



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES NO GENE FOSFODIESTERASE TIPO 4D COM  
ASMA E ATOPIA EM UMA POPULAÇÃO DE CRIANÇAS BRASILEIRAS

por

HATILLA DOS SANTOS SILVA

TCC apresentado ao Instituto de Biologia da  
Universidade Federal Bahia como exigência  
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas

Salvador, BA 2021

Data da Defesa: 03/12/2021

**Banca examinadora**

---

**Orientador Prof.<sup>a</sup> Dr. Ryan dos Santos Costa  
(Instituto de Ciências da Saúde - UFBA)**

---

**Coorientadora Msc. Helena Mariana Pitangueira Teixeira  
(Instituto de Ciências da Saúde - UFBA)**

---

**Membro I - Prof.<sup>a</sup> Dr. Thiago Magalhães da Silva  
(Departamento de Ciências Biológicas - UESB)**

---

**Membro II - Msc. Pedro Augusto Silva dos Santos  
(Instituto de Ciências da Saúde - UFBA)**

---

**Membro Suplente - Msc. Louise Correia de Lima  
(Instituto de Ciências da Saúde - UFBA)**

## RESUMO

Introdução: A asma é uma doença heterogênea de caráter inflamatório causada pela interação complexa entre fatores ambientais e genéticos. Neste sentido, tem sido sugerido que a disfunção em vias mediadas pelo mensageiro AMP cíclico (AMPc), como a ativada pelos receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos, estão envolvidas na patogênese da asma. Ademais, o AMPc tem um papel crucial tanto na regulação da resposta imune quanto na contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas. Por exemplo, tem sido proposto que os níveis de AMPc se relacionam positivamente com a produção da citocina IL-10, que desempenha um papel na modulação da resposta imune. O gene *PDE4D* codifica a enzima Fosfodiesterase tipo 4, responsável pela hidrólise do AMPc, atuando como um regulador chave da concentração intracelular de AMPc. Variantes genéticas no gene *PDE4D* foram anteriormente associadas com a suscetibilidade à asma em uma população branca não-hispânica. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre variantes e haplótipos no gene *PDE4D* com asma e atopia em uma população pediátrica brasileira. Métodos: O estudo envolveu 1.246 participantes (4 - 11 anos) não relacionados do programa SCAALA (Mudanças Sociais, Asma e Alergia na América Latina). A genotipagem foi realizada usando o chip Illumina 2.5 Human Omni bead. Uma regressão logística multivariada foi usada para investigar a associação entre variantes no *PDE4D* e fenótipos de asma / atopia no software PLINK 1.09. Além disso, a produção da citocina imunomoduladora IL-10 foi mensurada no sobrenadante da cultura de sangue total por meio do imunoenensaio ELISA. Resultados: Vinte e quatro SNVs em *PDE4D* foram associados a atopia ou asma. O alelo A do rs6898082 foi associado ao aumento da susceptibilidade à asma (OR 2,76; IC 99% 1,26-6,03) e também a uma maior expressão de *PDE4D* nos sangue total no banco de dados GTEx. Além disso, as variantes rs75699812 (C), rs8007656 (G) e rs958851 (T) foram associadas positivamente com o risco para atopia e negativamente à produção de IL-10, formando também um haplótipo de risco para atopia (OR 1,82; IC 99% 1,15-2,88). A avaliação funcional in silico mostrou que alguns SNVs no gene *PDE4D* podem ter um impacto na regulação e expressão gênica. Conclusão: Variantes no *PDE4D* foram significativamente associadas a marcadores de asma e alergia em uma população brasileira. É possível que essas variantes levem à alteração da expressão do *PDE4D* e, portanto, tenham impacto na imunidade e na função pulmonar.

## ABSTRACT

Background: Asthma is a heterogeneous inflammatory disease caused by the complex interaction between environmental and genetic factors. In this sense, it has been suggested that dysfunction in pathways mediated by the messenger cyclic AMP (cAMP), such as that activated by  $\beta$ 2 adrenergic receptors, are involved in the pathogenesis of asthma. Furthermore, cAMP plays a crucial role both in the regulation of the immune response and in the contractility of airway smooth muscle. For example, it has been proposed that cAMP levels are positively related to the production of the cytokine IL-10, which plays a role in modulating the immune response. The *PDE4D* gene encodes the enzyme Phosphodiesterase type 4, responsible for cAMP hydrolysis, acting as a key regulator of the cAMP intracellular concentration. Genetic variants in the *PDE4D* gene were previously associated with susceptibility to asthma in a non-Hispanic white population. Therefore, the aim of this study was to investigate the association between variants and haplotypes in the *PDE4D* gene with asthma and atopy in a Brazilian pediatric population. Methods: The study involved 1,246 participants (4 - 11 years old) unrelated to the SCAALA program (Social Change, Asthma and Allergy in Latin America). Genotyping was performed using the Illumina 2.5 Human Omni bead chip. A multivariate logistic regression was used to investigate the association between variants in the *PDE4D* and asthma/atopy phenotypes in the PLINK 1.09 software. Furthermore, the production of the immunomodulatory cytokine IL-10 was measured in the whole blood culture supernatant by means of the ELISA immunoassay. Results: Twenty-four SNVs in *PDE4D* were associated with atopy or asthma. The A allele of rs6898082 was associated with increased susceptibility to asthma (OR 2.76; 99% CI 1.26-6.03) and also with increased expression of *PDE4D* in whole blood in the GTEx database. In addition, the variants rs75699812 (C), rs8007656 (G) and rs958851 (T) were positively associated with atopy risk and negatively associated with IL-10 production, also forming a risk haplotype for atopy (OR 1.82; 99% CI 1.15-2.88). Functional in silico evaluation showed that some SNVs in the *PDE4D* gene may have an impact on gene regulation and expression. Conclusion: *PDE4D* variants were significantly associated with asthma and allergy markers in a Brazilian population. It is possible that these variants lead to changes in *PDE4D* expression and, therefore, have an impact on immunity and lung function.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia, por ter sido o local que me propiciou diversos aprendizados, vivências, relações, oportunidades e transformações significativas em minha vida que indubitavelmente colaboraram para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Instituto de Biologia, pois neste espaço pude desenvolver habilidades e me apropriar de conhecimentos que culminaram em uma boa formação profissional. Além de ter me proporcionado conhecer pessoas as quais tenho imenso carinho e admiração.

Ao CNPq e FAPESB, pelo apoio financeiro ao longo das Iniciações Científicas e para a execução do projeto de pesquisa em questão, suporte imprescindível para a sua execução.

Ao projeto SCAALA, assim como aos professores e colaboradores envolvidos, e a todos os participantes sem os quais este trabalho não seria possível, em especial ao Dr. Maurício Barreto.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular (IMUNOBIO) por possibilitar e a realização do projeto, e também contribuir para meu desenvolvimento técnico científico.

Ao meu orientador Dr. Ryan dos Santos Costa, por ter me oportunizado esse envolvimento e conseqüente crescimento científico. Com toda sua paciência, competência, sabedoria, sensatez, empatia e mais outras inúmeras qualidades, o professor Ryan conduz e orienta seus discentes da mais bela e admirável forma possível, nunca esquecendo que além de pesquisadores em formação, somos humanos.

À minha co-orientadora Msc. Helena Mariana Pitangueira Teixeira, por ter sido uma tutora incrível que, com toda paciência e disposição para ensinar, me guiou nesta jornada científica. Helena é muito solícita, competente e proativa, sempre realizando tudo com muita dedicação e maestria, tenho muita admiração pela pessoa, pesquisadora e profissional que ela se tornou.

À coordenadora do IMUNOBIO, e também minha co-orientadora, Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo, por ser uma líder admirável, com muito comprometimento com a produção científica e formação dos estudantes. Agradeço a professora Camila, pela confiança e oportunidade, me orientando com muita dedicação e atenção.

Às professoras e professores que tive a honra de conhecer durante a graduação, por todos os ensinamentos, em especial às professoras Nora Ney, Sheila Resende, Flora Fernandes e Renata Lúcia.

À minha mãe e amiga, Ana Cristina, por sempre ter se esforçado muito para que eu tivesse acesso a uma boa educação. Sempre presente ao longo da minha caminhada, me ajudando das mais incontáveis formas possíveis, mas especialmente me dando muito amor, carinho e incentivos. Minha mãe é uma mulher admirável, determinada e corajosa, não poderia deixar de agradecer por todos os ensinamentos, valores e educação que me deu, se não fosse por você eu não seria quem sou hoje. Essa conquista não é somente minha, é nossa.

À todos da minha família, pai, irmãs, tias e tios, primos e primas, que de alguma forma contribuíram na minha formação, seja pelo amor e carinho, pelos incentivos, pela torcida e apoio nas mais diversas situações na minha vida. Um agradecimento especial para minhas avós, as Marias, que sempre com muito altruísmo fazem tudo que podem, e diria que até mais, para o bem-estar e sucesso de todos.

Ao meu companheiro, Juan Vitor, agradeço por todo o incentivo, suporte e contribuição nas mais diversas situações. Sou muito grato por tê-lo em minha vida, com seu jeito sistemático sempre me ajuda a colocar as coisas no lugar, organizando a minha vida, e pelo carinho e companhia nos momentos de estudo, sempre os tornando mais leves e fluidos.

Aos meus amigos e amigas, agradeço por sempre terem dado força para encarar a dinâmica da vida acadêmica. Aos amigos que o IBIO me presenteou, Adson Santana, Antonio Mateus, Débora Zuanny, Jeferson Santana, João Pedro, Lucas Barbosa, Kevin Fernandes, Luciana Fiuza, Nina Bahia, Rebeca Vieira, Stefane Mendes, Victor Gomes e Vida Souza, que sempre estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos. Agradeço também à Tia Helena e Tia Tuka, as mães de Stefane e Vida, respectivamente, por terem sempre me acolhido com um carinho indescritível. Aos amigos que o IMUNOBIO me apresentou, Ana Paula, Ítalo Uzeda, Jéssica Francisco, Juliana Lopes, Maria Borges, Raíssa Coelho, Talita Santos, e todos outros com os quais compartilhei bons momentos no laboratório, tanto momentos de seriedade quanto de descontração. Agradeço em especial à minha amiga Stefane, minha parceira de aventuras e de conversas, sempre disposta a ouvir e falar sobre os mais diversos, e às vezes aleatórios, assuntos possíveis. Um agradecimento especial para Jeferson, Juliana e Vida, os quais tive o prazer de compartilhar não somente uma morada, mas sim um lar, obrigado por toda confiança, reciprocidade e carinho.

Agradeço a todos que, mesmo não sendo citados, colaboraram para a construção e conclusão dessa importante etapa.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPc** - Adenosina Monofosfato Cíclica
- COPD** - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- EHM** - *Enhancer-associated Histone Mark*
- ELISA** - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- eQTL** - *expression Quantitative Trait Locus*
- FEV1** - Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
- FT** - Fator de Transcrição
- GWAS** - *Genome Wide Association Study*
- HWE** - *Hardy-Weinberg Equilibrium*
- IgE** - Imunoglobulina tipo E
- IL** - Interleucina
- MC** - Motifs Changed
- MLVA** - Músculo Liso das Vias Aéreas
- PBR** - *Protein Binding Region*
- PCA** - Análise de Componente Principal
- LD** - Desequilíbrio de Ligação
- PDE** - Fosfodiesterase
- PHM** - *Promoter-associated Histone Mark*
- SNV** - *Single Nucleotide Variant*
- Th** - *T Helper*
- TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral Alfa
- Treg** - T regulatório
- $\beta$ 2AR** - Receptor Beta-2 Adrenérgico

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
SUMÁRIO .....	(i)
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 Asma .....	1
1.1.2 Epidemiologia da asma .....	1
1.1.2 Imunopatogênese da asma .....	2
1.1.3 Terapêutica da asma .....	2
1.2 Fosfodiesterases .....	3
1.2.1 Fosfodiesterase tipo 4D .....	3
1.2.2 Mecanismo de ação relacionado ao relaxamento muscular .....	4
1.2.3 Mecanismo de ação relacionado à resposta imune .....	5
1.3 Variantes no gene <i>PDE4D</i> e susceptibilidade à asma .....	6
2. OBJETIVOS .....	7
2. CAPÍTULO ÚNICO .....	8
3. DISCUSSÃO GERAL .....	26
4. CONCLUSÕES GERAIS .....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
ANEXOS .....	32
APÊNDICE .....	34



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ASMA

A asma pode ser definida como uma doença respiratória geralmente caracterizada por uma inflamação crônica nas vias aéreas (GINA, 2021). O diagnóstico de tal condição é baseado no histórico de sintomas respiratórios, como sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse que podem variar tanto na intensidade quanto na frequência em que ocorrem (GINA, 2021). Além disso, pessoas com asma podem apresentar limitação variável no fluxo de ar expiratório, que pode se tornar persistente (GINA, 2021). Neste contexto, a inflamação observada na doença tem um papel importante no aumento da hiperresponsividade das vias aéreas, resultando nos sintomas respiratórios clinicamente predominantes. A asma é classicamente ligada à condição alérgica, possuindo a resposta imune a alérgenos como um possível mecanismo subjacente à sua patogênese (HOLGATE, 2012; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

A etiologia dessa doença heterogênea e complexa é resultado de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, bem como da interação entre eles. A influência do *background* genético na susceptibilidade à asma foi demonstrada pela associação de vários loci genéticos, especialmente em *Genome Wide Association Studies* (GWAS) (WILLIS-OWEN *et al.*, 2018). Estudos estimam que a asma tenha uma herdabilidade em cerca de 55–74% em adultos e atingindo quase 90% em crianças (HERNANDEZ-PACHECO *et al.*, 2019). Entretanto, boa parte de tal contribuição genética ainda não foi explicada, o que destaca a presença do fenômeno conhecido como herdabilidade perdida (OBER, 2016).

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA

A asma é considerada uma das condições crônicas respiratórias mais comuns, afetando aproximadamente 358 milhões de pessoas em todo o mundo (GBD, 2017). A sua prevalência é especialmente relevante no contexto pediátrico, considerando que é uma das condições crônicas mais comuns em crianças (FERRANTE; LA GRUTTA, 2018). Além disso, tem sido observado que a prevalência da doença aumenta consistentemente em diversos países, principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (BRAMAN, 2006; PEARCE *et al.*, 2007; GINA, 2021). O Brasil tem sido apontado como um dos países com alta prevalência de sintomas de asma, estimada em 23,4% em crianças de 6 a 7 anos (SOLÉ *et al.*, 2014).

Apesar de ter sido observado um decréscimo em relação a internações e mortes em decorrência da asma, os números absolutos continuam elevados, o que implica em elevados custos ao sistema de saúde do país (CARDOSO *et al.*, 2017).

### 1.1.2 IMUNOPATOGENESE DA ASMA

A inflamação observada na asma tem um papel relevante na compreensão dos mecanismos imunopatológicos e a relação com os sintomas apresentados por aqueles que a possuem. O processo inflamatório influencia diretamente na disfunção das vias aéreas, tanto pela liberação de mediadores inflamatórios potentes quanto provocando o remodelamento das vias aéreas (HOLGATE, 2012). A cascata imune observada na condição atópica está principalmente relacionada a uma resposta do tipo Th2 (T helper tipo 2) que é caracterizada pela produção e liberação de citocinas específicas como interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13. (HOLGATE, 2012; LAMBRECHT; HAMMAD, 2014). Neste sentido, a IL-4 e IL-13, por exemplo estão relacionadas com a estimulação da produção da imunoglobulina tipo E (IgE) ao invés de IgG por células B, em que a IgE é o principal anticorpo dirigido aos alérgenos e um marcador da condição atópica. Ademais, a IL-5 e IL-9 tem um importante efeito proliferativo em leucócitos característicos da resposta Th2, levando a um aumento nos níveis de eosinófilos e mastócitos, respectivamente (HOLGATE, 2012; LAMBRECHT; HAMMAD, 2014).

Apesar da importância do perfil Th2 na asma, já têm sido demonstrados cluster imunologicamente distintos e não necessariamente associados com um fenótipo atópico. Por exemplo, indivíduos com asma podem apresentar uma resposta do tipo Th2 elevada sem uma condição alérgica subjacente ou possuir asma com uma resposta imune do tipo Th17, que é caracterizada por um padrão mais neutrofílico (LAMBRECHT; HAMMAD, 2014). Existe uma grande heterogeneidade na doença em relação a fenótipos, resposta terapêutica, intensidade e gravidade dos sintomas, o que a torna uma doença bastante complexa (SIROUX *et al.*, 2014).

### 1.1.3 TERAPÊUTICA DA ASMA

Não existe até o momento uma cura para a asma, entretanto, o controle dos sintomas, como a exacerbação, pode ser atingido a partir de abordagens terapêuticas (BALDI *et al.*, 2012). Dentre as estratégias utilizadas, destaca-se o uso dos broncodilatadores (agonistas  $\beta$ 2)

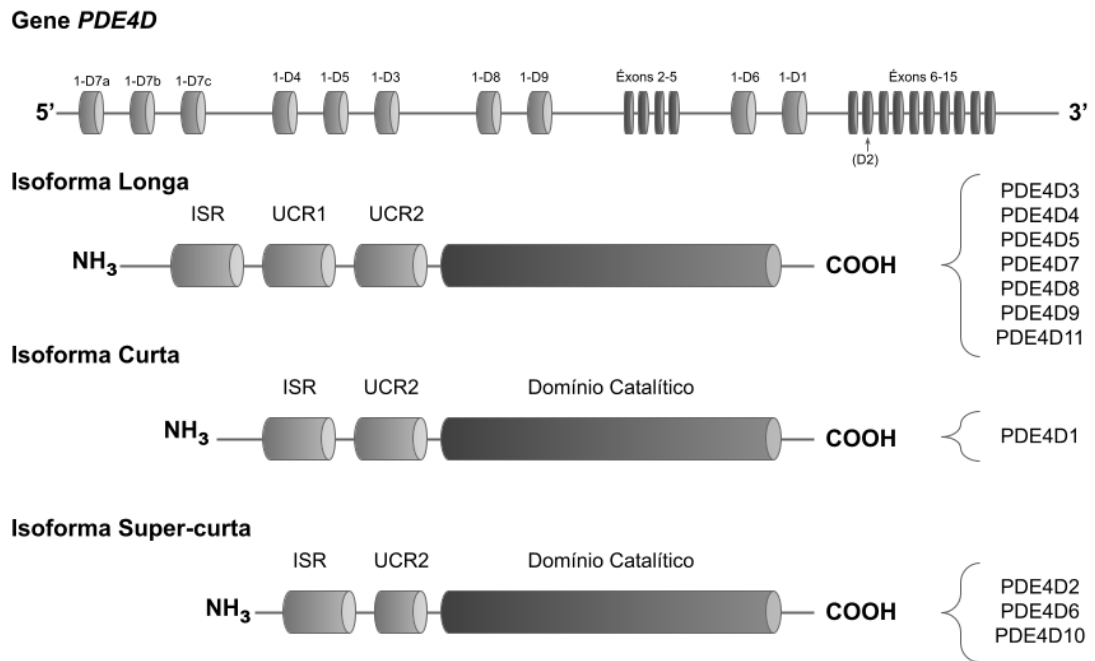
e corticosteroides (inalatório ou oral) que são utilizados em associação, considerando o contexto clínico do paciente (CHIANG *et al.*, 2015). Além disso, outras abordagens também são utilizadas em pacientes que não respondem bem à terapêutica convencional, como imunobiológicos (i.e. anti-IgE), antagonistas do receptor de leucotrienos e também inibidores de fosfodiesterase (FALK *et al.*, 2016).

## 1.2 FOSFODIESTERASES

As fosfodiesterases (PDE) constituem um grupo de enzimas envolvidas na hidrólise dos segundo mensageiros AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e GMPc (guanosina monofosfato cíclico), que são gerados pela atividade das enzimas Adenilato e Guanilato Ciclase, respectivamente. As PDEs são importantes na inativação destes mensageiros, pois estas regulam sua concentração intracelular e, conseqüentemente, regulam negativamente as vias ativadas por estas moléculas (ESSAYAN, 2001). Portanto, os níveis de AMPc são modulados por um balanço entre sua síntese e degradação devido à atividade das enzimas adenilato ciclase e fosfodiesterase, respectivamente.

### 1.2.1 FOSFODIESTERASE TIPO 4D

As PDEs de tipo 4 constituem uma família composta por proteínas (PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D) conhecidas por degradar especificamente o AMPc (MATERA *et al.*, 2021). Dentre estas enzimas, a PDE4D é considerada a principal responsável pela hidrólise do AMPc nas vias aéreas de humanos, em especial a isoforma PDE4D5 (MEHÁTS, 2002; BILLINGTON *et al.*, 2008; BILLINGTON, 2013). A PDE4D apresenta diversas isoformas, apresentando 11 principais isoformas (PDE4D1-11), bem como variantes destas, codificadas a partir dos mecanismos de *splicing* alternativo e promotores alternativos no gene *PDE4D* (Figura 1), localizado no cromossomo 5 (RICHTER *et al.*, 2005; PAES *et al.*, 2021). Nessa perspectiva, estudos mais recentes com humanos confirmam o papel da PDE4D no contexto da asma (TRIAN *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2016; OJIAKU *et al.*, 2019).



**Figura 1. Representação do gene *PDE4D* e as isoformas codificadas.** Na imagem é apresentada a estrutura gênica, evidenciando os possíveis éxons 1 usados em cada uma das isoformas. Figura adaptada de Houslay (2005) e Jørgensen e colaboradores (2015). ISR: *Isoform Specific Region*; UCR: *Upstream Conserved Region*

### 1.2.2 MECANISMO DE AÇÃO RELACIONADO AO RELAXAMENTO MUSCULAR

A PDE4D está localizada *downstream* em diversas vias que possuem receptores acoplados à proteína G, incluindo a dos receptores  $\beta 2$  adrenérgicos ( $\beta 2AR$ ), cuja disfunção tem sido relacionada com a patogênese da doença (TRIAN *et al.*, 2011). A ativação do  $\beta 2AR$  promove o aumento na concentração do AMPc devido à estimulação da atividade da Adenilato ciclase. A elevação nos níveis de AMPc nas células do músculo liso das vias aéreas (MLVA) leva à ativação da PKA (proteína quinase A), resultando na fosforilação de várias proteínas que culminam no relaxamento do MLVA (MEHÁTS *et al.*, 2002). Este efeito broncodilatador é explorado terapêuticamente com o uso de  $\beta 2$ -agonistas para que haja o alívio e controle dos sintomas em pacientes com asma. Nesse contexto, a PDE4D, como subtipo principal de PDE expresso no MLVA, está envolvida no mecanismo de *turnover* do AMPc, sendo um regulador crucial da sinalização do mensageiro e, conseqüentemente, da contratilidade do MLVA (MEHÁTS *et al.*, 2002). Inicialmente, Hansen *et al.* (2000) mostraram que camundongos *knockout* para o gene *PDE4D* apresentaram uma falta de

broncoconstrição mediada por metacolina. Além disso, foi observado que indivíduos com asma têm uma maior expressão de PDE4D do que os sem asma, e o aumento da expressão de *PDE4D* está correlacionado com a hiperreatividade das vias aéreas e a proliferação do MLVA (DENG *et al.*, 2006; TRIAN, 2011). Ademais, o gene *PDE4D* está hipometilado em células do MLVA de indivíduos asmáticos, o que se correlaciona com uma maior expressão do gene, levando a uma disfunção nestas células (LIN *et al.*, 2016).

### 1.2.3 MECANISMO DE AÇÃO RELACIONADO À RESPOSTA IMUNE

As fosfodiesterases do tipo 4 (PDE4) são importantes enzimas metabolizadoras de AMPc em diversas células e tecidos, tais como células imunes e inflamatórias, músculo liso das vias aéreas e nervos pulmonares (KROEGEL; FOERSTER, 2007). Considerando o papel central que as células imunes e inflamatórias desempenham na asma, o AMPc tem sido relacionado como um sinalizador chave na regulação desse complexo sistema sistema e consequente resolução da inflamação (TAVARES *et al.*, 2020). Estudos anteriores indicam que pacientes com doenças inflamatórias apresentaram um aumento estatisticamente significativo na expressão de PDE4 em relação a indivíduos saudáveis. Adicionalmente, evidências apontam que há uma maior atividade de PDE4 em células inflamatórias de pacientes com asma ou alergia (LANDELLS *et al.*, 2000; PAGE, 2014). Sendo assim, a PDE4D é um potencial alvo na fisiopatologia da asma, tendo em vista que é a principal enzima que hidrolisa o AMPc em células imunes e inflamatórias (KROEGEL; FOERSTER, 2007).

O medicamento Cilomilast, um inibidor da fosfodiesterase que é 10 vezes mais seletivo para PDE4D do que outros PDE4, suprime a atividade de várias células pró-inflamatórias e imunes envolvidas na patogênese da asma (KROEGEL; FOERSTER, 2007). Entretanto, apesar de inibidores de PDE4 serem aprovados para utilização clínica, a sua ampla utilização é limitada devido a presença de reações adversas, como náuseas, vômito e diarreia (PHILLIPS *et al.*, 2020). O envolvimento de PDE4D e resposta imune é explicado tanto por vias dependentes quanto independentes de AMPc, embora os mecanismos mediados por AMPc sejam melhor compreendidos. Baixas concentrações de AMPc em células dendríticas são importantes para induzir um perfil Th2 e são importantes na diferenciação de linfócitos, que expressam altos níveis de PDE4D (LEE *et al.*, 2015;

BEUTE, 2018). Os níveis de AMPc também são importantes na regulação da resposta imune, tendo em vista que a atividade das células T-regulatórias é dependente de altas concentrações de AMPc, capazes de estimular a produção da citocina imunomodulatória IL-10, que pode ser liberado no citoplasma de outros linfócitos pelas junções GAP. Nos linfócitos T efetores, níveis elevados de AMPc promovem a inibição do fator nuclear-kappa B e o fator nuclear de ativação das células T ativadas resultando na supressão da produção de citocinas, como a IL-2 (JIMENEZ *et al.*, 2001). Além disso, altas concentrações de cAMP nos monócitos estão correlacionadas com a supressão da produção da citocina pró-inflamatória TNF-alfa e aumento da IL-10, o que pode se relacionar com a redução da inflamação.

### 1.3 VARIANTES NO GENE *PDE4D* E SUSCEPTIBILIDADE À ASMA

Variantes genéticas em genes envolvidos na via do  $\beta$ 2AR já mostraram influenciar a suscetibilidade à asma, assim como a resposta a terapia com broncodilatadores, inclusive em populações brasileiras (HIMES *et al.*, 2009; LABUDA *et al.*, 2011; de PAIVA *et al.*, 2014; TEIXEIRA, 2017). Algumas variantes no *PDE4D* foram encontradas envolvidas na suscetibilidade à asma em alguns estudos de associação genética. Em um GWAS realizado em uma população de crianças brancas não hispânicas, os SNVs (Variante de Nucleotídeo Único; *Single Nucleotide Variants*) rs1544791-A, rs983280-G, rs1588265-G e rs2548659-G foram significativamente associados com uma menor chance dos portadores apresentarem asma leve e moderada, quando comparadas comparadas à população geral (HIMES *et al.*, 2009). Adicionalmente, o SNV previamente associado no GWAS rs1544791 foi associado com uma maior variação na FEV1 após o uso do broncodilatador de curta ação em pacientes pediátricos, consequentemente levando a uma melhor resposta ao medicamento (LABUDA *et al.*, 2011). Ademais, o SNV rs1504982-C, localizado na região promotora do gene *PDE4D*, foi associado com uma menor mudança na FEV1 pós broncodilatador neste mesmo estudo. Considerando que haplótipos são um conjunto de variantes geneticamente ligadas, no mesmo cromossomo, Homma e colaboradores (2006) realizaram uma análise de haplótipos considerando variantes no *PDE4D* e *IL13* e observaram diferenças significantes entre pacientes com COPD (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e o respectivo grupo controle. Entretanto, pelo nosso conhecimento, nenhum estudo de associação de SNV no *PDE4D* com asma ou atopia foi realizado em uma população brasileira.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre variantes no gene *PDE4D* com asma e atopia em uma população de crianças brasileiras, bem como avaliar os possíveis impactos funcionais dessas variantes.

### 2.2 Objetivos específicos

Descrever as frequências das variantes no gene *PDE4D* relacionados à asma em uma população brasileira;

Investigar a associação entre variantes no gene *PDE4D* e sintomas de asma e atopia;

Investigar a associação entre haplótipos no gene *PDE4D* e sintomas de asma e atopia;

Investigar a associação entre variantes no gene *PDE4D* associadas com a produção da Interleucina 10 (IL-10);

Descrever por meio de abordagens *in silico* o impacto funcional de variantes no gene *PDE4D* associadas à asma e atopia.

### **3 Capítulo único**

Artigo a ser submetido à revista Pediatric Allergy and Immunology

Homepage: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/13993038>

Versão em inglês encontra-se no apêndice



## **Variantes e haplótipos do gene *PDE4D* estão associados à asma e atopia em crianças brasileiras**

### ***PDE4D* gene variants and haplotypes are associated with asthma and atopy in Brazilian children**

Hatilla dos Santos Silva<sup>1</sup>  
Helena Mariana Pitangueira Teixeira<sup>1</sup>  
Neuza Maria Alcantara-Neves<sup>1</sup>  
Maurício Barreto<sup>2</sup>  
Camila Alexandrina Figueiredo<sup>1</sup>  
Ryan dos Santos Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil

<sup>2</sup> CIDACS, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil

#### **Resumo**

**Introdução:** A asma é uma doença heterogênea comum e de caráter inflamatório causada pela interação complexa de fatores ambientais e genéticos. Neste sentido, a disfunção em vias mediadas por AMP cíclico, como ativada pelos receptores dos receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos, está implicada na patogênese da asma. O gene *PDE4D* codifica a enzima Fosfodiesterase tipo 4, responsável pela hidrólise do AMP cíclico. Variantes genéticas no gene *PDE4D* foram descritos anteriormente como desempenhando um papel na suscetibilidade à asma. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre variantes do *PDE4D* (e seus haplótipos) com asma e atopia em uma população brasileira. **Métodos:** O estudo envolveu 1.246 participantes não relacionados do programa SCAALA (Mudanças Sociais, Asma e Alergia na América Latina). A genotipagem foi realizada usando o chip Illumina 2.5 Human Omni bead. Uma regressão logística multivariada foi usada para investigar a associação entre variantes no *PDE4D* e fenótipos de asma / atopia no software PLINK 1.09. A produção da citocina IL-10 foi mensurada no sobrenadante da cultura de sangue total por meio do imunoenensaio ELISA. **Resultados:** Vinte e quatro SNVs em *PDE4D* foram associados a atopia ou asma. O alelo A do rs6898082 aumentou a susceptibilidade à asma (OR 2,76; IC 99% 1,26-6,03) e também foi relacionado a uma maior expressão de *PDE4D* no banco de dados GTEx. Além disso, as variantes rs75699812 (C), rs8007656 (G) e rs958851 (T) foram associadas positivamente como risco para atopia e negativamente associadas à produção de IL-10. Além disso, essas variantes formaram um haplótipo de risco de atopia (OR 1,82; IC 99% 1,15-2,88). A avaliação funcional *in silico* mostrou que alguns SNVs no gene *PDE4D* podem ter um impacto na regulação e expressão gênica. **Conclusão:** Variantes no *PDE4D* estão significativamente associadas a

marcadores de asma e alergia. É possível que essas variantes levem à alteração da expressão do *PDE4D* e, portanto, tenham impacto na imunidade e na função pulmonar.

**Palavras-chave:** polimorfismo; fosfodiesterase; acampamento; asma; PDE4D

## Introdução

A asma é um distúrbio respiratório crônico que afeta aproximadamente 358 milhões de pessoas em todo o mundo e é considerada a condição crônica mais prevalente em crianças.<sup>1,2</sup> No Brasil, a prevalência de sintomas de asma é estimada em 23,4% em crianças de 6 a 7 anos.<sup>3</sup> A asma é caracterizada como uma doença obstrutiva em que a inflamação causa hiperresponsividade das vias aéreas, provocando sintomas como aperto no peito, tosse, falta de ar e chiado.<sup>4</sup> Esses sintomas geralmente estão associados a limitação variável do fluxo de ar expiratório, que muitas vezes é reversível.<sup>4</sup>

A asma é considerada uma doença heterogênea e complexa resultante da interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. O papel do *background* genético na susceptibilidade à asma foi demonstrado pela associação de vários loci genéticos.<sup>5</sup> Entre esses loci, o gene *PDE4D* (Fosfodiesterase tipo 4D) foi identificado como um gene de susceptibilidade à asma em um *Genome Wide Association Studies* (GWAS), no qual os resultados foram replicados usando populações independentes.<sup>6</sup>

PDE4D é um membro da superfamília de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) de enzimas específicas de degradação de AMPc. A proteína PDE4D está *downstream* na via do receptor  $\beta$ 2 adrenérgico ( $\beta$ 2AR) que promove a elevação do AMPc devido à estimulação da atividade da adenilil ciclase.<sup>7</sup> Em células do músculo liso das vias aéreas (MLVA), o AMPc leva à ativação de PKA causando a fosforilação de proteínas envolvidas no relaxamento muscular.<sup>8</sup> O efeito broncodilatador promovido pelos  $\beta$ 2-agonistas é explorado terapêuticamente para controlar os sintomas da asma. A PDE4D é o principal subtipo de fosfodiesterase envolvido na regulação negativa da contratilidade brônquica.<sup>8</sup> Além disso, há evidências atuais de que os níveis de AMPc influenciam a produção de IL-10, uma citocina imunomoduladora chave.<sup>9</sup> Estudos mostraram que indivíduos com asma ou alergia têm uma maior expressão e atividade de PDE4D em ambos MLVA e células imunes do que indivíduos sem tais condições.<sup>7,10</sup>

Variantes de genes da via adrenérgica, inclusive no *PDE4D*, já mostraram influenciar a susceptibilidade à asma.<sup>6,11</sup> Alguns desses estudos foram realizados no Brasil, embora nenhum tenha analisado o *PDE4D*.<sup>12,13</sup> Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre SNVs (Single Nucleotide Variants) no gene *PDE4D* com sintomas de asma e atopia em uma população brasileira.

## **Material e métodos**

### **População e desenho do estudo**

O estudo envolveu 1.246 crianças não aparentadas com idades entre 4 e 11 anos participantes da coorte brasileira SCAALA (*Social Change, Asthma, Allergy in Latin America*).<sup>14,15</sup> O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal da Bahia (003-05/CEP-ISC) e também pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, resolução nº 15 895/2011).

### **Definição de asma e atopia**

Uma versão adaptada para o português do questionário ISAAC foi utilizada para classificar as crianças em caso/controle. Os casos foram definidos pela presença de pelo menos um dos seguintes parâmetros nos últimos 12 meses: diagnóstico clínico de asma; ocorrência de chiado no peito com exercícios; quatro ou mais episódios de chiado no peito; acordar à noite por causa de respiração ofegante.

IgE sérica para os aeroalérgenos mais comuns encontrados em Salvador, como ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*) e baratas (*Periplaneta americana* e *Blattella germanica*), foram avaliadas conforme descrito anteriormente por Alcantara-Neves e colaboradores (2012).<sup>14</sup> Crianças com IgE positivo para pelo menos um alérgeno foram classificadas como atópicas.

### **Produção espontânea de IL-10**

Células de sangue total foram cultivadas (1: 4) em RPMI suplementado a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, a fim de detectar a produção de IL-10. O fluido sobrenadante foi coletado e o nível de IL-10 foi determinado usando pares de anticorpos Pharmingen BD e padrões recombinantes (Pharmingen, San Diego, Ca, EUA) por ELISA de captura seguindo as instruções do fabricante.<sup>15</sup>

## Extração de DNA e genotipagem

O DNA foi extraído do sangue periférico por meio de um kit comercial (Flexigene DNA Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A genotipagem foi realizada usando o chip Illumina 2.5 Human Omni bead. Marcadores genéticos no *PDE4D* foram extraídos considerando a localização 58264865 a 59784925 no cromossomo 5 (GRCh37). Posteriormente, foi aplicado um controle de qualidade nos marcadores por meio dos filtros de exclusão: taxa de genotipagem  $<0,9$ ; Desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,0001$ ); frequência de alelo menor (MAF)  $<0,05$ .

## Análise estatística

A análise de associação foi conduzida no software PLINK 1.09 por uma regressão logística multivariada, incluindo idade, sexo e infecção por helmintos como covariáveis. A Análise de Componentes Principais (PCA) também foi realizada para gerar os dois primeiros PCs, que foram incluídos na regressão para controlar a influência da estrutura populacional, o que é crucial considerando que as populações do Brasil são altamente miscigenadas. A análise foi realizada em três modelos de herança (aditivo, dominante e recessivo), e considerada significativa se o valor de  $p$  fosse inferior a 0,01. Além disso, uma abordagem de permutação adaptativa foi usada para resolver o problema de testes múltiplos.

O gráfico de *Linkage Disequilibrium* (LD) foi obtido usando o software Haploview. A análise de associação baseada em haplótipos foi realizada usando o pacote R haplo.stats<sup>16</sup> por uma regressão logística multivariada. Uma abordagem de janela deslizante (2 - 5 SNVs por janela) foi realizada considerando uma estrutura de janela agrupando SNVs vizinhos, a estrutura deslizou pela região mudando um SNV de cada vez. Todas as comparações consideraram o haplótipo protetor como referência. Uma avaliação gráfica da análise de haplótipos foi gerada usando o pacote R snp.plotter.<sup>17</sup> A análise de haplótipos foi realizada considerando o modelo genético das variantes associadas.

## Análise in silico

O banco de dados GTEx foi usado para investigar o impacto das variantes na expressão do gene. Portanto, permite identificar eQTL de acordo com um genótipo e expressão relativa do gene.<sup>18</sup>

## Resultados

### População de estudo

As características da população estudada estão resumidas na Tabela 1. Observamos maiores proporções de crianças asmáticas no grupo mais jovem. A proporção de atopia também foi maior na asma do que nos indivíduos sem asma. Nenhuma diferença foi encontrada em relação ao sexo ou infecção por helmintos entre os grupos.

**Tabela 1.** Características da amostra SCAALA de acordo com sintomas de asma e as variáveis incluídas no estudo.

	Não-asma (n=941)	Asma (n=273)	<i>p-value*</i>
Idade			
≤ 5	314 33,4%	132 48,4%	< 0,001
6 - 7	336 35,7%	88 32,2%	
≥ 8	291 30,9%	53 19,4%	
Sexo			
Masculino	506 53,8%	150 54,9%	0,732
Feminino	435 46,2%	123 45,1%	
Atopia	324 34,4%	133 48,7%	< 0,001
Infecção Helmíntica	206 22,3%	67 25,0%	0,342

\**p-value* obtido a partir do teste do qui quadrado

### Descrição das variantes *PDE4D*

Na região *PDE4D*, foram genotipados 1.180 SNVs. Destas, 454 variantes foram excluídas pelo MAF e uma variante devido à taxa de chamadas de genotipagem. Após o controle de qualidade, 727 variantes foram incluídas na análise. A Tabela 2 fornece informações genéticas e funcionais para os SNVs associados com asma ou atopia usando os bancos de dados Haploreg<sup>19</sup> e RegulomeDB<sup>20</sup>.

**Tabela 2.** Descrição genética e funcional dos SNVs *PDE4D*.

Variante	A1/A2 <sup>a</sup>	Freq.	HWE <sup>b</sup>	Posição (HG 19)	Anotação <sup>c</sup>	RegulomeDB	Haploreg
rs10472114	C/T	0,16	0,35	59035558	Intrônico	5	MC, eQTL
rs112873625	C/T	0,42	0,40	59074408	Intrônico	6	MC
rs12188950	T/C	0,11	0,06	59783317	Intrônico	4	PHM, EHM, DNase, PBR, MC, eQTL
rs13177163	A/G	0,14	0,10	59054145	Intrônico	5	PHM, EHM, PBR, MC
rs159625	T/C	0,14	0,10	59161352	Intrônico	5	PHM, EHM, MC
rs16889869	G/A	0,30	0,60	58755580	Intrônico	7	PHM, EHM
rs16889878	A/G	0,23	0,72	58768140	Intrônico	4	EHM, DNase, PBR
rs17782374	C/T	0,16	0,20	58663831	Intrônico	4	EHM, DNase, PBR, MC
rs1824154	A/G	0,31	0,37	58737707	Intrônico	5	EHM
rs194368	C/T	0,14	0,08	59179484	Intrônico	7	no
rs2112910	A/C	0,47	0,53	58727409	Intrônico	6	EHM, DNase, MC
rs298024	A/C	0,32	0,94	58941676	Intrônico	6	EHM, MC, eQTL
rs33950471	G/T	0,24	0,72	58449784	Intrônico	7	EHM, MC
rs34762247	C/A	0,22	0,04	59629365	Intrônico	5	EHM, DNase, MC, eQTL
rs4699942	T/G	0,42	0,40	59073475	Intrônico	5	EHM, MC, eQTL
rs4700340	T/C	0,14	0,79	59001077	Intrônico	5	PHM, EHM, DNase, MC, eQTL
rs6870632	A/G	0,43	0,41	58753267	Intrônico	5	MC
rs6896215	G/A	0,10	0,60	58418501	Intrônico	4	PHM, EHM, PBR, MC
rs6898082	A/G	0,20	0,19	58406404	Intrônico	6	EHM, MC
rs75699812	C/T	0,07	0,32	58628006	Intrônico	6	EHM, MC
rs80075656	G/T	0,07	0,34	58707869	Intrônico	7	MC
rs958851	T/G	0,20	0,62	58640143	Intrônico	7	EHM, MC
rs9942415	A/G	0,19	0,26	58771680	Intrônico	6	EHM, MC
rs9968728	C/T	0,27	0,05	58418981	Intrônico	2b	PHM, EHM, DNase, MC

<sup>a</sup>A1: Alelo de menor frequência; A2: Alelo principal <sup>b</sup> HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg <sup>c</sup> NCBI (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)

### Associação de variantes e haplótipos no gene *PDE4D* com asma

Doze SNVs foram significativamente associados aos sintomas de asma (Tabela 3). Usando um modelo aditivo, as variantes rs9968728-C e rs298024-A foram negativamente associadas, enquanto rs1824154-A, rs6896215-G e rs16889869-G aumentaram o risco de asma. Todas as variantes associadas no modelo aditivo também foram associadas no modelo dominante, exceto rs9968728-C (Tabela 3). Além disso, rs33950471-G e rs16889878-A foram associados positivamente com asma no modelo dominante. Por outro lado, rs2112910-A, rs6870632-A e rs12188950-T foram associados negativamente à asma. Em relação ao modelo recessivo, rs34762247-G foi associado negativamente, enquanto rs6898082-A aumentou o risco de asma (Tabela 3). A figura S1 mostra o gráfico LD para os SNVs associados.

**Tabela 3.** Associações significativas entre variantes no *PDE4D* e asma.

SNV	Genótipo	Controle	Caso	Modelo	OR (IC 99%)	P-value*
rs12188950	CC	78,55% (714)	84,35% (221)	Aditivo	0,63 (0,39 - 0,998)	0,0100
	CT	19,47% (177)	14,5% (38)	Dominante	0,58 (0,35 - 0,98)	<b>0,0099</b>
	TT	1,98% (18)	1,15% (3)	Recessivo	0,60 (0,12 - 3,05)	0,3175
rs16889869	AA	50,32% (471)	42,44% (115)	Aditivo	1,32 (1,001 - 1,74)	<b>0,0079</b>
	AG	40,71% (381)	46,49% (126)	Dominante	1,48 (1,02 - 2,14)	<b>0,0066</b>
	GG	8,97% (84)	11,07% (30)	Recessivo	1,32 (0,73 - 2,38)	0,2072
rs16889878	GG	60,21% (569)	52,38% (143)	Aditivo	1,34 (0,997 - 1,81)	<b>0,0077</b>
	GA	34,71% (328)	41,39% (113)	Dominante	1,47 (1,02 - 2,13)	<b>0,0063</b>
	AA	5,08% (48)	6,23% (17)	Recessivo	1,31 (0,61 - 2,82)	0,4571
rs1824154	GG	49,74% (470)	42,49% (116)	Aditivo	1,33 (1,01 - 1,75)	<b>0,0082</b>
	GA	40,95% (387)	46,15% (126)	Dominante	1,48 (1,02 - 2,14)	<b>0,0072</b>
	AA	9,31% (88)	11,36% (31)	Recessivo	1,36 (0,76 - 2,45)	0,1655
rs2112910	CC	25,82% (244)	34,43% (94)	Aditivo	0,82 (0,63 - 1,06)	0,0397
	CA	51,01% (482)	43,59% (119)	Dominante	0,64 (0,43 - 0,94)	<b>0,0020</b>
	AA	23,17% (219)	21,98% (60)	Recessivo	0,97 (0,62 - 1,5)	1
rs298024	CC	44,76% (423)	54,95% (150)	Aditivo	0,74 (0,55 - 0,99)	<b>0,0068</b>
	CA	44,34% (419)	36,26% (99)	Dominante	0,65 (0,45 - 0,94)	<b>0,0028</b>
	AA	10,9% (103)	8,79% (24)	Recessivo	0,8 (0,42 - 1,5)	0,3750
rs33950471	TT	59,15% (559)	50,55% (138)	Aditivo	1,34 (1,001 - 1,8)	0,0103
	TG	35,24% (333)	42,49% (116)	Dominante	1,46 (1,01 - 2,11)	<b>0,0073</b>
	GG	5,61% (53)	6,96% (19)	Recessivo	1,38 (0,67 - 2,88)	0,2692
rs34762247	AA	62,01% (586)	59,71% (163)	Aditivo	0,92 (0,67 - 1,25)	0,5652
	AC	31,96% (302)	38,1% (104)	Dominante	1,06 (0,73 - 1,55)	0,8571
	CC	6,03% (57)	2,2% (6)	Recessivo	0,29 (0,08 - 0,98)	<b>0,0044</b>
rs6870632	GG	30,08% (284)	38,6% (105)	Aditivo	0,82 (0,63 - 1,07)	0,0479
	GA	50,53% (477)	43,01% (117)	Dominante	0,67 (0,46 - 0,99)	<b>0,0086</b>
	AA	19,39% (183)	18,38% (50)	Recessivo	0,95 (0,59 - 1,52)	0,7500
rs6896215	AA	81,9% (774)	74,36% (203)	Aditivo	1,56 (1,05 - 2,33)	<b>0,0031</b>
	AG	17,14% (162)	24,54% (67)	Dominante	1,65 (1,07 - 2,55)	<b>0,0034</b>
	GG	0,95% (9)	1,1% (3)	Recessivo	1,42 (0,25 - 8,15)	0,6
rs6898082	GG	64,41% (608)	63,24% (172)	Aditivo	1,16 (0,85 - 1,59)	0,28
	GA	32,52% (307)	29,04% (79)	Dominante	0,99 (0,68 - 1,47)	1
	AA	3,07% (29)	7,72% (21)	Recessivo	2,76 (1,26 - 6,03)	<b>0,0007</b>
rs9968728	TT	52,87% (497)	59,71% (163)	Aditivo	0,75 (0,56 - 0,999)	<b>0,0096</b>
	TC	37,66% (354)	34,07% (93)	Dominante	0,71 (0,49 - 1,03)	0,0159
	CC	9,47% (89)	6,23% (17)	Recessivo	0,61 (0,30 - 1,24)	0,0803

\* Regressão logística ajustada para sexo, idade, infecções por helmintos e componentes principais 1 e 2.

Em relação à análise de haplótipos, oito haplótipos foram associados à asma no modelo aditivo (Tabela 5, Figura S2.A) e dezenove usando o modelo dominante (Figura S2.B). Nenhuma associação foi encontrada usando o modelo recessivo (Tabela 5, Figura S3.A). O haplótipo ATA (rs6896215-rs9968728-rs1824154), que era composto por dois alelos de risco, mostrou aumentar duas vezes a chance de asma no modelo aditivo (Tabela 5). Além disso, o

haplótipo AGC (rs1824154-rs16889869-rs298024) que é formado apenas por alelos de risco, foi positivamente associado à asma no modelo aditivo. Os haplótipos GCAGG (rs33950471-rs2112910-rs1824154-rs6870632-rs16889869) e AC (rs16889878-rs298024) eram haplótipos de risco para asma no modelo dominante AGCAG. rs6896215-rs33950471-rs2112910-rs1824154-rs6870632), com apenas um alelo protetor, foi associado ao risco de asma.

### **Associação de variantes e haplótipos no gene PDE4D com atopia**

Doze SNVs foram associados à atopia (Tabela 4). As variantes rs13177163-A, rs159625-T, rs75699812-C e rs80075656-G foram associadas ao risco de atopia em modelos aditivos e dominantes. O rs10472114-C também foi positivamente associado à atopia usando apenas o modelo aditivo. As variantes rs194368-C, rs4700340-T e rs958851-T foram associadas positivamente com atopia no modelo dominante. Notavelmente, as variantes rs159625-T e rs194368-C estão em forte desequilíbrio de ligação (LD;  $r^2 = 0,94$ , Figura S1). Além disso, os SNVs rs4699942-T e rs112873625-C foram associados como fator de proteção para atopia no modelo aditivo e estão em LD forte ( $r^2 = 1$ , Figura S1). O rs17782374-C foi associado a um risco aumentado de atopia no modelo aditivo. Essa variante também foi associada ao modelo recessivo, aumentando quase três vezes o risco de atopia. De forma semelhante, rs9942415-A também foi associado ao modelo recessivo.



**Table 4.** Significant association between *PDE4D* SNVs and atopy.

SNV	Genótipo	Controle	Caso	Modelo	OR (IC 99%)	P-value*
rs10472114	TT	73,82% (561)	66,95% (310)	Aditivo	1,37 (1,01 - 1,85)	<b>0,0053</b>
	TC	24,47% (186)	29,59% (137)	Dominante	1,37 (0,97 - 1,93)	0,0205
	CC	1,71% (13)	3,46% (16)	Recessivo	2,1 (0,77 - 5,73)	0,0432
rs112873625	TT	29,58% (226)	37,8% (175)	Aditivo	0,78 (0,61 - 0,98)	<b>0,0054</b>
	TC	52,36% (400)	48,81% (226)	Dominante	0,71 (0,51 - 0,99)	0,0101
	CC	18,06% (138)	13,39% (62)	Recessivo	0,74 (0,48 - 1,15)	0,0906
rs13177163	GG	76,83% (587)	68,68% (318)	Aditivo	1,41 (1,03 - 1,94)	0,0049
	GA	21,47% (164)	29,59% (137)	Dominante	1,52 (1,07 - 2,16)	<b>0,0022</b>
	AA	1,7% (13)	1,73% (8)	Recessivo	1,02 (0,31 - 3,36)	1
rs159625	CC	76,18% (582)	68,47% (317)	Aditivo	1,39 (1,01 - 1,91)	<b>0,0082</b>
	CT	21,99% (168)	30,02% (139)	Dominante	1,52 (1,07 - 2,16)	<b>0,0023</b>
	TT	1,83% (14)	1,51% (7)	Recessivo	0,80 (0,23 - 2,71)	0,6000
rs17782374	TT	72,91% (557)	67,17% (311)	Aditivo	1,38 (1,02 - 1,85)	<b>0,0056</b>
	TC	25,26% (193)	28,08% (130)	Dominante	1,33 (0,95 - 1,88)	0,0260
	CC	1,83% (14)	4,75% (22)	Recessivo	2,75 (1,07 - 7,07)	<b>0,0033</b>
rs194368	TT	76,12% (577)	69,48% (321)	Aditivo	1,31 (0,95 - 1,8)	0,0389
	TC	22,03% (167)	29,22% (135)	Dominante	1,43 (1,003 - 2,03)	<b>0,0089</b>
	CC	1,85% (14)	1,3% (6)	Recessivo	0,68 (0,19 - 2,49)	0,3830
rs4699942	GG	29,58% (226)	37,8% (175)	Aditivo	0,78 (0,61 - 0,98)	<b>0,0054</b>
	GT	52,36% (400)	48,81% (226)	Dominante	0,71 (0,51 - 0,99)	0,0101
	TT	18,06% (138)	13,39% (62)	Recessivo	0,74 (0,48 - 1,15)	0,0906
rs4700340	CC	76,7% (586)	69,76% (323)	Aditivo	1,40 (1,01 - 1,94)	0,0110
	CT	22,12% (169)	28,08% (130)	Dominante	1,44 (1,01 - 2,06)	<b>0,0080</b>
	TT	1,18% (9)	2,16% (10)	Recessivo	1,62 (0,45 - 5,84)	0,2800
rs75699812	TT	88,35% (675)	83,59% (387)	Aditivo	1,64 (1,07 - 2,51)	0,0043
	TC	11,39% (87)	15,33% (71)	Dominante	1,62 (1,03 - 2,56)	<b>0,0074</b>
	CC	0,26% (2)	1,08% (5)	Recessivo	4,81 (0,54 - 42,64)	0,0147
rs80075656	TT	88,32% (673)	83,33% (385)	Aditivo	1,69 (1,11 - 2,59)	<b>0,0018</b>
	TG	11,55% (88)	15,37% (71)	Dominante	1,63 (1,04 - 2,57)	<b>0,0045</b>
	GG	0,13% (1)	1,3% (6)	Recessivo	11,74 (0,71 - 194,1)	-
rs958851	GG	67,32% (513)	59,83% (277)	Aditivo	1,33 (1,00 - 1,77)	0,0108
	GT	29,53% (225)	36,72% (170)	Dominante	1,41 (1,02 - 1,96)	<b>0,0079</b>
	TT	3,15% (24)	3,46% (16)	Recessivo	1,25 (0,52 - 3,00)	0,4571
rs9942415	GG	67,23% (513)	63,42% (293)	Aditivo	1,26 (0,95 - 1,66)	0,0439
	GA	29,75% (227)	30,74% (142)	Dominante	1,2 (0,86 - 1,67)	0,1589
	AA	3,01% (23)	5,84% (27)	Recessivo	2,25 (1,01 - 4,99)	<b>0,0064</b>

\* Regressão logística ajustada para sexo, idade, infecções por helmintos e componentes principais 1 e 2.

**Tabela 5.** Associações mais significativas ( $p < 0,001$ ) entre os haplótipos *PDE4D* com asma e atopia por regressão logística ajustada para sexo, idade, infecções por helmintos e componentes principais 1 e 2.

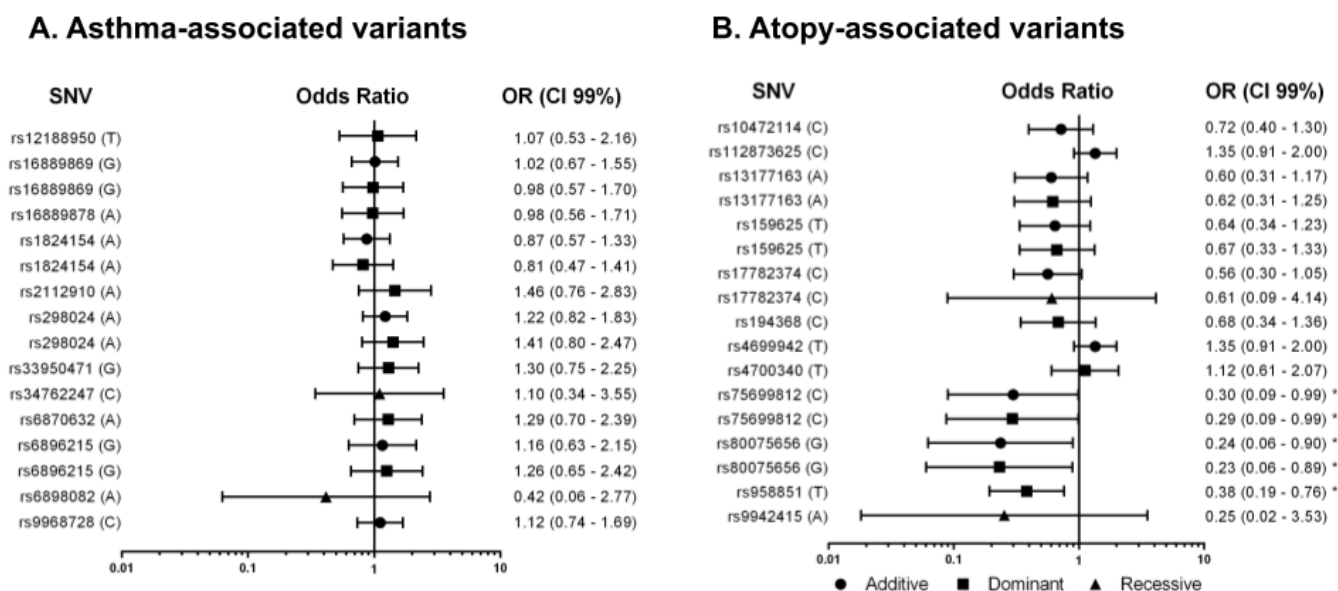
Fenótipo	Haplótipo					Frequência		OR (IC 99%)	p-value				
	rs6896215	rs9968728	rs1824154	rs16889869	rs298024	Controle	Caso						
Asma - Aditivo	-	-	-	-	A	C	-	-	-	0,29	0,23	REF	-
	-	-	-	-	G	T	-	-	-	0,09	0,14	1,83 (1,17 - 2,88)	0,0006
	-	-	-	-	-	C	G	-	-	0,17	0,14	REF	-
	-	-	-	-	-	T	A	-	-	0,17	0,26	1,83 (1,18 - 2,84)	0,0004
	-	-	-	-	-	-	-	A	A	0,27	0,2	REF	-
	-	-	-	-	-	-	-	G	C	0,23	0,29	1,65 (1,14 - 2,4)	0,0006
	-	-	-	-	A	C	G	-	-	0,17	0,14	REF	-
	-	-	-	-	A	T	A	-	-	0,13	0,21	1,96 (1,21 - 3,18)	0,0004
	-	-	-	-	-	-	G	A	A	0,25	0,2	REF	-
						A	G	C	0,18	0,24	1,68 (1,13 - 2,52)	0,0009	
Asma - Dominante	rs6896215	rs33950471	rs2112910	rs1824154	rs6870632	rs16889869	rs16889878	rs298024	rs12188950				
	-	-	-	-	-	-	G	A	-	0,29	0,21	REF	-
	-	-	-	-	-	-	A	C	-	0,18	0,22	1,66 (1,12 - 2,46)	0,001
	-	T	A	G	-	-	-	-	-	0,39	0,33	REF	-
	-	G	C	A	-	-	-	-	-	0,09	0,16	2,05 (1,31 - 3,21)	0,0001
	A	T	A	G	-	-	-	-	-	0,37	0,29	REF	-
	A	G	C	A	-	-	-	-	-	0,07	0,13	2,11 (1,25 - 3,57)	0,0002
	-	T	A	G	A	-	-	-	-	0,35	0,31	REF	-
	-	G	C	A	G	-	-	-	-	0,09	0,16	1,99 (1,26 - 3,14)	0,0001
	A	T	A	G	A	-	-	-	-	0,33	0,27	REF	-
	A	G	C	A	G	-	-	-	-	0,07	0,13	2,03 (1,19 - 3,45)	0,0006
-	T	A	G	A	A	-	-	-	0,35	0,31	REF	-	
-	G	C	A	G	G	-	-	-	0,08	0,14	1,92 (1,19 - 3,11)	0,0005	

	rs75699812	rs17782374	rs80075656	rs10472114	rs13177163	rs4699942	rs112873625	rs159625	Control	Case		
	-	T	T	-	-	-	-	-	0,85	0,81	REF	-
	-	C	C	-	-	-	-	-	0,05	0,08	1,83 (1,17 - 2,86)	0,0005
	-	-	-	-	-	G	T	-	0,44	0,38	REF	-
	-	-	-	-	-	A	G	-	0,12	0,17	1,57 (1,11 - 2,22)	0,0009
	-	T	T	T	-	-	-	-	0,84	0,81	REF	-
	-	C	C	G	-	-	-	-	0,05	0,08	1,83 (1,17 - 2,87)	0,0006
	-	-	T	T	T	-	-	-	0,73	0,65	REF	-
	-	-	C	G	T	-	-	-	0,04	0,07	1,96 (1,17 - 3,29)	0,0008
<b>Atopia - Aditivo</b>	-	-	-	-	-	G	T	C	0,44	0,38	REF	-
	-	-	-	-	-	A	G	T	0,12	0,17	1,57 (1,11 - 2,22)	0,0009
	-	T	T	T	T	-	-	-	0,72	0,65	REF	-
	-	C	C	G	T	-	-	-	0,04	0,07	2,09 (1,25 - 3,49)	0,0002
	-	-	T	T	T	G	-	-	0,73	0,64	REF	-
	-	-	C	G	T	G	-	-	0,04	0,07	1,95 (1,17 - 3,26)	0,0008
	-	T	T	T	T	G	-	-	0,72	0,64	REF	-
	-	C	C	G	T	G	-	-	0,04	0,07	2,08 (1,24 - 3,48)	0,0003
	-	-	T	T	T	G	T	-	0,36	0,29	REF	-
	-	-	C	G	T	G	G	-	0,02	0,04	2,93 (1,31 - 6,56)	0,0006
		rs75699812	rs958851	rs80075656	rs4700340	rs13177163	rs159625	rs194368	Control	Case		
<b>Atopia - Dominante</b>	-	-	T	G	T	-	-	-	0,81	0,77	REF	-
	-	-	C	T	G	-	-	-	0,05	0,08	1,82 (1,15 - 2,88)	0,0008

Considerando a análise baseada em haplótipos de atopia, 27 haplótipos foram associados no modelo aditivo (Figura S2.C), 17 deles foram associados com atopia usando o modelo genético dominante (Figura S2.D). A tabela 5 resume os haplótipos associados mais significativos com um valor de p inferior a 0,001. Nenhuma associação foi observada em relação ao modelo recessivo (Figura S3.B). O haplótipo AGT (rs13177163-rs4699942-rs112873625), foi associado como um haplótipo de risco (Tabela 5), como mencionado antes, rs4699942 e rs112873625 estão no mesmo bloco LD (Figura 1). Os haplótipos  $\text{CGTGG}$  (rs75699812-rs17782374-rs80075656-rs10472114-rs13177163) e  $\text{CGTGG}$  (rs17782374-rs80075656-rs10472114-rs13177163-rs4699942 tinham uma chance significativa de alleles 4 e 4 elevado em risco elevado). No modelo dominante, o haplótipo CTG (rs75699812-rs958851-rs80075656) também foi associado a um risco aumentado de atopia.

### Associação de SNVs *PDE4D* com produção de IL-10

As variantes rs75699812-C, rs8007656-G e rs958851-T foram negativamente associadas à produção de IL-10. Indivíduos portadores de tais alelos têm 3-4 vezes mais probabilidade de não produzir níveis detectáveis de IL-10 (Figura 1). Nenhum outro SNV foi associado à produção de IL-10 em nossa população (Figura 1).



**Figura 1. Forest plot mostrando a análise de entre variantes associadas à asma e atopia com a produção de IL-10.** Gráfico gerado usando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) ..

## Avaliação do impacto funcional

Uma correlação entre rs6898082-A e expressão aumentada de *PDE4D* em sangue total foi observada na base de dados GTEx (Figura S4). Nenhum outro SNV foi associado à expressão *PDE4D* (dados não mostrados).

## Discussão

Variantes do *PDE4D* já foram associadas à asma, porém existem poucos estudos, especialmente em populações latino-americanas.<sup>6,11</sup> Em nosso estudo, 24 SNVs foram significativamente associados a fenótipos de asma ou alergia em uma população brasileira. Aqui, as variantes rs6898082, rs16889869, rs33950471, rs1824154, rs6896215 e rs16889878 foram associadas positivamente à asma.

O genótipo AA de rs6898082 aumentou quase três vezes o risco de apresentar sintomas de asma. Além disso, esse mesmo genótipo foi relacionado ao aumento da expressão de *PDE4D* no sangue total. Essa variante está localizada em uma região acentuadora do tecido pulmonar fetal e demonstrou modificar a sequência de 4 motivos que interagem com o fator de transcrição (FT), como o POU2F2, que está envolvido no desenvolvimento de células B.<sup>21</sup> Assim, esse achado pode explicar sua impacto no aumento da transcrição de *PDE4D* que potencialmente se relaciona com a menor produção de AMPc e, conseqüentemente, maior susceptibilidade à asma.

O rs16889869 está localizado na região do acentuador em células Th17. A variante rs33950471 também está localizada em uma região marcada como acentuador em muitas células T auxiliares. Embora o papel do AMPc em células não Th17 seja melhor compreendido, há evidências de uma produção aumentada de citocinas Th17 mediada por AMPc.<sup>22</sup>

As variantes rs1824154 e rs6896215 estão localizadas em uma região acentuadora no DNA de células do pulmão fetal. O rs6896215 também está em uma região promotora em células do pulmão fetal e nas células T auxiliares, além disso, está em uma região de ligação CEBPB (um TF responsivo a glicocorticoides pleiotrópico) e impacta em uma afinidade mais alta para alguns TF, como FOXP1. Curiosamente, ambos os fatores de transcrição estão envolvidos na

organogênese pulmonar e na resposta imune.<sup>23,24</sup> Além disso, uma maior expressão de *FOXP1* é observada na asma quando comparada a indivíduos sem asma.<sup>23</sup>

As variantes rs12188950, rs298024, rs2112910, rs34762247, rs6870632 e rs9968728 foram associadas como fatores de proteção para asma. Essas variantes também estão localizadas em regiões regulatórias para a expressão gênica em vários tecidos com base em dados de Haploreg. A variante rs12188950 encontra-se nas regiões promotoras e acentuadoras em muitos tecidos, incluindo células primárias T auxiliares *naive* do sangue periférico e também no pulmão fetal. A presença do alelo variante reduz a afinidade com o TF RFX5 com base na previsão in silico. O RFX5 é conhecido como um FT importante no desenvolvimento do sistema imune adaptativo por promover a expressão de MHC-II, podendo também influenciar a expressão de outros genes.<sup>25</sup> Assim, essa variante pode conferir uma ligação fraca ao FT e, conseqüentemente, tem potencial para reduzir a expressão de *PDE4D* em células do sistema imunológico.

O rs6870632 altera a afinidade relativa ao fator nuclear de células T ativadas, resultando em uma ligação mais fraca desse TF no DNA.<sup>19</sup> Essa variante pode resultar em uma expressão mais baixa de *PDE4D* em células T. Uma expressão mais elevada de *PDE4D* é observada em células T efetoras ativadas.<sup>26</sup> Uma expressão reduzida de *PDE4D* aumenta os níveis de cAMP. Em linfócitos T efetores, níveis elevados de AMPc promovem a inibição do fator nuclear-kappaB (NF-κB) e do fator nuclear de ativação de células T ativadas (NFAT) resultando na supressão da produção de citocinas inflamatórias, como IL-2.<sup>9</sup> Além disso, células Treg a atividade é dependente de altas concentrações de AMPc que podem promover a produção de IL-10 e também podem ser liberados no citoplasma de outros linfócitos através das junções GAP.<sup>9</sup> Porém, não pudemos mostrar uma associação entre esta variante e a produção de IL-10.

Em relação à análise de haplótipos, foi observada a combinação de poucos alelos de risco, e essas combinações foram relacionadas ao aumento da suscetibilidade à asma, por exemplo, o GCAGG (rs33950471-rs2112910-rs1824154-rs6870632-rs16889869) cuja frequência é maior na asma quando comparado com não asma.

Os rs112873625 e rs4699942 foram associados como proteção para atopia e ambos estão em LD completo e foram relacionados à alteração da sequência de motivos de DNA, especialmente rs4699942 em Haploreg. De acordo com esse achado, rs4699942 está associado a uma expressão mais baixa de *PDE4D* em um grande estudo de metanálise de eQTLs no sangue.<sup>27</sup> É possível que essa variante contribua para a redução da expressão de *PDE4D*.

A presença das variantes rs958851, rs17782374, rs159625, rs4700340, rs13177163, rs75699812 e rs80075656 aumentou o risco de atopia. Todas as variantes foram relacionadas a acentuador, promotor, pico de DNase ou sítios de ligação de proteína, portanto, elas podem prejudicar a regulação gênica promovendo uma maior expressão de *PDE4D*. Uma correlação entre rs4700340 e maior expressão de *PDE4D* é relatada por um banco de dados eQTL em sangue total.<sup>27</sup> Um haplótipo compreendido por rs75699812, rs958851 e rs80075656 (CTG) foi mais observado em indivíduos atópicos do que não atópicos. Além disso, essas três variantes foram negativamente associadas à produção espontânea de IL-10. Foi demonstrado um aumento da produção de IL-10 por células dendríticas quando tratadas com um inibidor de PDE4, que atenua sua capacidade de promoção de Th2.<sup>29</sup> Baixas concentrações de cAMP em células dendríticas são cruciais para induzir um perfil de Th2, estimulando a ativação de linfócitos, que expressam altos níveis de PDE4D.<sup>28</sup> Portanto, o mecanismo pelo qual a combinação dessas variantes aumenta o risco de atopia pode estar reduzindo a produção de IL-10, uma importante citocina imunorreguladora.

Em resumo, os SNVs e seus haplótipos em *PDE4D* estão significativamente associados à asma e alergia. Portanto, essas variantes podem desempenhar um papel crucial na fisiopatologia da asma e alergia, possivelmente por afetar a regulação da expressão gênica e, conseqüentemente, a produção da enzima fosfodiesterase. É possível que essas variantes estejam modulando a inflamação, prejudicando a produção de IL-10 e também modificando o desenvolvimento pulmonar. Mais estudos são necessários para entender melhor o mecanismo pelo qual as variantes de *PDE4D* afetam a asma e a alergia.

## Referências

1. Global Burden Disease 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Respiratory Medicine*, **5**, 691 - 706 (2017).
2. Ferrante, G. & La Grutta, S. The burden of pediatric asthma. *Front. Pediatr.* **6**, 1–7 (2018).
3. Solé, D., Camelo-Nunes, I. C., Wandalsen, G. F. & Mallozi, M. C. Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Rev. Paul. Pediatr.* **32**, 114–125 (2014).
4. Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and prevention*. [ginasthma.org/gina-reports/](http://ginasthma.org/gina-reports/) (2021).
5. Willis-Owen, S. A. G., Cookson, W. O. C. & Moffatt, M. F. The genetics and genomics of asthma. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **19**, 223–246 (2018).
6. Himes, B. E. *et al.* Genome-wide Association Analysis Identifies PDE4D as an Asthma-Susceptibility Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 581–593 (2009).
7. Trian, T. *et al.*  $\beta$ 2-agonist induced cAMP is decreased in asthmatic airway smooth muscle due to increased PDE4D. *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
8. Méhats, C. *et al.* PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction. *FASEB J.* **17**, 1831–1841 (2003).
9. Jimenez, José L.; Punzón, Carmen; Navarro, Joaquín; Muñoz-Fernández, M. Angeles; Fresno, M. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor of activated T cells activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 753–759 (2001).
10. Landells, L. J., Spina, D., Souness, J. E., O'Connor, B. J. & Page, C. P. A biochemical and functional assessment of monocyte phosphodiesterase activity in healthy and asthmatic subjects. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **13**, 231–239 (2000).
11. Ding, L. *et al.* Rank-based genome-wide analysis reveals the association of Ryanodine receptor-2 gene variants with childhood asthma among human populations. *Hum. Genomics* **7**, 1–17 (2013).
12. Teixeira, H. M. P., Alcantara-Neves, N. M., Barreto, M., Figueiredo, C. A. & Costa, R. S. Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. *Mol. Immunol.* **82**, 137–145 (2017).
13. De Paiva, A. C. Z., Marson, F. A. de L., Ribeiro, J. D. & Bertuzzo, C. S. Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **10**, 1–9 (2014).
14. Alcantara-Neves, N. M. *et al.* The effect of single and multiple infections on atopy



and wheezing in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, (2012).

15. Figueiredo, C. A. *et al.* Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environ. Health Perspect.* **117**, 845–849 (2009).

16. Sinnwell JP, S. D. Package “haplo.stats”.

17. Luna, A. & Nicodemus, K. K. snp.plotter: An R-based SNP/haplotype association and linkage disequilibrium plotting package. *Bioinformatics* **23**, 774–776 (2007).

18. GTEx Consortium, Ardlie, K. G., Deluca, D. S., Segrè, A. V., Sullivan, T. J., Young, T. R., ... & Dermitzakis, E. T. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*, 348(6235), 648-660.

19. Ward, L. D. & Kellis, M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* **40**, 930–934 (2012).

20. Boyle, A. P. *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* **22**, 1790–1797 (2012).

21. Corcoran, L. *et al.* Oct2 and Obf1 as facilitators of B: T cell collaboration during a humoral immune response. *Front. Immunol.* **5**, 1–14 (2014).

22. Yoshida, N. *et al.* ICER is requisite for Th17 differentiation. *Nat. Commun.* **7**, (2016).

23. Pniewska, E. *et al.* Exacerbating factors induce different gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from asthmatics, patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy subjects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **165**, 229–243 (2014).

24. Roos, A. B. & Nord, M. The emerging role of C/EBPs in glucocorticoid signaling: Lessons from the lung. *J. Endocrinol.* **212**, 291–305 (2012).

25. Xia, J. *et al.* SIRT1 deacetylates RFX5 and antagonizes repression of collagen type I (COL1A2) transcription in smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **428**, 264–270 (2012).

26. Peter, D. *et al.* Predominant Role of PDE4D 1. **4**, (2007).

27. Westra, H. J. *et al.* Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat. Genet.* **45**, 1238–1243 (2013).

28. Lee, J. *et al.* Cyclic AMP concentrations in dendritic cells induce and regulate Th2 immunity and allergic asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1529–1534 (2015).

29. Bros, M., Montermann, E., Cholaszczyńska, A. & Reske-Kunz, A. B. The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast augments the Th17-promoting capability of dendritic cells by enhancing IL-23 production, and impairs their T cell stimulatory activity due to elevated IL-10. *Int. Immunopharmacol.* **35**, 174–184 (2016).

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

A via da fosfodiesterase é ativada pela ligação de um agonista ao  $\beta_2$  adrenoreceptor, que tem um importante papel no contexto da asma. O gene *PDE4D* já foi associado com asma em um trabalho de *Genome Wide Association Study* (GWAS) (HIMES et al., 2009), tal como variantes neste gene foram associadas com a resposta ao broncodilatador de curta ação (LABUDA et al., 2011). Alguns estudos já apontam uma correlação entre o aumento na expressão do RNA mensageiro e hiperresponsividade das vias aéreas (DENG et al., 2006). Os resultados deste estudo mostram que há associação de variantes no gene *PDE4D* com sintomas de asma e atopia em uma população brasileira. A maioria das variantes associadas neste estudo são intrônicas, e, possivelmente, podem ter algum papel na expressão e regulação gênica. Conforme demonstrado por (SODA et al., 2013), a dinâmica entre fatores de transcrição e o gene *PDE4D* alteram significativamente a expressão gênica. Desta forma, é plausível que alterações genéticas que modifiquem a interação com repressores e acentuadores alterem a expressão de *PDE4D* de forma que a expressão diferencial da enzima altere a susceptibilidade aos fenótipos estudados.

Neste estudo, identificamos que indivíduos homocigotos considerando a variante rs6898082-A possuem quase três vezes mais chances de desenvolver asma. Ademais, este mesmo genótipo foi relacionado ao aumento da expressão de *PDE4D* em sangue total (GTEX). Essa variante está localizada em uma região acentuadora do tecido pulmonar fetal e demonstrou modificar a sequência de 4 motivos que interagem com fatores de transcrição, como o POU2F2, que está envolvido no desenvolvimento de células B (CORCORAN et al., 2014). Assim, esse achado pode explicar sua impacto no aumento da transcrição de *PDE4D* que potencialmente se relaciona com a menor produção de cAMP e, conseqüentemente, maior susceptibilidade à asma.

Dentre as variantes associadas com atopia, destacam-se as variantes rs75699812-C, rs8007656-G e rs958851-T que foram associadas como fatores de risco para atopia. Além disso, o haplótipo CGT formado pelas três variantes foi também associado com maior risco para a presença de atopia. Estas mesmas variantes foram negativamente associadas à produção de IL-10. Indivíduos portadores de tais alelos têm 3-4 vezes mais chance de não produzir níveis detectáveis da citocina IL-10. Foi demonstrado um aumento da produção de IL-10 por células dendríticas quando tratadas com um inibidor de *PDE4*, que atenua sua capacidade de promoção de Th2 (BROS et al., 2016). Adicionalmente, evidências indicam que

baixas concentrações de AMPc em células dendríticas são cruciais para induzir um perfil de Th2, estimulando a ativação de linfócitos, que expressam altos níveis de PDE4D (LEE et al., 2015). Portanto, o mecanismo pelo qual a combinação dessas variantes aumenta o risco de atopia pode ser por meio da redução da produção de IL-10, uma importante citocina imunomoduladora.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo demonstra que variantes no gene *PDE4D* e seus haplótipos estão significativamente associados à asma e atopia. Portanto, essas variantes podem desempenhar um papel crucial na fisiopatologia destas condições possivelmente por afetar a regulação da expressão gênica e, conseqüentemente, a produção da enzima fosfodiesterase. É possível que essas variantes estejam modulando a inflamação, impactando assim na produção de IL-10 e também modificando o desenvolvimento pulmonar adequado. Apesar do potencial impacto destes fatores genéticos na asma, pouco se sabe sobre o real impacto biológico destas variantes. Sendo assim, mais estudos são necessários para entender melhor o mecanismo pelo qual as variantes do *PDE4D* afetam a asma e a alergia. É necessário que haja uma compreensão mais profunda acerca, tendo em vista o potencial de variantes genéticas como marcadores moleculares no diagnóstico da asma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDI, Bruno Guedes, et al. Highlights of the Brazilian Thoracic Association guidelines for interstitial lung diseases. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2012, 38: 282-291.
- BEUTE, Jan, et al. A pathophysiological role of PDE3 in allergic airway inflammation. **JCI insight**, 2018, 3.2.
- BRAMAN, Sidney S. The global burden of asthma. **Chest**, 2006, 130.1: 4S-12S.
- BROS, Matthias, et al. The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast augments the Th17-promoting capability of dendritic cells by enhancing IL-23 production, and impairs their T cell stimulatory activity due to elevated IL-10. **International immunopharmacology**, 2016, 35: 174-184.
- CARDOSO, Thiago de Araujo, et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. **Jornal brasileiro de pneumologia**, 2017, 43: 163-168.
- CHIANG, C. Y., et al. Management of asthma in resource-limited settings: Role of low-cost corticosteroid/ $\beta$ -agonist combination inhaler. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 2015, 19.2: 129-136.
- CORCORAN, Lynn M. et al. Oct2 and Obf1 as facilitators of B: T cell collaboration during a humoral immune response. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 108, 2014.
- DENG, Yang-mei, et al. Effects of ciclamilast, a new PDE 4 PDE4 inhibitor, on airway hyperresponsiveness, PDE4D expression and airway inflammation in a murine model of asthma. **European journal of pharmacology**, 2006, 547.1-3: 125-135.
- DE PAIVA, Ana Carolina Zimiani, et al. Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, 2014, 10.1: 1-9.
- ESSAYAN, David M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2001, 108.5: 671-680.
- FALK, Nathan; HUGHES, Scott W.; RODGERS, Blake C. Medications for chronic asthma. **American family physician**, 2016, 94.6: 454-462.
- FERRANTE, Giuliana; LA GRUTTA, Stefania. The burden of pediatric asthma. **Frontiers in pediatrics**, 2018, 6: 186.
- GBD 2015 CHRONIC RESPIRATORY DISEASE COLLABORATORS, et al. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 2017, 5.9: 691.
- GINA, Global Initiative for Asthma - global strategy for asthma management and prevention, 2021. Disponível em: <https://ginasthma.org/>
- GTEX CONSORTIUM et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*, v. 348, n. 6235, p. 648-660, 2015.

HANSEN, Gesine, et al. Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2000, 97.12: 6751-6756.

HIMES, Blanca E., et al. Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene. **The American Journal of Human Genetics**, 2009, 84.5: 581-593.

HOLGATE, Stephen T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature medicine**, 2012, 18.5: 673-683.

JIMENEZ, José Luis, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor of activated T cells activation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2001, 299.2: 753-759.

KROEGEL, Claus; FOERSTER, Martin. Phosphodiesterase-4 inhibitors as a novel approach for the treatment of respiratory disease: cilomilast. **Expert opinion on investigational drugs**, 2007, 16.1: 109-124.

LABUDA, Malgorzata, et al. Phosphodiesterase type 4D gene polymorphism: association with the response to short-acting bronchodilators in paediatric asthma patients. **Mediators of inflammation**, 2011, 2011.

LAMBRECHT, Bart N.; HAMMAD, Hamida. The immunology of asthma. **Nature immunology**, 2015, 16.1: 45-56.

LANDELLS, L. J., et al. A biochemical and functional assessment of monocyte phosphodiesterase activity in healthy and asthmatic subjects. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, 2000, 13.5: 231-239.

LEE, Jihyung, et al. Cyclic AMP concentrations in dendritic cells induce and regulate Th2 immunity and allergic asthma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2015, 112.5: 1529-1534.

MATERA, Maria Gabriella, et al. New avenues for phosphodiesterase inhibitors in asthma. **Journal of Experimental Pharmacology**, 2021, 13: 291.

MEHATS, Celine, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 2002, 13.1: 29-35.

OBER, Carole; YAO, Tsung-Chieh. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. **Immunological reviews**, 2011, 242.1: 10-30.

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

PEARCE, Neil, et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, 2007, 62.9: 758-766.

RICHTER, Wito; JIN, S.-L. Catherine; CONTI, Marco. Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. **Biochemical Journal**, 2005, 388.3: 803-811.

SIROUX, Valérie, et al. Genetic heterogeneity of asthma phenotypes identified by a clustering approach. **European Respiratory Journal**, 2014, 43.2: 439-452.

SODA, T. et al. DISC1–ATF4 transcriptional repression complex: dual regulation of the cAMP-PDE4 cascade by DISC1. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 8, p. 898-908, 2013.

SOLÉ, Dirceu, et al. Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Revista Paulista de Pediatria**, 2014, 32: 114-125.

TAVARES, Luciana P. et al. Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation. **Pharmacological research**, v. 159, p. 105030, 2020.

TEIXEIRA, Helena MP, et al. Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. **Molecular immunology**, 2017, 82: 137-145.

TRIAN, Thomas, et al.  $\beta$ 2-Agonist induced cAMP is decreased in asthmatic airway smooth muscle due to increased PDE4D. **PloS one**, 2011, 6.5: e20000.

WILLIS-OWEN, Saffron AG; COOKSON, William OC; MOFFATT, Miriam F. The genetics and genomics of asthma. **Annual review of genomics and human genetics**, 2018, 19: 223-246.

## **ANEXO**

Instruções para autores em relação à submissão do manuscrito, disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13993038/homepage/forauthors.html>.

### **ORIGINAL PAPERS REQUIREMENTS**

i. Word limit: 2,500 words maximum, excluding abstract, figure legends and references.

Structure: Introduction, Methods, Results, Discussion.

Abstract: 250 words maximum; must be structured, under the sub-headings:

Background: Problem that prompted the study and aim(s) of the study

Methods: If the space is short, only the primary outcomes

Results: The most important findings only

Conclusion: The most important inclusion only

Keywords: Up to 7 keywords.

References: Maximum of 30 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and tables.

The main text file should be presented in the following order and be line numbered throughout:

- i. A statement with potential conflict of interests related to the manuscript content;
- ii. Financial support;
- iii. Abstract and keywords;
- iv. Main text;
- v. Acknowledgments;
- vi. Impact statement;
- vii. References;
- viii. Tables (each table complete with title and footnotes);
- ix. Figure legends;
- x. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.



## References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals.

## APÊNDICE

Article type: Original

### ***PDE4D* gene variants and haplotypes are associated with asthma and atopy in Brazilian children**

#### **i. Conflict of interests**

All authors declare no conflicts of interest.

#### **ii. Financial support**

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Brazilian National Research Council (CNPq) and Foundation for Research Support of the State of Bahia (FAPESB).

#### **iii. Abstract**

##### **Background**

Asthma is a common heterogeneous and inflammatory disease caused by the complex interplay of environmental and genetic factors. The *PDE4D* (Phosphodiesterase 4D) gene encodes an enzyme involved in the metabolism of the second messenger, cyclic AMP. *PDE4D* genetic variants have been previously described as playing a role in asthma susceptibility. Therefore, the objective of this study was to investigate the association between *PDE4D* variants (and their haplotypes) with asthma and atopy in a Brazilian population.

##### **Methods**

The study comprised 1,246 unrelated participants from the SCAALA (Social Changes Asthma and Allergy in Latin America) program. Genotyping was performed using the Illumina 2.5 Human Omni bead chip. A multivariate logistic regression was used to investigate the association between *PDE4D* variants and asthma/atopy phenotypes in PLINK 1.09 software.

##### **Results**

Twenty-four SNVs in *PDE4D* were associated with atopy or asthma. The rs6898082 (A) variant increased asthma susceptibility (OR 2.76; CI 99% 1.26-6.03) and was also related to a greater *PDE4D* expression in the GTEx database. In addition, the variants rs75699812 (C), rs8007656 (G) and rs958851 (T) were positively associated as risk to atopy and negatively associated with IL-10 production. Moreover, these variants formed an atopy risk haplotype (OR 1.82; CI 99% 1.15-2.88). Functional *in*

*silico* assessment showed that some *PDE4D* SNVs may have an impact on gene regulation and expression.

## Conclusion

Variants in the *PDE4D* are significantly associated with asthma and allergy markers. It is possible that these variants lead to alteration in *PDE4D* expression and therefore impact on immunity and pulmonary function.

**Keywords:** SNVs; phosphodiesterase; cAMP; asthma; *PDE4D*; atopy; IL-10

## iv. Main text

### Introduction

Asthma is a chronic respiratory disorder that affects approximately 358 million people worldwide and is considered the most prevalent chronic condition in children.<sup>1,2</sup> In Brazil, the prevalence of asthma symptoms is estimated at 23.4% among children aged 6-7 years old.<sup>3</sup> Asthma is characterized as an obstructive disease in which the inflammation causes airway hyperresponsiveness, thus eliciting symptoms such as chest tightness, cough, shortness of breath, and wheeze.<sup>4</sup> These symptoms are usually associated with variable expiratory airflow limitation, which is often reversible.<sup>4</sup>

Asthma is considered a heterogeneous and complex disease resulted from interaction between genetic, epigenetic and environmental factors. The role of genetic background in asthma susceptibility has been demonstrated by the association of several genetic *loci*.<sup>5</sup> Among such *loci*, *PDE4D* (Phosphodiesterase type 4D) gene was identified as an asthma susceptibility gene in a Genome Wide Association Studies (GWAS), in which the results were replicated using independent populations.<sup>6</sup>

*PDE4D* is a member of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) superfamily of cAMP-degrading specific enzymes. *PDE4D* protein is downstream in the  $\beta_2$  adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) pathway that promotes cAMP elevation due the stimulation of adenylyl cyclase activity.<sup>7</sup> In airway smooth muscle (ASM) cells, cAMP leads to PKA activation causing the phosphorylation of proteins involved in muscle relaxation.<sup>8</sup> The bronchodilator effect promoted by  $\beta_2$ -agonists is therapeutically explored to control asthma symptoms. *PDE4D* is the main phosphodiesterase subtype involved in the negative regulation of bronchial contractility, leading to ASM relaxation.<sup>8</sup> Also, there is current evidence that cAMP levels influence the production of IL-10, a key immunomodulatory cytokine.<sup>9</sup> Studies have shown that individuals with asthma or allergy have a greater expression and activity of *PDE4D* in both ASM and immune cells than individuals without such conditions.<sup>7,10</sup>

Variants in genes involved in the adrenergic pathway, including in *PDE4D*, have already shown to influence asthma susceptibility.<sup>6,11</sup> Some of these studies were conducted in Brazil, although none have analyzed the *PDE4D*.<sup>12,13</sup> Thus, the objective of this study was to investigate the association between SNVs (Single

Nucleotide Variants) on *PDE4D* gene with asthma symptoms and atopy in a Brazilian population.

## **Material and Methods**

### **Study population and design**

The study comprised 1,246 unrelated children aged 4-11 years old enrolled in SCAALA (Social Change, Asthma, Allergy in Latin American) Brazilian cohort.<sup>14,15</sup> The project was approved by the ethics committee of Federal University of Bahia (registry 003-05/CEP-ISC) and also by National Council of Ethics in Research (CONEP, resolution number 15 895/2011).

### **Asthma and Atopy definition**

A Portuguese-adapted version of the ISAAC questionnaire was used to classify the children into case/control. Cases were defined by the presence of at least one of the following parameters in the last 12 months: clinical diagnosis of asthma; occurrence of wheezing with exercise; four or more episodes of wheezing; waking up at night because of wheezing.

Serum IgE against the most common aeroallergens found in Salvador such as mites (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*) and cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*), were evaluated as previously described by Alcantara-Neves and collaborators (2012).<sup>14</sup> Children who had positive IgE test for at least one allergen were defined as atopic.

### **Spontaneous IL-10 production**

Whole blood cells were cultivated (1:4) in supplemented RPMI at 37°C, 5% of CO<sub>2</sub> for 24 hours in order to detect IL-10 production. Supernatant fluid was collected and level of IL-10 was determined using Pharmingen BD antibody pairs and recombinant standards (Pharmingen, San Diego, Ca, USA) by capture ELISA following the manufacturer's instructions.<sup>15</sup>

### **DNA extraction and genotyping**

DNA was extracted from peripheral blood using a commercial kit (Flexigene DNA Kit, Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol recommended by the manufacturer. Genotyping was performed using the Illumina 2.5 Human Omni bead chip. Genetic markers in *PDE4D* were extracted considering the location 58264865 to 59784925 on chromosome 5 (GRCh37). A quality control was posteriorly applied in markers using the exclusion filters: genotyping rate <0.9; Hardy-Weinberg Equilibrium deviation ( $p < 0.0001$ ); minor allele frequency (MAF) <0.05.

### **Statistical analysis**

Association analysis was conducted in PLINK 1.09 software by a multivariate logistic regression, including age, sex and helminth infection as covariates. Principal Component Analysis (PCA) were also performed to generate the two first PCs, which

were included in regression to control the influence of population structure, which is crucial considering that Brazil populations are highly admixed. Analysis was carried out in three inheritance models (additive, dominant and recessive) and considered significant if the p-value was less than 0.01. Furthermore, an adaptive permutation approach was used to solve the problem of multiple tests.

Linkage Disequilibrium (LD) plot was obtained using the Haploview software. Haplotype-based association analysis was performed using the R package *haplo.stats*<sup>16</sup> by a multivariate logistic regression. A sliding window approach (2 – 5 SNVs per window) was performed considering a window framework grouping neighboring SNVs, the framework slid across the region shifting one SNV at time. All comparisons considered the protective haplotype as the baseline. A graphical assessment of the haplotype analysis was generated using the R package *snp.plotter*.<sup>17</sup> Haplotype analysis was carried out considering the genetic model of the associated variants.

### ***In silico* analysis**

GTEx database was used to investigate the impact of the variants on gene expression. Therefore, it permits to identify eQTL according to a genotype and relative expression of the gene.<sup>18</sup>

## **Results**

### **Study population**

Characteristics of the study population are summarized in Table 1. We observed greater proportions of children with asthma in the younger group. The proportion of atopy was also greater in asthma than in non-asthma. No difference was found in gender and helminth infection between groups.

### **Description of the *PDE4D* variants**

In the *PDE4D* region 1,180 SNVs were genotyped. Of these, 454 variants were excluded by MAF and one variant due to genotyping call rate. After quality control, 727 variants were included in the analysis. Table 2 provides genetic and functional information for the associated SNVs with asthma or atopy using Haploreg<sup>19</sup> and RegulomeDB<sup>20</sup> databases.

### **Single Marker and Haplotype-Based Association of *PDE4D* with asthma**

Twelve SNVs were significantly associated with asthma symptoms (Table 3). Using an additive model, the variants rs9968728-C and rs298024-A were negatively associated, while rs1824154-A, rs6896215-G and rs16889869-G increased asthma risk. All variants associated in the additive model were also associated in the dominant model, except the rs9968728-C (Table 3). In addition, rs33950471-G and rs16889878-A were positively associated with asthma in the dominant model. On the other hand, rs2112910-A, rs6870632-A, and rs12188950-T were negatively associated with asthma. Regarding the recessive model, rs34762247-G was

negatively associated, while rs6898082-A increased asthma risk (Table 3). The figure S1 shows the pairwise LD plot of associated SNVs.

Regarding the haplotype analysis, eight haplotypes were associated with asthma in the additive model (Table 5, Figure S2.A) and nineteen using the dominant model (Figure S1.B). No association was found using the recessive model (Table 5, Figure S3.A). The haplotype ATA (rs6896215-rs9968728-rs1824154), which was composed of two risk alleles, showed to increase twice the chance of asthma in additive model (Table 5). Also, the haplotype AGC (rs1824154-rs16889869-rs298024) which is formed only by risk alleles, was positively associated with asthma in the additive model.

The overlapping haplotypes GCAGG (rs33950471-rs2112910-rs1824154-rs6870632-rs16889869) and AC (rs16889878-rs298024) were risk haplotypes to asthma in dominant model. The haplotype AGCAG (rs6896215-rs33950471-rs2112910-rs1824154-rs6870632), with just one protective allele, was associated with risk of asthma.

### Single Marker and Haplotype-Based Association of *PDE4D* with atopy

Twelve SNVs were associated with atopy (Table 4). The variants rs13177163-A, rs159625-T, rs75699812-C, and rs80075656-G were associated with risk to atopy in both additive and dominant models. The rs10472114-C was also positively associated with atopy using the additive model only. The variants rs194368-C, rs4700340-T, and rs958851-T were positively associated with atopy in dominant model. Notably, the variants rs159625-T and rs194368-C are in strong linkage disequilibrium (LD;  $r^2 = 0.94$ , Figure S1). In addition, the SNVs rs4699942-T, and rs112873625-C were associated as a protective factor to atopy in the additive model and are in strong LD ( $r^2 = 1$ , Figure S1). The rs17782374-C was associated with an increased risk for atopy in the additive model. This variant was also associated in the recessive model, increasing almost three times the risk for atopy. In a similar way, rs9942415-A was also associated in the recessive model.

Considering the atopy haplotype-based analysis, 27 haplotypes were associated in the additive model (Figure S2.C), 17 of them were associated with atopy using the dominant genetic model (Figure S2.D). The table 5 summarizes the most significant associated haplotypes with a p-value less than 0.001. No association was observed regarding the recessive model (Figure S3.B). The haplotype AGT (rs13177163-rs4699942-rs112873625) was associated as a risk haplotype (Table 5), as mentioned before, rs4699942 and rs112873625 are in the same LD block (Figure 1). The overlapping haplotypes CGTGG (rs75699812-rs17782374-rs80075656-rs10472114-rs13177163), and CGTGG (rs17782374-rs80075656-rs10472114-rs13177163-rs4699942) had three risk alleles and were significantly associated with an elevated chance of atopy (Table 4). In the dominant model, the CTG (rs75699812-rs958851-rs80075656) haplotype was also associated with an increased risk of atopy.

### Association of *PDE4D* SNVs with IL-10 production

Variants rs75699812-C, rs8007656-G and rs958851-T were negatively associated with IL-10 production. Individuals carrying such alleles are 3-4 times more likely to

not produce detectable levels of IL-10 (Figure 1). No other SNV was associated with IL-10 production in our population (Figure 1).

### Functional annotation prediction

A correlation between the rs6898082-A and increased *PDE4D* expression in whole blood was observed in the GTEx database (Figure S4). No other SNV was associated with *PDE4D* expression (Data not shown).

### Discussion

Variants in *PDE4D* have already been associated with asthma, however there are few studies especially in Latin-American populations.<sup>6,11</sup> In our study, 24 SNVs were significantly associated with asthma or allergy phenotypes in a Brazilian population. Here, the variants rs6898082, rs16889869, rs33950471, rs1824154, rs6896215 and rs16889878 were positively associated with asthma.

The AA genotype of rs6898082 increased almost three times the risk of having asthma symptoms. Furthermore, this same genotype was related to increased *PDE4D* expression in whole blood. This variant is located in an enhancer region in fetal lung tissue and showed to modify the sequence of 4 motifs which interact with transcription factor (TF), such as POU2F2, which is involved in B cells development.<sup>21</sup>

The rs16889869 is located on the enhancer region in Th17 cells. The variant rs33950471 is also located on a region marked as an enhancer in many T helper cells. Although the role of cAMP in non Th17 cells is better understood, there is evidence of an enhanced cAMP-mediated Th17 cytokines production.<sup>22</sup> Thus, this finding may explain its impact on increased *PDE4D* transcription that potentially relates to lower cAMP production and consequently increased asthma susceptibility.

The variants rs1824154 and rs6896215 are located on an enhancer region in fetal lung. The rs6896215 is also in a promoter in fetal lung and T helper cells, moreover, it is in a CEBPB (a pleiotropic glucocorticoid-responsive TF) binding region and impacts in a higher affinity to some TF, such as FOXP1. Interesting, both transcription factors are involved in lung organogenesis and immune response.<sup>23,24</sup> Also, a greater expression of FOXP1 is observed in asthma when compared to non-asthmatic subjects.<sup>23</sup>

The variants rs12188950, rs298024, rs2112910, rs34762247, rs6870632, and rs9968728 were associated as protective factors to asthma. These variants are also located on regulatory regions to gene expression in several tissues based on Haploreg data. The variant rs12188950 lies on promoter and enhancer regions in many tissues, including primary T helper naive cells from peripheral blood and also in fetal lung. The presence of the variant allele reduces the affinity with the TF RFX5 based on *in silico* prediction. RFX5 is known as an important TF in adaptive immune system development by promoting the expression of MHC-II, and may also to influence expression of other genes.<sup>25</sup> Thus, this variant might confer a weak binding

to TF and consequently it has the potential to reduce expression of *PDE4D* in immune cells.

The rs6870632 changes the relative affinity to nuclear factor of activated T-cells, resulting in a weaker binding of this TF on DNA.<sup>19</sup> This variant may result in a lower expression of *PDE4D* in T cells. A higher expression of *PDE4D* is observed in activated effectors T cells.<sup>26</sup> A reduced expression of *PDE4D* increases the cAMP levels. In effectors T lymphocytes, high levels of cAMP promote the inhibition nuclear factor-kappaB (NF-κB) and nuclear factor of activated T cells activation (NFAT) resulting in the suppression of inflammatory cytokines production, such as IL-2.<sup>9</sup> Moreover, Treg cells activity is dependent of high concentrations of cAMP that can promote the production of IL-10 and also can be released into the cytoplasm of other lymphocytes through GAP junctions.<sup>9</sup> Although, we could not show an association between this variant and IL-10 production.

Regard to haplotype analysis, the combination of few risk alleles was observed, and, these combinations were related to increase asthma susceptibility, for example the GCAGG (rs33950471-rs2112910-rs1824154-rs6870632-rs16889869) which its frequency is higher in asthma when compared to non-asthma.

The rs112873625 and rs4699942 were associated as protection for atopy and both are in complete LD and were related to change the sequence of DNA motifs, especially rs4699942 in Haploreg. In accordance with this finding, rs4699942 is associated with a lower expression of *PDE4D* in a large meta-analysis study of eQTLs in blood.<sup>27</sup> It is possible that this variant contributes to the reduction of *PDE4D* expression.

The presence of variants rs958851, rs17782374, rs159625, rs4700340, rs13177163, rs75699812 and rs80075656 increased the risk of atopy. All variants were related to enhancer, promoter, DNase peak or protein binding sites, thus they might impair gene regulation promoting a greater expression of *PDE4D*. A correlation between rs4700340 and greater expression of *PDE4D* is reported by a blood eQTL database.<sup>27</sup> A haplotype comprised by rs958851, rs75699812 and rs80075656 are most observed in atopic individuals then non atopic. Also, these three variants were negatively associated with spontaneous production of IL-10. It was shown an increased IL-10 production by dendritic cells when treated with a PDE4 inhibitor, which attenuates their Th2-promoting ability.<sup>29</sup> Low concentrations of cAMP in dendritic cells are crucial to induce a Th2 profile by stimulating the activation of lymphocytes, which express high levels of *PDE4D*.<sup>28</sup> Therefore, the mechanism whereby the combination of these variants increases the atopy risk may be reducing the IL-10 production, an important immunoregulatory cytokine.

In summary, SNVs and their haplotypes in *PDE4D* are significantly associated with asthma and allergy. Therefore, these variants may play a crucial role in asthma and atopy pathophysiology, possibly by affecting the regulation of gene expression and consequently the production of the phosphodiesterase enzyme. It is possible that these variants are modulating inflammation by impairing IL-10 production and also



modifying lung development. Further studies are necessary to better understand the mechanism whereby *PDE4D* variants affect asthma and allergy.

#### **v. Acknowledgments;**

We thank all participants and all the collaborators of the Laboratory of Immunopharmacology and Molecular Biology (IMUNOBIO) for all support, and the Universidade Federal da Bahia for the structure to develop the work. Moreover, we thank the SCAALA (Social Change of Asthma and Allergy in Latin America) cohort for making this study possible.

#### **vi. Impact statement;**

To our knowledge, this is the first study investigating the role of single nucleotide variants (SNVs) in *PDE4D* gene in asthma symptoms and atopy susceptibility in a Brazilian population. A secondary aim of the study is to correlate the studied SNVs with the spontaneous production of the cytokine IL-10.

#### **vii. References;**

1. Global Burden Disease 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Respiratory Medicine*, **5**, 691 - 706 (2017).
2. Ferrante, G. & La Grutta, S. The burden of pediatric asthma. *Front. Pediatr.* **6**, 1–7 (2018).
3. Solé, D., Camelo-Nunes, I. C., Wandalsen, G. F. & Mallozi, M. C. Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Rev. Paul. Pediatr.* **32**, 114–125 (2014).
4. Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and prevention*. [ginasthma.org/gina-reports/](http://ginasthma.org/gina-reports/) (2021).
5. Willis-Owen, S. A. G., Cookson, W. O. C. & Moffatt, M. F. The genetics and genomics of asthma. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **19**, 223–246 (2018).
6. Himes, B. E. *et al.* Genome-wide Association Analysis Identifies PDE4D as an Asthma-Susceptibility Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 581–593 (2009).
7. Trian, T. *et al.*  $\beta$ 2-agonist induced cAMP is decreased in asthmatic airway smooth muscle due to increased PDE4D. *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
8. Méhats, C. *et al.* PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction. *FASEB J.* **17**, 1831–1841 (2003).

9. Jimenez, José L.; Punzón, Carmen; Navarro, Joaquín; Muñoz-Fernández, M. Angeles; Fresno, M. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor of activated T cells activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 753–759 (2001).
10. Landells, L. J., Spina, D., Souness, J. E., O'Connor, B. J. & Page, C. P. A biochemical and functional assessment of monocyte phosphodiesterase activity in healthy and asthmatic subjects. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **13**, 231–239 (2000).
11. Ding, L. *et al.* Rank-based genome-wide analysis reveals the association of Ryanodine receptor-2 gene variants with childhood asthma among human populations. *Hum. Genomics* **7**, 1–17 (2013).
12. Teixeira, H. M. P., Alcantara-Neves, N. M., Barreto, M., Figueiredo, C. A. & Costa, R. S. Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. *Mol. Immunol.* **82**, 137–145 (2017).
13. De Paiva, A. C. Z., Marson, F. A. de L., Ribeiro, J. D. & Bertuzzo, C. S. Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **10**, 1–9 (2014).
14. Alcantara-Neves, N. M. *et al.* The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, (2012).
15. Figueiredo, C. A. *et al.* Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environ. Health Perspect.* **117**, 845–849 (2009).
16. Sinnwell JP, S. D. Package “haplo.stats”.
17. Luna, A. & Nicodemus, K. K. snp.plotter: An R-based SNP/haplotype association and linkage disequilibrium plotting package. *Bioinformatics* **23**, 774–776 (2007).
18. GTEx Consortium, Ardlie, K. G., Deluca, D. S., Segrè, A. V., Sullivan, T. J., Young, T. R., ... & Dermitzakis, E. T. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*, 348(6235), 648-660.
19. Ward, L. D. & Kellis, M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* **40**, 930–934 (2012).
20. Boyle, A. P. *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* **22**, 1790–1797 (2012).
21. Corcoran, L. *et al.* Oct2 and Obf1 as facilitators of B: T cell collaboration during a humoral immune response. *Front. Immunol.* **5**, 1–14 (2014).
22. Yoshida, N. *et al.* ICER is requisite for Th17 differentiation. *Nat. Commun.* **7**,

- (2016).
23. Pniewska, E. *et al.* Exacerbating factors induce different gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from asthmatics, patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy subjects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **165**, 229–243 (2014).
  24. Roos, A. B. & Nord, M. The emerging role of C/EBPs in glucocorticoid signaling: Lessons from the lung. *J. Endocrinol.* **212**, 291–305 (2012).
  25. Xia, J. *et al.* SIRT1 deacetylates RFX5 and antagonizes repression of collagen type I (COL1A2) transcription in smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **428**, 264–270 (2012).
  26. Peter, D. *et al.* Predominant Role of PDE4D 1. **4**, (2007).
  27. Westra, H. J. *et al.* Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat. Genet.* **45**, 1238–1243 (2013).
  28. Lee, J. *et al.* Cyclic AMP concentrations in dendritic cells induce and regulate Th2 immunity and allergic asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1529–1534 (2015).
  29. Bros, M., Montermann, E., Cholaszczyńska, A. & Reske-Kunz, A. B. The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast augments the Th17-promoting capability of dendritic cells by enhancing IL-23 production, and impairs their T cell stimulatory activity due to elevated IL-10. *Int. Immunopharmacol.* **35**, 174–184 (2016).

## viii. Tables

**Table 1.** Characteristics of the SCAALA sample according to asthma status and the variables included in the study.

	Non-asthma (n=941)	Asthma (n=273)	p-value*
Age			
≤ 5	314 33.4%	132 48.4%	< 0.001
6 - 7	336 35.7%	88 32.2%	
≥ 8	291 30.9%	53 19.4%	
Sex			
Male	506 53.8%	150 54.9%	0.732
Female	435 46.2%	123 45.1%	
Atopy	324 34.4%	133 48.7%	< 0.001
Helminth Infection	206 22.3%	67 25.0%	0.342

\*p-value obtained from the chi square test

**Table 2.** Genetic and functional description of *PDE4D* SNVs.

Variant	A1/A2 <sup>a</sup>	Freq.	HWE <sup>b</sup>	Position (HG 19)	Annotation <sup>c</sup>	RegulomeDB <sup>d</sup>	Haploreg <sup>e</sup>
rs10472114	C/T	0.16	0.35	59035558	Intronic	5	MC, eQTL
rs112873625	C/T	0.42	0.40	59074408	Intronic	6	MC
rs12188950	T/C	0.11	0.06	59783317	Intronic	4	PHM, EHM, DNase, PBR, MC, eQTL
rs13177163	A/G	0.14	0.10	59054145	Intronic	5	PHM, EHM, PBR, MC
rs159625	T/C	0.14	0.10	59161352	Intronic	5	PHM, EHM, MC
rs16889869	G/A	0.30	0.60	58755580	Intronic	7	PHM, EHM
rs16889878	A/G	0.23	0.72	58768140	Intronic	4	EHM, DNase, PBR
rs17782374	C/T	0.16	0.20	58663831	Intronic	4	EHM, DNase, PBR, MC
rs1824154	A/G	0.31	0.37	58737707	Intronic	5	EHM
rs194368	C/T	0.14	0.08	59179484	Intronic	7	no
rs2112910	A/C	0.47	0.53	58727409	Intronic	6	EHM, DNase, MC
rs298024	A/C	0.32	0.94	58941676	Intronic	6	EHM, MC, eQTL
rs33950471	G/T	0.24	0.72	58449784	Intronic	7	EHM, MC
rs34762247	C/A	0.22	0.04	59629365	Intronic	5	EHM, DNase, MC, eQTL
rs4699942	T/G	0.42	0.40	59073475	Intronic	5	EHM, MC, eQTL
rs4700340	T/C	0.14	0.79	59001077	Intronic	5	PHM, EHM, DNase, MC, eQTL
rs6870632	A/G	0.43	0.41	58753267	Intronic	5	MC
rs6896215	G/A	0.10	0.60	58418501	Intronic	4	PHM, EHM, PBR, MC
rs6898082	A/G	0.20	0.19	58406404	Intronic	6	EHM, MC
rs75699812	C/T	0.07	0.32	58628006	Intronic	6	EHM, MC
rs80075656	G/T	0.07	0.34	58707869	Intronic	7	MC
rs958851	T/G	0.20	0.62	58640143	Intronic	7	EHM, MC
rs9942415	A/G	0.19	0.26	58771680	Intronic	6	EHM, MC
rs9968728	C/T	0.27	0.05	58418981	Intronic	2b	PHM, EHM, DNase, MC

<sup>a</sup> A1: Minor allele; A2: Major allele <sup>b</sup> HWE: Hardy Weinberg Equilibrium <sup>c</sup> NCBI (National Center for Biotechnology Information) <sup>d</sup> RegulomeDB <sup>e</sup> Haploreg

**Table 3.** Significant association between *PDE4D* SNVs and asthma.

SNV	Genotype	Control	Case	Model	OR (CI 99%)	P-value*
rs12188950	CC	78.55% (714)	84.35% (221)	Additive	0.63 (0.39 - 0.998)	0.0100
	CT	19.47% (177)	14.5% (38)	Dominant	0.58 (0.35 - 0.98)	<b>0.0099</b>
	TT	1.98% (18)	1.15% (3)	Recessive	0.60 (0.12 - 3.05)	0.3175
rs16889869	AA	50.32% (471)	42.44% (115)	Additive	1.32 (1.001 - 1.74)	<b>0.0079</b>
	AG	40.71% (381)	46.49% (126)	Dominant	1.48 (1.02 - 2.14)	<b>0.0066</b>
	GG	8.97% (84)	11.07% (30)	Recessive	1.32 (0.73 - 2.38)	0.2072
rs16889878	GG	60.21% (569)	52.38% (143)	Additive	1.34 (0.997 - 1.81)	<b>0.0077</b>
	GA	34.71% (328)	41.39% (113)	Dominant	1.47 (1.02 - 2.13)	<b>0.0063</b>
	AA	5.08% (48)	6.23% (17)	Recessive	1.31 (0.61 - 2.82)	0.4571
rs1824154	GG	49.74% (470)	42.49% (116)	Additive	1.33 (1.01 - 1.75)	<b>0.0082</b>
	GA	40.95% (387)	46.15% (126)	Dominant	1.48 (1.02 - 2.14)	<b>0.0072</b>
	AA	9.31% (88)	11.36% (31)	Recessive	1.36 (0.76 - 2.45)	0.1655
rs2112910	CC	25.82% (244)	34.43% (94)	Additive	0.82 (0.63 - 1.06)	0.0397
	CA	51.01% (482)	43.59% (119)	Dominant	0.64 (0.43 - 0.94)	<b>0.0020</b>
	AA	23.17% (219)	21.98% (60)	Recessive	0.97 (0.62 - 1.5)	1
rs298024	CC	44.76% (423)	54.95% (150)	Additive	0.74 (0.55 - 0.99)	<b>0.0068</b>
	CA	44.34% (419)	36.26% (99)	Dominant	0.65 (0.45 - 0.94)	<b>0.0028</b>
	AA	10.9% (103)	8.79% (24)	Recessive	0.8 (0.42 - 1.5)	0.3750
rs33950471	TT	59.15% (559)	50.55% (138)	Additive	1.34 (1.001 - 1.8)	0.0103
	TG	35.24% (333)	42.49% (116)	Dominant	1.46 (1.01 - 2.11)	<b>0.0073</b>
	GG	5.61% (53)	6.96% (19)	Recessive	1.38 (0.67 - 2.88)	0.2692
rs34762247	AA	62.01% (586)	59.71% (163)	Additive	0.92 (0.67 - 1.25)	0.5652
	AC	31.96% (302)	38.1% (104)	Dominant	1.06 (0.73 - 1.55)	0.8571
	CC	6.03% (57)	2.2% (6)	Recessive	0.29 (0.08 - 0.98)	<b>0.0044</b>
rs6870632	GG	30.08% (284)	38.6% (105)	Additive	0.82 (0.63 - 1.07)	0.0479
	GA	50.53% (477)	43.01% (117)	Dominant	0.67 (0.46 - 0.99)	<b>0.0086</b>
	AA	19.39% (183)	18.38% (50)	Recessive	0.95 (0.59 - 1.52)	0.7500
rs6896215	AA	81.9% (774)	74.36% (203)	Additive	1.56 (1.05 - 2.33)	<b>0.0031</b>
	AG	17.14% (162)	24.54% (67)	Dominant	1.65 (1.07 - 2.55)	<b>0.0034</b>
	GG	0.95% (9)	1.1% (3)	Recessive	1.42 (0.25 - 8.15)	0.6
rs6898082	GG	64.41% (608)	63.24% (172)	Additive	1.16 (0.85 - 1.59)	0.28
	GA	32.52% (307)	29.04% (79)	Dominant	0.99 (0.68 - 1.47)	1
	AA	3.07% (29)	7.72% (21)	Recessive	2.76 (1.26 - 6.03)	<b>0.0007</b>
rs9968728	TT	52.87% (497)	59.71% (163)	Additive	0.75 (0.56 - 0.999)	<b>0.0096</b>
	TC	37.66% (354)	34.07% (93)	Dominant	0.71 (0.49 - 1.03)	0.0159
	CC	9.47% (89)	6.23% (17)	Recessive	0.61 (0.30 - 1.24)	0.0803

\*Logistic regression adjusted for sex, age, helminth infections, and principal components 1 and 2.

**Table 4.** Significant association between *PDE4D* SNVs and atopy.

SNV	Genotype	Control	Case	Model	OR (CI 99%)	P-value*
rs10472114	TT	73.82% (561)	66.95% (310)	Additive	1.37 (1.01 - 1.85)	<b>0.0053</b>
	TC	24.47% (186)	29.59% (137)	Dominant	1.37 (0.97 - 1.93)	0.0205
	CC	1.71% (13)	3.46% (16)	Recessive	2.1 (0.77 - 5.73)	0.0432
rs112873625	TT	29.58% (226)	37.8% (175)	Additive	0.78 (0.61 - 0.98)	<b>0.0054</b>
	TC	52.36% (400)	48.81% (226)	Dominant	0.71 (0.51 - 0.99)	0.0101
	CC	18.06% (138)	13.39% (62)	Recessive	0.74 (0.48 - 1.15)	0.0906
rs13177163	GG	76.83% (587)	68.68% (318)	Additive	1.41 (1.03 - 1.94)	0.0049
	GA	21.47% (164)	29.59% (137)	Dominant	1.52 (1.07 - 2.16)	<b>0.0022</b>
	AA	1.7% (13)	1.73% (8)	Recessive	1.02 (0.31 - 3.36)	1
rs159625	CC	76.18% (582)	68.47% (317)	Additive	1.39 (1.01 - 1.91)	<b>0.0082</b>
	CT	21.99% (168)	30.02% (139)	Dominant	1.52 (1.07 - 2.16)	<b>0.0023</b>
	TT	1.83% (14)	1.51% (7)	Recessive	0.80 (0.23 - 2.71)	0.6000
rs17782374	TT	72.91% (557)	67.17% (311)	Additive	1.38 (1.02 - 1.85)	<b>0.0056</b>
	TC	25.26% (193)	28.08% (130)	Dominant	1.33 (0.95 - 1.88)	0.0260
	CC	1.83% (14)	4.75% (22)	Recessive	2.75 (1.07 - 7.07)	<b>0.0033</b>
rs194368	TT	76.12% (577)	69.48% (321)	Additive	1.31 (0.95 - 1.8)	0.0389
	TC	22.03% (167)	29.22% (135)	Dominant	1.43 (1.003 - 2.03)	<b>0.0089</b>
	CC	1.85% (14)	1.3% (6)	Recessive	0.68 (0.19 - 2.49)	0.3830
rs4699942	GG	29.58% (226)	37.8% (175)	Additive	0.78 (0.61 - 0.98)	<b>0.0054</b>
	GT	52.36% (400)	48.81% (226)	Dominant	0.71 (0.51 - 0.99)	0.0101
	TT	18.06% (138)	13.39% (62)	Recessive	0.74 (0.48 - 1.15)	0.0906
rs4700340	CC	76.7% (586)	69.76% (323)	Additive	1.40 (1.01 - 1.94)	0.0110
	CT	22.12% (169)	28.08% (130)	Dominant	1.44 (1.01 - 2.06)	<b>0.0080</b>
	TT	1.18% (9)	2.16% (10)	Recessive	1.62 (0.45 - 5.84)	0.2800
rs75699812	TT	88.35% (675)	83.59% (387)	Additive	1.64 (1.07 - 2.51)	0.0043
	TC	11.39% (87)	15.33% (71)	Dominant	1.62 (1.03 - 2.56)	<b>0.0074</b>
	CC	0.26% (2)	1.08% (5)	Recessive	4.81 (0.54 - 42.64)	0.0147
rs80075656	TT	88.32% (673)	83.33% (385)	Additive	1.69 (1.11 - 2.59)	<b>0.0018</b>
	TG	11.55% (88)	15.37% (71)	Dominant	1.63 (1.04 - 2.57)	<b>0.0045</b>
	GG	0.13% (1)	1.3% (6)	Recessive	11.74 (0.71 - 194.1)	-
rs958851	GG	67.32% (513)	59.83% (277)	Additive	1.33 (1.00 - 1.77)	0.0108
	GT	29.53% (225)	36.72% (170)	Dominant	1.41 (1.02 - 1.96)	<b>0.0079</b>
	TT	3.15% (24)	3.46% (16)	Recessive	1.25 (0.52 - 3.00)	0.4571
rs9942415	GG	67.23% (513)	63.42% (293)	Additive	1.26 (0.95 - 1.66)	0.0439
	GA	29.75% (227)	30.74% (142)	Dominant	1.2 (0.86 - 1.67)	0.1589
	AA	3.01% (23)	5.84% (27)	Recessive	2.25 (1.01 - 4.99)	<b>0.0064</b>

\*Logistic regression adjusted for sex, age, helminth infections, and principal components 1 and 2.

**Table 5.** Most significant ( $p < 0.001$ ) associations between *PDE4D* haplotypes with asthma and atopy by logistic regression adjusted for sex, age, helminth infections, and principal components 1 and 2.

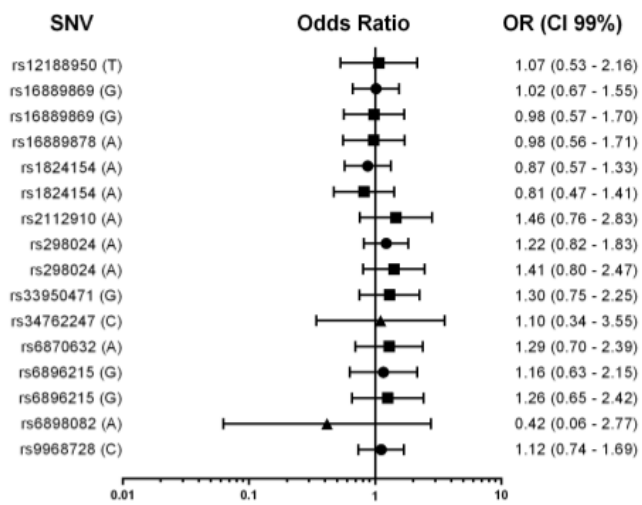
Phenotype	Haplotype									Frequency		OR (CI 99%)	p-value
	rs6896215	rs9968728	rs1824154	rs16889869	rs298024	Control	Case						
<b>Asthma Additive</b>	-	-	-	-	A	C	-	-	-	0.29	0.23	REF	-
	-	-	-	-	G	T	-	-	-	0.09	0.14	1.83 (1.17 - 2.88)	0.0006
	-	-	-	-	-	C	G	-	-	0.17	0.14	REF	-
	-	-	-	-	-	T	A	-	-	0.17	0.26	1.83 (1.18 - 2.84)	0.0004
	-	-	-	-	-	-	-	A	A	0.27	0.2	REF	-
	-	-	-	-	-	-	-	G	C	0.23	0.29	1.65 (1.14 - 2.4)	0.0006
	-	-	-	-	A	C	G	-	-	0.17	0.14	REF	-
	-	-	-	-	A	T	A	-	-	0.13	0.21	1.96 (1.21 - 3.18)	0.0004
	-	-	-	-	-	-	G	A	A	0.25	0.2	REF	-
	-	-	-	-	-	-	A	G	C	0.18	0.24	1.68 (1.13 - 2.52)	0.0009
<b>Asthma Dominant</b>	rs6896215	rs33950471	rs2112910	rs1824154	rs6870632	rs16889869	rs16889878	rs298024	rs12188950	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	G	A	-	0.29	0.21	REF	-
	-	-	-	-	-	-	A	C	-	0.18	0.22	1.66 (1.12 - 2.46)	0.001
	-	T	A	G	-	-	-	-	-	0.39	0.33	REF	-
	-	G	C	A	-	-	-	-	-	0.09	0.16	2.05 (1.31 - 3.21)	0.0001
	A	T	A	G	-	-	-	-	-	0.37	0.29	REF	-
	A	G	C	A	-	-	-	-	-	0.07	0.13	2.11 (1.25 - 3.57)	0.0002
	-	T	A	G	A	-	-	-	-	0.35	0.31	REF	-
	-	G	C	A	G	-	-	-	-	0.09	0.16	1.99 (1.26 - 3.14)	0.0001
	A	T	A	G	A	-	-	-	-	0.33	0.27	REF	-
	A	G	C	A	G	-	-	-	-	0.07	0.13	2.03 (1.19 - 3.45)	0.0006
	-	T	A	G	A	A	-	-	-	0.35	0.31	REF	-
-	G	C	A	G	G	-	-	-	0.08	0.14	1.92 (1.19 - 3.11)	0.0005	

		rs75699812	rs17782374	rs80075656	rs10472114	rs13177163	rs4699942	rs112873625	rs159625	Control	Case		
<b>Atopy Additive</b>	-	T	T	-	-	-	-	-	-	0.85	0.81	REF	-
	-	C	C	-	-	-	-	-	-	0.05	0.08	1.83 (1.17 - 2.86)	0.0005
	-	-	-	-	-	G	T	-	-	0.44	0.38	REF	-
	-	-	-	-	-	A	G	-	-	0.12	0.17	1.57 (1.11 - 2.22)	0.0009
	-	T	T	T	-	-	-	-	-	0.84	0.81	REF	-
	-	C	C	G	-	-	-	-	-	0.05	0.08	1.83 (1.17 - 2.87)	0.0006
	-	-	T	T	T	-	-	-	-	0.73	0.65	REF	-
	-	-	C	G	T	-	-	-	-	0.04	0.07	1.96 (1.17 - 3.29)	0.0008
	-	-	-	-	-	G	T	C	-	0.44	0.38	REF	-
	-	-	-	-	-	A	G	T	-	0.12	0.17	1.57 (1.11 - 2.22)	0.0009
	-	T	T	T	T	-	-	-	-	0.72	0.65	REF	-
	-	C	C	G	T	-	-	-	-	0.04	0.07	2.09 (1.25 - 3.49)	0.0002
	-	-	T	T	T	G	-	-	-	0.73	0.64	REF	-
	-	-	C	G	T	G	-	-	-	0.04	0.07	1.95 (1.17 - 3.26)	0.0008
	-	T	T	T	T	G	-	-	-	0.72	0.64	REF	-
	-	C	C	G	T	G	-	-	-	0.04	0.07	2.08 (1.24 - 3.48)	0.0003
-	-	T	T	T	G	T	-	-	0.36	0.29	REF	-	
-	-	C	G	T	G	G	-	-	0.02	0.04	2.93 (1.31 - 6.56)	0.0006	
		rs75699812	rs958851	rs80075656	rs4700340	rs13177163	rs159625	rs194368	Control	Case			
<b>Atopy Dominant</b>	-	-	T	G	T	-	-	-	-	0.81	0.77	REF	-
	-	-	C	T	G	-	-	-	-	0.05	0.08	1.82 (1.15 - 2.88)	0.0008

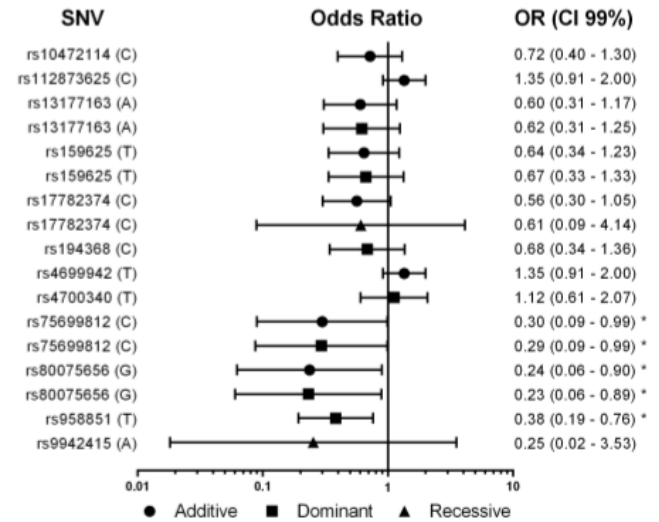


## ix. Figures

## A. Asthma-associated variants

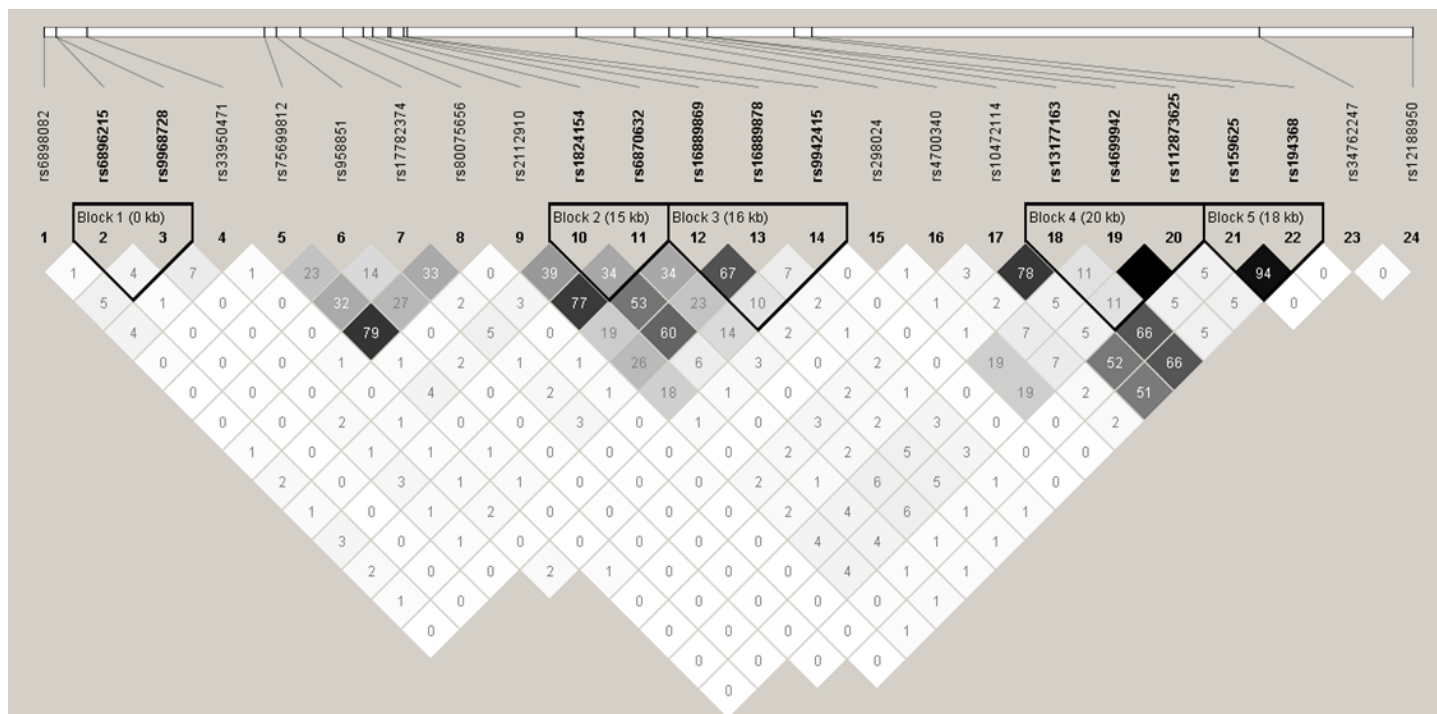


## B. Atopy-associated variants

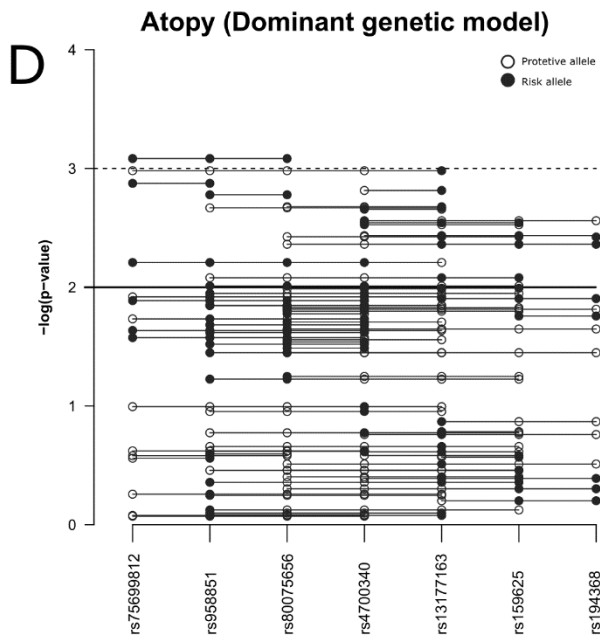
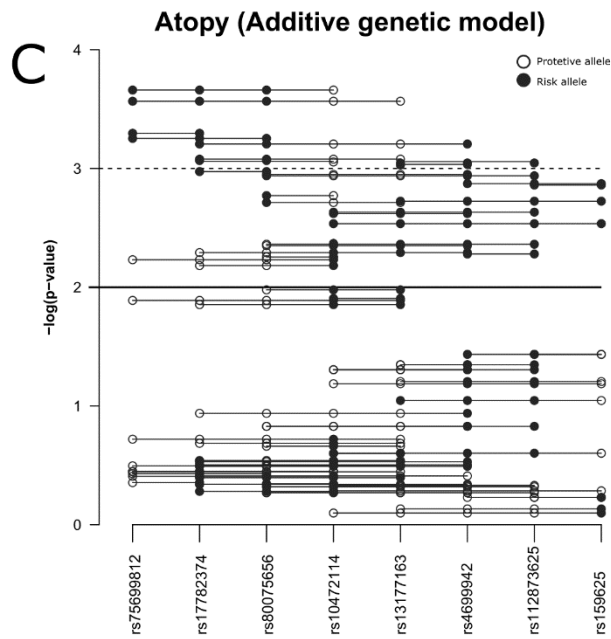
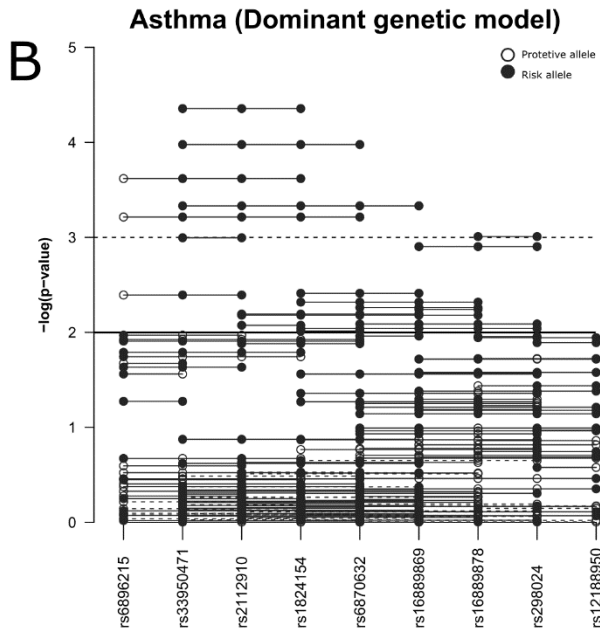
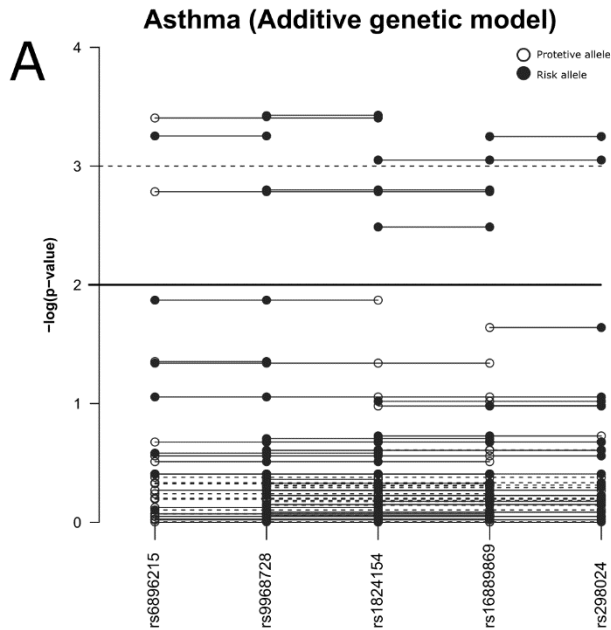


**Figure 1. Forest plot showing association analysis of atopy-associated variants with IL-10 production.** Graph generated using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)".

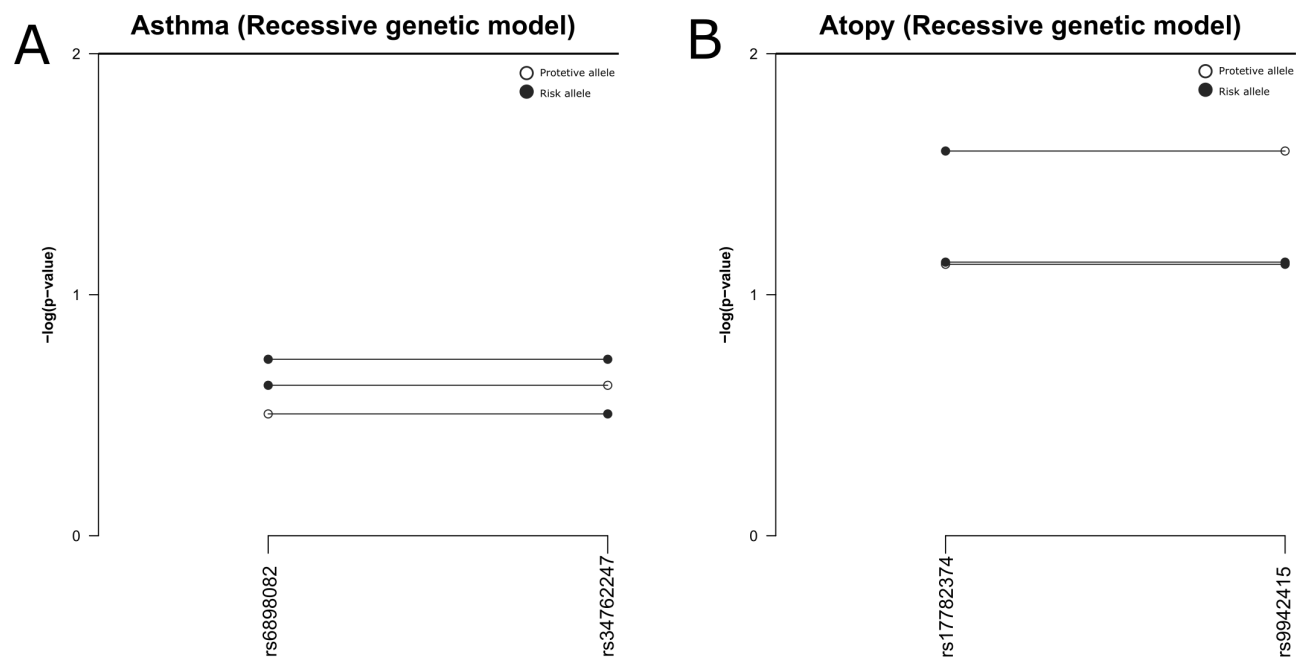
## Appendix - Supplementary Figures



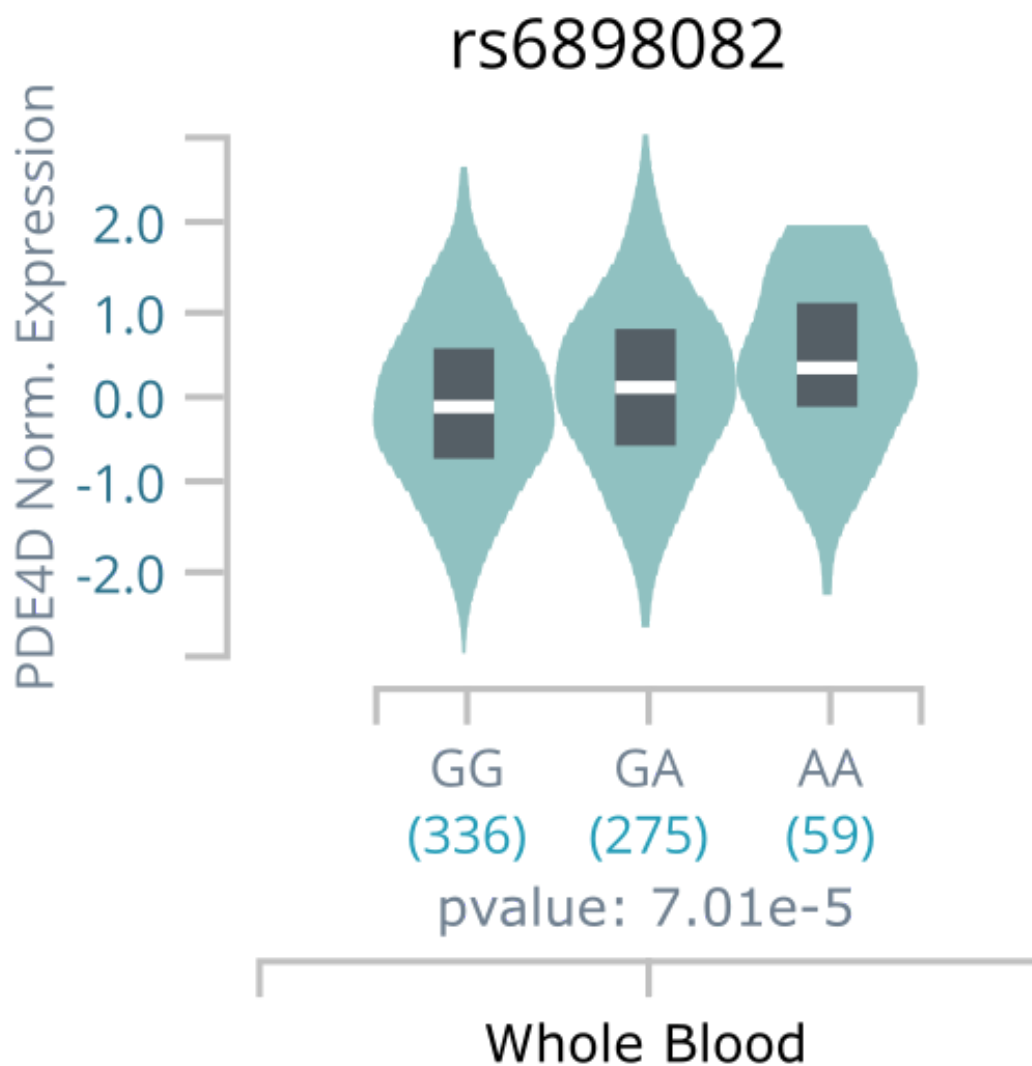
**Figure S1.** Pairwise LD using the  $r$  squared statistic for the associated SNVs in *PDE4D* gene.



**Figure S2. Sliding window haplotype analysis with asthma under the (A) Additive and (B) Dominant genetic model, and with atopy under (C) Additive and (D) Dominant genetic model.**



**Figure S3.** Sliding window haplotype analysis for asthma under the (A) Recessive and and for atopy under (B) Recessive. Filled circles represent a risk allele in the haplotype, and the unfilled circles correspond to protective allele based on single marker association. The bold line marks the p-value threshold ( $p < 0.01$ ) and the dashed line marks the most associated haplotypes threshold ( $p < 0.001$ ). The graphs were generated using the `snp.plotter` R package.



**Figure S4.** GTEx-Gene expression level of Phosphodiesterase type 4D grouped by rs6898082 genotypes in whole blood ( $p < 0.0001$ ). No other asthma or atopy associated SNV was significant associated as an eQTL in GTEx database.