos homozigotos (+/+). Raia 6 indivíduo heterozigoto (+/-) . Raia 4 indivíduo homozigoto (-/-).

SB19.3

A inserção *Alu* Sb19.3 pertence a subfamília Yb8 e está localizada no cromossomo 19p 12 (ARCOT et al, 1998). A presença da inserção *Alu* gera um fragmento de ~450pb (Figura 2) e caracteriza o alelo *Sb19.3*1*.

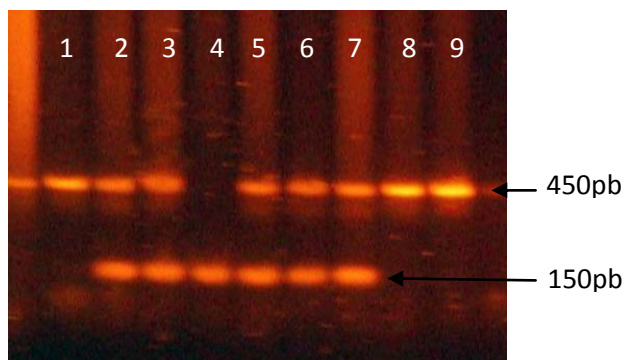


Figura 2. Nas raias 1, 8 e 9 encontram-se homozigotos para inserção (+/+), na raia 4, homozigotos para ausência da inserção (-/-), e nas raias 2, 3, 5, 6 e 7 heterozigotos (-/+).

PV92

O *locus* para essa inserção *Alu* encontra-se no cromossomo 16 (BATZER et al., 1999). Sua amplificação por PCR produz um fragmento de aproximadamente 400pb (presença de inserção) e um de 110pb (ausência da inserção) (NOVICK et al., 1995).

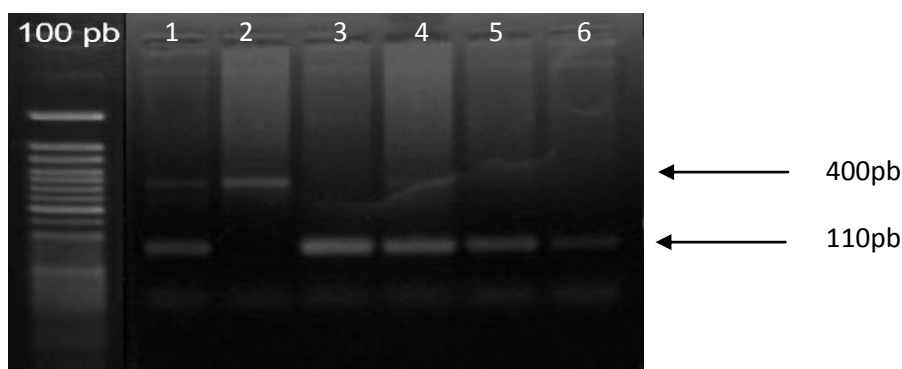


Figura 3. Raia 1 indivíduo heterozigoto (+/-). Raia 2 indivíduo homozigoto (-/-). Raias 3, 4, 5, e 6 indivíduos homozigotos (+/+).

AT3

O polimorfismo do *locus* AT3 aqui analisado se caracteriza pela presença ou ausência de uma inserção de 76pb no exón 1 de gene da antitrombina III. O alelo*1 é observado pela presença da inserção, a mais pesada (572pb), e a mais leve, o alelo AT3*2.

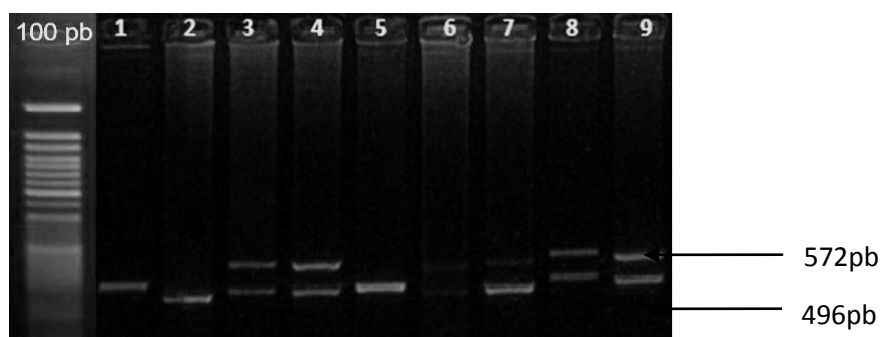


Figura 4. Raias 1,2 e 5 indivíduos homozigotos. Raias 3,4,6,7,8 e 9 indivíduos heterozigotos .

LPL

Os *primers* utilizados para o *locus* LPL (Tabela 1) flanqueiam uma região de 319pb no intron 6 do gene da lipoproteína lipase (LPL). A presença de um sítio de restrição da enzima *PvuII* nesta região permite a detecção de dois fragmentos após a reação de

restrição: 161pb e 158pb. A ausência do sítio da *PvuII*, e consequentemente a presença do fragmento de 319pb após a reação de restrição caracterizam o alelo *LPL*1*.

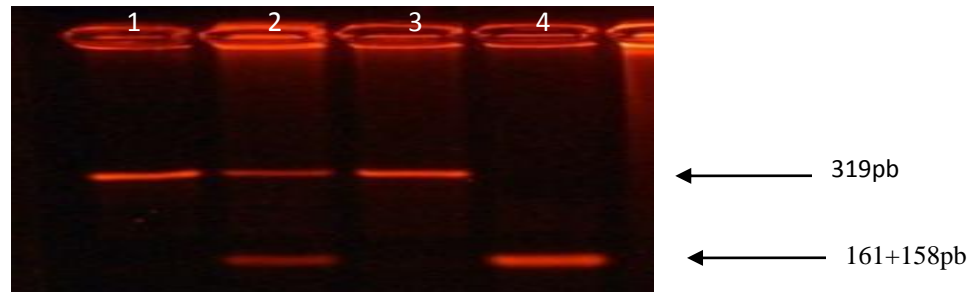


Figura 5. Nas raias 1 e 3 encontram-se homozigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 4 , homozigoto para a presença do sítio de restrição (-/-), e na raia 2 heterozigoto (-/+).

RB2300

Os *primers* utilizados para o *loci* RB2300 (Tabela 1) flanqueiam uma região de 180pb no intron 1 do gene do Retinoblastoma (RB) (BOOKSTEIN et al., 1990). A presença de um sítio de restrição da enzima *BamHI* nesta região permite a detecção de dois fragmentos após a reação de restrição: 130pb e 50pb.

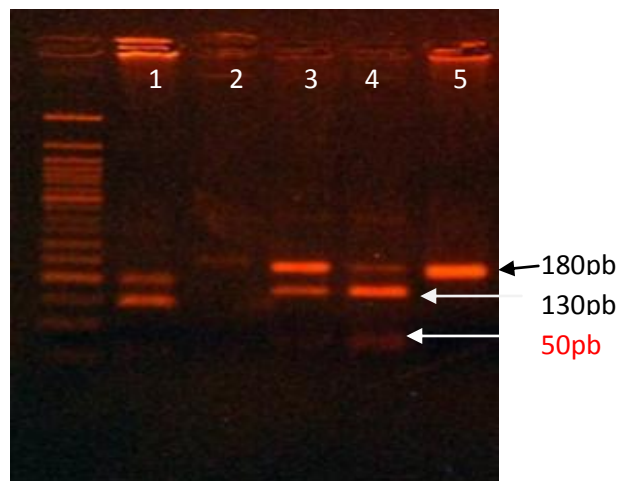


Figura 6. Nas raias 2 e 5 encontram-se homozigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 1, 3 e 4 heterozigotos o sítio de restrição (-/+).

CKMM

Os *primers* utilizados para o *loci* CKMM (Tabela 1) flanqueiam uma região de 216pb do gene da Creatina ckinase do músculo (CKM). A presença de um sítio de restrição da enzima *TaqI* nesta região permite a detecção de dois fragmentos após a reação de restrição: 170pb e 46pb.

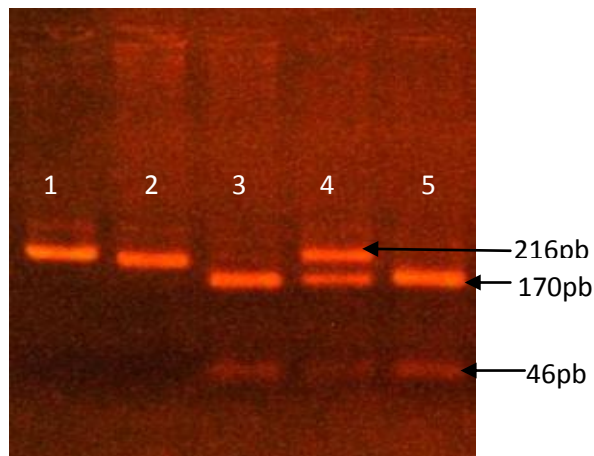


Figura 7. Nas raias 1 e 2 encontram-se homozigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 3 e 5, homozigotos para o sítio de restrição (-/-), e na raia 4, heterozigotos (-/+).

Genotipagem do *IL-13RA1* (+1398 A/G):

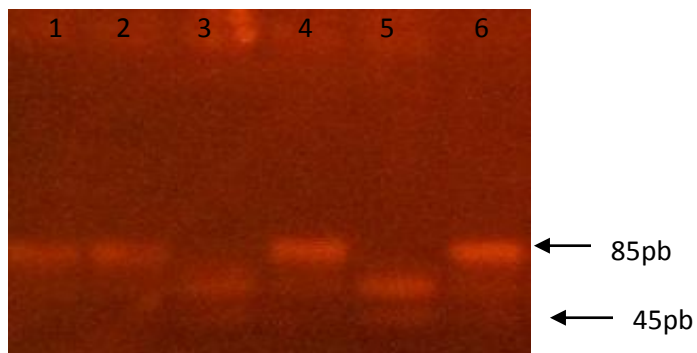


Figura 8. Nas raias 1, 2, 4 e 6 encontram-se homozigotos para ausência do sítio de restrição (+/+), na raia 3 e 5, homozigotos para o sítio de restrição.

Análise dos dados

As análises das frequências alélicas de cada *locus* em cada amostra foram estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa FSTAT versão 2.8 (GOUDET 1995). Para aquisição da média ponderada das frequências alélicas das populações mundiais foi utilizado o programa Microsoft Excel®.

Foram realizados dois tipos de testes para verificar a aderência ao equilíbrio de Hardy- Weinberg. Testes globais realizados pelo teste exato de Fisher, assumindo-se independência entre os *loci* utilizados: o teste *multi-locus* (que analisa as frequências genotípicas de todos os *loci* em uma única população) e o teste multi-populacional (que analisa as frequências genotípicas de um único *locus*, em todas as populações), utilizando-se o programa GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET 1995).

A análise de associações par-a-par entre *loci* e os testes exatos para diferenciação populacional também foram realizados utilizando-se o programa GENEPOP 2.0 (RAYMOND & ROUSSET 1995).

As estimativas das proporções étnicas foram obtidas segundo o método de identidade gênica (CHAKRABORTY, 1991) e foram realizadas com o uso do programa ADMIX 3 e 2. O ajuste a este modelo é avaliado pelo coeficiente de correlação múltipla (R^2) entre as frequências alélicas nas populações híbridas e aquelas das populações ancestrais (CHAKRABORTY, 1991).

As análises das frequências alélicas e genotípicas do IL-13RA1 e a associação entre acometimentos da asma e o polimorfismo no receptor de interleucina 13 (IL-13RA1) foram realizadas no programa SPSS 20.0.

RESULTADOS

Frequências alélicas

Foram observados todos os alelos já identificados para os sete *loci* utilizados (APO, SB19.3, PV92, AT3, LPL, RB2300 e CKMM). A comparação das distribuições das frequências alélicas entre as duas amostras (Tabela 4 e Figuras 8), mostrou que os alelos *LPL*1*, *APO*1e Sb19.3* foram mais frequente nas amostras casos comparadas com os controles. Enquanto isso, os alelos *AT3*1*, *RB2300*1*, *CKM*1* e *PV92*1* tiveram suas frequências maiores entre os controles.

Os valores de δ entre as amostras analisadas e os grupos mundiais estão apresentados na Tabela 5. Os valores dos sete *loci* analisados foram eficazes para a separação entre os grupos, sendo os *loci* AT3, RB2300 e CKMM que apresentaram maior diferencial de frequências entre todos os *loci* analisados (Figura 10).

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas dos sete *loci* nas duas amostras analisadas.

<i>Loci</i>	Casos	Controles	Total Geral	<i>P value</i> (Método de Fisher)
APO				
1/1	76	115	191	
½	26	77	103	
2/2	3	8	11	
N	105	200	305	
APO*1	0,847	0,767	0,807	0,019
PV92				
1/1	17	39	56	
½	32	36	68	
2/2	48	55	103	
N	97	130	227	
PV92*1	0,340	0,438	0,389	0,087
AT3				
1/1	21	59	80	
½	50	63	113	
2/2	32	32	64	
N	103	154	257	
AT3*1	0,447	0,588	0,518	0,004

SB19.3				
1/1	55	66	121	
½	39	86	125	
2/2	16	54	70	
N	110	206	316	
Sb19.3*1	0,677	0,529	0,603	0,002
LPL				
1/1	19	30	49	
½	23	74	97	
2/2	5	27	32	
N	47	131	178	
LPL*1	0,648	0,512	0,58	0,016
RB2300				
1/1	0	20	20	
½	16	55	71	
2/2	7	21	28	
N	23	96	219	
RB2300*1	0,347	0,495	0,421	0,063
CKMM				
1/1	6	25	31	
½	9	59	68	
2/2	9	16	25	
N	24	100	124	
CKMM*1	0,437	0,545	0,491	0,178

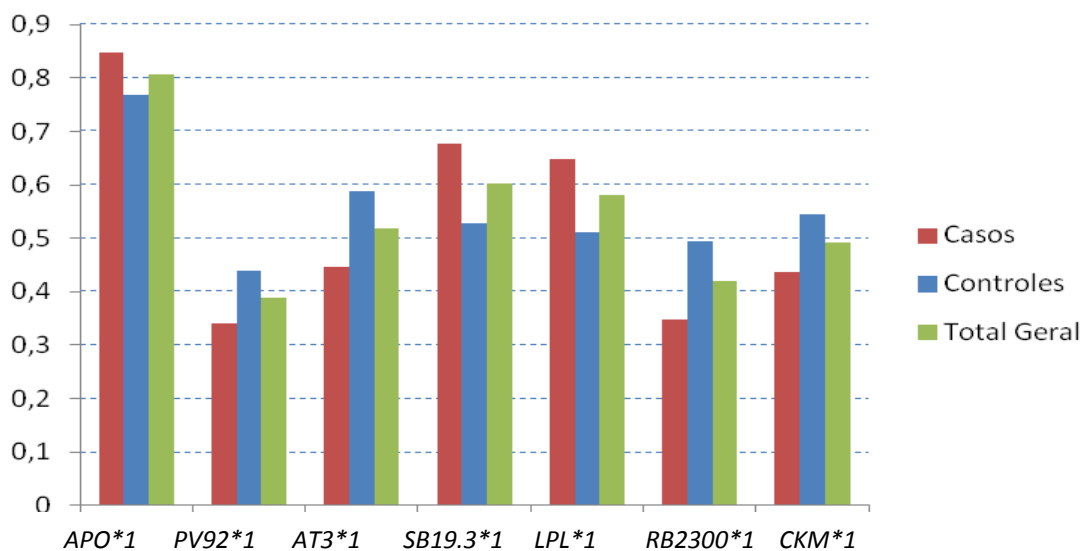


Figura 9. Comparação das frequências alélicas *APO*1*, *PV92*1*, *RB2300*1*, *LPL*1*, *AT3*1*, *Sb19.3*1* e *CKM*1* nos casos e controles.

Tabela 5. Diferencial de frequência (δ) dos *loci* AIMs entre grupos étnicos mundiais – Africano (AFR), Europeu (EUR) e Ameríndio (AMR) e os casos e controles. Os valores >50% estão destacados em negrito.

MIAs	Casos	Contr.	Casos/			Contr./					
			Afr.	Eur.	Amer.	Afr.	Eur.	Amer.			
AT3	0,447	0,588	0,858	0,282	0,061	0,411	0,195	0,381	0,27	0,306	0,527
APO	0,848	0,767	0,420	0,925	0,977	0,428	0,077	0,129	0,347	0,158	0,21
PV92	0,340	0,438	0,225	0,152	0,792	0,115	0,188	0,452	0,213	0,286	0,354
SB19.3	0,677	0,529	0,415	0,903	0,645	0,262	0,226	0,032	0,114	0,374	0,116
LPL	0,649	0,511	0,971	0,492	0,442	0,322	0,157	0,207	0,460	0,019	0,069
RB2300	0,348	0,495	0,926	0,315	0,175	0,578	0,033	0,173	0,431	0,18	0,32
CKMM	0,438	0,545	0,164	0,313	0,904	0,274	0,125	0,466	0,381	0,232	0,359

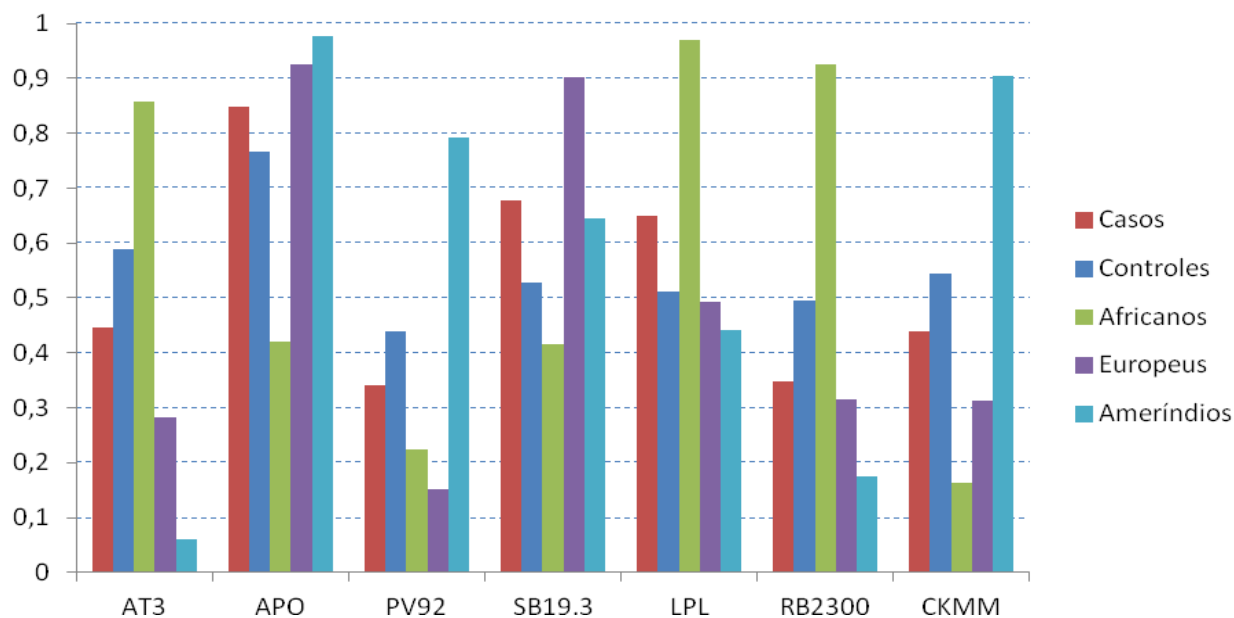


Figura 10. Diferencial de frequência (δ) alélica *Sb19.3*1*, *APO*1*, *PV92*1*, *AT3*1*, *LPL*1*, *RB2300*1*, *CKM*1* entre os grupos étnicos mundiais.

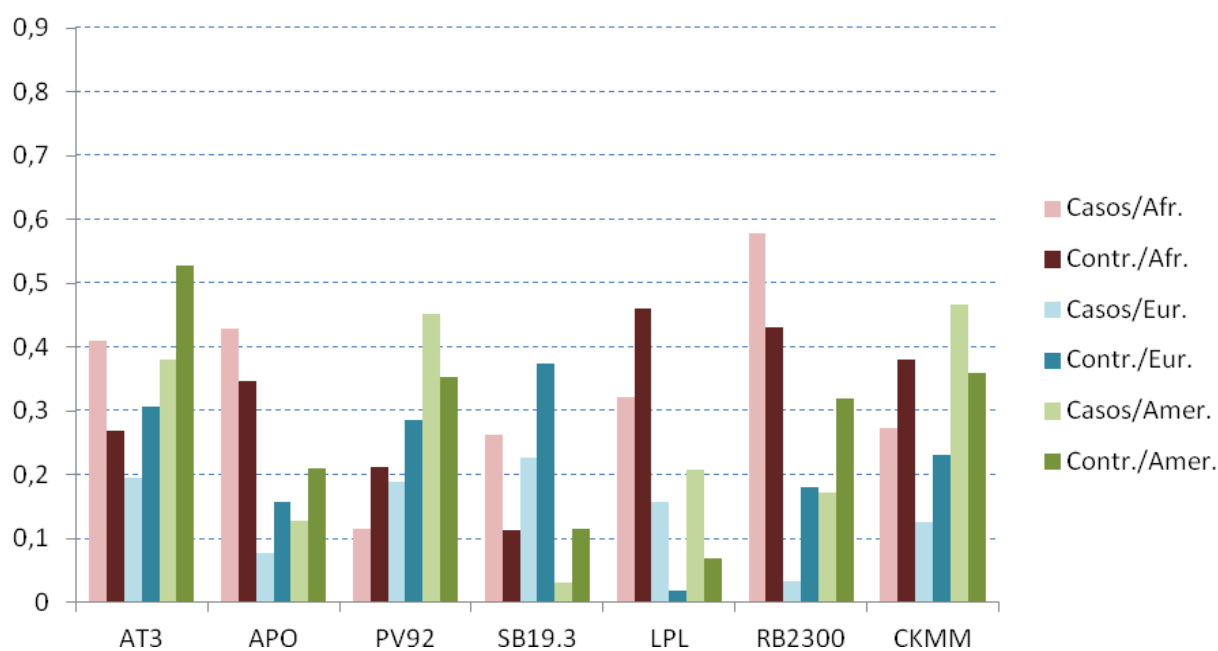


Figura 11. Diferencial de frequência (δ) dos alelos *Sb19.3*1*, *APO*1*, *PV92*1*, *AT3*1*, *LPL*1*, *RB2300*1*, *CKM*1* nos grupos casos e controles.

Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências genóticas observadas dos sete *loci* (Tabela 6) foram comparadas aos valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste exato G. Observou-se cinco desvios no geral, dois no *loci* *Sb19.3* e *PV92* para casos e controles, e um no *locus* *RB2300* para os casos. (Tabela 6).

Testes mais sensíveis foram utilizados para detectar se os desvios observados ocorreram pela ausência ou pelo excesso de heterozigotos. Os *loci* *Sb19.3* e *PV92* apresentaram desvio em casos ($p=0,031$ e $p=0,006$) e controles ($p=0,001$ e $p=0,000$), respectivamente, o *locus* *AT3* somente nos controles ($p=0,033$), esses desvios podem ser explicados pela falta de heterozigotos (Tabela 7). No teste multi-populacional os *loci* *SB19.3* ($p=0,001$), *PV92* ($p=0,000$) e *AT3* ($p=0,037$) apresentaram desvio (Tabela 7), enquanto o teste multi-locus foi significativo apenas nos casos ($p=0,019$) (Tabela 7).

Enquanto que o *locus* *RB2300* mostrou diferença significativa em casos ($p=0,016$) e o *locus* *CKMM* apenas nos controles ($p=0,049$) que são explicados pelo excesso de heterozigotos (Tabela 9). No teste multi-populacional apenas o *locus* *RB2300* ($p=0,008$) apresentou desvio (Tabela 9).

Tabela 6. Probabilidades de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson. 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy- Weinberg. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.

Amostra	Sb19.3	APO	PV92	AT3	LPL	RB2300	CKMM
Casos	0,047	0,702	0,011	0,843	0,755	0,021	0,245
Controles	0,025	0,323	0,000	0,068	0,163	0,220	0,075
Chi ²	13,47	4,37	∞	5,93	4,16	10,82	8,05

Tabela 7. Probabilidades de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson. 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy- Weinberg (déficit de heterozigotos). Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.

Amostra	Sb19.3	APO	PV92	AT3	LPL	RB2300	CKMM	Multi locus
Casos	0,031	0,442	0,006	0,478	0,772	1,000	0,195	0,019
Controles	0,012	0,898	0,000	0,033	0,945	0,945	0,981	0,052
Multi-Populacional	0,001	0,706	0,000	0,037	0,926	0,992	0,826	0,005

Tabela 8. Probabilidades de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson. 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy- Weinberg (excesso de heterozigotos). Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.

Amostra	Sb19.3	APO	PV92	AT3	LPL	RB2300	CKMM	Multi locus
Casos	0,990	0,807	0,999	0,674	0,458	0,016	0,956	0,980
Controles	0,995	0,193	1,000	0,985	0,102	0,118	0,049	0,948
Multi-Populacional	0,999	0,294	1,000	0,963	0,074	0,008	0,174	0,995

Associações par a par entre loci

Para cada uma das amostras foi realizada comparações par a par entre os sete *loci* AIMS. De 21 análises realizadas foram observados associações par a par apenas entre o *loci* AT3/LPL (Casos $p=0,035$).

Diferenciação genética das populações

Na análise de diferenciação genotípica e gênica baseada nos sete *loci* AIMS encontrou-se valor significativo ($p < 0,05$) para os *loci* AT3 ($p=0,004$ e $p=0,002$), APO ($p=0,019$ e $p=0,026$), SB19.3 ($p=0,002$ e $p=0,001$) e LPL ($p=0,015$ e $p=0,023$), respectivamente (Tabela 9). Enquanto no *locus* PV92 ($p=0,043$) apresentou significância apenas na diferenciação gênica.

Tabela 9. Diferenciação gênica e genotípica baseada nos sete *loci* AIMS. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.

<i>Loc</i>	P-value	P-value
	Gênica	Genotípica
AT3	0,002	0,004
APO	0,026	0,019
PV92	0,043	0,087
SB19.3	0,001	0,002
LPL	0,023	0,015
RB2300	0,103	0,062
CKMM	0,187	0,178

Mistura étnica

Os valores percentuais das estimativas de mistura étnica foram diferentes em cada um das amostras populacionais, além de indicar uma maior contribuição ameríndia em todas as amostras (casos 37,42% e controles 50,52%) (Tabela 10 e Figura 11).

Com base nos sete *loci* AIMS as amostras casos e controles apresentaram valores consistentes com o modelo tri-híbrido (Tabela 10). As amostras casos e controles

apresentaram contribuição africana e europeia inferior à contribuição ameríndia, respectivamente (Figura 11).

Tabela 10. Estimativa de mistura étnica nas amostras analisadas, segundo o método de identidade gênica. Valores em percentuais.

Amostras	Europeu (%)±S.E.	Africano (%)±S.E.	Ameríndio (%)±S.E.	R2
Casos	34,24±0,45	28,34±0,20	37,42±0,34	99,99
Controles	8,84±1,97	40,64±0,86	50,52±1,48	99,90

R2- indica a adaptação dos dados ao modelo de mistura.

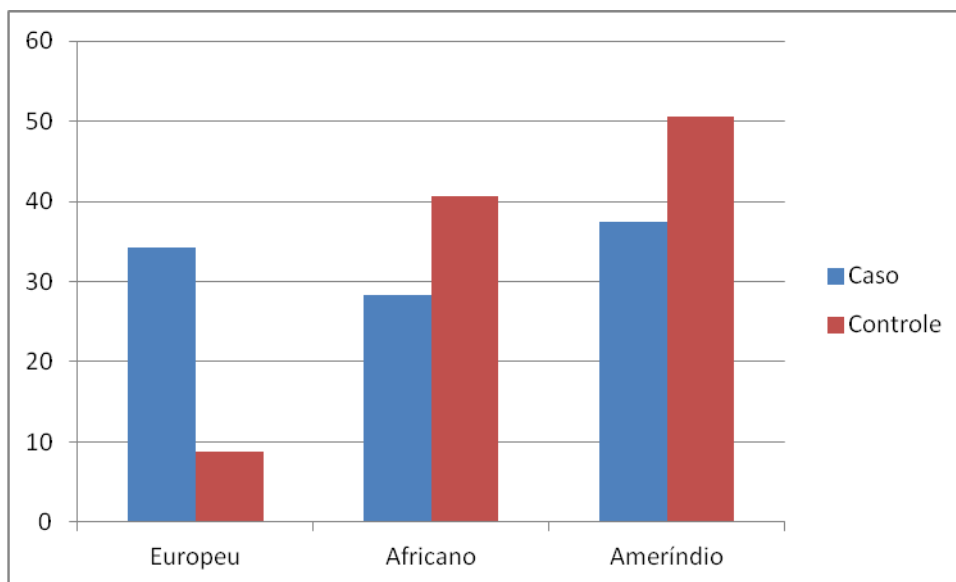


Figura 12. Comparação gráfica das estimativas de mistura étnica obtida a partir de sete *loci* (Sb19.3, APO, PV92, AT3, LPL, DRD2, RB2300 e CKM).

Polimorfismo no IL-13RA1 e sua associação com a asma

A asma é uma patologia extremamente complexa, a correlação entre a doença e as variáveis história familiar e níveis totais de IgE são importantes para se fechar o diagnóstico da doença, ou até mesmo sub-classificá-la. Na associação destas com o polimorfismo no IL-13RA1, foi possível observar significância estatística com a história

familiar (X^2 p-valor =0,004, OR foi de 2,69, com IC entre 1,36-5,35), mais não com os níveis de IgE (Tabela11).

Nas associações dos sintomas frequentes na asma, admitindo-se valor significativo para $p < 0,05$, foi possível observar que apenas as variáveis secreção nasal (X^2 p-valor =0,004, OR foi de 2,88, com IC entre 1,39-5,99), espirros (X^2 p-valor =0,04, OR foi de 2,09, com IC entre 1,05-4,16) e rinite (X^2 p-valor =0,02, OR foi de 2,64, com IC entre 1,19-5,87) demonstraram correlações estatísticas significativas com o polimorfismo no IL-13RA1 (Tabela 11).

Tabela 11 – Associações (X^2) e fatores de risco (OR) entre acometimentos frequentes na asma e os diferentes genótipos para o polimorfismo IL-13RA1. Os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.

Acometimentos	Genótipos		χ^2 p-valor	OR p-valor	Intervalo de Confiança
	AA n(%)	GG n(%)			
Asma			0,11	1,77	0,88-3,56
Controle	66(66,7%)	33 (33,3%)			
Caso	26(53,1%)	26 (46,9%)			
Dificuldade de Respirar			0,11	1,75	0,88-3,48
Não	63(67%)	31(33%)			
Sim	29(53,7%)	25(46,3%)			
Secreção Nasal			0,004	2,88	1,39-5,99
Não	73(69,5%)	32(30,5%)			
Sim	19(44,2%)	24(55,8%)			
Coceira			0,42	1,34	0,66-2,71
Não	65(64,4%)	36(35,6%)			
Sim	27(57,4%)	20(42,6%)			
Tosse			0,81	1,09	0,55-2,34
Não	69(62,7%)	41(37,3%)			
Sim	23(60,5%)	15(39,5%)			
Chiado no Peito			0,48	1,32	0,61-2,85
Não	72(63,7%)	41(36,3%)			
Sim	20(57,1%)	15(42,9%)			

Aperto no Peito			0,09	2,03	0,87-4,70
Não	79(65,3%)	42(34,7%)			
Sim	13(48,1%)	14(52%)			
Espirros			0,04	2,09	1,05-4,16
Não	65(68,4%)	30(31,6%)			
Sim	27(51%)	26(49,1%)			
Histórico Familiar			0,004	2,69	1,36-5,35
Não	63(72%)	25(28,4%)			
Sim	29(48,3%)	31(51,7%)			
Rinite			0,02	2,64	1,19-5,87
Não	78(67,2%)	38(32,8%)			
Sim	14(43,8%)	18(56,2%)			
Níveis de IgE			0,48	1,27	0,65-2,48
IgE <160	49(65,3%)	26(34,7%)			
IgE >160	43(59,7%)	29(40,3%)			

O polimorfismo em estudo (+1398 A/G) é caracterizado pela substituição de uma adenina por uma guanina, tendo como genótipos possíveis AA, AG e GG. Como não foi identificado em nosso grupo amostral indivíduos heterozigotos, as frequências alélicas e genotípicas apresentaram os mesmos valores, AA(0,622) para ausência do polimorfismo e GG(0,378) para presença do mesmo.

DISCUSSÃO

A amostra estudada é miscigenada, apresentando contribuição de africanos, ameríndios e europeus. Em concordância com dados do IBGE (2012), os quais revelam que os afrodescendentes predominam na população da Bahia, especialmente na cidade de Salvador, observou-se, nestas amostras prevalência diferente da capital, com maior proporção de indivíduos de ancestralidade ameríndia.

De acordo com Moreira (2008) o papel desempenhado pela ideia de mestiçagem no mito de fundação da nação brasileira, trata a mesma como principal meio de integração social do índio e, finalmente, algumas armadilhas que a ideia de miscigenação produz, impedem uma apreensão crítica da presença indígena no processo de desenvolvimento histórico do Brasil e do povo brasileiro.

Frequências alélicas

São considerados AIMS os marcadores que apresentam diferenciais de frequência (δ) >30% entre quaisquer grupos étnicos ou geográficos (BONILLA et al., 2004). Os valores de δ obtidos para alelos *AT3*1* e *RB2300*1* foram > 50% para ameríndios (controle) e africanos (casos), respectivamente, dessa forma podem ser utilizados para estimar a contribuição gênica europeia (Figura 9e a Tabela 5).

Entre as amostras do presente estudo a frequência do alelo *LPL *1* variou de 51,2% (Controles) a 64,8% (Casos) com média de 58% (Tabela 4 e Figura 8), mais próxima à frequência relatada para ameríndios (44,9%) (Tabela 4). Em Salvador este alelo apresentou a frequência de 74% (ABE-SANDES et al., 2010).

A frequência do alelo *PV92* 1* variou de 34% (Casos) a 43,8% (Controles) (Tabela 4 e Figura), com média de 38,9%. Este marcador, em populações mundiais é mais frequente em ameríndios (77,6%) (Tabela 5). Em estudo realizado em uma amostra populacional de Salvador foi encontrada a frequência de 25% (ABE-SANDES et al., 2010).

A frequência do alelo *AT3-ID* 1* variou de 44,7% (Casos) a 55,8% (Controles) (Tabela 4 e Figura 8), com média de 51,8%. Este marcador, em populações mundiais é mais frequente em africanos (85%) (Tabela 5). Em estudo realizado em uma amostra

populacional de Salvador foi encontrada a frequência de 55% (ABE-SANDES et al., 2010).

Para o alelo *Sb19.3*1* (Tabela 4) a frequência variou de 52,9% (Controles) a 67,7% (Casos) entre as amostras, com média de 60,3%. Este marcador, em populações mundiais é mais frequente em europeus (92,7%) (Tabela 5). Na população de Salvador foi encontrada uma frequência de 67% (ABE-SANDES et al., 2010).

Para o alelo *RB2300*1* (Tabela 4) a frequência variou de 34,2% (Casos) a 49,5% (Controles) entre as amostras, com média de 42,1%. Este marcador, em populações mundiais é mais frequente em africanos (93%) (Tabela 5). Na população de Salvador foi encontrada uma frequência de 60% (ABE-SANDES et al., 2010).

Para o alelo *CKMM*1* (Tabela 3) a frequência variou de 43,7% (Casos) a 54,5% (Controles) entre as amostras, com média de 49,1%. Este marcador, em populações mundiais é mais frequente em ameríndios (90%) (Tabela 5). Na população de Salvador foi encontrada uma frequência de 27,3% (ABE-SANDES et al., 2010).

Para o alelo *APO*1* (Tabela 3) a frequência variou de 76,7% (Controles) a 84,7% (Casos) entre as amostras, com média de 80,7%. Este marcador, em populações mundiais é mais frequente em ameríndios (97,7%) (Tabela 5). Na população de Salvador foi encontrada uma frequência de 20% (ABE-SANDES et al., 2010).

Esta variação das frequências alélicas das amostras em relação às populações mundiais poderia ser explicada pelos graus diferentes de miscigenação das amostras, visto que há uma grande dificuldade na coleta dos indivíduos com asma e dos pareados para esta doença. Além do mais, como a etnia pode estar associada à manifestação da doença, a seleção e coleta das amostras não são processos aleatórios.

Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

Foram observados desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) nos *loci* *Sb19.3* e *PV92* nos casos e controles, no *locus* *RB2300* nos casos (Tabela 6). Quando aplicado o teste multi-locus apenas as amostras casos, indicou a falta de heterozigotos (Tabela 7). Na análise teste multi-populacional, sugeriu que os *loci* *PV92*, *AT3* e *Sb19.3* também apresentaram desvio pela falta de heterozigotos (Tabela 7).

Enquanto que os desvios do EHW encontrados no *locu* *RB2300* nos casos e *CKMM* nos controles podem ser explicados pelo excesso de heterozigotos, embora este

último não apreça no teste global. O teste multi populacional sugeriu excesso para o *locus* RB2300 (Tabela 8).

O princípio de Hardy-Weinberg prevê frequências genótípicas através da informação das frequências alélicas das populações e, diz-se que as populações estão em equilíbrio, quando as frequências alélicas e genótípicas têm a mesma chance de serem passadas de geração para geração, supondo-se a presença de casamentos aleatórios, populações infinitamente grandes, números semelhantes de filhos, número semelhante entre homens e mulheres e ausência de fatores que perturbem este equilíbrio, tais como: mutações, migração, seleção natural ou deriva genética (SNUSTAD, 2006).

A não aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg neste estudo pode ser devido aos seguintes fatores: primeiro por tratar-se de uma amostra de tamanho limitado composto por uma parcela de pacientes asmáticos, não sendo, portanto, uma amostra coletada de forma aleatória.

Machado et al (2007) estudando marcadores de ancestralidade genômica em amostras aleatórias representativas da população de Salvador, coletadas em diversas regiões da cidade, observou que, apesar de não preencher todos os critérios teóricos, a população de Salvador estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Outra possível explicação para a amostra não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg é a existência de “reprodução preferencial” já demonstrada em estudos realizados no estado da Bahia, devido à tendência dos indivíduos de se casarem dentro de grupos fenotipicamente similares (SNUSTAD, 2006).

Estes achados corroboram com os dados obtidos por Azevedo et al (1982), os casamentos preferenciais, aumentam a frequência de homozigotos e diminuem a frequência de heterozigotos na população para marcadores associados à ancestralidade.

A migração recente de indivíduos também é um fator importante para o desequilíbrio temporário em populações miscigenadas, estando presente até que ocorra reprodução aleatória por, pelo menos, uma geração (SNUSTAD, 2006). Sendo assim, os marcadores de ancestralidade ameríndia apresentaram uma frequência maior em nossa amostra, refletindo a contribuição indígena na formação da população da Bahia.

Associações par a par entre *loci*

O padrão de associação par a par entre os sete *loci* não ligados foi analisado com o intuito de averiguar a existência de estrutura genética nas amostras, o que seria sugerido pela presença de desvios significativos entre esses *loci*.

Associações significativas foram observadas apenas entre os *loci* AT3/LPL (casos- $p=0,035$) e seriam indicativas de subestruturação por miscigenação.

Diferenciação genética das populações

A diferenciação genotípica e gênica pelo método de Fisher's dos sete *loci* indicou valores significativos ($p<0,05$) para os *loci* AT3, APO, Sb19.3, LPL (Tabela 8). Já o *locus* PV92 (Tabela10) apresentou significância apenas na diferenciação gênica. Estes resultados são condizentes com a história de formação da população em estudo e também evidenciam diferenças entre as amostras casos/controle para a asma, sugerindo a necessidade do controle genômico.

Mistura étnica

As estimativas de mistura étnica foram obtidas utilizando o método da identidade gênica (CHAKRABORTY 1985), o coeficiente de identidade gênica estima a probabilidade de dois genes escolhidos ao acaso (em uma ou mais populações) serem idênticos por natureza. Nas amostras casos e controles, utilizando os sete *loci* AIMs a estimativa de mistura étnica se adequou ao modelo tri-híbrido. Em todas as amostras a maior contribuição observada foi ameríndia, tanto nos casos quanto nos controles.

Estes resultados estão de acordo com a história da formação da população de Itabuna, inicialmente de constituição ameríndia, pois foram os primeiros povos a habitar esta região (BARBOSA, 1994). Desde o início da colonização e povoamento da região, a população indígena sofreu às uniões preferenciais entre homens africanos e europeus e mulheres ameríndias (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001).

Alves-Silva *et al* (2000) corrobora com o exposto acima, pois em análises que utilizaram marcadores uniparentais, do cromossomo Y e do DNA mitocondrial (DNAMt) observaram resultados que indicaram que a patrilinhagem brasileira é principalmente de origem européia, enquanto que a matrinhagem é ameríndia ou africana.

Segundo os critérios do IBGE (2010) para etnia auto-declarada não há separação entre africanos, de pardos e índios. No estudo caso-controle realizado por Oliveira (2012), em uma população miscigenada no sul da Bahia, os indivíduos casos na auto-classificação, 26%, declaram-se brancos e 74% não-brancos (negros e pardos). Já na auto-classificação dos controles, 33,3% declaram-se brancos e 66,7% não-brancos (negros e pardos). Esses valores colaboram os dados obtidos pelos AIMS do presente trabalho. Porém, Pena et al (2009) afirma que a correlação entre a cor da pele e ancestralidade genômica é falha em populações miscigenadas.

Estes resultados indicam a importância de avaliar a ancestralidade genômica baseados em marcadores genéticos, visto que estes fornecem resultados mais precisos sobre a composição genética da população.

Polimorfismo no IL-13RA1 e sua associação com a asma

A variável asma não apresentou correlação com o polimorfismo no IL-13RA1, acreditamos que o tamanho amostral tenha forte influencia neste resultado. Torgerson et al (2011) reuniram dados de vários estudos em uma meta-análise, conjuntos de dados genômicos para a asma, sugeriram que alguns *loci* de susceptibilidade para asma são resistentes a diferenças na ascendência e necessitam de grandes amostras para apresentarem alguma significância, e que as associações específicas de ascendência também contribuem para a arquitetura complexa da genética da asma.

O fator história familiar de asma ($p=0,004$) mostrou ser um forte indicador de suscetibilidade na presença do polimorfismo no IL-13RA1. Em um estudo realizado com a população europeia, Koppelman (1999) ratifica o exposto acima, pois tendo os fatores genéticos e ambientais papéis importantes na etiologia da asma, os fatores genéticos, por exemplo, são tão importantes no quadro asmático que o peso ou papel da herdabilidade pode chegar próximo de 80%. Deste modo, os fatores genéticos são generosamente discutidos no ciclo da asma, pois ter uma história familiar de asma, em teoria, contribui fortemente a favor do desenvolvimento da doença.

Os sintomas frequentes na asma que apresentaram associação significativa com o polimorfismo em estudo, secreção nasal, espirros e rinite, estão fortemente presentes em indivíduos portadores da doença. Bousquet (2008) chama atenção, como a secreção nasal

(rinorréia) e espirros frequentes, que são característicos da rinite alérgica coexistem. De fato, muitos estudos mostram que a rinite alérgica e a asma são doenças inter-relacionadas, de tal forma que sugerem a quebra do paradigma como doenças diferentes (CAMARGOS, 2002).

Leynaert et al (2009) corroboram com o exposto acima, ao afirmarem que a rinite ocorre em 75% a 90% dos indivíduos adultos com asma alérgica. E a asma ocorre em 25% a 50% dos indivíduos com rinite, e que adultos com rinite são mais propensos a ter asma do que aqueles sem rinite.

CONCLUSÕES

As frequências alélicas para os *loci* AIMS (APO, Sb19.3, PV92, AT3, LPL, RB2300 e CKMM) apresentaram diferenças entre amostras analisadas em relação às populações mundiais.

Os desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg detectados em alguns *loci* sugerem estruturação nas amostras analisadas especialmente por causa da miscigenação.

As estimativas de mistura étnica se adequaram ao modelo tri-híbrido. Em todas as amostras, a maior contribuição observada foi à ameríndia. Os resultados encontrados na presente amostra foram diferentes dos observados em amostra populacional de Salvador, que apresenta maior contribuição afrodescendente.

A diferenciação gênica populacional observada nos *loci* AT3, APO, Sb19.3 e LPL, desvios no EHW, associações par a par entre *loci* não ligados, contribuições variáveis nas estimativas de mistura étnica entre as amostras indicam sub-estruturação populacional e a necessidade de realização do controle genômico.

O polimorfismo no receptor de IL-13 (IL-13RA1) mostrou significância estatística com as variáveis história familiar de asma, secreção nasal, espirros e rinite. Ratificando os achados da literatura, pois esses acometimentos e a asma coexistem na grande maioria dos indivíduos. Contudo, os resultados obtidos com os AIMS não condizem com os achados da literatura atual, que refere maior suscetibilidade a asma em populações afrodescendentes, no presente trabalho os casos de asma apresentaram uma maior contribuição ameríndia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÉ-SANDES, K.; BOMFIM, T. F.; ABE-SANDES, C.; ACOSTA, A. X.; ALVES, C. R. B. Ancestralidade Genômica, Nível Socioeconômico e Vulnerabilidade ao HIV/AIDS na Bahia, Brasil. **Saúde Soc.** São Paulo, v.19, supl.2, p.75-84, 2010.
- ABÉ-SANDES, K.; SILVA JUNIOR, W. A.; ZAGO, M. A. Heterogeneity of the Y chromosome in AfroBrazilian populations. **Hum Biol**, Paris, v. 76, n. 1, p. 77-86, 2004.
- ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS, M.; GUIMARÃES, P. E.; FERREIRA, A. C.; BANDELT, H. J.; PENA, S. D.; PRADO, V. F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet.** v. 67, n. 2, p. 444-61, 2000.
- ANDRADE, M. P.; ROCHA, L. B.. De Tabocas a Itabuna. Ilhéus: **Editus**, 2005. 183p.
- ANGNES, M. R.; MACAGNAN, Jamile B. A.; CAUDURO, J. M.; SILVEIRA, L.. Asma: uma revisão da literatura. **Rev. Saúde Públ.** Santa Cat., Florianópolis, v. 5, n. 3, p. 81-94, dez. 2012.
- ARCOT, S.S.; ADAMSON, A.W.; RISCH, G.W.; LAFLEUR, J.; ROBICHAUX, M.B.; LAMERDIN, J.E.; CARRANO, A.V.; BATZER, M.A. High-resolution cartography of recently integrated human chromosome 19-specific Alu fossils. **J. Mol. Biol.**, v.281, n. 5, p.843-56, 1998.
- ASHER MI; MONTEFORT S; BJÖRKSTÉN B; LAI CK; STRACHAN DP; WEILAND SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**;368(9537):733-43 2006.
- AZEVEDO, E. S. et al. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Human Biology**, Bethesda, v. 54, n. 2, p. 329-341, may 1982.
- AZEVEDO, E.S. Subgroup studies of black admixtures within a mixed population Bahia, Brazil. **Ann. Hum. Genet.**, v. 44, p.55-60, 1980.
- BARBOSA, C. R. A. **Notícia histórico de Ilhéus**. 3.ed. Itabuna: COLOGRAF, 1994.
- BARNES, K.C.; Grant, A.V.; Hansel, N.N.; Gao, P.; Dunston, G.M. African Americans with asthma: genetic insights. **Proc Am Thorac Soc.**;4:58-68 2007.
- BAYE, T. M. *et al.* Differences in Candidate Gene Association between European Ancestry and African American Asthmatic Children. **PLoS ONE**, volume 6, 2011.
- BATZER, M.A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D.H.; SHAIKH, T.H.; NOVICK, G.E.; IOANNOU, P.A.; SCHEER, W.D.; HERRERA, R.J. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. **Proc. Natl. Acad. Sci . US A.** v.91, n.25, p.12288-92, 1999.
- BIERBAUM, S.; HEINZMANN, A. The genetics of bronchial asthma in children. **Respir Med.**;101:1369-75 2007.
- BONILLA, C; PARRA, E. J., PFAFF, C. L; DIOS, S; MARSHAL, J. A; HAMMAN, R. F; FERREL, R. E; HOGGART, C. L; MCKEIGUE, P. M & SHRIVER, D. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for Complex trait gene mapping. **Ann Hum Genet.** 68:139-153, 2004.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, A. A.; *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008. **Allergy**, v. 63, p. 8–160, 2008.

BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. **Atenção primária e promoção da saúde**. Brasília: CONASS, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Asma**. 2010. Disponível em: <<http://www.isaude.net/pt-BR/noticia/4592/geral/segundo-ministerio-da-saude-asma-e-responsavel-por-6-mortes-ao-diano-brasil>>. Acesso em: 28 de março de 2010.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. ; SALZANO, F.M. . **Brazilian Indian**/non-Indian Interactions and their Effects. *Ciência e Cultura (SBPC)*, São Paulo, v. 51, n. 3/4, p. 166-174, 1999.

CAMARGOS, P. A. M.; RODRIGUES, M. E. S. M.; SOLÉ, D.; SCHEINMANN, P. Asma e rinite alérgica como expressão de uma única doença: um paradigma em construção. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 123–128, 2002.

CAMPOS, H. S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. **Rev. Bras. Pneumol. Sanit.**, dic., vol.15, no.1, p.47-60. ISSN 1982-3258 2007.

CARVALHO-SILVA, D. R.; SANTOS, F. R.; ROCHA, J. AND PENA, S. D. J. The phylogeography of Brazilian Y-Chromosome lineages. **Am J Hum Genet** 68:281-286, 2001.

CHAKRABORTY, R.; KAMBOH MI & FERRELL, R.E. “Unique” alleles in admixed populations: a strategy for determining hereditary population differences of disease frequencies. **Ethn. Dis.**, v.1, p. 245-256, 1991.

CHAKRABORTY, R.; KAMBOH, M.I.; NWANKWO M & FERRELL, R.E. Caucasian genes in American blacks: new data. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p.145-155, 1985.

CHIANG, C.; LIN, M.W.; CHUNG, M.Y.; YANG, U.C.. The association between the IL-4, ADRb2 and ADAM 33 gene polymorphisms and asthma in the Taiwanese population. **J Chinese Medical Association** 75 635e643,(2012).

Choudhry, S.; Burchard, E. G.; Borrell, L. N., Tang, H.; Gomez, I.; *et al.* Ancestry–Environment Interactions and Asthma Risk among Puerto Ricans. **A J Respiratory and Critical Care Medicine** vol 174 2006.

CURTIN PD. **The Atlantic slave trade**: a census. University of Wisconsin Press, Madison, 1969.

DANIELS SE, BHATTACHARYA S, JAMES A, LEAVES NI, YOUNG A, HILL MR, *et al.* A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. **Nature**; 383:247-50 1996.

FLORES, Carlos; FAN Ma, Shwu; YANES, Mari’á Pino-; *et al.* African Ancestry Is Associated with Asthma Risk in African Americans. **PLoS ONE**, January 2012 | Volume 7 | Issue 1 | e26807.

GOMES, Luciano Gama da Silva. Análise da correlação de aspectos clínico-laboratoriais, epidemiológicos e genéticos com a asma em uma população do sul da Bahia. **Dissertação de Mestrado**. Agosto, 2013.

HOEBEE, B.; *et al.* Association of Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis with Interleukin-4 and Interleukin-4 Receptor a Polymorphisms. **J Infectious Diseases**; 187:2–11 2003.

HOPKIN J. Mechanisms of asthma. **Medicine**;31(12):41-4 2003.

IBGE- CENSO 2012. SITE DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEPGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível na Internet via [www.URL: www.ibge.gov.br/](http://www.ibge.gov.br/). Acesso em dezembro de 2013.

IBGE- CENSO 2007. SITE DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEPGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível na Internet via [http:// www.ibge.gov.br/ cidadesat/ topwindow.htm?1](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1). Acesso em setembro de 2013.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). População residente, por cor ou raça, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação – 2000. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tendencia_demografica/analise_populacao/194_0_2000/tabela07.pdf

JENNELMAN MC, VAN Snick J, CORMONT F, SALMAN B. Allergeninduced Th1 and Th2 cytokine secretion in relation to specific allergen sensitization and atopic symptoms in childre. **Clin Exp Allergy** 2001;31:1528-35.

KARATHANASIS, S. K.; ZANNIS, V.I.; BRESLOW, J.L. Characterization of the apolipoprotein A-I-C-III gene complex. **Methods Enzymol.**, v.128, p.712-26, 1985.

KAWAKAMI K, TAGUCHI J, MURATA T, PURI RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. **Blood**;97:2673-9 2001.

KIDD, P. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 223–246, 2003.

KIM, Hyo-Bin et al. Gene–gene interaction between IL-13 and IL-13R α 1 is associated with total IgE in Korean children with atopic asthma. **J Hum Genet**; 51:1055–1062 (2006).

KNISZ J., ROTHMAN P.B. Suppressor of cytokine signaling in allergic inflammation. **J Allergy Clin Immunol**. 2007;119:739-45.

KOPPELMAN, G. H.; LOS, H.; POSTMA, D. S. Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. **The European respiratory journal**, v. 13, n. 1, p. 2–4, jan 1999.

LEYNAERT B, BOUSQUET J, NEUKIRCH C, et al. Perennial rhinitis: an independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey. **J Allergy Clin Immunol** 2009;104:301.

MACEDO, S. E. C. et al. Fatores de risco para a asma em adultos, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p.863-874, abr. 2007.

MACHADO, T.M.B.; BOMFIM,T.F; ACOSTA, A.X.; , GALVÃO-CASTRO, B.; , SOUSA, S.M.B; ABÉ-SANDES, K. ESTIMATIVA DE MISTURA GENÉTICA EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE SALVADOR-BA-BRASIL. **FIOCRUZ-BA**, 2007.

MALERBA, G.; PIGNATTI, P. F.. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. Department of Mother and Child and Biology–Genetics, Section of Biology and Genetics, University of Verona, Italy. **J Appl Genet** 46(1) pp. 93-104 2005.

MILOUX B, LAURENT P, BONNIN O, LUPKER J, CAPUT D, VITA N, FERRARA P. Cloning of the human IL-13R α 1 chain and reconstitution with the IL4R α of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. **FEBS Lett**; 401:163-6 1997.

MITSUYASU H, IZUHARA K, MAO XQ, GAO PS, ARINOBU Y, Enomoto T, et al. Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. **Nat Genet**; 19: 119-20 1998.

MOREIRA, V. M. L. História, etnia e nação: o índio e a formação nacional sob a ótica de Caio Prado Júnior. **Memoria Americana** 16 (1) - Año 2008: 63-84.

NOVICK, G.E.; BATZER, M.A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D.H.; SHAIKH, T.HIOANNOU, P.A.; SCHEER, W.D.; HERRERA, R.J. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. **Proc. Natl. Acad. Sci. US A.** v.91, n.25, p.12288-92, 1995.

OLIVEIRA, J.S.. Composição genômica de uma amostra de homens do sul da Bahia. **Dissertação de conclusão do curso de mestrado**. Fevereiro, 2012.

PARRA, E.J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M.A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D.B.; DEKA, R.; FERRELL, R.E.; SHRIVER, M.D. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 63, n. 6, p. 1839-51, 1998.

PARRA, E.J. et al. Ancestral Proportions and Admixture Dynamics in Geographically Defined African Americans Living in South Carolina. **J Physical Anthropology** 114:18–29 (2001).

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n.1, p.177-82, 2003.

PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte Responses and Cytokines. **Cell Press**, v. 76, p. 241–251, 1994.

PENA, S. D. J.; BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J. R. AND BYDLOWSKI, S. P. DNA test probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz J Med Biol Res**, 42: 870- 876, 2009.

PINTO, L. A.; STEIN, R. T.; KABESCH, M.. O impacto da genética na asma infantil. **J Pediatr (Rio J)**;84(4 Supl):S68-75: Asma, genética, infância, farmacogenética 2008.

SHRIVER, M. D. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Hum Genet**: 112 : 387–399 (2003).

RAYMOND, M. & ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Hered**, v. 86, p. 248-49, 1995.

ROUQUAYROL, M. Z.; Almeida, F. N.. Epidemiologia & saúde. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2003.

RUMPEL, J.A; AHMEDANI, B.K.; PETERSON, E.L.. Genetic ancestry and its association with asthma exacerbations among African American subjects with asthma. **J Allergy Clin Immunol** 2012;130:1302-6.

SALES, I. R. F.; FERNANDES, E. S.; PEIXOTO, D. M.; MUNIZ, M. T. C.; SARINHO, E.S. C. Associação dos polimorfismos nos genes da IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 e a asma infantil: uma revisão sistemática. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** – Vol. 35. Nº 3, 2012.

SCHWARTZMAN, S. Fora de foco: diversidade e identidades étnicas no Brasil, **Novos Estudos CEBRAP**, v. 55, p. 83-96, 1999.

SHRIVER, M. D.; PARRA, E. J.; DIOS, S.; BONILLA, C.; NORTON, H.; JOVEL, C.; PFAFF, C. L.; JONES, C.; MASSAC, A.; CAMERON, N.; BARON, A.; JACKSON, T.; ARGYROPOULOS, G.; JIN, L.; HOGGART, C. J.; McKEIGUE, P. M.; KITTLES, R. A. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Hum Genet**, 112(4):387-99, 2003.

SHRIVER, M. D.; SMITH, M. W.; JIN, L. *et al.* Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet*, v. 60, n. 4, p. 957-64, abr 1997. FERRELL, R. E. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet*, 60:957-964, 1997.

SILVA JR., W.A.; BONATTO, S.L.; HOLANDA, A.J.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; PAIXAO, B.M.; GOLDMAN, G.H.; ABE-SANDES, K.; RODRIGUEZ-DELFIN L; BARBOSA, M.; PACO-LARSON, M.L.; PETZL-ERLER, M.L.; VALENTE, V.; SANTOS, S.E.; ZAGO, M.A. Mitochondrial genome diversity of native americans supports a single early entry of founder populations into America. **Am J Hum Genet** v. 71, n.1, p.187-92, 2002.

SMELTZER, S. C. et al. **Tratado de enfermagem Médico-cirúrgico**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SNUSTAD, P; SIMMONS, M.J. Principles of Genetics, Editora: **John Wiley & Sons Inc**, 2006.

SOLÉ D, WANDALSEN GF, CAMELO-NUNES IC, NASPITZ C. K. Prevalência de sintomas de asma, rinite e eczema atópico entre crianças e adolescentes brasileiros identificados pelo International Study of Asthma and Allergies (ISAAC) Fase 3. **J Pediatr** (Rio J);82(5):341-6 2006.

STEPHENS, J.C.; BRISCOE, D.; O'BRIEN, S.J. Mapping by admixture linkage disequilibrium in human populations: limits and guidelines. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 55, p 809-824, 1994.

STIRBULOV, R; BERND, L. A. G.; SOLE D. IV Diretrizes brasileiras para o manejo da Asma. **J Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 447, jan./fev. 2006.

TELLES, E.E. Racial ambiguity among the Brazilian population. **Ethn. Racial. Stud.**, v.25, n.3, p.415-41, 2002.

TORGERSON DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet* 2011;43:887-92.

VRIES, J. E. De. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. **J. Allergy Clin Immunol** AUGUST 1998.

WYNN, T. A. IL-13 Effector functions. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 425–56, 2003.

VRIES, J. E. De. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. **J. Allergy Clin Immunol** AUGUST 1998.

ANEXO 1

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TCLE Casos

Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.

(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores. De forma clínica, ela é caracterizada pelo aumento da dificuldade de respirar. Sabemos também que a asma é hereditária, havendo interação entre a genética do indivíduo e o ambiente onde ele vive. A melhor compreensão da genética envolvida na asma pode representar avanço importante para os esforços futuros de prevenção e tratamento dela.

O (A) senhor(a) está sendo convidado(a) formalmente a participar da pesquisa: **Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.**

O(a) senhor(a) foi selecionado(a) por possuir quadro clínico da asma. Compreenda que a sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento, não fazendo mais parte das nossas análises nesta pesquisa.

O objetivo desse estudo é avaliar diferenças genéticas que podem estar relacionadas à asma em indivíduos de Itabuna.

A participação nesta pesquisa consistirá na coleta de sangue (10mL). Caso o senhor(a) opte em realizar a coleta no laboratório selecionado pelos pesquisadores, no momento no qual estiver sendo feita a coleta para os exames de rotina (solicitados pelo médico), será feita a coleta de mais dois tubos de sangue, não sendo necessária uma nova picada. Caso o senhor(a) tenha outro laboratório de sua preferência, não há qualquer problema. Posteriormente, entraremos em contato apenas para verificar os resultados dos exames de rotina e marcar um dia para realizarmos a coleta de sangue para a pesquisa na sua residência. Não há qualquer diferença entre essa coleta e aquelas feitas normalmente no laboratório. A pesquisa será realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz e qualquer dúvida você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, através do telefone 3680-5267.

Podemos afirmar que não correrá risco algum. Poderá sofrer apenas o desconforto da retirada de sangue, que será feito no momento de coleta para os seus exames solicitados pelo seu médico. Como qualquer coleta de sangue feita em laboratórios, esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Tal coleta será realizada por um profissional competente e devidamente treinado.

As informações, dados e resultados gerados sobre a sua pessoa serão devidamente arquivados em local seguro, os quais só terão acesso pessoas de confiança envolvidas diretamente com esta pesquisa. O material biológico, no caso o DNA, obtido a partir do

TCLE Controles

Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.
--

(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores. De forma clínica, ela é caracterizada pelo aumento da dificuldade de respirar. Sabemos também que a asma é hereditária, havendo interação entre a genética do indivíduo e o ambiente onde ele vive. A melhor compreensão da genética envolvida na asma pode representar avanço importante para os esforços futuros de prevenção e tratamento dela.

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) formalmente a participar da pesquisa: **Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.**

O(A) senhor(a) foi selecionado(a) por não possuir dados relevantes que possam sugerir um quadro clínico de asma, fazendo parte, então, do nosso grupo controle. Compreenda que a sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento, não fazendo mais parte das nossas análises nesta pesquisa.

O objetivo desse estudo é avaliar diferenças genéticas que podem estar relacionadas à asma em indivíduos de Itabuna.

A participação nesta pesquisa consistirá na coleta de sangue(10mL). Caso o senhor(a) opte em realizar a coleta no laboratório selecionado pelos pesquisadores, no momento no qual estiver sendo feita a coleta para os exames de rotina (solicitados pelo médico), será feita a coleta de mais dois tubos de sangue, não sendo necessária uma nova picada. Caso o senhor(a) tenha outro laboratório de sua preferência, não há qualquer problema. Posteriormente, entraremos em contato apenas para verificar os resultados dos exames de rotina e marcar um dia para realizarmos a coleta de sangue para a pesquisa na sua residência. Não há qualquer diferença entre essa coleta e aquelas feitas normalmente no laboratório. A pesquisa será realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz e qualquer dúvida você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, através do telefone 3680-5267.

Podemos afirmar que não correrá risco algum. Poderá sofrer apenas o desconforto da retirada de sangue, que será feito no momento de coleta para os seus exames solicitados pelo seu médico. Como qualquer coleta de sangue feita em laboratórios, esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Tal coleta será realizada por um profissional competente e devidamente treinado.

As informações, dados e resultados gerados sobre a sua pessoa serão devidamente arquivados em local seguro, os quais só terão acesso pessoas de confiança envolvidas diretamente com esta pesquisa. O material biológico, no caso o DNA, obtido a partir do sangue coletado (caso autorizado por você), ficará guardado em freezer a -70°C por cinco anos, no Laboratório de Farmacogenômica da UESC. O material ficará armazenado para

repetição de algum teste já realizado, ou para realização de novos testes relacionados a estudos de susceptibilidade à asma. Após esses cinco anos o material será descartado.

Como benefício, receberá os resultados dos exames, bem como, se solicitado, os resultados obtidos ao final da pesquisa, os quais serão apresentados pelo pesquisador responsável. Os benefícios em relação ao estudo dos polimorfismos podem não ser diretos para você, mas poderão fornecer mais informações acerca da sua patologia, a asma, podendo auxiliar estudos futuros de prevenção e tratamento.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que se seguem.

Termo de consentimento livre após esclarecimento	
<p>Eu, _____</p> <p>_____</p> <p>li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a que serei submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo.</p> <p>Assim sendo, concordo em participar do estudo,</p> <p>Itabuna, ____/____/____</p>	
<p>_____</p> <p style="text-align: center;">Assinatura do voluntário</p>	<p>Nome: Identidade: Telefone pessoal: Telefone para contato: Nome do contato:</p>
<p>_____</p> <p>Sandra Rocha Gadelha Mello - Mat: 734757678 Pesquisador responsável – DCB</p>	<p>Telefones Contato: (73) 3680-5267 E-mail: srgmello@uesc.br</p>

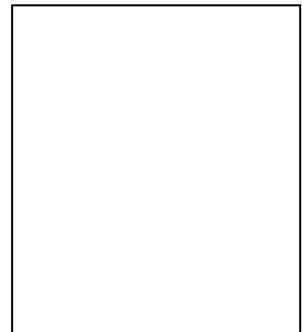
_____, ____/____/____
Local dia mês ano

A rogo do Sr. _____, assinam:

Assinatura da Testemunha 1

Marca do polegar

Assinatura da Testemunha 2



TCLE Para menores de 18 anos

Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.

(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores. De forma clínica, ela é caracterizada pelo aumento da dificuldade de respirar. Sabemos também que a asma é hereditária, havendo interação entre a genética do indivíduo e o ambiente onde ele vive.

A melhor compreensão da genética envolvida na asma pode representar avanço importante para os esforços futuros de prevenção e tratamento dela.

O(A) menor está sendo convidado(a) formalmente a participar da pesquisa: **Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.**

O(a) menor foi selecionado(a) por possuir quadro clínico da asma, ou não. As pessoas com asma farão parte do nosso grupo de casos, enquanto, as pessoas que não apresentam quadro de asma, farão parte do nosso grupo controle. A nossa intenção é diferenciar esses dois grupos. Compreenda que a participação não é obrigatória. A qualquer momento poderá desistir de participar e retirar este consentimento, não fazendo mais parte das nossas análises nesta pesquisa.

O objetivo desse estudo é avaliar diferenças genéticas que podem estar relacionadas à asma em indivíduos de Itabuna.

A participação nesta pesquisa consistirá na coleta de sangue (10mL). Caso o senhor(a) opte em levar o menor para realizar a coleta no laboratório selecionado pelos pesquisadores, no momento no qual estiver sendo feita a coleta para os exames de rotina (solicitados pelo médico), será feita a coleta de mais dois tubos de sangue, não sendo necessária uma nova picada. Caso o senhor(a) tenha outro laboratório de sua preferência, não há qualquer problema. Posteriormente, entraremos em contato apenas para verificar os resultados dos exames de rotina e marcar um dia para realizarmos a coleta de sangue para a pesquisa na sua residência. Não há qualquer diferença entre essa coleta e aquelas feitas normalmente no laboratório. A pesquisa será realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz e qualquer dúvida você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, através do telefone 3680-5267.

Podemos afirmar que não correrá risco algum. O menor poderá sofrer apenas o desconforto da retirada de sangue, que será feito no momento de coleta para os seus exames solicitados pelo seu médico. Como qualquer coleta de sangue feita em laboratórios, esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Tal coleta será realizada por um profissional competente e devidamente treinado.

As informações, dados e resultados gerados serão devidamente arquivados em local seguro, os quais só terão acesso pessoas de confiança envolvidas diretamente com esta pesquisa. O material biológico, no caso o DNA, obtido a partir do sangue coletado (caso autorizado por você), ficará guardado em freezer a -70°C por cinco anos, no Laboratório de

Farmacogenômica da UESC. O material ficará armazenado para repetição de algum teste já realizado, ou para realização de novos testes relacionados a estudos de susceptibilidade à asma. Após esses cinco anos o material será descartado.

Como benefício, receberá os resultados dos exames, bem como, se solicitado, os resultados obtidos ao final da pesquisa, os quais serão apresentados pelo pesquisador responsável. Os benefícios em relação ao estudo dos polimorfismos podem não ser diretos, mas poderão fornecer mais informações acerca da asma, podendo auxiliar estudos futuros de prevenção e tratamento.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para que o menor participe desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que se seguem.

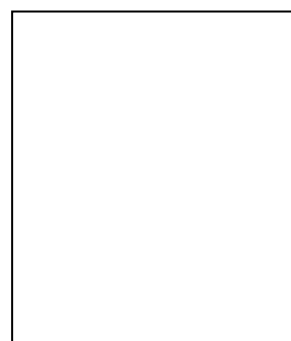
Termo de consentimento livre após esclarecimento	
<p>Eu, _____, responsável por _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento o qual será submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que eu ou o menor qual sou responsável somos livres para interromper sua participação a qualquer momento. Sei que meu nome nem o do menor qual sou responsável não serão divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para a participação do estudo. Assim sendo, concordo a participação do estudo,</p> <p>Itabuna, ____/____/____</p>	
<p>_____</p> <p>Assinatura do responsável</p>	<p>Nome do responsável: Identidade: Telefone pessoal: Telefone para contato: Nome do contato:</p>
<p>_____</p> <p>Assinatura do menor de 18 anos</p>	<p>Nome do menor: Identidade:</p>
<p>_____</p> <p>Sandra Rocha Gadelha Mello - Mat: 734757678 Pesquisador responsável – DCB</p>	<p>Telefones Contato: (73) 3680-5267 E-mail: srgmello@uesc.br</p>

_____, ____/____/____
 Local dia mês ano

A rogo do Sr. _____, assinam:

 Assinatura da Testemunha 1

 Assinatura da Testemunha 2



Marca do polegar

ANEXO 2

Questionário



Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.

1. Dados pessoais

Nome: _____

Nascimento: ____/____/____

Estado civil: () solteiro(a) () casado(a) () viúvo(a) () divorciado(a)

Filhos: () Não () Sim Quantos(as)? _____

Endereço:

Tel: (____) _____ E-mail: _____

Escolaridade: _____

Como você classifica sua cor / raça?

1 () branco; 2 () preto; 3 () pardo; 4 () amarelo; 5 () indígena

Qual a sua faixa de renda familiar bruta mensal?

2. Comportamento

Atualmente você fuma? () Não () Sim Quantos cigarros por dia? _____

Anteriormente na sua vida você já fumou? () Não () Sim Quantos anos?

Você tem história familiar de asma? () Não () Sim Quem?

Algum médico já te diagnosticou como tendo alergia? () Não () Sim

A que? _____

Caso tenha alergia, você já fez algum tipo de tratamento? () Não () Sim

Qual? _____

Há quanto tempo sabe que tem alergia? _____ Não tenho alergia ()

Qual destes sintomas você apresenta?

- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| () dificuldade de respirar | () Chiado no peito |
| () escorre secreção do nariz | () Aperto no peito |
| () coceiras | () espirros constantes |
| () tosse frequente | |

Faz uso contínuo de alguma medicação? () Não () Sim

Para qual problema? _____

Qual(is) medicamento(s) é (são) usado(s)? _____

3. Estado de saúde

Você sabe se é portadora de algum outro problema de saúde? () Não () Sim

() problemas renais () problemas hepáticos () problemas da tireóide ()
outros

Qual(is)? _____

