

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho de conclusão de curso

Estudo da associação do polimorfismo -589 C>T do gene da IL-4 com níveis de IgE em uma subamostra de adolescentes da coorte de 1993, Pelotas-Brasil: um enfoque pontual para o estudo da asma.

Mônica Silveira Wagner

Pelotas, 2011

Mônica Silveira Wagner

Estudo da associação do polimorfismo -589 C>T do gene da IL-4 com níveis de IgE em uma subamostra de adolescentes da coorte de 1993, Pelotas-Brasil: um enfoque pontual para o estudo da asma.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biologia

Orientadora: Isabel Oliveira de Oliveira

Pelotas, 2011

Banca Examinadora:

Isabel Oliveira de Oliveira - Dr^a – IB/ Universidade Federal de Pelotas;

Otávio Martins Cruz- Mestrando – PPGB/ Universidade Federal de Pelotas;

Liziane Pereira da Silva - Mestranda – PPGB/ Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo Roberto Wagner e Méris Teresinha Silveira Wagner, por sempre me apoiarem e acreditarem nos meus sonhos. Sem vocês eu jamais conseguiria.

À minha irmã, Paula Silveira Wagner, pelo amor e apoio incondicional. Mesmo distante sempre torceu pelo meu sucesso.

À minha vó, Iloni Maria Wagner, por toda ajuda, apoio e compreensão.

Ao meu amigo e namorado, Itauá Leston Araujo, pelo amor e apoio incansável nos momentos de alegria e desespero acadêmico.

As minhas tias, Jaíce Silveira Reis e Jalda Silveira Kucharski, por toda preocupação e palavras de carinho que nunca me faltaram.

À orientadora, Isabel Oliveira de Oliveira, um exemplo de dedicação e seriedade. Muito obrigada por todo apoio, confiança e ajuda, nesses anos de orientação e amizade.

Aos meus professores e agora colegas de profissão, Joel Peixoto Silveira e Rosângela Piero Nunes, por me ensinarem o prazer e o fascínio do conhecimento.

Aos meus colegas de aula e quase irmãos, pela amizade e por compartilharem os melhores 5 anos da minha vida.

As minhas companheiras de apartamento, Angélica Xavier Kalinoski e Carla Juliana Formulo Dhein, por toda paciência, companherismo e apoio.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Liziane Pereira da Silva, Otávio Martins Cruz, Josiane Weber Tessmann e William Borges Domingues, por todo apoio, incentivo e excelentes risadas, que foram imprescindíveis para manter minha sanidade mental.

À professora, Ana Paula Nunes, pelo apoio para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Pelotas que sempre ajudaram e incentivaram minha jornada acadêmica.

À Universidade Federal de Pelotas, pelo apoio financeiro para realização da minha mobilidade acadêmica.

Ao Instituto Politécnico de Bragança, por ter me acolhido nos meses de intercâmbio.

Ao Cnpq, pelo apoio financeiro para realização da pesquisa e formação acadêmica.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram e incetivaram minha formação profissional.

Resumo

WAGNER, Mônica Silveira. **Estudo da associação do polimorfismo -589 C>T do gene da IL-4 com níveis de IgE em uma subamostra de adolescentes da coorte de 1993, Pelotas-Brasil: um enfoque pontual para o estudo da asma.** 2011. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso- Curso de Ciências Biológicas Bacharelado. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A asma é uma doença caracterizada pela obstrução geral das vias respiratórias, de reversão espontânea ou através de tratamento. Diversos genes são potenciais candidatos a marcadores de suscetibilidade à asma, dentre eles podemos destacar o gene da Interleucina-4 (IL-4). A IL-4 é uma proteína produzida principalmente por células T, que regula as reações imunes mediadas pelos linfócitos B através da produção de uma glicoproteína, a imunoglobulina E (IgE). Tem sido descrita uma associação entre o SNP -589 C>T (rs 2243250) da região promotora do gene da IL-4 e níveis aumentados de IgE, cujo aumento está por sua vez associado à asma. A busca por um marcador genético associado à asma, é de suma importância principalmente para quem possui o alelo de risco pois, a partir deste marcador, podem ser indicadas medidas preventivas para que a asma não se manifeste. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre o SNP -589C>T da região promotora do gene da IL-4 com níveis de IgE, em uma subamostra de adolescentes da coorte de nascimentos ocorridos na cidade de Pelotas-Brasil, no ano de 1993. O SNP -589C>T do gene da IL-4, uma troca silenciosa da base C pela base T, foi genotipado pela técnica de discriminação alélica. Amostras de DNA genômico de 500 adolescentes pertencente a coorte de 93 foram sorteadas aleatoriamente, e foi realizado o ensaio de TaqMan[®] no equipamento Real Time PCR ABI 7.500Fast (Applied Biosystems). Na distribuição das frequências, o genótipo CC foi o mais observado com 56%. A distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2= 1,61$), sendo C o alelo de maior frequência (0,74). Não foi observada associação do SNP -589C>T com níveis de IgE ($p= 0,479$). Investigações complementares a esse estudo serão realizadas a fim de se buscar novos conhecimentos sobre as interações gene-ambiente envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos da asma.

Palavras-chave: Doenças Genéticas Complexas. Imunoglobulina E. Marcador Genético. SNP.

Abstract

WAGNER, Mônica Silveira. **Estudo da Associação do Polimorfismo -589 C>T da Região Promotora do Gene da IL-4 com Asma em uma Subamostra de Adolescentes da Coorte de 1993**. 2011. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso- Curso de Ciências Biológicas Bacharelado. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Asthma is a disease characterized by general airways obstruction, that can be spontaneously reverted or with treatment. Several genes are potential candidates to markers of asthma susceptibility, among it can be detached the gene of Interleukin-4 (IL-4). The inteleukin-4 is a protein principally produced by the T cells, which regulates the immune reactions mediated by immunoglobulin E (IgE), a glycoprotein produced by plasmocytes in response to an immunogen. An association has been described between the SNP -589 C>T (rs 2243250) of the promoter region of IL-4 gene with increased levels of IgE, which in turn is known to be associated with asthma. The research for a genetic marker associated with asthma is essential mainly for the carriers of the risk allele because, from this marker, preventive measures can be indicated in order to avoid asthma. The aim of this study was to evaluate the association between the SNP -589 C>T of the promoter region of IL-4 gene with levels of IgE, in a sub-sample of the 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil. The polymorphism -589 C>T of IL-4 gene, a silent C to T substitution, was genotyped by allelic discrimination technique. Genomic DNA samples of 500 adolescents belonging to 93 cohort were randomly selected and TaqMan® assay was performed using an ABI 7500 Fast (Applied Biosystems). The CC genotype was the most observed with 56%. This distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2= 1.61$), where C was found as the major allele (0.74). No significant association of SNP-589C>T with levels of IgE ($p= 0.479$) was found. Future investigations will be performed in order to bring new knowledge about the gene-environment interactions involved on physiopathological mechanisms of asthma.

Keywords: Complex genetic disease. Genetic marker. Immunoglobulin E. SNP.

Lista de Figuras

Figura 1	Frequência genotípica do SNP -589 C>T da região promotora do gene da Interleucina-4 em 500 indivíduos da coorte de 1993 Pelotas, Brasil.....	23
Figura 2	Frequência alélica do SNP -589 C>T da região promotora do gene da Interleucina-4 em 500 indivíduos da coorte de 1993 Pelotas, Brasil.....	23
Figura 3	Frequência genotípica do SNP -589 C>T da região promotora do gene da Interleucina-4 em 251 mulheres e 249 homens da coorte de 1993 Pelotas, Brasil.....	24

Lista de Tabelas

Tabela 1	Comparação das médias de IgE entre os três genótipos CC, CT e TT do SNP -589 C>T da região promotora do gene IL-4 em uma sub- amostra de 500 indivíduos da coorte de 1993, Pelotas, Brasil.....	24
Tabela 2	Comparação das médias de IgE entre os três genótipos CC, CT e TT do SNP -589 C>T da região promotora do gene IL-4 entre 249 homens e 251muleres da coorte de 1993, Pelotas, Brasil.....	25

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA- Análise da Variância

CPE- Centro de Pesquisas Epidemiológicas

C- Citocina

DNA- Ácido Desoxiribonucleico

EDTA- Ácido Etileno Diamino Tetracético

°C- Graus Celsius

IgE- Imunoglobulina E

IL-4- Interleucina 4

Kb- Kilobases

µL- Microlitro

MGB- Minor Groove Binding

ng/µL- Nanogramas por microlitro

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

SNP- Polimorfismo de Nucleotídeo Único

χ^2 - Qui-quadrado

SPSS- Statistical Package for the Social Sciences-

STATA- Data Analysis and Statistical Software

TE- Tris-EDTA

T- Timina

UFPEL- Universidade Federal de Pelotas

UI/mL- Unidade Internacional / mililitro

VEF₁- Volume Expiratório Forçado do Primeiro Segundo

SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Objetivos.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 Revisão de Literatura	15
4 Materiais e Métodos	20
4.1 População estudada.....	20
4.2 Extração de DNA.....	20
4.3 Genotipagem.....	20
4.4 Dosagem de IgE.....	21
4.5 Análise estatística.....	21
5 Resultados	22
6 Discussão	26
7 Conclusão	28
Referências	29

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença caracterizada pela obstrução geral das vias respiratórias, de reversão espontânea ou através de tratamento (CUSHLEY; TATTERSFIELD, 1983). Na maioria dos pacientes, a asma pode ser controlada tornando os sintomas diurnos e noturnos pouco comuns, o que leva ao uso menos frequente de medicamentos de alívio e menor número de crises (FRANCO et al., 2007). Quando a asma não é bem controlada, ela pode tornar-se crônica, levando à limitação física e social significativa e até causar a morte por crises graves (KELLY; HUDSON; RAVEN, 1988).

A asma é uma condição cuja fisiopatologia é multifatorial, influenciada por características étnicas, genéticas, ambientais e sócio-culturais (BREDA et al., 2009). Suscetibilidade genética, exposições ambientais e, suas interações são os principais componentes que contribuem para a expressão fenotípica da asma (ZHU et al., 2000).

Diversos genes, que são potenciais candidatos a marcadores de suscetibilidade à asma têm sido investigados (WEISS; RABY; ROGERS, 2009). Dentre esse grupo de genes podemos destacar o gene que codifica a Interleucina-4 (IL-4) (FARIA et al., 2008). O gene da IL-4 tem expressão mono e bi-alélicas e está localizado em uma região de 140 Kb no cromossomo 5q31-33 (BATTLE et al., 2007). A IL-4 é uma citocina produzida principalmente por células T, que regula reações imunes mediadas pela imunoglobulina E (IgE) e por mastócitos e eosinófilos (FENGHAO et al., 1995). Entre as inúmeras funções da IL-4, são destacadas as seguintes: ativação de linfócitos B e mudança de isotipo de cadeia pesada para IgE; estimular a produção de IgE na sensibilização alérgica; e inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos (SANTOS et al., 2007). Por sua vez, a IgE atua como uma molécula efetora, desencadeando reações alérgicas relacionadas a diferentes condições, entre elas, às doenças inflamatórias das vias aéreas (PATE et al., 2010).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são o tipo mais comum de variação genética entre indivíduos de uma mesma espécie, tratando-se da variação de apenas um nucleotídeo na sequência de DNA do genoma (BROOKS, 1999).

A associação de polimorfismos de nucleotídeo único da IL-4 com asma tem sido investigada em populações etnicamente distintas em diferentes estudos (BASEHORE et al., 2004; STEINKE; BORISH, 2001; SUZUKI et al., 2000; BATTLE et al., 2007).

O presente estudo enfoca o SNP -589 C>T (rs 2243250) da região promotora do gene da IL-4, o qual foi relatado estar associado com níveis aumentados de IgE e aumento da transcrição do gene da IL-4 (ROSENWASSER et al., 1995; NOGUCHI et al., 1998; KABESCH et al., 2003). A literatura científica sugere que a presença do SNP - 589C>T da IL-4 aumenta a suscetibilidade do indivíduo à asma.

A busca por um marcador genético associado à asma é de suma importância, principalmente para quem possui o alelo de risco, pois a partir deste marcador, podem ser indicadas medidas preventivas para que a asma não se manifeste. É, portanto, de grande interesse para o meio científico e para a formação de políticas públicas de saúde que estudos como este sejam realizados, pois a prevalência, a incidência e a severidade da asma são problemas em crescimento no mundo, o que implica alto custo para as famílias e para o sistema público de saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação do SNP -589C>T da região promotora do gene da IL-4 com níveis de IgE , em uma subamostra de adolescentes da coorte de nascimentos ocorridos na cidade de Pelotas-Brasil no ano de 1993.

2.2 Objetivos Específicos

Descrever as frequências alélicas do SNP -589C>T da região promotora do gene da IL-4 em uma subamostra de 500 indivíduos da coorte de 93.

Descrever as frequências genotípicas do SNP -589C>T em uma subamostra de 500 indivíduos da coorte de 93.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Doenças crônicas relacionadas ao trato respiratório inferior, ou seja, a porção inferior da traquéia, os brônquios, os bronquíolos e os alvéolos pulmonares são bastante comuns. Suas origens são tão diversas quanto os seus sintomas e o seu grau de severidade. A asma, a rinite alérgica e a doença pulmonar obstrutiva crônica são as mais comuns doenças do trato respiratório (MIYAO et al., 1999).

A asma é uma patologia do sistema respiratório que atinge, segundo a Organização Mundial de Saúde, 235 milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2011). Na sua etiologia, é definida como uma doença respiratória comum causada por inflamação brônquica aguda ou crônica que resulta em obstrução variável das vias aéreas (KELLY; HUDSON; RAVEN, 1988).

Conforme o grau de severidade a asma pode ser classificada em leve, moderada e grave (ANDRADE; CHATKIN; CAMARGOS, 2010). A primeira condição é caracterizada por crises esporádicas, desencadeadas por vários fatores e intervalada por períodos assintomáticos. A asma considerada de moderada à grave é persistente, com aumento da frequência de episódios de broncoespasmo. Em qualquer condição podem ocorrer exacerbações agudas. Dentre as várias gradações de asma aguda, destaca-se a Síndrome de Asma Aguda Grave, reconhecida por presença de sibilância (chiado no peito) ou dispnéia que impedem a formulação de uma sentença em único movimento respiratório, além de taquicardia e taquipnéia (BREDA, et al., 2009).

Os tratamentos terapêuticos direcionam-se ao manejo sintomático das crises e à profilaxia, visando minimizar sintomas e evitar novas exacerbações agudas (MOURA; CAMARGOS; BLIC, 1992). Incluem duas categorias de fármacos: broncodilatadores e anti-inflamatórios. A seleção dos medicamentos depende da categorização clínica da doença e do objetivo do tratamento (sintomático ou profilático). Com eles, objetiva-se diminuir sintomas, melhorar função pulmonar, reduzir risco de crises graves, melhorar distúrbios do sono e reduzir número de hospitalizações (PONTE et al., 2007).

Na patogenia da asma, uma variedade de células e mediadores inflamatórios estão envolvidos, os quais atuam sobre as vias aéreas e levam ao desenvolvimento e a manutenção dos sintomas (NUNES; SOLÉ; NASPITZ, 1997).

Os fatores desencadeantes das crises asmáticas são múltiplos. Os fatores mais comuns são contato com substâncias alergênicas, tais como pólen, poeira e fezes de ácaros, poluição, alterações climáticas e situações de estresse emocional (BREDA et al., 2009).

Na asma é observada uma classe de respostas do sistema imune que são denominadas, no seu conjunto, de reações de hipersensibilidade do tipo I, onde ocorre produção de anticorpos IgE específicos a antígenos comuns.

A IgE é produzida pelos plasmócitos localizados nos linfonodos, que drenam a linfa, uma porta de entrada do antígeno. A IgE presente nos tecidos, encontra-se ligada aos mastócitos por receptores de superfície de alta afinidade, denominados FcεRI (DAVIES; O'HEHIR, 2008). A ligação do antígeno à IgE, produz ligações cruzadas entre esses receptores, o que causa liberação de mediadores químicos pelos mastócitos, levando ao quadro de asma (GARCIA et al., 2005).

Estudos genéticos sugerem que *loci* nos cromossomos 11q e 5q podem ser importantes para determinar a presença de hipersensibilidade a diferentes fatores ambientais, ou seja, a presença de doenças atópicas como a asma (XU et al., 2000; HUANG et al., 2003). A região cromossômica 5q31-33 tem sido destacada como uma região importante em inúmeros estudos de associação com a asma (BASEHORE et al., 2004; GUIA; RAMOS, 2010), pois abriga uma região de 140Kb, onde está localizado um *cluster* de genes codificadores de citocinas, que são referência para inúmeras moléculas inflamatórias envolvidas na patogenia da asma .

O gene da IL-4 é, portanto, um candidato importante na associação com doenças atópicas como a asma, pois a citocina por ele codificada, IL-4, promove a mudança do isotipo IgM para IgE (PATE et al., 2010). Esta citocina desempenha um papel essencial na regulação da expressão de IgE, sendo uma das principais citocinas relacionadas com níveis elevados de IgE sérica (XU et al 2000; GUIA & RAMOS, 2010). O nível de IgE no soro varia com a idade e tende a flutuar em

conseqüência de contato com antígenos. Indivíduos atópicos se caracterizam por desenvolver altos títulos de anticorpos IgE para diferentes alérgenos. De modo geral a IgE sérica está mais elevada nos quadros mais extensos ou graves de atopia (SPALDING; WALD ;BERND, 2000). Um aspecto interessante a ressaltar é que níveis séricos de IgE total fornecem uma estimativa do componente alérgico da asma, sendo associados a essa doença independentemente de níveis de IgE específicos (SUNYER et al., 1996).

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único foram identificados na região promotora do gene da IL-4, sendo a associação destes polimorfismos com asma investigada em populações etnicamente distintas (BASEHORE et al., 2004; BAYE et al., 2011). Alguns estudos demonstraram a associação destes polimorfismos com o aumento dos níveis séricos totais de IgE (SUZUKI et al., 2000), com asma (NOGUCHI et al., 1998) e com alteração da função pulmonar (BURCHARD et al., 1999). No entanto, esse achado não foi confirmado em outros estudos (WALLEY; COOKSON, 1996; DIZIER et al., 1999).

O SNP -589 C>T da região promotora do gene da IL-4, vem sendo destacado em diversos estudos (GUIA; RAMOS, 2010; NOGUCHI, et al., 1998). Este polimorfismo corresponde a uma substituição silenciosa da base nitrogenada Citosina (C) pela base Timina (T), na posição -589 da região promotora do gene da IL-4, estando presente em aproximadamente 27% dos caucasóides (FARIA et al., 2008).

O destaque do polimorfismo ocorre principalmente por apresentar associação com níveis elevados de IgE e aumento da transcrição do gene da IL-4 em indivíduos brancos (ROSENWASSER et al., 1995), menor volume expiratório em indivíduos brancos asmáticos (GUIA; RAMOS, 2010) e asma e níveis séricos de IgE em crianças alemãs (KABESCH et al., 2003). Um estudo de meta-análise reforçou a associação do SNP-589 C>T da IL-4 com asma em diferentes populações (LI et al., 2008).

Em um estudo realizado em crianças com risco aumentado para doenças alérgica, o alelo T do polimorfismo -589 do gene da IL-4 foi associado com a

expressão aumentada do gene *in vitro* e com maiores níveis de IgE *in vivo* (ROSENWASSER et al., 1995), além de relacionar-se com asma, rinite e atopia (MARSH et al., 1994). Esse alelo também tem sido associado com baixos valores de volume expiratório forçado do primeiro segundo (VEF₁) em uma população caucasóide com asma (BURCHARD et al., 1999).

Em estudo realizado com crianças japonesas, foi relatada uma associação do alelo T do polimorfismo com asma, mas não com níveis de IgE total ou específica (NOGUCHI et al., 1998). Esses dados sugerem que o SNP-589C>T poderia influenciar a gravidade da asma. No entanto, em outros estudos não foi encontrada uma associação do SNP -589 C>T com asma ou com níveis aumentados de IgE (DIZIER et al., 1999; NOGUCHI et al., 1998; WALLEY; COOKSON, 1996).

Estudos do ciclo vital, como os estudos de coortes de nascimentos, são importantes porque permitem acompanhamentos em diferentes etapas ao longo da vida dos indivíduos, dando condições de se investigar a influência de exposições precoces sobre a determinação de doenças crônicas que ocorrem na vida adulta.

O Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) da UFPel possui três estudos de coorte de nascimentos: a coorte de 1982, a coorte de 1993 e a coorte de 2004. Nesses estudos todos os nascimentos ocorridos na zona urbana da cidade de Pelotas, nos respectivos anos, foram monitorados. Desde o nascimento, os participantes das coortes têm sido acompanhados em diferentes momentos de suas vidas.

A coorte de 1993 representa um estudo de ciclo vital, onde foram incluídos todos os indivíduos nascidos nos hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1993, num total de 5.304 crianças nascidas vivas (TOMASI *et al.*, 1996).

Os indivíduos foram acompanhados com 1, 3, 6 e 12 meses; 4,11 e 14 anos e, mais recentemente, 17-18 anos. A partir desses estudos de acompanhamento foram obtidas informações clínicas, antropométricas, demográficas, socio-econômicas, comportamentais, entre outras. Desde então, diferentes estudos vem sendo realizados (ALBERNAZ et al., 2000; CHATKIN, et al., 2008; MUIÑO, et al., 2008).

No acompanhamento de 6-7 anos da coorte de 1993, foi encontrada uma prevalência de 12,8% de asma na subamostra de crianças avaliadas naquele momento (CHATKIN; MENEZES, 2005), o que reforça o interesse em investigações nessa área de pesquisa.

Para concluir cabe salientar ainda que, tendo o conhecimento que a asma, acomete uma parcela significativa da população mundial, comprometendo a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos é, portanto, de grande interesse para o meio científico e para a geração de políticas públicas de saúde que se realizem estudos acerca do tema, visando reconhecer precocemente os fatores que põem em risco à saúde humana, a fim de aumentar a qualidade de vida da população, e diminuir o encargo econômico para o indivíduo e para a sociedade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População estudada

Na etapa de acompanhamento da coorte de 1993 realizada em 2008, 4.349 adolescentes compareceram à Central de Medidas no Centro de Pesquisas Epidemiológicas/UFPEL para a realização de entrevistas e de medidas antropométricas, clínicas, de função pulmonar. Destes, 4.110 concordaram em coletar uma amostra de saliva. A partir do número total de indivíduos acompanhados em 2008, foram sorteadas 500 amostras, aleatoriamente usando o programa estatístico SPSS, para a realização do presente estudo.

4.2 Extração de DNA

A saliva foi coletada através do kit comercial Oragene DNA® (DNAGenotek). A extração do material genômico a partir de células da mucosa oral presentes na saliva foi realizada utilizando-se tampão purificador do *kit*, seguida de uma etapa de banho de gelo e centrifugação; após foi realizada a precipitação do DNA com etanol 100%; e eluição final em T.E. (Tris-HCl 1M pH 8,0; e EDTA 0,5M pH 8,0).

A avaliação quantitativa e qualitativa do DNA foi realizada por espectrofotometria, através do equipamento Nanovue (GE Healthcare) utilizando-se 1µL de cada amostra na leitura. A seguir foi preparada uma diluição do DNA de 20 ng/µL para ser utilizada na reação de genotipagem por discriminação alélica. A diluição foi mantida à 4°C e a amostra de DNA total foi armazenada à -20°C,

4.3 Genotipagem

O SNP -589C>T (rs2243250) da região promotora do gene da IL-4 foi analisado pela técnica de discriminação alélica usando sondas pré-desenhadas TaqMan® no equipamento Real Time ABI 7.500 Fast (Applied Biosystems by Life Technologies- Grand Island, USA). Foram analisadas amostras de DNA genômico de 500 adolescentes da coorte de 1993. O ensaio consiste de um par de primers *forward* e *reverse*, os quais flanqueiam o polimorfismo de interesse, e um par de sondas do tipo Minor Groove Binding (MGB), uma marcada com o fluoróforo repórter

FAM® para detectar o alelo T, e a outra marcada com o fluoróforo repórter VIC®, para detectar o alelo C. A atividade 5'nuclease da TaqDNA Polimerase durante a fase de extensão do PCR cliva o repórter da sonda perfeitamente hibridizada, ocorrendo emissão de fluorescência que é detectada pelo equipamento Real Time ABI 7.500 Fast, obtendo-se a genotipagem das amostras.

4.4 Dosagem de IgE

Os dados referentes às dosagens de IgE foram obtidos no banco de variáveis da coorte de 1993. A dosagem de IgE foi realizada em laboratório de análises clínicas pela técnica de quimioluminescência, a partir de amostras de sangue da polpa do dedo coletado e armazenado em papel de filtro Whatman 903® durante o acompanhamento de 2008.

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Stata 11.0. Foram avaliadas a frequência alélica e genotípica do SNP -589C>T. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pelo teste do qui-quadrado, com um grau de liberdade. A análise da associação entre os genótipos e os níveis de IgE foi realizada pelo teste de ANOVA, sendo os valores de IgE transformados em logaritmo uma vez que não foi observada uma distribuição normal. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Foram processadas e analisadas 500 amostras de DNA genômico da população-alvo, as quais foram genotipadas pela técnica de discriminação alélica.

A frequência genotípica observada na população de estudo foi de 56,0% (n= 280) para o genótipo CC, de 36,2% (n=181) para o genótipo CT e de 7,8% (39) para o genótipo TT (Fig. 1).

A distribuição dos genótipos relativos ao SNP -589C>T da região promotora do gene da interleucina-4, na população estudada, encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2= 1,61$), sendo C o alelo de maior frequência (0,74), também dito alelo ancestral e, T o alelo de menor frequência (0,26), ou alelo mutado (Fig. 2).

Foi realizada a análise da frequência genotípica estratificada por sexo na população-alvo (Fig.3). De um total de 249 homens, observou-se que 59,0% (147) apresentaram genótipo CC; 33,0% (82) genótipo CT; e 8,0% (20) genótipo TT. Dentre as mulheres 53,0% (133) apresentaram genótipo CC; 39,4% (99) genótipo CT; e 7,6% (19) genótipo TT, de um total de 251 mulheres. Não foi observada diferença na distribuição entre os sexos (p=0,314).

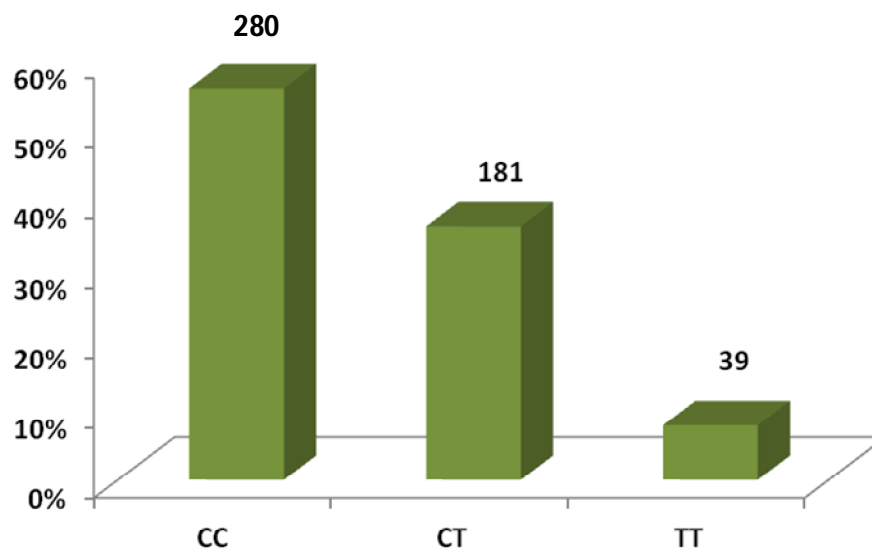


Figura 1: Frequência genotípica do SNP -589 C>T da região promotora do gene da IL-4 em 500 indivíduos da coorte de 1993, Pelotas, Brasil.

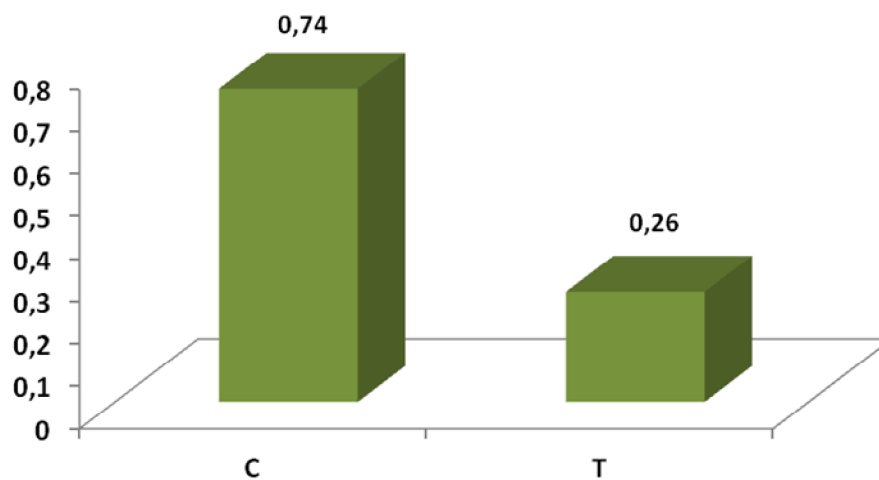


Figura 2: Frequência alélica do SNP -589 C>T da região promotora do gene da IL-4 em 500 indivíduos da coorte de 1993, Pelotas, Brasil.

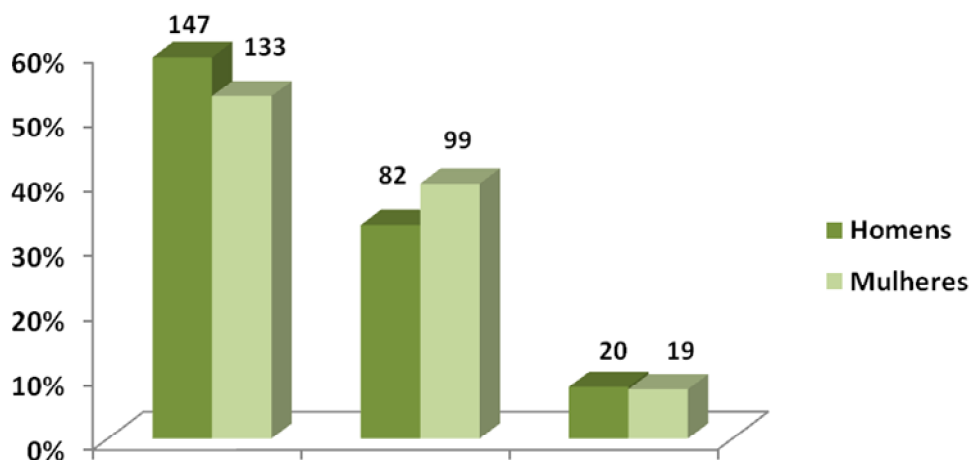


Figura 3: Frequência genotípica do SNP -589 C>T da região promotora do gene da IL- 4 em 249 homens e 251 mulheres da coorte de 1993, Pelotas, Brasil.

Não foi observada associação do SNP -589C>T da região promotora do gene da interleucina-4 com níveis de IgE ($p= 0,479$; Tabela 1). Da mesma forma, na análise estratificada por sexo, não foi observada uma associação entre o polimorfismo e os níveis de IgE. Os dados para homens, $p= 0,962$ e para mulheres $p= 0,150$, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1- Comparação das médias de IgE entre os três genótipos CC, CT e TT do SNP -589 C>T do gene IL-4 em uma subamostra de indivíduos da coorte de 1993, Pelotas, Brasil.

Genotipagem	Média (UI/mL)	Desvio Padrão	P
CC	183,27	343,87	0,479
CT	200,58	331,40	
TT	297,71	520,60	

Tabela 2- Comparação das médias de IgE entre os três genótipos CC, CT e TT do SNP -589 C>T do gene IL-4 entre 249 homens e 251 mulheres da coorte de 1993, Pelotas, Brasil.

Genotipagem				
	CC	CT	TT	P
Homens				
Média de IgE (UI/mL)	238,05	256,01	296,65	0,962
(Desvio Padrão)	(±412,41)	(±395,08)	(±601,74)	
Mulheres				
Média de IgE (UI/mL)	122,73	154,66	299,12	0,150
(Desvio Padrão)	(±234,05)	(±260,78)	(±435,84)	

6 DISCUSSÃO

As frequências alélicas e genotípicas para o SNP -589 C>T da região promotora do gene da IL-4 relatadas no presente estudo contribuíram para inserir dados genéticos de uma amostra da população brasileira no painel mundial de polimorfismos. É sabido que essas frequências mudam de acordo com a origem étnica das populações, sendo que os dados depositados pelo projeto HapMap no banco de SNPs do National Center for Biotechnology Information-USA (NCBI Entrez SNP rs2243250) apontam para uma frequência de C/T igual a 0,86/0,14 em caucasianos descendentes de europeus e de 0,21/0,79 entre africanos subsaarianos. Frente ao conhecimento que a população brasileira é descendente de uma mistura de caucasianos europeus, africanos e ameríndios, e que existe uma variação dessa proporção entre as diferentes regiões do Brasil (PENA et al., 2011), seria interessante investigarmos os marcadores genéticos de ancestralidade na população de estudo a fim de analisarmos a população-alvo estratificada por etnia predominante. Dessa forma, poderia ser melhor definida a contribuição de cada alelo à suscetibilidade à asma.

Foram demonstrados níveis de IgE mais elevados em adolescentes do sexo masculino do que em adolescentes do sexo feminino, confirmando assim dados conhecidos que relatam variação da imunoglobulina com sexo, idade, compleição física, etc. (SPALDING; WALD ;BERND, 2000).

Não foi demonstrada uma associação do SNP -589 C>T com níveis de IgE na população investigada. Esse achado é discordante de estudos que demonstraram associação do polimorfismo com níveis elevados de IgE sérica (SUZUKI et al., 2000), além de associação entre IgE sérica e asma (KABESCH et al., 2003). Apesar de não ter sido encontrada uma associação significativa entre o polimorfismo de interesse e os níveis de IgE, pode ser observado que indivíduos homocigotos para o alelo T apresentam níveis mais elevados da imunoglobulina. Esse dado é corroborado por diferentes estudos que apontam o alelo T como alelo de risco para doenças atópicas como a asma (BARNES et al., 2007; BAYE et al 2011; GUIA; RAMOS, 2010).

Por se tratar de um estudo de base populacional onde se busca avaliar uma doença complexa envolvendo diferentes genes, na qual a contribuição de cada gene corresponde a uma pequena fração de suscetibilidade à doença, sugere-se um tamanho maior de amostra para aumentar o poder estatístico da análise. Essa situação é diferente de estudos de caso-controle, onde se comparam indivíduos atópicos com não atópicos sendo necessário um tamanho amostral menor.

Outro aspecto a discutir diz respeito a dosagem de IgE específica em relação a dosagem de IgE total. Considerando que vários fatores podem contribuir para elevação de IgE sérica, tais como, parasitoses, infecções, tabagismo, entre outros (SPALDING.; WALD ;BERND, 2000; BATTLE et al., 2007), a dosagem de IgE específica poderia ser mais informativa. Entretanto, é descrito que níveis de IgE total são associados à asma independente de níveis de IgE específicos (SUNYE et al., 1996). Além disso, o custo da dosagem seria um fator negativo à execução do estudo. Cabe por fim salientar que dosagens de IgE sérica quando tomadas como dado isolado, não discriminam a presença ou ausência de atopia, pois é difícil definir os valores normais de IgE sérica. Além disso dados de medidas séricas devem sempre ser interpretados em conjunto com dados clínicos do histórico do paciente.

Portanto, pretendemos dar continuidade ao estudo aumentando o tamanho amostral, além de buscar outras variáveis clínicas e ambientais sobre a função pulmonar, disponíveis no banco de dados da coorte de 1993, as quais podem revelar associações entre polimorfismos da IL-4 e asma.

7 CONCLUSÃO

O alelo C do SNP -589C>T da região promotora do gene da IL-4, na subamostra estudada, foi o alelo de maior frequência.

De acordo com a distribuição genotípica do SNP -589C>T da região promotora do gene da IL-4, o genótipo CC foi o de maior frequência, mesmo quando a amostra foi estratificada por sexo.

A distribuição dos genótipos do SNP -589C>T da região promotora do gene da IL-4, na população estudada, encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O SNP -589C>T da região promotora do gene da IL-4 não apresentou associação significativa com níveis de Imunoglobulina-E totais na subamostra da coorte de 1993, Pelotas- Brasil.

REFERÊNCIAS

ALBERNAZ, E. P.; MENEZES, A. M. B.; CÉSAR, J.; VICTORA, C. G.; BARROS, F. C. Hospitalização por bronquiolite aguda como fator de risco para sibilância recorrente. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 4, p. 1049-1057, 2000.

ANDRADE, C. R.; CHATKIN, J. M.; CAMARGOS, P. A. M. Avaliação do grau de controle clínico, espirométrico e da intensidade do processo inflamatório na asma. **Jornal de Pediatria**, v.86, n.2, p.93-100, 2010.

BATTLE, N. C.; CHOUDHRY, S.; TSAI, H. J.; ENG, C.; KUMAR, G.; BECKMAN, K. B.; NAQVI, M.; MEADE, K.; WATSON, G.; LE NOIR, M.; BURCHARD, E. G. Ethnicity-specific Gene–Gene Interaction between IL-13 and IL-4R_α among African Americans with Asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.175, n.1, p.881-887, 2007.

BARNES, K. C.; GRANT, A. V.; HANSEL, N. N.; GAO, P.; DUNSTON, G. M. African Americans with asthma: genetic insights **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.4, n.1, p.58-68, 2007.

BASEHORE, M. J.; HOWARD, T. D.; LANGE, L. A.; MOORE, W. C.; HAWKINS, G. A.; MARSHIK, P. L.; HARKINS, M. S.; MEYERS, D. A.; BLEEKER, E. R. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 1, p. 80-87, 2004.

BAYE, T. M.; KOVACIC, M. B.; MYERS, J. M. M.; MARTIN, L. J.; LINDSEY, M.; PATTERSON, T. L.; HE, H.; ERICKSEN, M. B.; GUPTA, J.; TSORAS, A. M.; LINDSLEY, A.; ROTHENBERG, M. E.; WILLS-KARP, M.; EISSLER, N. T.; BORISH, L.; HERSHEY, G. K. K. Differences in Candidate Gene Association between European Ancestry and African American Asthmatic Children. **Plos One**, v. 6, n. 2, 2011.

BREDA, D.; FREITAS, P. F.; PIZZICHINI, E.; AGOSTINHO, F. R.; PIZZICHINI, M. M. M. Prevalência de sintomas de asma e fatores de risco associados em adolescentes escolares de 13 e 14 anos dos municípios de Tubarão e Capivari de Baixo, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 11, p. 2497-2506, 2009.

BROOKS, Anthony. The essence of SNPs. **Gene** v.234, p.177-186,1999.

BURCHARD, E. G.; SILVERMAN, E. K.; ROSENWASSER, L. J.; BORISH, L.; YANDAVA, C.; PILLARI, A.; WEISS, S. T.; HASDAY, J.; LILLY, C. M.; FORD, J. G.; DRAZEN, J. M. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.160, n.3, p.919-922, 1999.

CHATKIN, M. N.; MENEZES, A. M. B. Prevalência e fatores de risco para asma em escolares de uma coorte no Sul do Brasil. **Jornal de Pediatria**, v.81, n. 5, p. 411-416, 2005.

CHATKIN, M. N.; MENEZES, A. M. B.; MACEDO, S. E. C.; FISS, E. Asma e função pulmonar aos 6-7 anos de idade em uma coorte de nascimentos no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 10, p. 764-771, 2008.

CUSHLEY, M. J.; TATTERSFIELD, A. E. Sudden death in asthma: discussion paper. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 76, n. 7, p. 662-666, 1983.

DAVIES, J. M.; O'HEHIR, R. E. Immunogenetic characteristics of immunoglobulin E in allergic disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v.38, n. 4, p. 566-578, 2008.

DIZIER, M. H.; SANDFORD, A.; WALLEY, A.; PHILIPPI, A.; COOKSON, W.; DEMENAI, F. Indication of linkage of serum IgE levels to the interleukin-4 gene and exclusion of the contribution of the (-590 C to T) interleukin-4 promoter polymorphism to IgE variation. **Genetic Epidemiology**, v. 16, n. 1, p. 84-94, 1999.

FARIA, I. C. J.; FARIA, E. J.; TORO, A. A. D. C.; RIBEIRO, J. D.; BERTUZZO, C. S. Associação dos polimorfismos dos genes TGF- β 1, CD14, IL-4, IL-4R e ADAM33 com a gravidade da asma em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, p. 203-210, 2008.

FENGHAO, X.; SAXON, A.; NGUYEN, A.; KE, Z.; SANCHEZ, D. D.; NEL, A. Interleukin 4 activates a signal transducer and activator of transcription (Stat) protein which interacts with an interferon- γ activation site-like sequence upstream of the I ϵ exon in a human B cell line. **The Journal of Clinical**, v. 96, n. 1, p. 907-914, 1995.

FRANCO, R.; SANTOS, A. C.; NASCIMENTO, H. F.; MACHADO, C. S., PONTE, E.; MACHADO, A. S.; LOUREIRO, S.; BARRETO, M. L.; RODRIGUES, L. C.; CRUZ, A. A. Cost-effectiveness analysis of a state funded programme for control of severe asthma. **Biomed Central Public Health**, v. 7, n. 82, p. 10-18, 2007.

GARCIA, M. I.; DÁVILA, I.; LAFFOND, E.; MORENO, E.; LORENTE, F.; SARMIENTO, R. G. Interleukin-4 (*IL4*) and Interleukin-4 receptor (*IL4RA*) polymorphisms in asthma: a case control study. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 3, n. 15, p. 900-917, 2005.

GUIA, R. M.; RAMOS, J. D. A. The -590C/T/*IL4* single-nucleotide polymorphism as a genetic factor of atopic allergy. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 1, n. 1, p. 67-73, 2010.

HUANG, S. K.; MATHIAS, R. A.; EHRLICH, E.; PLUNKETT, B.; LIU, X.; CUTTING, G. R.; WANG, X. J.; LI, X. D.; TOGIAS, A.; BARNES, K. C.; MALYEAUX, F.; RICH, S.; MELLEEN, B.; LANGE, E.; BEATY, T. H. Evidence for asthma susceptibility genes on chromosome 11 in an African-American population. **The American Journal of Human Genetic**, v. 113, n. 1, p. 71-75, 2003.

KABESCH, M.; TZOTCHEVA, I.; CARR, D.; HOFLEER, C.; WEILAND, S. K.; FRITZSCH, C.; MUTIUS, E. V.; MARTINEZ, F. D. A complete screening of the *IL4* gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 5, p. 893-898, 2003.

KELLY, W. J. W.; HUDSON, I.; RAVEN J. Childhood asthma and adult lung function. **The American review of respiratory disease**, v. 138, n. 1, p. 26-30, 1988.

LI, Y.; ZHONG, L.; WU, B.; XIONG, H. Association between C-589T polymorphisms of interleukin-4 gene promoter and asthma: a meta-analysis. **Respiratory Medicine**, v.102, n. 7, p. 984-992, 2008.

MARSH, D. G.; NEELY, J. D.; BREAZEALE, D. R.; GHOSH, B.; FREIDHOFF, L. R.; EHRLICH, K. E. Linkage analysis of *IL4* and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. **Science**, v. 264, n. 1, p. 1152-1156, 1994.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **Jornal de Pediatria**, v.75, n.5, p.334-344, 1999.

MOURA, J. A. R.; CAMARGOS, P. A. M.; BLIC, J. Tratamento profilático da asma. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.2, p.141-150, 1992.

MUIÑO, A.; MENEZES, A. M. B.; REICHERT, F. F.; DUQUIA, R. P.; CHATKIN, M. Padrões de sibilância respiratória do nascimento até o início da adolescência: coorte de Pelotas (RS) Brasil, 1993-2004. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 6, p. 347-355, 2008.

NCBI- National Center for Biotechnology Information. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs2243250> >. Acesso em: 03 de dezembro de 2011.

NOGUCHI, E.; SHIBASAKI, M.; ARINAMI, T.; TAKEDA, K.; YOKOUCHI, Y.; KAWASHIMA, T.; YANAGI, H.; MATSUI, A.; HAMAGUCHI, H. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 28, n.4, p. 449-453, 1998.

NUNES, I. C. C.; SOLÉ, D.; NASPITZ, C. K. Fatores de risco e evolução clínica da asma em crianças. **Jornal de Pediatria**, v.73, n.3, p.151-160, 1997.

PATE, M. B.; SMITH, J. K.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Regulation and dysregulation of immunoglobulin E: a molecular and clinical perspective. **Clinical and Molecular Allergy**, v.8, n.3, p.151-160, 2010.

PENA, S. D. J.; DI PIETRO, G.; MORAES, M. F.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY, F. S. G.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNOS, A. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. R.; OJOPI, E. B.; PERINI, J. A.; RACCIOPI, C.; SANTOS, A. K. C. R.; SANTOS, F. R.; SILVA, M. A. R.; SORTICA, V. A.; KURTZ, G. S. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **Plos One**, v.6, n.2, 2011.

PONTE, E. V.; PETRONI, J.; RAMOS, D. C. B.; PIMENTEL, L.; FREITAS D. N.; CRUZ, A. A percepção do controle dos sintomas em pacientes asmáticos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.33, n. 6, p. 635–640, 2007.

ROSENWASSER, L. J.; KLEMM, D. J.; DRESBACK, J. K.; INAMURA, H.; MASCALI, J. J.; KLINNERT, M. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 25, n.2, p. 74-78, 1995.

SANTOS, T. Q.; VIJAYAPRAKASH, S.; SHIRLEY, H.; CAETANO, R.; LEON, S. A.; VANDENBROECK, K. Study of polymorphisms in the interleukin-a and IL-4 receptor

genes in a population of Brazilian patients with multiple sclerosis. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 65, n. 1, p. 15-19, 2007.

SPALDING, S. M.; WALD, V.; BERND, L. A. IgE sérica total em atópicos e não-atópicos na cidade de Porto Alegre. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 93-97, 2000.

STEINKE, J. W.; BORISH, L. Th2 cytokines and asthma interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. **Respiratory Research**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2001.

SUNYER, J.; ANTÓ, JM; CASTELLSAGUÉ J; ET AL. Total serum IgE is associated with asthma independently of specific IgE levels. **European Respiratory Journal**, v.9, p.1880-1884, 1996.

SUZUKI, I.; HIZAWA, N.; YAMAGUCHI, E.; KAWAKAMI, Y. Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 30, n.2, p. 1746-1749, 2000.

TOMASI, E.; BARROS, C. F.; VICTORA, C. G. As mães e suas gestações: comparação de duas coortes de base populacional no Sul do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 12, n. 1, p.21-25, 1996.

WALLEY, A.J.; COOKSON, W. O. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. **Journal of Medical Genetics**, v.33, n. 8, p. 689-692, 1996.

WEISS, S. T.; RABY, B. A.; ROGERS, A. Asthma genetics and genomics 2009. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 19, n.3, p. 279-822, 2009.

WHO – World Health Organization. Disponível em:
<<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>. Acesso em: 02 de agosto de 2011.

XU, J.; DIRKJE, S. P.; HOWARD, T. D.; KOPPELMAN, G. H.; ZHENG, S. L.; STINE, O. C.; BLEECKER, E. R.; MEYERS, D. A. Major Genes Regulating Total Serum Immunoglobulin E Levels in Families with Asthma. **The American Journal of Human Genetic**, v. 67, n. 1, p. 1163-1173, 2000.

ZHU, S.; CHAN-YEUNG, M.; BECKER, A. B.; WARD-DIMICH, H.; FERGUSON, A. C.; MANFREDA, J.; WATSON, W. T. A.; PARÉ, P. D.; SANDFORD, A. J.

Polymorphisms of the IL-4, TNF- α , and Fc ϵ RI β Genes and the Risk of Allergic Disorders in At-risk Infants. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n.1, p. 1655-1659, 2000.

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

W134e Wagner, Mônica Silveira

Estudo da associação do polimorfismo -589 C>T do gene da IL-4 com níveis de IgE em uma sub-amostra de adolescentes da coorte de 1993, Pelotas-Brasil : um enfoque pontual para o estudo da asma / Mônica Silveira Wagner. – 34. ; gráf. – Monografia (Conclusão de curso). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2011. – Orientador Isabel Oliveira de Oliveira.

1.Biologia. 2.Imunoglobulina E. 3.Marcador genético. 4.SNP. 5.Doenças genéticas complexas. I.Oliveira, Isabel Oliveira de. II.Título.