



Epigenética da asma: revisão

Epigenetics of asthma: a review

Ataulpa P. Reis, MD, PhD¹

RESUMO

O tratamento atual da asma permite controlar os sintomas, mas não modifica a sua história natural. Mecanismos epigenéticos aumentaram muito nosso conhecimento do início e progressão da asma, e novas estratégias de tratamento serão desenvolvidas para esta geração e para prevenção de asma de gerações futuras. O campo certamente avançou muito nos últimos anos. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão de estudos experimentais e clínicos publicados nos últimos anos. As fontes de dados incluíram artigos originais, revisões e publicações concernentes indexados nos bancos de dados PubMed, MEDLINE, LILACS, SciELO e publicações *on line* nos últimos 20 anos. Os resultados da presente revisão mostraram que marcadores epigenéticos (metilação do DNA, modificações das histonas e síntese de RNAs não codificadores) trabalham em concerto com outros componentes do mecanismo regulador celular para controlar a expressão de genes. Alterações nestes marcadores epigenéticos estão associadas com exposições relevantes para a asma, particularmente dieta, poluição atmosférica, endotoxinas, alérgenos ambientais e fumaça de cigarro, assim como com fenótipos de asma. Por outro lado, estudos estão começando a decifrar o papel da regulação epigenética da expressão dos genes associados ao desenvolvimento de asma alérgica. Em conclusão, avanços tecnológicos recentes têm tornado possível o estudo de marcadores epigenéticos nos pulmões, e está sendo antecipado que este conhecimento vai melhorar a compreensão da biologia dinâmica nos pulmões e que levará ao desenvolvimento de novos meios de diagnóstico e tratamento para pacientes com asma.

Descritores: Asma, epigenética, fatores ambientais, doenças alérgicas.

ABSTRACT

Current asthma treatment allows to control symptoms but does not modify the natural history of the disease. Epigenetic mechanisms have significantly increased our understanding of the initiation and progression of asthma, and new treatment strategies will be developed for today's generation and ultimately for the prevention of asthma in future generations. Research in the field has certainly advanced significantly in the past few years. The objective of this study was to review experimental and clinical studies that have been published in the last years. Original articles, reviews and related texts published over the past 20 years were retrieved from PubMed, MEDLINE, LILACS, SciELO databases and other online publications. The results of the present review showed that epigenetic markers (DNA methylation, modification of histone tails, and synthesis of noncoding RNAs) work in concert with other components of the cellular regulatory machinery to control the expression of genes. Changes in these epigenetic markers have been associated with exposures relevant to asthma, particularly diet, air pollution, endotoxins, environmental allergens and tobacco smoke, in addition to asthma phenotypes. Conversely, studies are beginning to decipher the role of epigenetic regulation of gene expression in the development of allergic asthma. In conclusion, recent technological advances have made it possible to study epigenetic markers in the lung, and it is anticipated that this knowledge will enhance our understanding of dynamic biology in the lung and lead to the development of novel diagnostic and therapeutic approaches for patients with asthma.

Keywords: Asthma, epigenetics, environmental mechanisms, allergic diseases.

¹ Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG.

Correspondência para:
Ataulpa P. Reis
E-mail: ataulpapreis@gmail.com

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Submetido em: 19/03/2014,
aceito em: 20/06/2016.

INTRODUÇÃO

Doenças complexas em geral, e asma em particular, são amplamente conhecidas como condições nas quais tanto genes quanto fatores ambientais têm papéis críticos. O componente ambiental da asma tem relevância pelo aumento marcante da prevalência da doença nas últimas décadas¹, fato incompatível com mecanismos puramente genéticos. Para aumentar a complexidade, a asma é altamente influenciável por fatores do desenvolvimento na primeira infância, independente da idade na qual o diagnóstico de asma é realizado². Neste contexto, a epigenética que estuda as mudanças herdadas na expressão do gene sobre os fenótipos celulares, mas que não envolve mudanças na sequência subjacente do DNA³⁻⁵, tem emergido como um campo promissor de investigação. Certamente os mecanismos epigenéticos são essenciais para elucidar a resposta dada pelas exposições ambientais e pelos processos de desenvolvimento, e contribuem para o conhecimento da origem das doenças e entendimento da variabilidade fenotípica. A observação de que exposição ambiental a certos agentes na primeira infância, tais como infecção, poluentes e fármacos, pode contribuir para o desenvolvimento de asma alérgica, levanta questões fundamentais sobre o mecanismo da doença. Se atopia e a resposta imunológica polarizada para Th2 são mecanismos precursores no desenvolvimento da asma na infância, como então uma infecção viral respiratória pode mudar o fenótipo das células T *helper*? A epigenética pode dar resposta a esta indagação.

O interesse atual da epigenética na asma é também o resultado da falta de elucidações dadas pelos estudos abordando a genética da asma. Tanto os estudos da associação genética simples quanto os mais recentes da associação a nível genômico (*genome-wide association*) foram eficientes em identificar um número de genes candidatos a terem significado biológico⁷⁻¹⁰, mas pecaram por não elucidar grande parte das variações genotípicas responsáveis pela asma¹¹⁻¹². Isto motivou estudos de procura de fontes das variações fenotípicas que fossem baseadas no DNA, mas que não fossem puramente genéticas.

A ênfase na epigenética se tornou possível com os avanços tecnológicos. Os estudos do genoma amplo abriram a possibilidade de análise de alguns marcadores genéticos importantes, tais como a metilação do DNA e modificações de histonas pós-transcrição¹³⁻¹⁴. A metilação do DNA surgiu como método viável em estudos populacionais, pois pode usar pequenas quantidades de DNA, mesmo que conservadas por períodos longos, permitindo a utilização ampla deste método de estudo de epigenética¹⁵⁻¹⁶.

METILAÇÃO DO DNA, ALTERAÇÃO DAS HISTONAS E EXPRESSÃO DE *microRNAs* ABERRANTES

As modificações epigenéticas mais comuns envolvem a metilação do DNA ou modificação pós-transcrição de grupos de aminoácidos das histonas por acetilação, metilação ou fosforilação¹⁸⁻¹⁹.

A metilação do DNA é um processo bioquímico que envolve a adição de um grupo metil aos nucleotídeos de DNA cisteína ou adenina. É considerada um processo epigenético que leva principalmente ao silenciamento do gene, e subsequente inibição da transcrição gênica. Em geral, a metilação de DNA ocorre em diferentes CpGs (regiões do DNA onde nucleotídeos citosina ocorrem próximos a nucleotídeos guanina, separados apenas por um fosfato), agrupados em ilhas na maioria dos genes. Essas ilhas ricas em CpGs têm um papel crítico nas regiões promotoras dos genes. Uma vez que estas CpGs sejam metiladas, a transcrição gênica pode não acontecer; por outro lado, quando são desmetiladas, as regiões promotoras podem se tornar ativas, permitindo a interação com vários fatores de transcrição que controlam a ativação gênica. Por exemplo, nas células T a metilação tem um papel importante no desenvolvimento, ativação e manutenção da célula T efetora. A desmetilação da região da FOX P3 (*forkhead box protein P3*) favorece o desenvolvimento de células T reguladoras. Durante este desenvolvimento das células T em efectoras ou outros tipos de células T, existe um intenso mecanismo de alterações epigenéticas. As principais enzimas associadas à metilação do DNA são as DNA metiltransferases (DNMTs) e estas enzimas têm um papel preponderante no processo de metilação. DNMT1 é a principal DNMT, e é importante na manutenção da metilação do DNA, mantendo o silenciamento do mesmo. DNMT3a e DNMT3b são as principais enzimas responsáveis por novas metilações e são mediadoras da repressão do gene. Estas também podem interagir com DNMT1 e proporcionar um efeito cooperativo¹⁸⁻¹⁹.

Histonas são proteínas altamente alcalinas encontradas no núcleo de células eucarióticas, que promovem o empacotamento e a ordenação do DNA em unidades estruturais denominadas nucleossomos. O DNA é geralmente envolvido em torno de duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 ou H4. O principal mecanismo de regulação da cromatina é através de modificações pós-tradução na cauda proteica dessas histonas. Do ponto de vista bioquímico, as principais modificações são acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação (adição de SUMOs, *small ubiquitin-like modifiers*). Os efeitos de tais modificações variam desde a ativação de genes até o silenciamento de genes, podendo ter também algumas funções no reparo de DNA. Acetilação de diferentes resíduos de lisina em histonas representa um dos melhores exemplos neste sentido, resultando em ativação da transcrição. Essa ativação é catalisada

por histona acetiltransferases (HATs). Existem duas famílias de HATs: as do tipo A, localizadas no núcleo e que estão envolvidas na expressão de genes através de acetilação de histonas nucleossômicas, e as HATs do tipo B, que estão localizadas no citoplasma e são responsáveis pela acetilação de histonas recentemente sintetizadas, antes de serem montadas no nucleossoma. Modificações de histonas nas células T têm um papel importante no desenvolvimento de células T para diferentes subtipos, tendo papel importante em condições tanto fisiológicas como patológicas. Por exemplo, metilação de H3K9 é eficiente mecanismo de silenciamento em muitos genes efetores Th1 e Th2. Além disso, Th-POK (*Th inducing POZ-Kruppel factor*), o fator de transcrição primário para CD4, recruta diferentes histonas deacetilases, que silenciam muitos dos genes CD8, e como resultado, células T são induzidas ao desenvolvimento de subpopulação CD4¹⁸⁻¹⁹.

Cada um destes mecanismos está envolvido na regulação da expressão de genes²⁰. Um mecanismo adicional consiste na expressão aberrante de microRNAs. MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificadores envolvidas na repressão da transcrição e silenciamento de genes. Estes microRNAs são moléculas de RNA simples com 21-23 nucleotídeos de extensão e que induzem a degradação do mRNA alvo. O conhecimento da atividade destes microRNAs em asma ou outras doenças complexas talvez seja o menos conhecido entre os mecanismos epigenéticos. Um microRNA em particular pode ter centenas de genes alvos e, portanto, pode influenciar na expressão de uma grande quantidade de proteínas, causando sobretudo silenciamento do gene²¹.

Coletivamente, estes três principais mecanismos epigenéticos afetam interações do DNA com fatores de transcrição, estabilidade da transcrição, posicionamento do nucleossoma, compactação da cromatina e organização nuclear, todos determinando se um gene ou um grupo de genes vai ser ativado ou silenciado, e quando e onde um gene será expresso. Eles portanto têm papel crucial em determinar programas de transcrição de determinados tecidos. Quando, por epigenética, um gene é alterado durante o desenvolvimento, o novo código epigenético torna-se plataforma para futuras modificações epigenéticas que normalmente ocorrem durante o desenvolvimento²² (Figura 1).

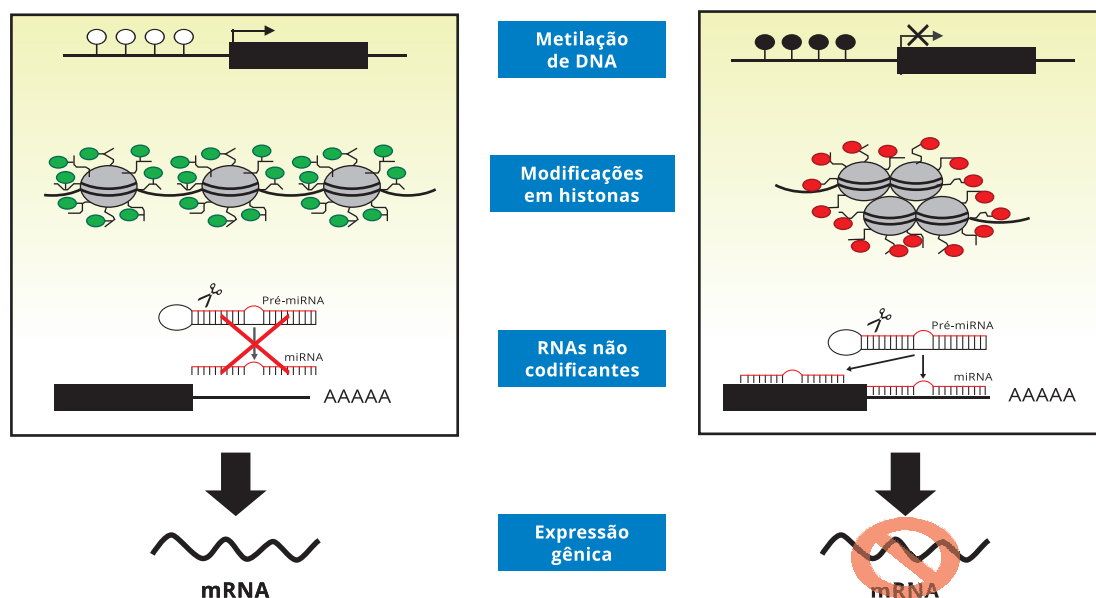
EPIGENÉTICA E O SISTEMA IMUNE

O desenvolvimento de uma célula T imatura (*naive*) para célula Th1 ou Th2 do sistema imune é associado com mudanças de linhagem específica com características epigenéticas. Durante a diferenciação para Th1, ocorre metilação na região entre interleucina IL-4 e

IL-13 no cromossomo 5q21²³, enquanto ocorre também acetilação de histonas em nível comparável nestas células T imaturas²⁴. Ambos os efeitos levam a uma redução de atividade Th2. Além disso, a ligação de T bet ao promotor de interferon gama não somente induz a aumento de atividade mas também desloca complexos de histona deacetilases, o que torna impossível a ligação de acetiltransferase²⁵, desta forma fazendo que o locus genético do interferon gama seja reprimido. Metilação deste locus também impede que o fator nuclear das células T seja ativado pelo interferon gama²⁶. Em contraste, as regiões IL-13 e IL-4 sofrem intensa desmetilação na diferenciação de Th2, o que facilita a transcrição dos fatores STAT6 e GATA3²³. Simultaneamente à desmetilação de DNA²⁴, as histonas nas regiões IL-13 e IL-4 são acetiladas, promovendo modificações estruturais no locus²⁷. O desenvolvimento e a função das células T reguladoras (Treg) é mediado predominantemente por FOXP3, e diversos estudos mostram que este fator de transcrição é influenciado por mecanismos epigenéticos. Um mecanismo estimulador é a metilação de FOXP3 nas células T CD4+CD25 e nas células T CD4+, mas ocorre desmetilação no caso das células T reguladoras naturais²⁸. Como os inibidores de deacetilase das histonas aumentam a expressão de FOXP3, foi também sugerido que o nível de acetilação das histonas do locus FOXP3 tem importante papel no desenvolvimento de células T reguladoras²⁹. Acetilação de histonas pode estar envolvida na diferenciação de células T para Th17³⁰. Além das células T, também os mastócitos sofrem regulação epigenética no locus IL-4/IL-13³¹. Para outras células do sistema imune, muito pouco é conhecido.

EXPOSIÇÕES AMBIENTAIS IMPLICADAS NA EPIGENÉTICA DA ASMA

Uma das exposições ambientais implicadas na asma e regulação epigenética é dieta. Existem vários estudos implicando modificações de dieta com maior ou menor risco de asma, tais como suplementação com vitamina D, E, soja e dieta Mediterrânea³²⁻³⁴. Contudo, a suplementação dietética mais documentada como relacionada com indução epigenética relevante para asma é ácido fólico como fonte de doação de radicais metil. Em ensaios com animais experimentais, a suplementação de ácido fólico administrado durante a gravidez e durante a amamentação foi associada com aumento da hiperreatividade brônquica e maior inflamação eosinofílica³⁵. Em humanos, a suplementação de ácido fólico está associada com maior risco de asma diagnosticada em crianças, e talvez exista uma janela na gravidez em que a suplementação com ácido fólico induza a alterações de epigenética, levando a maior risco de asma na infância³⁶⁻³⁸.



Fonte: acesso livre por Internet.

Figura 1 - Diagrama esquemático de mecanismos da regulação epigenética: metilação do DNA, modificação das histonas e RNAs não codificantes. À esquerda, modificações epigenéticas levando a aumento da expressão do gene, e à direita, modificações epigenéticas causando supressão da expressão do gene

Outra exposição ambiental há muito tempo considerada como fator de risco para desenvolvimento de asma em crianças é o tabagismo materno³⁹⁻⁴¹. Alguns estudos demonstram que o mecanismo de ação pode ser transmitindo por várias gerações. De forma interessante, o tabagismo da avó durante a gestação aumentou o risco de asma para os netos, mesmo que não tenha havido tabagismo da mãe⁴². Uma ação epigenética da exposição ao cigarro é mediada por rompimento da homeostase de histona acetiltransferase/histona diacetilase nas células imunes do sistema respiratório⁴³. Importante assinalar que neste trabalho ficou demonstrado que fumaça de cigarro atenuou a ação dos corticosteroides nos macrófagos alveolares, levando a resistência aos corticosteroides. O cigarro pode ainda exercer ações epigenéticas por metilação do DNA, ou por sequências regulatórias⁴⁴⁻⁴⁵.

Exposição a poluentes do tráfego de veículos também é considerada como indutor de asma por via epigenética⁴⁶. Existe a influência da poluição por gases do tráfego de veículos nas mães e desenvolvimento de asma nos filhos, e há envolvimento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que parece ser devido à metilação do DNA na região promotora ACSL3. Quanto mais exposição aos hidrocarbonetos, maior a metilação. Existe também poluição por hidrocarbonetos derivados da preparação de alimentos com uso de carvão ou defumados⁴⁷.

Exposição a endotoxinas bacterianas na primeira infância pode proteger contra asma, mas exposição mais tardia pode predispor à doença⁴⁸⁻⁵². Em alguns estudos de população rural, a exposição a endotoxina bacteriana esteve relacionada à proteção contra rinite e asma⁵³. Existe indicação de interação genética, sendo que a endotoxina afeta principalmente polimorfismo de CD14 e imunoglobulina IgE⁵⁴⁻⁵⁵. As endotoxinas podem ainda produzir efeito no polimorfismo dos *toll-like receptors* (TLRs) destas populações rurais⁵⁶. Um importante mecanismo descrito seria uma reprogramação epigenética do TNF- α destas células imunes por remodelamento da cromatina⁵⁷. Além disso, foi também demonstrado que histonas sofrem desmetilação na região IL-1 β após estimulação dos leucócitos humanos por endotoxinas⁴⁸.

Em estudo de coorte comparando mães e recém-nascidos expostos a ambiente de fazenda *versus* não expostos, um número aumentado de células positivas para FOXP3 foi encontrado em células mononucleares de sangue de cordão de recém-nascidos de mães com intensa exposição a ambiente de fazenda. Além disso, a função de células T reg foi mais eficiente naqueles com a exposição a fazenda. Estes achados foram associados à desmetilação do promotor de FOXP3 nas crianças de mães com exposição a leite de fazenda, quando comparadas a mães controle⁵⁸.

Exposição a alérgenos ambientais, incluindo ácaros, está associada a sensibilização e desenvolvimento de asma, e aqui também o mecanismo proposto envolve alterações dos TLRs, que funcionam como sentinelas ativadoras do sistema imune inato e têm papel crucial na programação da resposta Th2⁵⁸. Exposição a estes alérgenos ativa TLR4 e aumenta a expressão de um conjunto de microRNAs, incluindo miRNA-16, miRNA-21 e miRNA-126⁵⁹. O bloqueio seletivo do miRNA-126 leva a melhor controle de sintomas de asma e diminuição de resposta Th2, inflamação e hiperreatividade das vias aéreas. O mecanismo é a supressão da expressão de GATA-3 pelo miRNA-126.

Estudo sobre exposição ambiental de crianças na cidade de Boston, nos Estados Unidos, a alérgenos ambientais, endotoxina, fungos e poluentes atmosféricos, mostrou que altos níveis de metilação na região promotora dos receptores beta-2-adrenérgicos foram associados de forma significativa à diminuição de relato de dispneia, e à tendência para diminuição de sintomas de asma e obstrução das vias aéreas⁶⁰.

CONCLUSÕES

Mesmo ainda nos seus estágios iniciais, a análise epigenética oferece uma ferramenta poderosa para explorar os mecanismos das doenças complexas, tais como a asma, e ajuda a melhor definir os vários fenótipos desta doença. Usando a epigenética para entender a dinâmica biológica no trato respiratório, e aplicando este conhecimento para desenvolver novas oportunidades de diagnóstico e tratamento da asma, poderemos oferecer a nossos pacientes novas estratégias de controle da doença.

AGRADECIMENTO

Nosso agradecimento ao Prof. Dr. Sérgio D. J. Pena, geneticista do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, pela revisão do artigo.

REFERÊNCIAS

- Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 2006;355:2226-35.
- Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *Lancet*. 2013;382(9901):1360-72.
- Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 2007;8:253-62.
- Vercelli D. Genetics, epigenetics and the environment: Switching, buffering, releasing. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:381-6.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:245-54.
- Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:169-82.
- Li X, Howard TD, Zheng SL, Haselkorn T, Peters SP, Meyers D, et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ r regions. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:328-35.
- Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 2010;363:1211-21.
- Moffatt MF, Kabisch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007;448:470-3.
- Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet*. 2011;43:887-92.
- Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet*. 2010;11:446-50.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461:747-53.
- Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*. 2010;11:191-203.
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. 2005;120:169-81.
- Palmke N, Santacruz D, Walter J. Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip. *Methods*. 2011;53:175-84.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*. 2005;37:853-62.
- Isidoro-Garcia M, Davila-Gonzalez I, Pascual de Pedro M, Sanza-Lozano C, Lorente, Toledano F. Interactions between genes and the environment. *Epigenetics in allergy*. *Allergol Immunopathol*. 2007;35:254-8.
- Miller RL, Herbstman J. Epigenetic mechanisms in asthma. In: Haslberger A, Gressler S, editors. *Epigenetics nutrition and environmental health*. Berlin: Wiley; 2009. p. 253-63.
- Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, Pegoraro V, Bollati V, Marinelli B, et al. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect*. 2009;117:217-22.
- Ho SM. Environmental epigenetics of asthma: an update. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(3):453-65.
- Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs: essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:15-26.
- Joss-Moore LA, Albertine KH, Lane RH. Epigenetics and the developmental origins of lung disease. *Mol Genet Metab*. 2011;104(1-2):61-6.
- Lee DU, Agarwal S, Rao A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity*. 2002;16:649-60.
- Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A. TH cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol*. 2002;3:643-51.
- Chen GY, Osada H, Santamaria-Babi LF, Reiji K. Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:16894-9.
- Jones B, Chen J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J*. 2006;25:2443-52.
- Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:607-56.
- Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol*. 2009;182:259-73.

29. Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, Chen C, Wang L, Porrett PM, et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med.* 2007;13:1299-307.
30. Akimzhanov AM, Yang XO, Dong C. Chromatin remodeling of interleukin-17(IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J Biol Chem.* 2007;282:5969-72.
31. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2003;4:616-23.
32. Devereux G, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Harbour PJ, et al. Low maternal vitamin E intake during pregnancy is associated with asthma in 5-year-old children. *Am J Resp Crit Care.* 2006;174:499-507.
33. Devereux G, Litonjua A, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:853-9.
34. Castro-Rodriguez JA, Garcia-Marcos L, Sanchez-Solis M, Pérez-Fernández V, Martínez-Torres A, Mallol J. Olive oil during pregnancy is associated with reduced wheezing during the first year of life of the offspring. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45:395-402.
35. Blatter J, Han YY, Forno E, Brehm J, Bodnar L, Celedón JC. Folate and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(1):12-7.
36. Whitrow M, Moore V, Rumbold A, Davies M. Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol.* 2009;170:1486-93.
37. Haberg SE, London SJ, Nafstad P, Nilsen RM, Ueland PM, Vollset SE, et al. Maternal folate levels in pregnancy and asthma in children at age 3 years. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:262-4.
38. Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA, et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 mg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One.* 2009;4:e7845.
39. Moshhammer H, Hoek G, Luttmann-Gibson H, Neuberger MA, Antova T, Gehring U, et al. Parental smoking and lung function in children: an international study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:1255.
40. Alati R, Al-Mamun A, O'Callaghan M, Najman JM, Williams GM. In utero and postnatal maternal smoking and asthma in adolescence. *Epidemiology.* 2006;17:138-44.
41. Eisner MD. Environmental tobacco smoke exposure and pulmonary function among adults in NHANES III: impact on the general population and adults with current asthma. *Environ Health Perspect.* 2002;110:765-70.
42. Li Y-F, Langholz B, Salam MT, Gilliland FD. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest.* 2006;127:1232-41.
43. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression and inhibits glucocorticoid action in alveolar macrophages. *FASEB J.* 2001;15:1110-2.
44. Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T, et al. Frequent epigenetic silencing of the p16 gene in non small cell lung cancer of tobacco smokers. *Jpn J Cancer Res.* 2002;93:1107-13.
45. Diegel H, Lubbert M. DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;55:1-11.
46. Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, et al. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One.* 2009;4:e4488.
47. Hon J, Hershey GKK. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:33-41.
48. Douwes J, Pearce N, Heederik D. Does environmental endotoxin exposure prevent asthma? *Thorax.* 2002;57:86-90.
49. Chan C, Li L, McCall CE, Yoza BK. Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1beta promoter. *J Immunol.* 2005;175:461-8.
50. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 2009;30:475-87.
51. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* 2007;447:972-8.
52. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: Implication in innate immunity. *J Biol Chem.* 2009;284:34590-9.
53. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 2002;347:869-77.
54. Simpson A, John SL, Jury F, Niven R, Woodcock A, Ollier WE A, et al. Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment. *Am J Resp Crit Care.* 2006;174:386-92.
55. Zambelli-Weiner A, Ehrlich E, Stockton ML, Grant AV, Zhang S, Levett PN, et al. Evaluation of the CD14/-260 polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:1203-9.
56. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:482-8.
57. Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, Wolf HJ, Rogers J, Vu K, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res.* 2006;66:3338-44.
58. Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic mechanisms and the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:1243-55.
59. Mattes J, Collison A, Plank M, Phipps S, Foster PS. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:18704-9.
60. Gaffin JM, Phipatanakul W. Beta-2 adrenergic receptor methylation influences asthma phenotype in the school inner city asthma study. *Receptors Clin Investig.* 2014;1:4-6.