

Polimorfismo de interleucina 10 e persistência da alergia ao leite de vaca

Interleukin 10 polymorphism and cow's milk allergy persistence

Cristina Miuki Jacob¹, Léa Campos de Oliveira², Anna Carla Goldberg³,
Thelma Suely Okay⁴, Andréia K. F. Gushken¹, Letícia A. Watanabe¹,
Ana Paula M. Castro¹, Ângela B. F. Fomin¹, Antonio Carlos Pastorino¹

Resumo

Justificativa: Alergia à leite de vaca (ALV) afeta 2,5% das crianças menores de 3 anos, sendo que a maioria dos pacientes desenvolvem tolerância até 3 anos de idade. No entanto, na ALV IgE-mediada cerca de 35% desses pacientes persistem sintomáticos. O objetivo deste estudo foi determinar se polimorfismos no gene que codifica a IL-10 estariam associados à ALV persistente mediada por IgE em crianças brasileiras com cinco anos.

Métodos: Neste estudo, 50 pacientes com ALV com idade de 5 anos foram avaliados, sendo 36 persistentes e 14 tolerantes. Um grupo controle composto por 224 indivíduos saudáveis foi incluído no estudo. Os critérios de diagnóstico foram: anafilaxia desencadeada pelo leite de vaca (LV) ou reação clínica imediata para o Teste Duplo Cego Placebo Controlado (DCPC). A tolerância foi definida como a ausência de resposta clínica ao DBPC ou durante a exposição acidental ao LV. Os dados utilizados na análise dos resultados clínicos e laboratoriais foram aqueles na época do diagnóstico. Todos os pacientes e os controles foram avaliados pelo PCR-RFLP para os seguintes polimorfismos de IL-10: -3575A/T, -2849A/G, -763A/C, 592C/A e pelo PCR-SSP para o polimorfismo IL-10 -1082G/A.

Resultados: Houve diferença estatisticamente significante apenas para o polimorfismo IL-10 -1082G/A, sendo a homozigose para o alelo A estatisticamente significante comparando-se pacientes do grupo ALV total *versus* grupo controles ($p = 0,027$) e a homozigose para o alelo G entre grupo persistente *versus* grupo controle ($p = 0,001$).

Conclusão: Nos pacientes avaliados, o polimorfismo de IL-10 -1082G/A foi associado ao fenótipo da ALV persistente.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2010; 33(3):93-98: Hipersensibilidade ao leite de vaca, interleucina 10, polimorfismo genético, evolução clínica.

Introdução

Nas últimas décadas tem sido constatado um aumento da prevalência das doenças alérgicas, incluindo as alergias alimentares, que acometem cerca de 7-8% das crianças e 4% dos adultos^{1,2}. Vários fatores têm sido apontados como

Abstract

Rationale: Cow's milk allergy (CMA) affects 2.5% of children under 3 years and the majority of patients develop tolerance at age 3. However, in IgE-mediated CMA about 35% of them persist symptomatic. The aim of this study is to determine if interleukin 10 (IL-10) gene polymorphisms are associated to persistent IgE-mediated CMA in Brazilian children at age five.

Methods: In this study, 50 IgE-mediated CMA patients were evaluated at age 5, being 36 persistent and 14 tolerant to cow's milk (CM). A control group with 224 healthy individuals was included. The diagnosis criteria were: anaphylaxis triggered by CM or immediate clinical reaction to double blind placebo control test (DBPCT). The tolerance was defined as the absence of clinical response to the DBPCT or during the accidental exposure to CM. The data used about clinical and laboratorial findings were from the diagnosis work up. All patients and the controls were typed by PCR-RFLP for the following IL-10 polymorphisms: -3575A/T, -2849A/G, -763A/C, -592C/A and by SSP for -1082G/A.

Results: There was differences statistically significant only for IL-10 polymorphisms -1082G/A. Homozygosity to A allele was statistically significant comparing CMA total patients with controls ($p = 0.027$) and homozygosity to G allele between persistent group versus control group ($p = 0.001$).

Conclusion: In these patients evaluated the IL-10 -1082G/A polymorphism was associated to CMA persistent phenotype.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2010; 33(3):93-98: Cow's milk hypersensitivity, interleukin 10, gene polymorphisms, clinical evolution.

possíveis facilitadores da alergia alimentar, entre eles a interação entre predisposição genética e fatores ambientais, incluindo a dieta³. A alergia ao leite de vaca (ALV) é uma das mais frequentes alergias alimentares e acomete cerca

1. Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
2. Laboratório de Pediatria Clínica (LIM36) do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
3. Instituto de Educação e Pesquisa, Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP.
4. Laboratório de Sorroepidemiologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo.

de 2,5% das crianças menores de 3 anos⁴. Muitas proteínas do leite de vaca podem estar envolvidas na ALV, sendo as mais importantes: a caseína, a beta-lactoglobulina e a alfa-lactoalbumina⁵. As manifestações clínicas podem ser extremamente variadas, dependendo do mecanismo imunológico envolvido. O tratamento baseia-se na exclusão do leite e derivados, sendo fundamental a escolha de substitutos que garantam o desenvolvimento pôndero-estatural adequado e a qualidade de vida do paciente.

O controle do processo alérgico inclui o mecanismo de tolerância oral envolvendo deleção ou anergia de células T reativas a antígenos específicos, associados à expansão da população de células T reguladoras com produção de IL-10⁶. O papel da interleucina 10 na indução de tolerância tem sido bastante evidenciado por vários estudos mostrando associação entre níveis de IL-10 e desenvolvimento de tolerância a alimentos^{7,8}. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, também conhecida como fator inibidor de síntese de citocinas (CSIF), causando redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas, tais como Interleucinas -2 e 3 (IL-2, IL-3) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Ela é produzida por linfócitos, células *Natural Killer*, macrófagos, monócitos, células B, células dendríticas e queratinócitos. A célula responsável pela maior parte da produção de IL-10 é a célula T reguladora, que exerce ação supressora por meio da produção desta citocina^{9,10}. Células T regulatórias CD4+CD25+ aparecem precocemente e a imunossupressão é consequência da expressão do fator de transcrição FOXP3. Mutações desse fator podem causar desregulação da resposta imune, caracterizando em humanos uma doença auto-imune¹¹. O papel das células T reguladoras e da IL-10 têm sido também relacionadas à alergia alimentar. Linfócitos de crianças com múltiplas sensibilizações a alimentos, quando estimulados *in vitro* com extrato de amendoim, ovoalbumina e beta-lactoglobulina apresentam redução da secreção dos níveis de IL-10 e interferon γ (IFN- γ), com aumento da secreção de interleucina 4¹². Da mesma forma, crianças de risco para o desenvolvimento de doenças atópicas também apresentam redução dos níveis de IL-10¹³.

Um dos papéis fundamentais da IL-10 é a indução do desenvolvimento de tolerância oral. Crianças com alergia às proteínas do leite de vaca que desenvolvem tolerância apresentam alta contagem de células T regulatórias CD4+CD25+ e reduzem a resposta proliferativa *in vitro* para beta-lactoglobulina, quando comparadas às crianças alérgicas com doença clinicamente ativa¹⁴. Estudo realizado por Hobbs et al. mostrou que o polimorfismo IL-10 -571 está associado com altas concentrações de IgE, podendo ter relevância funcional não apenas na resposta inflamatória, mas também na produção de moléculas relacionadas a fenômenos alérgicos¹⁵. Polimorfismos do IL10 nas posições -1082 (G / A) e -819 (T/C) estão relacionados a diferentes níveis de IL-10¹⁶. Recentemente, Negoro et al. avaliaram a relação entre IL-10 e outras citocinas com a gravidade da alergia alimentar e eczema atópico em crianças japonesas. Neste estudo, observou-se correlação entre o genótipo do IL10 - 627A, que apresenta baixa expressão dessa citocina, com as concentrações de IgE e gravidade da alergia alimentar¹⁷.

A Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança, considerada centro de referência para o diagnóstico e tratamento da alergia alimentar, organizou um ambulatório específico para esta afecção em 2003, com atendimento protocolado dos pacientes. Esta experiência mostrou que dos pacientes com 5 anos ou mais, apenas 59,5% desenvolveram tolerância ao leite de vaca, dado este contrastante com a literatura sobre a história natural da ALV⁴. Deve ser ressaltado, que muitos pacientes em seguimento são adolescentes ainda reativos ao leite de vaca, inclusive com quadros anafiláticos. Assim, além da avaliação das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, o estudo da presença de polimorfismos da IL-10 em pacientes com alergia ao leite de vaca que persistem sensibilizados pode contribuir para melhor caracterização deste grupo de risco. Poderíamos definir um perfil genético, epidemiológico e clínico para pacientes com persistência da alergia ao leite de vaca, possibilitando o conhecimento dos riscos do desenvolvimento de outras doenças alérgicas e elaboração de estratégias terapêuticas específicas.

Casuística e métodos

Foram incluídos 50 pacientes com alergia ao leite de vaca por mecanismo mediado por IgE, com idade mínima de 5 anos, em seguimento no ambulatório de Alergia Alimentar da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo (ICr-HC-FMUSP), sendo 14 tolerantes e 36 persistentes ao leite de vaca. Todos estes pacientes foram avaliados aos 5 anos de idade e diagnosticados na Unidade, sendo adotado o seguinte critério de diagnóstico de alergia ao leite de vaca – todos os três itens abaixo:

- história familiar e/ou pessoal de atopia;
- história clínica compatível com alergia ao leite de vaca: presença de sinais e sintomas relacionados à ingestão de leite de vaca;
- presença de IgE específica ao leite de vaca total e/ou às proteínas do leite de vaca (caseína, beta-lactoglobulina e alfa-lactoalbumina) pela técnica do ImmunoCAPTM, sendo consideradas concentrações $\geq 3,5$ kU/L; associados a um dos seguintes itens:
 - teste de provocação duplo cego placebo controlado positivo;
 - teste de provocação aberto com manifestações clínicas IgE mediadas, ocorrendo até 2 horas após a ingestão do leite;
 - presença de anafilaxia.

O grupo controle para a avaliação dos polimorfismos das regiões promotoras do gene da IL-10 foi constituído pelos dados referentes a 227 indivíduos sadios, não relacionados, candidatos a serem doadores de medula óssea e provenientes da Divisão de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), cujas amostras de DNA foram cedidas para este estudo após aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas FMUSP.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de amostra colhida em tubo com EDTA pelo método descrito por Bignon et al., 1995¹⁸.

Estudo dos polimorfismos de citocinas

Todos os polimorfismos estudados são do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*), e foram identificados pela técnica de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism* – PCR), ou pela técnica de PCR-SSP (*sequence specific primers* – PCR).

PCR-RFLP: realizada em tubos de 0,2 mL, num volume final de reação de 25 µl, contendo: 50 ng do DNA genômico, 2,5 µl de tampão 10 x (GIBCO-BRL), 1,0 a 2,0 mM de MgCl₂ (GIBCO-BRL), 50 µM de cada dNTP (GIBCO-BRL), 0,25 a 1,0 µM de *primers*, 0,2 unidades de Taq DNA polimerase (LABTRADE). As sequências dos *primers*, bem como a concentração utilizada dos mesmos e do MgCl₂ e as condições das reações e as enzimas de restrição utilizadas, estão descritas na Tabela 1. Dez microlitros dos produtos de amplificação serão acrescentados a 20 µL de uma mistura contendo a enzima de restrição (Tabela 1). No sítio de restrição de cada enzima, onde houve reconhecimento da sequência de nucleotídeos pela enzima, houve quebra (digestão) no produto de PCR, formando fragmentos menores. Os polimorfismos foram identificados por eletroforese em gel de agarose, contendo 1 µg/L de brometo de etídio, em tampão TAE 1,0 x (pH 8,0). A imagem resultante de cada gel foi capturada em sistema de fotodocumentação com transiluminador e luz ultravioleta (UV) e armazenada para posterior análise.

PCR SSP: realizada em tubos de 0,2 mL, num volume final de reação de 25 µl, contendo: 50 ng do DNA e uma mistura de reagentes contendo tampão 10 x, 1,0 a 2,0 mM de cloreto de magnésio, 50 µM de cada dNTP, 0,25 a 1,0 pmol/µL de *primers* e a enzima 1U da enzima Taq DNA polimerase. As sequências dos *primers*, a mistura dos reagentes, bem como as condições das reações estão descritas na Tabela 2. Os polimorfismos foram identificados por eletroforese em gel de agarose, contendo 1 µg/L de brometo de etídio, em

tampão TAE 1,0 x (pH 8,0). A imagem resultante de cada gel foi capturada em sistema de fotodocumentação com transiluminador e luz ultravioleta (UV), e armazenada para posterior análise.

Análise estatística

Para análise dos dados, as variáveis qualitativas (nominais e ordinais) entre os grupos tolerantes e persistentes, descritas em frequência e intervalo de confiança, foram comparadas por meio de métodos não paramétricos: teste de χ^2 ou teste de Fisher, quando indicado. A associação entre os polimorfismos de IL-10 dos pacientes e do grupo controle foi analisada pelo teste de χ^2 ou teste de Fisher, quando indicado. A correção de Bonferroni (p_c), utilizada para comparações múltiplas, foi aplicada na comparação dos resultados do polimorfismo IL-10 -1082A/G com os pacientes agrupados em persistentes e tolerantes.

As frequências alélicas foram obtidas pela fórmula: $f_{al} = n/2N$, onde as frequências relativa e absoluta do alelo são representadas por f_{al} e n , respectivamente, e o número de indivíduos da amostra é N .

Resultados

Os polimorfismos IL-10 -3575, IL-10 -2849, IL-10 -2763 e IL-10 -592 não apresentaram associação com a alergia a leite de vaca (ALV). Entretanto, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na distribuição de alelos e genótipos da IL-10 -1082G/A comparando o grupo com ALV total com o grupo-controle. Neste caso, a homozigose para o alelo A foi significativamente maior no grupo controle (46%) em comparação com o grupo AVL total (26%) com $p = 0,027$ (OR=2,89; IC95% 1,10-7,58). Entretanto, a homozigose para o alelo G foi significativamente aumentada nos pacientes com alergia persistente (24%) em comparação com o grupo tolerante (8%), com $p = 0,001$ (OR = 6,15; IC95% 1,86-20,39). Esta diferença estatística permaneceu mesmo após correção de Bonferroni ($p_c=0,002$) (Tabela 3).

Tabela 1 - Composição nucleotídica dos *primers*, temperaturas do programa de amplificação no termociclador, e enzimas utilizadas para a digestão dos produtos amplificados

PCR-RFLP SNPs	Primers	Conc. primer µM	Conc. MgCl ₂ mM	A	E	D	enzima
IL-10 -592,	F-ATCCAAGACAACACTACTAA R-TAAATATCCTCAAAGTTCC	0,50 0,50	2,0	56 °C 20s	72 °C 30s	95 °C 20s	Rsa II
IL10 -2763, -2849	F- TCTAGGAAATGGCTTGAGAT R- AATAGGGTTGAGGTTAGGATCTG	0,25 0,25	1,5	65 °C* 30s 58 °C** 30s	72 °C 30s	94 °C 30s	DdeI, AlwI
IL-10 -3575	F- GGTTCCTTCATTTGCAGC R- ACACGTGAGCTTCTTGAGG	0,25 0,25	1,5	62 °C 20s	72 °C 30s	95 °C 20s	ApoI

* = 15 ciclos; ** = 25 ciclos; A = *annealing*; E = extensão; D= denaturação.

Tabela 2 - Sequência dos *primers* e condições de amplificação dos PCRs

	Primers	Conc. primer mM	Conc MgCl₂ mM	A	E	D	A	E	A
IL-10	F- ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAAG	0,25	1,5	65	72	95	62	72	95
1082	F- ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAAA R-CAGTGCCAAGTGAATTTGG comum	0,25		45s	30s	30s	30s	30s	30s

A = temperatura de *annealing*; E = temperatura de extensão; D = temperatura de denaturação.

Tabela 3 - Frequências dos polimorfismos de IL-10 em crianças com alergia a leite de vaca comparando-se pacientes tolerantes e persistentes com controles saudáveis

	Pacientes com ALV				Análise estatística			
	T	P	Total	C	p	χ²	OR	IC 95%
IL10 -1082								
n	13	34	47	217				
AA	7 (0,54)	5 (0,14)	12 (0,26)	100 (0,46)				
AG	5 (0,38)	21 (0,62)	26 (0,55)	91 (0,42)	0,032	-	-	-
GG	1 (0,08)	8 (0,24)	9 (0,19)	26 (0,12)				
Genótipo								
GG vs AA								
Total vs C					0,027	4,90	2,89	1,10-7,58
T vs C					ns			
P vs C					0,001**	10,67	6,15	1,86-20,39
P vs T					ns			
IL10 -3575								
n	14	34	49	224				
AA	2 (0,14)	3 (0,09)	5 (0,22)	13 (0,06)				
AT	5 (0,36)	15 (0,44)	20 (0,28)	77 (0,35)	ns*	-	-	-
TT	7 (0,50)	16 (0,47)	23 (0,50)	134 (0,60)				
IL10 -2849								
n	14	35	49	224				
AA	1 (0,07)	0 (0,00)	1 (0,02)	12 (0,05)				
AG	3 (0,21)	16 (0,46)	19 (0,39)	52 (0,23)	ns*	-	-	-
GG	10 (0,71)	19 (0,54)	29 (0,59)	160 (0,71)				
IL10 -2763								
n	14	36	50	224				
AA	1 (0,07)	2 (0,06)	3 (0,06)	21 (0,09)				
AC	7 (0,50)	15 (0,42)	22 (0,44)	66 (0,29)	ns*	-	-	-
CC	6 (0,43)	19 (0,52)	25 (0,50)	138 (0,62)				
IL10 -592								
AA	2 (0,18)	5 (0,14)	7 (0,15)	32 (0,14)				
AC	8 (0,62)	16 (0,44)	24 (0,51)	95 (0,42)	ns*	-	-	-
CC	3 (0,23)	13 (0,36)	16 (0,34)	97 (0,43)				
TOTAL	13	34	47	224				

T = tolerantes; P = persistentes; C = controles saudáveis; n = número de indivíduos; χ² = qui-quadrado; RC = razão de chances; IC = intervalo de confiança; ns = não significante.

* se refere à análise de todos os dados.

** p_c – após correção de Bonferroni (p_c = 0,002).

A homozigose para o alelo G também estava aumentada em comparação com o grupo controle (12%), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 3).

Discussão

A prevalência da alergia a alimentos vem aumentando nas últimas décadas, em parte devido a mudanças nos hábitos alimentares. Os antecedentes genéticos têm se mostrado importantes e parecem contribuir não só para o desenvolvimento global da alergia, como também para sua gravidade e persistência¹⁷.

No presente estudo, após observação que clinicamente muitos pacientes estavam ainda persistentes à idade de 5 anos, tentou-se avaliar fatores que poderiam justificar este fenótipo, entre eles a ocorrência de polimorfismos de IL-10 que poderiam não induzir à tolerância do leite de vaca. Outros autores já haviam relacionado estes dados, porém em nossa população, caracterizada por grande miscigenação, poderia haver um perfil diferente daquele já publicado, o que justificaria esta pesquisa. Embora seja uma casuística reduzida para se concluir sobre perfil genético relacionada à persistência de ALV, este é o primeiro estudo entre a associação de ALV e polimorfismos de IL-10. O tamanho da amostra pode ser um fator de erro em estudos de associação¹⁹, devendo ser utilizadas populações tão grandes quanto possível para manter o poder estatístico capaz de detectar uma associação significativa. Entretanto, a presença do alelo G na posição -1082 mostrou um risco seis vezes maior para desenvolver uma alergia persistente (OR=6,15), mantendo-se este risco mesmo após cuidadosa correção estatística de Bonferroni.

Observamos também associação quando comparamos pacientes persistente *versus* tolerantes à ALV onde o alelo G em homozigose estava presente em uma frequência mais elevada no grupo persistente. Corroborando com os nossos dados, Hunninghake et al. mostraram associação do genótipo GG com exacerbação da asma em crianças expostas a alérgenos de ácaros na Costa Rica²⁰. Ao contrário, Kim et al. mostraram associação do alelo A do polimorfismo -1082 com asma induzida por aspirina além da presença de rinosinusites devido à interação de entre polimorfismo de IL-10 -1082A/G e TGFB -509C/T²¹.

Diferentes estudos têm mostrado resultados conflitantes com relação aos níveis séricos de IL-10 e os dados de polimorfismos^{22,23}, o que indica a necessidade de um estudo entre a associação dos polimorfismos do gene que codifica a IL-10 e os níveis dessa citocina em nossa população. Apesar de acreditarmos que uma menor produção de IL-10, pode resultar na falta da indução de tolerância e contribuir para um fenótipo alérgico, a alta produção de IL-10 poderia estar relacionada à maior gravidade das doenças alérgicas. Isso pode ser explicado pelo fato de IL-10 ser um potente fator de crescimento e fator de diferenciação em células B ativadas humanas, levando à amplificação da resposta imune humoral²⁴.

Em resumo, nossos resultados indicam que o polimorfismo -1082A/G no gene da IL-10 pode estar associado à ALV. Além disso, se correlacionou com a gravidade da alergia a leite de

vaca, podendo funcionar como um marcador de persistência a ALV, servindo de alerta para essa evolução e a necessidade de intervenção precoce nesses pacientes.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). Agradecemos ao Prof. Jorge Kailil, chefe do Laboratório de Imunologia do InCor, por permitir a utilização das amostras dos indivíduos saudáveis (controles) neste estudo.

Referências

1. Sampson HA. Food Allergy: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin Immunol* 1999;103:717-28.
2. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* 2009;124:1549-55.
3. Björkstén B. Genetic and environmental risk factors for the development of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:249-53.
4. Host A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:33-37.
5. Wal JM. Cow's milk allergens. *Allergy* 1998;53:1013.
6. Crittenden RG, Bennett LE. Cow's milk Allergy: a complex disorder. *J Am Coll Nutr* 2005;24:S582-91.
7. Brandtzaeg PE. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann NY Acad Sci* 2002;964:13-45.
8. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunological Rev* 2005;206:232-59.
9. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
10. Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S460-75.
11. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27(1):20-1.
12. Scott-Taylor TH, Hourihane JB, Harper J, Strobel S. Patterns of food allergen-specific cytokine production by lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1473-80.
13. van der Velden VH, Laan MP, Baert MR, de Waal Malefyt R, Neijens HJ, Savelkoul HF. Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN γ , IL4 and IL10. *Clin Exp Allergy* 2001;31:997-1006.
14. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+ CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004;199:1679-88.
15. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and Transforming growth factor β 1 promoter polymorphism in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1958-62.
16. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin 10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-9.
17. Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, et al. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:583-90.

18. Bignon JD, Vinã MF. 12th IHWC HLA Class II Reference Protocol. In: Technical Handbook of 12th International Histocompatibility Workshop, ed. Fauchet and Charron, HLA et Médecine, Paris, 1995.
19. Colhoun HM, Mckeigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361:865-72.
20. Hunninghake GM GM, Soto-Quiros ME, Lasky-Su J, Avila L, Ly NP, Liang C, et al. Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:93-8.
21. Kim SH, Yang EM, Lee HN, Cho BY, Park HS. Combined effect of IL-10 and TGFβ1 promoter polymorphisms as a risk factor for aspirin-intolerant asthma and rhinosinusitis. *Allergy* 2009;64:1221-25.
22. Zhang X, Hei P, Deng L, Lin J. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein production in peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2007;13:135-40.
23. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RJ, Huizinga T. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:3915-22.
24. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1890-3.

Correspondência:
Antonio Carlos Pastorino
Rua Dr. João Batista S. Faria, 113 - ap. 141
CEP 02403-050 – São Paulo, SP
Telefone: (11) 3063.2791
E-mail: acpastorino@uol.com.br