

# MUTAÇÕES DO GENE DO RECEPTOR DE VITAMINA D E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CRIANÇAS COM ASMA

Vitamin D receptor gene mutations and vitamin D serum levels in asthmatic children

Hevertton Luiz Bozzo Silva Santos<sup>a</sup>, Silvia de Souza e Silva<sup>b</sup>, Estela de Paula<sup>b</sup>, Lilian Pereira-Ferrari<sup>c</sup>, Liya Mikami<sup>c</sup>, Carlos Antônio Riedi<sup>a</sup>, Herberto José Chong-Neto<sup>a,\*</sup>, Nelson Augusto Rosário<sup>a</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Verificar a relação dos polimorfismos do gene do receptor de vitamina D (RVD) com sinais clínicos e níveis de vitamina D (VD) em asmáticos.

**Métodos:** Estudo transversal com 77 crianças de 7 a 14 anos de um ambulatório especializado, divididas em 3 grupos: asmáticos, em uso de corticoide inalatório (ICS) por mais de um ano; asmáticos sem necessidade de ICS; não asmáticos e não alérgicos (de acordo com o *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* – ISAAC). Foram avaliados: espirometria, testes alérgicos, presença do polimorfismo CDX2 do promotor do RVD por reação em cadeia da polimerase (PCR) e genotipagem de polimorfismos dos éxons 2 e 3 por PCR-SSCA (*single-strand conformational analysis*), imunoglobulina E (IgE) total e IgE específica para ácaros e gramíneas nos três grupos estudados. Níveis de 25-hidroxivitamina D foram dosados nos asmáticos.

**Resultados:** A média de idade foi 10,8±2,2 anos, 57% masculinos, 38 asmáticos com ICS, 22 sem ICS e 17 não asmáticos. Rinite alérgica esteve presente em 90% dos asmáticos, polimorfismo CDX2 em 23% dos asmáticos e ausente nos controles (p=0,03). Menores níveis de volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>,%) foram observados nos asmáticos homocigotos para CDX2 (p=0,001). Variações nas sequências dos éxons 2 e 3 não foram relacionadas com a asma ou demais testes. Deficiência ou insuficiência de VD foi diagnosticada em 98% dos asmáticos. Não houve associação entre níveis de VD e polimorfismos genéticos dos éxons 2 e 3.

## ABSTRACT

**Objective:** To verify the relationship between polymorphisms of the vitamin D receptor gene (VDR), clinical findings, and serum vitamin D (VD) levels in asthmatics.

**Methods:** A cross sectional study of 77 children aged 7 to 14 years old, who were attended at a specialized clinic. The children were divided into 3 groups: asthmatics who had been using inhaled corticosteroids (ICS) for more than one year; asthmatics who had not been using ICS; non-asthmatics, and children without allergies (according to the *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* – ISAAC). Spirometry, skin prick tests, the presence of a VDR promoter CDX2 polymorphism from an allele-specific polymerase chain reaction (PCR), exons 2 and 3 polymorphisms genotyping by PCR-SSCA (*single-strand conformational analysis*), total immunoglobulin E (IgE) and specific IgE to mites and grass were evaluated in these three groups. Levels of 25-hydroxyvitamin D were determined in asthmatics only.

**Results:** The mean age of the children was 10.8±2.0 years old, 57% were male, 38 were asthmatic and using ICS, 22 were asthmatic and not using ICS, and 17 were non-asthmatic. Allergic rhinitis was present in 90% of asthmatics. Homozygous CDX2 was detected in 23% of the patients and absent in the control group (p=0.03). Lower forced expiratory volume in 1 second (FEV<sub>1</sub>,%) values were observed in CDX2 homozygous asthmatics (p=0.001). Variations in the exon 2 and 3 sequences were not related to asthma or the other tests. VD deficiency or insufficiency was detected in 98% of asthmatics. There was no association between VD levels and genetic polymorphisms from exons 2 and 3.

\*Autor correspondente. E-mail: [h.chong@uol.com.br](mailto:h.chong@uol.com.br) (H.J. Chong-Neto).

<sup>a</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>b</sup>Faculdades Integradas do Brasil, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>c</sup>Centro Universitário Autônomo do Brasil, Curitiba, PR, Brasil.

Recebido em 12 de abril de 2017; aprovado em 22 de setembro de 2017; disponível on-line em 10 de julho de 2018.

**Conclusões:** Observou-se associação positiva entre polimorfismo CDX2 em homozigose com asma e menores valores de VEF<sub>1</sub>%. O CDX2 pode modificar a interação celular do RVD com a vitamina, bem como pode estar associado com a asma e com a dificuldade de controle da doença.

**Palavras-chave:** Asma; Vitamina D; Polimorfismo genético; Fator de transcrição CDX2; Pediatria.

**Conclusions:** There was a positive association between homozygous CDX2 polymorphism, asthma and lower FEV<sub>1</sub>% values. CDX2 is capable of modifying cell interaction between VDR and VD, and it could be associated with the prevalence of asthma, and the difficulty in controlling the disease.

**Keywords:** Asthma; Vitamin D; Genetic polymorphism; CDX2 transcription factor; Pediatrics.

## INTRODUÇÃO

Asma é a doença crônica mais comum na infância.<sup>1</sup> Resulta da interação de fatores genéticos, exposição ambiental e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e à manutenção dos sintomas.

A deficiência de vitamina D (VD) está relacionada à maior incidência de asma e outras doenças alérgicas.<sup>2-4</sup> O aporte dietético responde por uma pequena parte do requerimento diário de VD. Conforme a população torna-se mais próspera e ocidentalizada, passa mais tempo em ambientes fechados, com menor exposição à luz solar, utiliza protetor solar e, assim, aumenta a prevalência de hipovitaminose D.

A deficiência perinatal de VD é capaz de afetar o desenvolvimento dos pulmões e do sistema imunológico fetal, podendo ser exacerbada por deficiência de VD pós-natal.<sup>5</sup> Baixos níveis de VD foram associados à maior frequência de asma,<sup>6</sup> particularmente em meninos,<sup>7</sup> exacerbações de asma e maior gravidade das crises,<sup>2</sup> maior gravidade da dermatite atópica<sup>8</sup> e maior frequência de anafilaxia.<sup>9</sup> No entanto, a exata relação da VD com as doenças alérgicas permanece desconhecida. Embora a suplementação de VD possa reduzir o risco de crises em asmáticos,<sup>10</sup> atualmente não se pode recomendar o uso de VD na prevenção e no tratamento de doenças alérgicas.<sup>11,12</sup>

Para exercer sua função, a VD requer que seu receptor seja produzido e que funcione corretamente. O receptor da vitamina D (RVD) é uma proteína nuclear, composta por 437 aminoácidos, codificada pelo gene *RVD* localizado no cromossomo 12. O *RVD* é composto por 11 éxons e se estende por 75 kb.<sup>13</sup> Nesse gene foram identificados mais de 900 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), incluindo regiões codificantes e não codificantes. A maioria desses concentra-se nos éxons 2 e 3, responsáveis por codificar o domínio de ligação ao DNA. Alterações nesses dois éxons modificam o dedo de zinco que faz ligação com o DNA, gerando uma deformação no receptor, o que impede a ligação da vitamina.<sup>14</sup> Alterações na região 5' do promotor do gene *RVD* podem alterar padrões de expressão e níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), enquanto variações na região 3' (UTR) podem afetar a estabilidade do

mRNA e a eficiência da tradução de proteínas.<sup>15</sup> O polimorfismo CDX2 deriva da substituição de uma adenina (A) por uma guanina (G), na porção 1e da região promotora do gene *RVD* na posição 4913, alterando os níveis de transcrição de *RVD* e a atividade global da transcrição do receptor nuclear, que é responsável por modular genes envolvidos na inflamação, imunorregulação e remodelação das vias aéreas.<sup>16</sup>

Camundongos *knock-out* para o *RVD* têm níveis elevados de interleucina (IL) 13 e imunoglobulina E (IgE).<sup>17</sup> Mutações no gene *RVD* já foram associadas ao câncer colorretal, à puberdade precoce, à dermatite atópica e a outras doenças alérgicas em certas populações.<sup>18</sup> Alterações nesse gene modificam o mecanismo de ação, impedindo ou dificultando a atividade da VD, mesmo em indivíduos com níveis normais dessa vitamina.

Os objetivos deste estudo são: identificar a frequência dos polimorfismos CDX2 da região promotora e de polimorfismos dos éxons 2 e 3 do gene do *RVD* em uma amostra de pacientes asmáticos, bem como determinar se existe relação desses com o diagnóstico de asma, com os níveis séricos de VD e cálcio e com a necessidade de corticosteroides.

## MÉTODO

O delineamento deste estudo foi observacional, analítico e de corte transversal, em que participaram indivíduos de 7 a 14 anos, sendo uma amostra de conveniência recrutada no dia da consulta em ambulatório especializado. Foram constituídos dois grupos: indivíduos com diagnóstico de asma persistente de acordo com a *Global Initiative for Asthma* (GINA 2010), em uso de corticoide inalatório (ICS)  $\geq 400$  mcg/dia de beclometasona ou o equivalente por período superior a 1 ano e indivíduos com asma intermitente, sem necessidade de ICS. Um terceiro grupo, com participantes sem história de asma e/ou atopia, considerados não asmáticos e não atópicos, pareados por idade com os asmáticos, selecionados aleatoriamente de acordo com sua chegada no dia da coleta de exames solicitados por outros ambulatórios do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), foi designado para servir de

grupo de comparação para a presença de polimorfismos do gene *RVD* em não asmáticos. Foram excluídos indivíduos com diagnóstico clínico de doenças crônicas associadas, assim como não asmáticos que responderam afirmativamente a alguma pergunta do questionário *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC).

Dados clínicos dos asmáticos foram obtidos dos prontuários padronizados. Os resultados de espirometria [porcentagem do predito do volume expiratório forçado no primeiro segundo (% VEF<sub>1</sub>)] foram obtidos por espirômetro Koko® (NSPIRE Health, Longmont, CO, USA), com valores espirométricos de referência de Polgar e Promadhat<sup>19</sup> e testes cutâneos alérgicos por puntura para *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Blomia tropicalis* (BT) e *Lolium perene* (LP) realizados com extratos IPI-ASAC do Brasil® (São Paulo, Brasil) foram registrados.

Níveis de IgE total e IgE específica para DP, BT, e LP foram obtidos de todos os indivíduos. Para fins estatísticos, os valores de IgE total superiores a 5.000 unidades internacionais por mL (UI/mL) foram considerados em ordem crescente como 5.001, 5.002, 5.003 etc. UI/mL; e valores de IgE específica acima de 100 KU/L, da mesma maneira, foram considerados em ordem crescente para 101, 102, 103 etc. KU/L.

Níveis de 25-hidroxivitamina D [25(OH)VD], cortisol matinal, paratormônio (PTH), cálcio, fósforo e fosfatase alcalina foram determinados nos asmáticos. Os valores de referência para VD foram: níveis <30 ng/mL=insuficiência; níveis <15 ng/mL=deficiência; níveis ≥30 ng/mL=normal.<sup>20,21</sup>

Para avaliar a região promotora do gene *RVD*, utilizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR)-alelo específica, com os seguintes iniciadores: A-for 5'TCCTGAGTAAACTAGGTCACAA3', A-rev 5'ACGTTAAGTTCAGAAAGATTAATTC3', G-for 5'AGGATAGAGAAAATAATAGAAAACATT3' e G-rev 5'AACCCATAATAAGAAATAAGTTTTTAC3'.

As reações foram realizadas com volume final de 20 mL, contendo 18 mL de PCR supermix (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), 150 ng de DNA, 16,4 pM do iniciador A-for, 20,3 pM do iniciador A-ver, 18,8 pM do iniciador G-for e 18,7 pM do iniciador G-ver. As PCRs foram realizadas em termociclador e os ciclos de amplificação foram os mesmos para cada par de iniciadores, utilizando-se a seguinte programação:

1. 94°C por 5 minutos;
2. 94°C por 45 segundos;
3. 56°C por 45 segundos;
4. 72°C por 45 segundos; repetir por 28 vezes do passo 2 ao 4;
5. 72°C por 5 minutos.

O conjunto de iniciadores G-for e G-rev amplificam especificamente o alelo G, gerando um fragmento de 110 pb, A-for

e A-rev amplificam especificamente o alelo A com um tamanho de 235 pb e os iniciadores G-for e A-rev amplificam o fragmento de controle interno com um tamanho de 297 pb.<sup>22</sup> Os fragmentos foram separados por tamanho em eletroforese em gel de agarose 2,5% a 125 V por 1 h. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo e revelada em transluminador ultravioleta.

Para a avaliação de polimorfismos nos éxons 2 e 3, utilizou-se PCR-SSCA (*single-strand conformational analysis*). Para o éxon 2, os iniciadores utilizados foram 2a sense (5'AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT3') e 2a antisense (5'ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC3') e para o éxon 3, os iniciadores 3a sense (5'AGGGTGAAGGAGCCGGAAGTTCAGTGAC3') e 3a antisense (5'CTTTCCCTGACTCCACTTCAGGCCCAA3').

A reação de PCR, para cada éxon, foi de 20 mL, contendo 18 mL de PCR Supermix (Invitrogen), 150 ng de DNA e 18 pM de cada iniciador. A reação de PCR para o éxon 2 foi realizada por 35 ciclos de *touchdown* iniciando com temperatura de anelamento em 60°C e finalizando em 50°C. Para o éxon 3, foram utilizados 35 ciclos de amplificação, descritos a seguir: 94°C por 1 minuto; 48°C por 1 minuto; e 72°C por 1 minuto.

As amostras, após reação de amplificação, geraram, para o éxon 2, um fragmento de 267 pb e, para o éxon 3, um fragmento de 220 pb. Após a PCR, o produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, e a corrida foi realizada a 250 V por 2 horas e 30 minutos. A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata.<sup>23</sup>

As características clínicas, a frequência de polimorfismos dos genes do *RVD* de acordo com a presença de asma e o diagnóstico de asma de acordo com o genótipo foram apresentados em distribuição de frequência e proporções e, para sua comparação, foi utilizado o teste exato de Fisher. Dosagens de IgE específica e total foram apresentadas em mediana e, para comparação entre os grupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Os dados obtidos foram armazenados no Microsoft Excel® (Microsoft™ Redmond, USA) e processados com o *software* Action® (Estatcamp®, São Carlos, Brasil). Relações univariadas entre níveis séricos de 25(OH)VD e características demográficas dos pacientes foram determinadas usando o coeficiente de correlação de Pearson, sendo significantes p-valores ≤0,05.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR e o termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os pais.

## RESULTADOS

Foram avaliados os genótipos de 77 indivíduos: 38 asmáticos em uso de ICS; 22 asmáticos sem ICS; e 17 não alérgicos.

Quarenta e quatro (57%) pacientes eram do sexo masculino e média de idade foi  $10,8 \pm 2,2$  anos. O índice de massa corpórea (IMC) médio entre meninos foi de  $18,2 \pm 3,0$  kg/m<sup>2</sup> e, entre meninas, foi de  $18,6 \pm 3,5$  kg/m<sup>2</sup>.

Quando avaliados individualmente, os grupos de asmáticos em uso de ICS, asmáticos sem uso de ICS e não asmáticos foram semelhantes em história pessoal e familiar de atopia. Testes de função pulmonar foram realizados em 50 asmáticos. Não houve diferenças nas características clínicas entre os asmáticos (Tabela 1).

Quase 98% dos indivíduos testados estavam com níveis inadequados de VD e não houve diferença entre os grupos de asmáticos com ou sem ICS.

Os níveis de IgE total e específicas para DP, BT, LP foram superiores nos grupos de asmáticos com ou sem corticoides, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Os valores das medianas de IgE total e específicas foram verificados a partir da distribuição dos pacientes nos três grupos, de acordo com o genótipo na região promotora (Tabela 2).

Não houve correlação significativa entre níveis séricos de VD e outros exames laboratoriais realizados nos 60 asmáticos. Também não houve correlação significativa entre os níveis séricos de VD, os valores de VEF<sub>1</sub>% e o número de alérgenos positivos obtidos pelo teste cutâneo alérgico (realizados respectivamente em 47 e 60 dos asmáticos). O teste de correlação de Pearson foi aplicado às variáveis com distribuição normal (cálcio, fósforo, cortisol, paratormônio, fosfatase alcalina, IgE específica para DP, BT, LP e total) e não mostrou significância em nenhum caso.

**Tabela 1** Características clínicas do grupo de asmáticos.

	Sem ICS (n=22) n (%)	Com ICS (n=38) n (%)	p-valor
Rinite	20 (90,9)	37 (97,4)	0,54
Conjuntivite	15 (68,2)	22 (57,9)	0,58
Dermatite atópica	3 (13,6)	5 (13,2)	1,00
Outras alergias	2 (9,1)	2 (5,3)	0,61
História familiar de asma	16 (72,7)	27 (71,1)	1,00
História de tabagismo	9 (40,9)	11 (28,9)	0,40
Internações	4 (18,2)	17 (44,7)	0,05
TCA	22 (100)	36 (94,7)	0,52
DVO	3/19 (15,8)	7/31 (22,6)	0,72
PBD +	4/19 (21,1)	11/31 (35,5)	0,35
VEF <sub>1</sub> % (mediana)	102	98	0,87
Anos de doença (média±DP)	9,1±2,2	8,7±2,5	0,54

ICS: uso de corticoide inalatório; TCA: teste cutâneo alérgico; DVO: distúrbio ventilatório obstrutivo; PBD: prova broncodilatadora; VEF<sub>1</sub>%: volume expiratório forçado no primeiro segundo; DP: desvio padrão.

Para a análise do gene *RVD*, três genótipos da região promotora foram avaliados nos 77 indivíduos. O polimorfismo *CDX2* esteve presente em 71,4% da população avaliada (71,6% dos asmáticos e 70,5% dos não asmáticos). Os dados apontam uma tendência ( $p=0,06$ ) à associação entre genótipo da região do promotor e o diagnóstico de asma (Tabela 3). Ainda na Tabela 3, observa-se a presença de mutações do éxon 3 em 7 dos 69 indivíduos testados. Não foi observada associação entre a presença da mutação e o diagnóstico de asma. Não foram identificados indivíduos com variações genéticas no éxon 2.

A fim de melhor avaliar a associação entre a presença do polimorfismo *CDX2* e o diagnóstico de asma, os indivíduos foram comparados da seguinte forma: grupo de homocigotos para o alelo A (AA) versus grupo Gx [homocigotos para o alelo G (GG) e heterocigotos (GA)]. Posteriormente, comparou-se o grupo GG versus grupo Ax, composto por AA e AG.

**Tabela 2** Mediana dos valores de imunoglobulina E (kU/L) de acordo com o genótipo da região promotora do gene.

IgE	GG	GA	AA	p-valor*
DP	44,7	33,2	101,0	0,01
BT	16,5	3,2	27,3	0,08
LP	0,3	0,1	0,6	0,06
Total	775,0	498,0	1108,5	0,06

IgE: imunoglobulina E sérica total (kU/L); GG: homocigotos para alelo G; GA: heterocigotos para alelo G e A; AA: homocigotos para o alelo A. DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*; BT: *Blomia tropicalis*; LP: *Lolium perenne*; \*teste de Kruskal-Wallis.

Dessa análise, 46 asmáticos e 17 controles apresentaram o genótipo Gx, enquanto 14 asmáticos e nenhum controle apresentaram o genótipo AA. A análise da tabela de contingência mostra associação entre a homozigose para o alelo A e o diagnóstico de asma ( $p=0,03$ ) (Tabela 4). A avaliação de indivíduos com genótipos Ax *versus* GG não mostrou associação com o diagnóstico de asma ( $p=1,00$ ). Também não foi observada associação entre a corticoterapia inalatória e os polimorfismos estudados.

Os asmáticos foram divididos de acordo com a presença de mutações apresentadas para o éxon 3 em 2 grupos (genótipo usual e genótipo variante). Quanto à região promotora, foram divididos em três grupos, de acordo com o genótipo (GG, GA e AA). Não houve diferença significativa entre os grupos para os níveis de VD, cálcio, fósforo, PTH, cortisol e número de testes alérgicos positivos. Notou-se diferença significativa ( $p=0,004$ ) para a média dos percentuais dos preditos de VEF<sub>1</sub> entre os asmáticos, quando agrupados de acordo com os genótipos da região do promotor (GG: 98,2%; GA: 102,5% e AA: 79,5%). Quando comparadas as médias de VEF<sub>1</sub> dos grupos Gx (100,8%) *versus* AA (79,4%), observou-se diferença significativa ( $p=0,001$ ). Tal relação não foi observada na análise Ax (96,0%) *versus* GG (98,2%) ( $p=0,71$ ).

## DISCUSSÃO

A ocorrência de hipovitaminose D vem sendo relatada amplamente, tanto entre indivíduos saudáveis quanto em alérgicos.<sup>24</sup> A explicação possível para os baixos níveis séricos de VD encontrados nos estudos pode ser a inadequação dos valores de referência utilizados.<sup>20</sup> Inicialmente, a determinação dos valores de referência foi baseada em indivíduos considerados saudáveis e que tinham pouca exposição solar. Esse método é pouco acurado, visto que os níveis de VD estão relacionados com exposição solar, dieta, latitude de residência, cor da pele, estilo de vida e idade.<sup>4</sup> Como os níveis de VD são dependentes de múltiplas variáveis, há necessidade de se estabelecer valores de referência

para diferentes populações. Já o nível sérico de VD que se associa à incidência de doenças foi estabelecido em 30 ng/dL.<sup>20,21</sup>

Na amostra avaliada, o polimorfismo da região promotora, 4913G>A, conhecido como CDX2, foi frequente na população testada (71,4%) e se associou positivamente com o diagnóstico de asma, quando em homozigose. Nos heterozigotos para qualquer mutação, incluindo a mutação CDX2, pode ocorrer a expressão de duas proteínas diferentes. Entretanto, a influência da alteração estrutural da proteína variante na expressão do fenótipo (suficiente para causar consequências clínicas) determina o padrão de dominância.<sup>25</sup> Nesse caso, como nos heterozigotos, em que 50% da proteína é expressa normalmente, pode-se inferir que, na asma, o alelo G tem padrão dominante, estando associado à menor prevalência da doença.

Além de estar associada à maior prevalência de asma, a presença do alelo A também mostrou relação com valores mais baixos de VEF<sub>1</sub> observados entre os asmáticos. Embora piores valores de função pulmonar tenham sido associados à maior gravidade da doença, a presença da mutação CDX2 não determinou, nesse grupo, maior gravidade da doença, estando similarmente distribuída tanto entre asmáticos em tratamento com corticoide inalatório (asma persistente) quanto entre aqueles que não necessitam de tratamento (asma intermitente).

Variações genéticas do éxon 3 foram pouco frequentes na população estudada e não exerceram influência no diagnóstico, no tratamento ou, ainda, nos parâmetros laboratoriais avaliados.

**Tabela 4** Número de indivíduos com diagnóstico de asma de acordo com o genótipo.

Genótipo	Asma (n=60) n (%)	Controles (n=17) n (%)	p-valor*
AA	14 (23,3)	0 (0)	0,03
Gx	46 (76,6)	17 (100)	

AA: homozigoto para o alelo A; Gx: homozigotos para o alelo G (GG) e heterozigotos (GA); \*teste exato de Fisher.

**Tabela 3** Frequência de polimorfismos dos genes do receptor de vitamina D de acordo com a presença de asma.

Região	Genótipo	Asma		Controle		p-valor*
		n	%	n	%	
Promotor	GG	17/60	28,3	5/17	29,4	0,06
	GA	29/60	48,3	12/17	70,6	
	AA	14/60	23,3	0	0	
Éxon 2	Usual	51/51	100	14/14	100	0,18
Éxon 3	Variante	7/52	13,5	0	0	
	Usual	45/52	86,5	17/17	100	

GG: homozigotos para alelo G; GA: heterozigotos para alelo G e A; AA: homozigotos para o alelo A; \*teste exato de Fisher.

Apesar de associado ao diagnóstico de asma, o polimorfismo CDX2 mostrou efeito protetor em outros estudos. Foi relacionado à maior taxa de transcrição do promotor e, por consequência, possível incremento na absorção intestinal de cálcio.<sup>26</sup> Também foi associado a menor risco de fraturas, de osteoporose e maior densidade óssea.<sup>27</sup>

Outros polimorfismos vêm sendo estudados e, de fato, estão associados à maior frequência de asma e outras doenças alérgicas em estudos populacionais. Entretanto, permanece incerta a influência desses polimorfismos sobre o funcionamento do RVD e sobre o funcionamento de outros genes.<sup>28</sup> Ainda não está claro como essas mutações se relacionam com asma e as demais alergias.

Deficiência ou insuficiência de VD foi verificada em 98% dos indivíduos avaliados. Não houve relação entre os níveis de VD com nenhum dos polimorfismos estudados; da mesma forma, não se observou relação entre valores da VD com o uso ou não de ICS. Não houve correlação entre os valores de VD e de VEF<sub>1</sub>, discordando da literatura, que mostrou associação inversa entre níveis de VD e valores de VEF<sub>1</sub>.<sup>29</sup>

Níveis séricos mais baixos de VD foram relacionados à maior frequência de doença alérgica ou asma. Ainda que se utilizem como artifício nesse grupo, valores de referência menos rigorosos, que consideram suficientes valores superiores a 20 ng/dL,<sup>30</sup> mais de três quartos dos sujeitos avaliados não atingiram valores adequados da vitamina.

O achado de níveis séricos baixos de cortisol ocorreu em 17 (20%) asmáticos, entretanto, a frequência foi similar entre os tratados com ICS. Assim, não é possível afirmar que tais níveis se devam ao uso do medicamento. Provavelmente, a utilização de corticoide tópico nasal para o controle da rinite (presente em aproximadamente 90% desse grupo) esteja relacionada com tal resultado. Outra hipótese é a prescrição de corticoide para tratamento de doenças agudas ou crises, que pode ter ocorrido em outros centros e, dessa forma, não está registrada no prontuário e pode ter sido omitida, esquecida ou, ainda, ser desconhecida pelos entrevistados.

Apesar de não serem apresentados os resultados, alterações dos níveis de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e PTH foram pouco frequentes e ocorreram de forma semelhante entre os asmáticos, sem significância estatística.

Níveis séricos de IgE estão inversamente associados aos níveis séricos de VD.<sup>31</sup> No entanto, não se evidencia uma relação linear entre níveis séricos de IgE e 25(OH)VD.<sup>32</sup> Na vigência de baixos níveis de VD, a sensibilização aos alérgenos domiciliares como ácaros da poeira é frequente em crianças asmáticas.<sup>6</sup> A exposição natural aos alérgenos leva ao incremento da reação inflamatória e ao aumento da responsividade brônquica, bem como à elevação da contagem de eosinófilos no lavado

bronco-alveolar, da mesma forma que a hipovitaminose D.<sup>29</sup> Embora a VD se relacione com a asma de forma similar à IgE, faltam estudos experimentais que demonstrem como ocorre realmente essa interação.

Este estudo forneceu informações sobre a associação entre polimorfismo CDX2, da região promotora do gene do receptor de VD com o diagnóstico de asma, e com menores valores de VEF<sub>1</sub>. No entanto, existem algumas limitações a serem consideradas. Entre elas, destacam-se a utilização de uma amostra de conveniência e o possível uso não declarado de corticoide no grupo de asmáticos sem prescrição de ICS para controle da doença. Outra limitação está no grupo de comparação, que foi selecionado para servir de controle apenas para as mutações. Sugere-se, assim, a realização de um estudo de intervenção com asmáticos com o intuito de demonstrar se existe diminuição da necessidade de corticoide para o controle da doença após a suplementação de VD.

Uma vez que a hipovitaminose D vem sendo relacionada à maior frequência de asma e outras doenças alérgicas, pode haver envolvimento do receptor dessa vitamina no mecanismo da doença. Assim como o CDX2, é possível que outros polimorfismos ou mutações no gene do receptor de VD, capazes de modificar a interação celular com a vitamina, estejam associados com a prevalência de asma e, talvez, com a dificuldade de controle da doença.

Conclui-se que a presença do polimorfismo CDX2 foi frequente (71,4%). Os polimorfismos não especificados dos éxons 2 e 3 ocorreram discretamente (7 e 2%, respectivamente). O polimorfismo CDX2 esteve associado ao diagnóstico de asma, bem como com resultados inferiores de VEF<sub>1</sub>% na espirometria. Não houve correlação entre os níveis de VD e os polimorfismos estudados, assim como não houve correlação entre os níveis séricos de cálcio com esses polimorfismos. Não se observou associação significativa entre corticoterapia inalatória para o controle da asma e os polimorfismos estudados.

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Mônica Nunes Lima, pela contribuição nas análises estatísticas, e ao Dr. Marco Antônio Largura, Dr. Álvaro Largura e Alisson Aparecido Pereira Trespach, pelo suporte laboratorial.

## Financiamento

O estudo não recebeu financiamento.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. *J Bras Pneumol*. 2012;38(Supl 1):S1-46.
2. Camargo CA, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:788-95.
3. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, Mcneill G, Martindale S, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy and childhood wheezing. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:853-9.
4. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.
5. Sandhu MS, Casale TB. The role of vitamin D in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105:191-9.
6. Wawro N, Heinrich J, Thiering E, Kratzsch J, Schaaf B, Hoffmann B, et al. Serum 25(OH)D concentrations and atopic diseases at age 10: results from the GINIplus and LISAplus birth cohort studies. *BMC Pediatr*. 2014;14:286.
7. Hollams EM, Hart PH, Holt BJ, Serralha M, Parsons F, Klerk NH, et al. Vitamin D and atopy and asthma phenotypes in children: a longitudinal cohort study. *Eur Respir J*. 2011;38:1320-7.
8. Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *Br J Dermatol*. 2011;164:1078-82.
9. Camargo CA, Clark S, Kaplan MS, Lieberman P, Wood RA. Regional differences in EpiPen prescriptions in the United States: the potential role of vitamin D. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:131-6.
10. Majak P, Olszowiec-Chlebna M, Smejda K, Stelmach I. Vitamin D supplementation in children may prevent asthma exacerbation triggered by acute respiratory infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:1294-6.
11. Giustina AD, Landi M, Bellini F, Bosoni M, Ferrante G, Onorari M, et al. Vitamin D, allergies and asthma: focus on pediatric patients. *World Allergy Organ J*. 2014;7:27.
12. Castro M, King TS, Kunselman SJ, Cabana MD, Denlinger L, Holguin F, et al. Effect of vitamin D3 on asthma treatment failures in adults with symptomatic asthma and lower vitamin D levels the VIDA randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;311:2083-91.
13. Ranganathan, P. Genetics of bone loss in rheumatoid arthritis - role of vitamin D receptor polymorphisms. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48:342-6.
14. Mechica JB, Leite MO, Mendonca BB, Frazzatto ES, Borelli A, Latronico AC. A novel nonsense mutation in the first zinc finger of the vitamin D receptor causing hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D3-resistant rickets. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3892-4.
15. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006;371:1-12.
16. Bossé Y, Hudson TJ. Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes. *Annu Rev Med*. 2007;58:171-84.
17. Wittke A, Chang A, Froicu M, Harandi OF, Weaver V, August A, et al. Vitamin D receptor expression by the lung microenvironment is required for maximal induction of lung inflammation. *Arch Biochem Biophys*. 2007;460:306-13.
18. Ferrarezi DA. Variações alélicas no gene do receptor da vitamina D (VDR) e risco de doença arterial coronariana em pacientes diabéticos tipo 2 [PhD thesis]. São Paulo (SP): USP; 2011.
19. Polgar G, Promadhat V. Pulmonary function testing in children. Philadelphia: WB Saunders; 1971.
20. Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, Plebani M, Shoenfeld Y, Wang TJ, et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev*. 2010;9:709-15.
21. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1911-30.
22. Fang Y, Meurs JB, Bergink AP, Hofman A, Duijn CM, Leeuwen JP, et al. CDX-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res*. 2003;18:1632-41.
23. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994;17:914-21.
24. Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DY. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:995-1000.
25. Beiguelman B. Genética de populações humanas. Ribeirão Preto: SBG; 2008.
26. Yamamoto H, Miyamoto K, Li B, Taketani Y, Kitano M, Inoue Y, et al. The caudal-related homeodomain protein CDX-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J Bone Miner Res*. 1999;14:240-47.
27. Fang Y1, Meurs JB, Bergink AP, Hofman A, Duijn CM, Leeuwen JP, et al. Cdx-2 Polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res*. 2003;18:1632-41.
28. Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics*. 1999;58:1-8.
29. Alyasin S, Momen T, Kashef S, Alipour A, Amin R. The relationship between serum 25 hydroxy vitamin D levels and asthma in children. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011;3:251-5.
30. Ahmed SF, Franey C, Mcdevitt H, Somerville L, Butler S, Galloway P, et al. Recent trends and clinical features of childhood vitamin D deficiency presenting to a children's hospital in Glasgow. *Arch Dis Child*. 2011;96:694-6.
31. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:765-71.
32. Hypponen E, Berry DJ, Wjst M, Power C. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - a significant but nonlinear relationship. *Allergy*. 2009;64:613-20.