



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Projeto de Pesquisa

Título:

**Estudo longitudinal de dados de saúde na Região
Metropolitana da Grande Vitória para fins da
associação entre a qualidade do ar e sintomas de asma
em crianças e adolescentes'**

Equipe:

Prof. Dr. José Geraldo Mill – Pesquisador responsável, Depto. Ciências Fisiológicas/UFES

Profa. Dra. Jane Meri Santos – Pesquisadora principal, Depto. Engenharia Ambiental/UFES

Deborah M. Proctor – Pesquisadora, ToxStrategies, Califórnia, USA

Prof. Dr. Neyval Costa Reis Jr – Pesquisador, Depto. Engenharia Ambiental/UFES

Dra. Faradiba Sarquis Serpa – Pesquisadora, Depto. Clínica Médica/EMESCAM

Prof. Dr. Valdério Reisen – Pesquisador, Depto. Estatística/UFES

Vitória, ES

Outubro/2017



1.0 Histórico e Justificativa do estudo

A asma é problema de saúde pública em todo o mundo, sendo uma das mais importantes doenças não transmissíveis que afeta, aproximadamente, 300 milhões de indivíduos. Cerca de 250.000 mortes a cada ano são atribuíveis a esta doença (Bousquet et al. 2005; Souza-Machado et al. 2012; WHO 2007, 2013). A asma é mais comum na infância e adolescência e a causa exata da doença permanece desconhecida. Como as demais doenças complexas, contribuem para seu aparecimento e curso clínico fatores genéticos e fatores ligados ao meio ambiente (ACAAI 2014; NHLBI, 2014). Dentre esses últimos, pode-se citar a exposição a produtos químicos e irritantes suspensos no ar e aeroalérgenos, como pólenes, ácaros e fungos contidos em poeira, dentre outros. Podem também se associar ao aparecimento ou agravamento de sintomas e desencadeamento de crises de asma, as infecções respiratórias, o ar frio e até mesmo o exercício físico (ACCAI, 2014).

O Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (ISAAC) avaliou a prevalência de asma e de rinite alérgica em vários municípios do Brasil (Costa et al. 2013). Em crianças e adolescentes a taxa média de prevalência de asma ativa foi de 24% e 19%, respectivamente (Costa et al. 2013). Serpa et al. (2014) realizaram estudo de prevalência de asma e rinite em escolares do município de Vitória por meio da aplicação do questionário ISAAC. Foram avaliados 2.452 escolares e as prevalências de asma e rinite foram de 26,5% e 46,7%, respectivamente. Esses percentuais corresponderam as mais altas prevalências observadas em diferentes cidades do Brasil que participaram do estudo ISAAC.

A asma é a terceira causa de internação hospitalar e a quarta causa de morte por doença respiratória no Brasil (Costa et al. 2013; Souza-Machado et al. 2012). Na última década, vários estudos foram conduzidos no Brasil, para caracterizar possíveis associações entre a prevalência de asma e necessidade de internação hospitalar devido aos efeitos nocivos sobre o aparelho respiratório de produtos químicos suspensos no ar, incluindo o material particulado (MP), ozônio (O_3), dióxido de enxofre (SO_2), e óxido de nitrogênio (NO_x), incluindo a região da Grande Vitória (Castro et al. 2007, 2011; FFM 2003, 2007; Freitas et al. 2016; Pereira, 1999).



A região da Grande Vitória possui fontes de poluição importantes e diversificadas. Nesta região localizam-se seis portos que formam o maior complexo portuário do Brasil (Freitas et al. 2016). A poluição industrial oriunda de plantas que se instalaram nesta região a partir dos anos 70 do século passado, tem sido reconhecida como uma fonte potencialmente significativa de poluentes do ar que podem estar associados com a asma (Freitas et al. 2016). Na região da Grande Vitória, foi implantada em 2002 uma 'Rede Automática de Monitoramento da Qualidade do Ar (RAMQAR)' (Freitas et al. 2016). Com base em dados coletados pela RAMQAR, foi relatado que as atividades industriais na região são as principais responsáveis pelos níveis de MP_{10} , NO_x , SO_2 e pequenas quantidades das emissões de hidrocarbonetos (Freitas et al. 2016). Estudos conduzidos na região da Grande Vitória encontraram associações significativas entre as internações hospitalares por doenças respiratórias, incluindo asma, e o grau de poluição do ar (Castro et al. 2007, 2011; FFM 2003, 2007; Freitas et al. 2016; Pereira, 1999). Em 2005, produtos químicos poluentes do ar medidos em Vitória foram comparados aos padrões estabelecidos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) de 1990 e às diretrizes para a qualidade do ar da OMS, em relação ao MP_{10} , SO_2 , NO_2 , e O_3 . Os autores indicaram que os padrões primários e secundários de qualidade do ar não foram excedidos (Castro et al. 2011).

Os artigos científicos publicados até aqui sobre asma e poluição do ar no Brasil e na Grande Vitória são decorrentes de estudos ecológicos ou de estudos descritivos relativos à população geral ou a subgrupos populacionais específicos. Tais estudos não são ideais para avaliar com precisão a associação entre exposição-resposta e a relação causativa entre a asma e a exposição aos poluentes suspensos no ar (Castro et al. 2011). Os estudos ecológicos não são adequados para estabelecer relações causais, servindo mais especificamente para gerar hipóteses e não para testá-las. Inferências no nível da população não podem traduzir com confiança efeitos no nível do indivíduo (Rothman et al., 2008). Embora os estudos conduzidos no Brasil tenham utilizado métodos quantitativos, tais como modelos aditivos generalizados (MAG) e modelos de regressão de Poisson, não houve coleta de dados primários, havendo possibilidade de contaminação dos achados principais por variáveis de confusão e limitações no uso de variáveis de controle.

Castro e colaboradores observaram taxa de internação hospitalar por asma relativamente mais alta em crianças de até 6 anos de idade nos bairros de Vitória com condições sociais e ambientais mais precárias, incluindo ruas não pavimentadas, trânsito de caminhões pesados ou ônibus, e queima de lixo, ex.: 88% em São José, 59% em Jabour (Castro et al. 2007).

Nos últimos anos foram identificados alguns fatores genéticos e epigenéticos como predispondo indivíduos à asma na infância, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e metilação de DNA. Certos SNP foram identificados como associados à suscetibilidade à asma em estudos anteriores (ex.: Costa et al. 2015, Meyers et al. 2014, Moffatt et al. 2010). Exemplos de regiões cromossômicas de interesse comumente associadas à asma incluem 5q32 (no gene, *ADRB2*), 6p21 (no *HLA-DQ*), e 17q21 (associado com *GSDMA*, *GSDMB* e *ORMDL3*), entre outros. Além do papel dos SNP, há atualmente necessidade de se realizar estudos que avaliem mecanismos epigenéticos, especialmente a metilação de DNA, que possam contribuir para a suscetibilidade à asma (Thomsen et al. 2014). Evidências preliminares indicam que perfis alterados de metilação de DNA em amostras do epitélio das vias respiratórias e de leucócitos possam estar associados à asma (Nicodemus-Johnson et al. 2016, Stefanowicz et al. 2012; Kumar et al. 2016, Perera et al. 2009). Uma parte dessas alterações também mostrou relações com exposição à poluição do ar (Perera et al. 2009). Entretanto, esses estudos foram conduzidos em populações da América do Norte e Europa, inexistindo dados desta natureza na população brasileira. Até onde sabemos, somente um estudo recente em Salvador, Bahia, (Costa et al. 2015) avaliou marcadores genéticos em crianças com asma. Os autores relataram que as regiões cromossômicas 14q11 (associadas com *SLC7A7*, *MMP14* e *DAD1*) e 15q22 (associadas com *RORA*, *SMAD3* e *SCG3*) podem estar associadas com sintomas de asma em crianças. Devido às informações limitadas relacionadas às alterações de SNP e metilação de DNA na susceptibilidade à asma em crianças brasileiras, estudos adicionais podem contribuir com informações valiosas para a compreensão da influência de fatores genéticos e epigenéticos na suscetibilidade à asma nessa população.

Assim, este estudo se propõe a investigar, em uma abordagem longitudinal, o impacto da poluição atmosférica na frequência e gravidade dos sintomas em crianças e adolescentes portadores de asma leve e moderada que residem em Vitória. Para tanto, será feita a coleta direta de dados individuais, de parâmetros funcionais do aparelho respiratório concomitantemente com medidas da concentração de poluentes no ar respirável da cidade. Cabe destacar que o controle da asma é um desafio complexo e que a doença se estende por toda a vida de muitos indivíduos. Portanto, a identificação de fatores associados à piora do controle do asmático são importantes não só para os indivíduos incluídos na pesquisa mas para toda a população na medida em que os dados obtidos podem contribuir para otimizar os recursos públicos e privados investidos no controle desta doença debilitante e de alto custo.



2.0 Objetivos do Estudo

O objetivo geral do estudo longitudinal é determinar se, e em que extensão, os níveis de alguns poluentes suspensos no ar afetam os sintomas da asma entre crianças e adolescentes (8 a 14 anos) moradores de Vitória. O estudo é projetado para obtenção de dados diretos em amostra robusta de sujeitos e inclui um número elevado de covariáveis relacionados ao desencadeamento e piora dos sintomas de asma de acordo com a literatura médica atual. Como a sazonalidade é um fator importante na modulação da exacerbação dos sintomas da asma, foi proposto um estudo longitudinal com os mesmos sujeitos da pesquisa, abrangendo o período de inverno e verão. O acompanhamento da saúde de crianças e adolescentes com asma por um período de 1 ano, combinado com monitoramento abrangente dos poluentes na atmosfera de Vitória, irá fornecer os dados longitudinais necessários para a pesquisa de possíveis associações causais. Além disso, fontes potenciais de parcialidade e confusão que possam mascarar as verdadeiras relações entre a qualidade do ar e a exacerbação da asma serão investigadas e controladas na análise de exposição-resposta.

A inovação do estudo reside na obtenção direta de dados na população exposta com um monitoramento abrangente da qualidade do ar. A coleta de dados em campo será rigorosa e acompanhada por equipe envolvendo médicos e enfermeiros. Além disso, será feita coleta abrangente de covariáveis, incluindo análise de genes que, em outras populações, mostraram associação com o aparecimento ou gravidade da doença. A produção e divulgação dos dados irá permitir uma melhor compreensão da dinâmica da doença em Vitória, o real impacto da poluição na exacerbação de sintomas. Estes dados são importantes para definir estratégias de melhoria da qualidade do ar e para o estabelecimento de estratégias para enfrentamento desse problema de saúde pública.

5.1. População do estudo

Constituem a população do estudo crianças e adolescentes de 8-14 anos de idade que sejam moradoras de bairros de Vitória onde os pesquisadores do projeto conduzirão a coleta de dados de poluição. Numa proposta preliminar, pretende-se incluir sujeitos de ambos os sexos residentes nas regiões de Maruípe, Enseada do Suá e Maria Ortiz. Entretanto, a depender do ritmo de inclusão de participantes previsto, outros bairros de Vitória poderão ser arrolados como potenciais locais de recrutamento de participantes.

Os principais critérios de inclusão são:

- a) Idade compreendida entre 8 a 14 anos;
- b) Ser morador de um dos bairros/regiões escolhidos pelos pesquisadores para realizarem o monitoramento do ar;
- c) Ter o diagnóstico de 'asma' segundo registros médicos em unidades de atenção básica ou consultório médico, clínicas, etc;
- d) Ter o diagnóstico confirmado de 'asma leve a moderada' feita por médico da equipe do projeto;
- e) Não ser portador de incapacidade física ou mental que impeça o uso dos instrumentos de coleta de dados (espirômetro portátil para medida domiciliar diária do FEM e FEV1s e diário do paciente).
- f) Ter a concordância dos pais ou responsáveis formalizada pela assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e, no caso de terem idade ≥ 12 anos, assinar o Termo de Assentimento, respectivamente.

Não serão incluídos no estudo, portadores de asma grave (necessidade de uso continuado e de altas doses de corticosteroides), com dificuldades de locomoção que impossibilitem o acesso aos locais dos exames ou portadores de outras doenças crônicas (câncer, doenças cardíacas, doenças renais, hepáticas ou outras doenças respiratórias concomitantes com asma).

5.2. Tamanho Amostral

A hipótese a ser testada no estudo é que o incremento de um intervalo interquartilico (IQR) de material particulado fino ($PM_{2.5}$) no ar respirável monitorado externamente à residência da criança ou adolescente se associa com redução de 6% na FEV-1s. Estudo realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Nascimento et al., 2016) mostrou que o IQR na concentração do $MP_{2.5}$ médio na atmosfera de Vitória é de cerca de $4,2 \text{ ug/m}^3$. Considerando que estudos anteriores (Noonan et al., 2017) em crianças asmáticas encontraram valor médio para a fração de ar expirado do 1o. segundo de $85 \pm 21\%$ do valor esperado para a idade, para se testar a hipótese de ausência de associação (H_0 , ou seja, variação menor do que 6% com a variação de 1 IQR) com erro do tipo I de 5% e erro do tipo II de 10% (poder do estudo de 90), precisariam ser incluídos na pesquisa, aproximadamente, 160 crianças. Considerando perda de cerca 25% (mudança de domicílio entre as duas coletas, retirada no termo de consentimento, falha na coleta de dados, etc), a meta é incluir 200 elegíveis nesta pesquisa.



5.3. Protocolo do Estudo

5.3.1. Seleção dos participantes/recrutamento

Será construído folheto (tipo *folder*) com informações básicas sobre o projeto para ser distribuído em algumas Unidades Básicas de Saúde de Vitória (Andorinhas, Maruípe, Enseada do Suá e Maria Ortiz) e em consultórios médicos. O folder conterá informações básicas sobre o projeto, incluindo pequena explanação sobre potenciais efeitos da poluição atmosférica nos sintomas de asma e a necessidade de se estudar o impacto desta exposição em crianças e adolescentes portadores desta doença. Serão dadas ainda informações sobre o local de realização do projeto e como os interessados poderão acessar a equipe de recrutamento. Adicionalmente, será também feita busca ativa de potenciais casos nos mesmos locais buscando-se informações com os médicos que fazem atendimento às crianças na faixa etária do estudo.

5.3.2. Critérios de inclusão

Os elegíveis deverão procurar a Clínica de Investigação Cardiovascular, vinculada ao Hospital Universitário da UFES, para uma consulta com médico vinculado ao projeto ao qual caberá decidir se o possível participante atende ou não a todos os critérios de inclusão listados a seguir:

- a) Idade compreendida entre 8 e 14 anos;
- b) Estar regularmente matriculado em escola pública ou privada;
- c) Receber diagnóstico de asma leve a moderada;
- d) Não ter outras doenças associadas que exijam tratamento específico e que possam interferir na evolução da doença ou no tratamento de asma.

5.3.3. Critérios de exclusão

São critérios de exclusão:

- a) Portadores de asma grave (indivíduos cujo controle de asma só é conseguido com uso contínuo de corticosteroides).
- b) Portadores de asma controlada ou de asma muito leve (indivíduos que não fizeram uso de broncodilatador e que não tenham apresentado sintomas de asma no último ano)
- c) Portadores de asma com doenças respiratórias concomitantes que exijam tratamento continuado.
- d) Crianças ou adolescentes com defeitos no tórax, problemas graves de locomoção (cadeirantes) ou portadores de déficit cognitivo que dificulte a realização do

monitoramento domiciliar da doença (preenchimento de diário, uso do espirômetro portátil, etc).

5.3.4. Exames iniciais

Após autorização de inclusão pelo médico assistente, o participante será encaminhado para a realização dos exames iniciais:

a) Coleta de sangue

Do sangue serão separadas alíquotas para Laboratório de Análises Clínicas para realização dos seguintes exames:

- Hemograma
- Bioquímica básica (glicose, ureia, ácido úrico, creatinina, colesterol total, HDL-c, triglicerídeos, PCR)
- Mediadores pró- e anti-inflamatórios (Periostina, IgE total, IgE específica para Dermatofagoides pteronyssinus, Blomia tropicalis, Dermatofagoides farinae e fungos do ar.

Observação: A definição final dos fungos a serem investigados dependerá de estudo piloto em 10 residências em locais onde o projeto será implantado para determinar os filos mais comuns encontrados em residências.

- Aliquotagem para análise de polimorfismos gênicos e metilação de DNA

b) Exames Clínicos

- Antropometria (medida de estatura, perímetros da cintura e quadril e peso corporal)
- Bioimpedância (balança InBody 230, para determinação da composição corporal e

distribuição da gordura corporal)

- Pressão arterial (Omron 765CP Intelissense)
- Eletrocardiograma convencional de repouso (ECG Mortara)
- Espirometria (Espirômetro Koko®) para medidas de diversos fluxos e volumes pulmonares (Capacidade Vital Forçada- CVF, Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo- VEF₁, relação VEF₁/CVF, Fluxo Expiratório Forçado 25-75- FEF 25-75% e Pico de Fluxo Expiratório- PFE).
- Medida de Óxido Nítrico Exalado (FeNO)

c) Preenchimento de formulários (juntamente com a mãe, pai ou responsável)

- Dados pessoais

- Histórico de asma e outras doenças alérgicas em pais e irmãos
- História da doença atual
- História médica pregressa e presença de comorbidades (notadamente doenças alérgicas)
- Uso de medicamentos
- Hábitos de vida (alimentação, atividade física, etc)
- Vida escolar
- Nível sócio econômico (a partir de bens disponíveis no domicílio)
- Escolaridade (incluindo pais ou responsáveis)
- Teste de Controle da Asma (ACT)

Observação: O preenchimento de formulários poderá ser feito, no todo ou em parte, durante visita domiciliar.

Após recolhimento de dados nesta etapa, o participante, juntamente com o adulto responsável (de preferência a mãe) receberão instruções completas e detalhadas sobre as medidas a serem feitas no domicílio (descritas abaixo). A cada participante será entregue um espirômetro portátil (marca/modelo) e um diário para ser preenchido no período de coleta domiciliar dos dados, como descrito no item seguinte.

5.3.4. Medidas e dados a serem coletados em domicílio

Cada participante deverá fazer a coleta de dados durante 15 consecutivos em dois períodos do ano: um denominado 'inverno' (junho a setembro) e outro de 'verão' (dezembro a março). Basicamente os participantes deverão coletar nesse período dois tipos de dados:

- a) Medida do FEV₁ (*peak flow*) no espirômetro portátil. Deverão ser feitas duas medidas a cada dia, uma de manhã (6-8 horas) e outra à noite (18-20 h). Para cada medida deverá ser feita 3 tentativas, considerando-se o valor máximo obtido em cada teste.
- b) Preenchimento do diário (de preferência ao final do dia) contendo informações básicas sobre a rotina do dia (atividades na escola, atividades de lazer, atividade física, necessidade de uso de medicamentos – agonista beta-2 de curta duração (salbutamol e fenoterol), presença de sinais e sintomas de asma – tosse, sibilos, dispneia, etc – uso crônico de medicamentos). Os participantes serão estimulados a preencherem o diário com a ajuda/participação de um adulto previamente orientado a respeito (ver anexo I).

Durante o período de coleta de dados em campo, o participante receberá visita domiciliar de enfermeira participante do projeto sempre que achar necessário. Entretanto, prevê-se visita regular

de enfermeira ao domicílio ao final do primeiro ou segundo dias de coleta de dados em campo para supervisão de todos os procedimentos de coleta de dados. Ao final do período de coleta, a enfermeira deverá fazer nova visita aos participantes para recolher o espirômetro e o diário. Esta visita será feita em hora pré-agendada para ser feita em presença do participante e do acompanhante adulto para possibilitar revisão completa dos dados obtidos. Havendo impossibilidade de devolução do material e dados no domicílio, esta etapa poderá ser realizada também, mediante pré-agendamento, na Clínica de Investigação Cardiovascular.

Tabela 1. Proposta para o Diário do Participante da pesquisa

Relato diário de função pulmonar e sintomas

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	Data:	Data:	Data:	Data:	Data:	Data:	Data:
Tosse 0=nada; 1=suave; 2=moderada; 3=severa							
Chiado 0=nada; 1=suave; 2=moderado; 3=severo							
Asma Noturna 0=nada; 1=suave; 2=moderada; 3=severa							
Número de jatos de agonista beta-2 (salbutamol ou fenoterol)							
Falta a escola por causa dos Sintomas da asma S=sim; N=não							
Foi ao pronto-socorro devido aos Sintomas da asma S=sim; N=não							
Ficou internado devido aos Sintomas da asma S=sim; N=não							

Diário de atividades (a ser preenchido com auxílio de adulto)

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	Data:	Data:	Data:	Data:	Data:	Data:	Data:
Quantas horas seu filho/sua filha ficou ao ar livre?							
Quantas horas seu filho/sua filha ficou dentro de casa?							
Quantas horas seu filho/sua filha ficou dentro da escola em sala de aula?							
Seu filho/sua filha teve restrição de atividade (cansaço ao esforço) hoje? S=sim; N=não							
Você usou ar condicionado hoje? S=sim; N=não							
Você usou um purificador de ar com "absorção de partículas de alta-eficiência" S=sim; N=não							
Seu filho/sua filha foi a escola hoje? S=sim; N=não							
Seu filho/sua filha brincou ao ar livre hoje? S=sim; N=não							
A asma impediu seu filho/sua filha de brincar hoje? S=sim; N=não							
Alguém fumou na sua casa hoje? S=sim; N=não							
Quantas horas seu filho/sua filha ficou no trânsito (ônibus/carro)?							
Seu filho/sua filha ficou perto de um fumante? S=sim; N=não							
Sendo o caso, quantas horas seu filho/sua filha ficou perto de um fumante?							

5.3.5. Obtenção de Dados Genéticos

Durante a visita inicial, será coletado material biológico (sangue e esfregaço bucal) para análise genética e epigenética. As amostras de sangue serão coletadas dos participantes do estudo usando Tubos PAXgene Sangue DNA (Qiagen, catálogo nº761115). Esses tubos permitem a coleta e purificação simultânea do sangue assegurando DNA genômico de alta qualidade para posterior análise genética. As amostras de sangue serão coletadas de acordo com o protocolo padrão dos Tubos PAXgene Sangue DNA. Em resumo, 8,5ml de sangue total será coletado usando técnica de punção venosa padrão em Tubo PAXgene Sangue DNA contendo 2,0ml de aditivo de estabilização de DNA. Após a coleta, o tubo completo será virado de 8 a 10 vezes para assegurar a mistura do aditivo de estabilização com a amostra de sangue. Ao final da visita do paciente, as amostras de sangue coletadas serão armazenadas a -20°C. Caso as etapas de processamento do DNA sejam conduzidas em prazo maior do que 10 semanas da data da coleta, as amostras serão primeiro congeladas a -20°C e depois transferidas para -70°C ou -80°C.

Esfregaços bucais serão coletados dos participantes do estudo usando Cotonete Oral do kit de coleta bucal da Gentra Puregene (Qiagen, catálogo nº158845). Os pacientes serão avisados para não comer ou beber por uma hora antes da coleta da amostra (para otimizar os resultados da coleta de DNA bucal). A parte interna da boca de cada paciente será delicadamente esfregada 10 vezes com o cotonete oral. O cotonete oral será separado da parte usada para segurar usando tesoura ou lâmina esterilizada. A parte da cabeça do cotonete destacada será colocada em um tubo de microcentrifuga de 1.5ml contendo 300 µl de solução de lise celular. As amostras serão armazenadas em temperatura ambiente até que as etapas de extração de DNA sejam executadas, (e estas permanecem estáveis por pelo menos dois quando completamente submersas em solução de lise) as amostras completamente submersas em solução de lise permanecem estáveis por pelo menos dois anos em temperatura ambiente.

O material coletado ficará estocado temporariamente em freezer de -80°C no Biorrepositório do Centro de Investigação ELSA/ES até sua transferência para o Laboratório responsável pela realização das análises genéticas e epigenéticas. Os tubos

de coleta são identificados por código de barra com acesso restrito à identificação do participante da pesquisa. O armazenamento das amostras é feito sob condições estritas de segurança em relação à sua conservação (freezers ColdLab, com dispositivo de back up de CO₂ e gerador próprio para suprir eventuais ausência de energia na rede elétrica disponível em sala específica da Clínica de Investigação Cardiovascular pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES).

Análise de DNA de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) relevantes para asma e de metilação de todo o genoma

O DNA isolado do sangue e esfregaços bucais serão analisados para polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que potencialmente influenciam a suscetibilidade à asma. Os SNP serão analisados de modo programado, uma vez que há evidência preliminar disponível para priorizar certos SNP como provavelmente envolvidos na suscetibilidade à asma. Os SNP foram priorizados através da revisão de três publicações altamente relevantes: (1) o estudo sobre asma na infância de uma parceria brasileira (Costa et al. 2015), (2) o estudo representando o maior estudo de associação de todo o genoma (GWAS) em relação à asma, até o momento (Moffatt et al. 2010), e (3) a revisão que identificou SNP consistentes que tem sido relacionado à asma em muitas populações (Meyers et al. 2014). A revisão dessas publicações resultou em uma lista concentrada de SNP prioritários para avaliação no estudo atual (Tabela 2).

Esses SNP prioritários serão avaliados usando uma abordagem baseada em Reação em cadeia da polimerase (PCR). Especificamente, o kit Type-it Fast SNP Probe PCR (Qiagen) será usado para conduzir uma genotipagem de SNP específico. Os sinais fluorescentes baseados em PCR resultantes, refletindo informação alélica, serão processados e analisados quantitativamente para associação com sintomas da asma, conforme detalhado na Seção 7.

Tabela 2. Lista de SNP prioritários e genes associados para avaliar suscetibilidade à asma.

SNP associados à asma	Frequência global de alelo menor	Região cromossômica com SNP ^a	Símbolo de Gene(s) associado(s)	Referência(s)
rs1042713	47,56%	5q32	<i>ADRB2</i>	Meyers et al. 2014
rs10159952	4,75%	10q22	<i>C10orf11</i>	Costa et al. 2015
rs3894194	43,09%	17q21	<i>GSDMA</i>	Moffatt et al. 2010
rs2305480	28,67%	17q21	<i>GSDMB</i>	Moffatt et al. 2010; Meyers et al. 2014
rs9273349	não disponível	6p21	<i>HLA-DQ</i>	Moffatt et al. 2010; Meyers et al. 2014
rs20541	27,00%	5q31	<i>IL13</i>	Meyers et al. 2014
rs3771166	36,12%	2q12	<i>IL18R1</i>	Moffatt et al. 2010; Meyers et al. 2014
rs1420101	36,00%	2q12	<i>IL1RL1</i>	Meyers et al. 2014
rs2284033	42,87%	22q12	<i>IL2RB</i>	Moffatt et al. 2010
rs1342326	17,15%	9p24	<i>IL33</i>	Moffatt et al. 2010; Meyers et al. 2014
rs1999071	29,75%	14q11	Intergênicos, associados com <i>DAD1 / LTBA / MMP14 / OXA1L / SLC7A7 / TRA</i>	Costa et al. 2015
rs10519031	1,94%	15q21	Intergênicos, associados com <i>FOXB1 / RORA / SCG3 / SMAD3</i>	Costa et al. 2015; Moffatt et al. 2010
rs8029377	3,12%	15q21	Intergênicos, associados com <i>FOXB1 / RORA / SCG3 / SMAD3</i>	Costa et al. 2015; Moffatt et al. 2010
rs77165709	5,79%	3q25	<i>IQCJ-SCHIP1</i>	Costa et al. 2015
rs7216389	33,21%	17q21	<i>ORMDL3</i>	Moffatt et al. 2010; Meyers et al. 2014
rs2244012	32,29%	5q31	<i>RAD50</i>	Meyers et al. 2014
rs744910	42,77%	15q21	<i>SMAD3</i>	Costa et al. 2015; Moffatt et al. 2010
rs1837253	38,22%	5q22	<i>TSLP</i>	Meyers et al. 2014
rs2416257	14,22%	5q22	<i>WDR36</i>	Meyers et al. 2014

^a Frequências globais de alelo menor foram obtidas do banco de dados de SNP do Centro Nacional para Informações de Biotecnologia (NCBI), disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

O DNA isolado dos sangues e esfregaços bucais serão analisados para padrões de metilação de DNA de todo o genoma usando o kit Infinium Methylation EPIC (Illumina). Essa matriz examina mais de 850.000 sítios de metilação por todo o genoma, incluindo sítios de CpG (citosina-fosfato-guanina) tanto dentro como fora das ilhas de CpG, e também sítios de metilação recentemente descobertos, incluindo sítios de CpG não metilados, assegurando a estratégia mais robusta para identificar os padrões de metilação potencialmente influenciando a suscetibilidade à asma. O DNA isolado será primeiro submetido à conversão por bissulfito usando o kit EZ DNA Methylation (Zymo Research). O DNA convertido por bissulfito será então hibridizado no kit Infinium Methylation EPIC e as intensidades do sinal de sonda serão escaneados. Os dados resultantes do escaneamento da metilação serão processados e analisados quantitativamente para associação com sintomas da asma, conforme detalhado na Seção 7.

5.5.3 Comunicação aos participantes do estudo sobre a análise genética e os resultados

O impacto dos dados coletados sobre a vida dos indivíduos avaliados será informado aos participantes e suas famílias/comunidade de acordo com as diretrizes do comitê de ética (i.e.

UFES e CONEP). Os participantes terão a opção de escolher entre serem informados ou não dos resultados do teste genético. Entre os tópicos incluídos nessa informação está o fato dos pesquisadores terem identificado fatores genéticos que contribuem para a suscetibilidade à asma. Se um participante for identificado como tendo um fator genético que possa contribuir para a suscetibilidade à asma, essa informação será divulgada para o paciente (dependendo da escolha do paciente de ser informado, ou não). A proposta de aconselhamento genético será incluída nessa informação se os dados do aplicativo e resultados forem obtidos.

Dependendo dos resultados do teste genético, a revisão da literatura / análises de ligação ao alvo pode identificar potenciais ações terapêuticas para reduzir o risco de asma. Se forem identificadas, e uma consulta com o médico confirmar a segurança e potencial eficácia de tais ações, a informação aos participantes incluirá informação dos resultados e potencial eficácia de tais ações. Conforme indicado acima, a privacidade e confidencialidade dos dados serão estritamente mantidas durante todo o tempo e nenhum dado será transmitido sem o consentimento explícito dos participantes do estudo e seus pais ou responsáveis.

5.3.5. Medidas de Exposição

Um sistema customizado e móvel de mediação do poluentes atmosféricos será instalado nos locais de coleta de dados de campo pelo Grupo de Pesquisa em Poluição Atmosférica da Universidade Federal do Espírito Santo. Basicamente o sistema mede a concentração diária dos seguintes poluentes na atmosfera:

1) Material Particulado (MP) dividido em PM_{10} , (partículas com diâmetro aerodinâmico menor do que 10 μm) e $PM_{2.5}$ (partículas com diâmetro aerodinâmico menor do que 2,5 μm). A concentração deste material na atmosfera é fornecido em ug/m^3 de ar. As medidas são obtidas a cada hora e a concentração média diária é usada como exposição média diária. Conhecido o volume ventilatório médio de cada participante calculado a partir dos dados de espirometria e antropometria, é possível determinar a carga poluente diária de exposição de cada participante. A composição elementar (Cd, Ni, Fe, Cu, Pb, Al, Na e Hg) no MP será determinado em etapa posterior. Para tanto, os filtros serão removidos diariamente e guardados em invólucros apropriados para posterior análise elementar por meio de espectroscopia de absorção atômica.

2) Gases

Serão medidas as concentrações médias diárias dos seguintes gases na atmosfera:

- Dióxido de enxofre (SO_2)
- Óxidos de nitrogênio (NO_2 e NO_x)
- Ozônio (O_3)
- Monóxido de carbono (CO) e Dióxido de carbono (CO_2)

Em subamostra de domicílios (cerca de 20% dos domicílios de morada dos participantes, escolhidos aleatoriamente e de acordo com a concordância dos pais ou responsáveis e do proprietário do imóvel) será feita a avaliação de poluentes indoor, isto é, no ar interno ao domicílio. Esta etapa da pesquisa também ficará a cargo do Grupo de Pesquisa em Poluição Atmosférica do Departamento de Engenharia Ambiental da UFES. Serão utilizados amostradores portáteis em espaço interno do domicílio para aferição do MP (MP_{10} e $\text{MP}_{2.5}$), além de poeira doméstica. Parte dos filtros será utilizada para pesquisa de fungos dispersos no ar.

5.3.6. Análise de Dados

As repetidas medições dos sintomas de crianças por FEV_1 e os diários eletrônicos das crianças e dos pais, as variáveis relacionadas à clínica, família, moradia, e saúde geral, e a modelagem de exposição ambiental tornam possível um modelamento estatístico multinível de efeitos mistos avançados. Essa modelagem é mais robusta para falta de dados do que modelos mais tradicionais e pode responder a questões referentes à influência de covariáveis de histórico de asma, covariáveis obtidas do diário do participante, das exposições diárias aos diferentes poluentes com ajuste para variáveis de sazonalidade (estação do ano), variáveis climatológicas (temperatura diária, variação da temperatura diária, direção de ventos), dentre outras.

5.3.7. Cronograma

Janeiro-Março 2018: Finalização do projeto em relação às medidas de poluição, definição de equipamentos a serem adquiridos.

Abril-Julho 2018: Aquisição de equipamentos, definição de softwares de modelagem da dispersão de poluentes na atmosfera de Vitória

Agosto-Outubro 2018: Montagem da equipe de coleta de dados em campo, montagem de equipamentos e estudo piloto.

Novembro 2018 a Março 2019: Primeira campanha de campo (período verão) com recrutamento previsto de 100 participantes.



Maio a Setembro 2019: Segunda campanha de campo (período inverno) com reavaliação dos mesmos participantes da campanha verão.

Outubro 2019: Primeira análise interina de dados

Novembro/2019 a Março 2020 - Terceira campanha de campo (período verão) com recrutamento previsto de mais 100 participantes.

Maio a setembro 2020 - Quarta campanha de campo (período inverno) com reavaliação dos mesmos participantes da campanha verão.

Outubro 2020 - Segunda análise de dados

Novembro 2020 a Dezembro 2021 - complementação da coleta de dados faltantes, montagem de banco de dados e publicações.

5.3.8. Orçamento

(ver anexo)



5.3.9. Referências

American College of Allergy, Asthma, and Immunology (ACAAI). 2014. Asthma Information. <http://acaai.org/asthma/about> (Accessed 8.12.16)

Bousquet J, Bousquet PJ, Goddard P, Daures J-P. 2005. The public health implications of asthma. *Bulletin World Health Org* 83:548-554.

Castro HA, Hacon S, Argento R, Junger WL, Mello CF, et al. 2007. Air pollution and respiratory diseases in the Municipality of Vitória, Espírito Santo State, Brazil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 23 Sup 4:S630-S642.

Castro HA, Hacon S, Gonçalves K, and Junger WL. 2011. Chapter 4. Air Pollution and Outpatient Treatment and Hospital Admissions for Respiratory Diseases in Children in Southeast Region of Brazil in "Advanced Topics in Environmental Health and Air Pollution Case Studies." (Editor: Moldoveanu A). DOI: 10.5772/23656

Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Vital Signs, May 2011.

Costa GN, Dudbridge F, Fiaccone RL, da Silva TM, Conceição JS, Strina A, Figueiredo CA, Magalhães WC, Rodrigues MR, Gouveia MH, Kehdy FS, Horimoto AR, Horta B, Burchard EG, Pino-Yanes M, Del Rio Navarro B, Romieu I, Hancock DB, London S, Lima-Costa MF, Pereira AC, Tarazona E, Rodrigues LC, Barreto ML. 2015. A genome-wide association study of asthma symptoms in Latin American children. *BMC Genet.* 16:141.

Costa E, Bregman M, Araujo DV, Costa CH, Rufina R. 2013. Asthma and the socioeconomic reality in Brazil. *World Allergy Organization Journal* 6:20.

Delfino RJ, Gong H, Linn WS, Hu Y, Pellizzari ED. 2003. Respiratory symptoms and peak expiratory flow in children with asthma in relation to volatile organic compounds in exhaled breath and ambient air. *J Expo Anal Environ epidemiol.* Sep; 13(5): 348-63. DOI: [10.1038/sj.jea.7500287](https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500287)

FFM. 2003. Epidemiological analysis of air pollution impact on the health of the population of Greater Vitória. Prospective study report. LPAE/FMUSP RT-238-1.

FFM. 2007. Proposal for measures to assess air pollution impact on human health in the Greater Vitória area. Prospective study report. LPAE/FMUSP RT-408-v1.

Freitas CU, Ponce de Leon A, Juger W, Gouveia N. Air pollution and its impacts on health in Vitória, Espírito Santo, Brazil. *Rev Saude Publica.* 2016;50:4.

ISAAC. 2017. ISAAC Tools. ISAAC Steering Committee. Accessed on Feb 9, 2017. Available at: <http://isaac.auckland.ac.nz/resources/tools.php?menu=tools1>.



Kumar A, Söderhäll C, Merid S, Xu C, Gruziova O, Koppelman G, Kere J, Pershagen G, Melén E. 2016. meQTL analysis of asthma GWAS loci and DNA methylation. *European Respiratory Journal*. 48 (suppl 60) PA1209; DOI: 10.1183/13993003.congress-2016.PA1209.

Meyers DA, Bleecker ER, Holloway JW, Holgate ST. 2014. The genetics of asthma: towards a personalized approach to diagnosis and treatment. *Lancet Respir Med*. 2(5):405-415.

Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WO; GABRIEL Consortium. 2010. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 363(13):1211-21.

Nascimento AP, Santos JM, Mill JG, Souza JB, Reis NC Júnior, Reisen VA. Association between the concentration of fine particles in the atmosphere and acute respiratory diseases in children. 2017. *Rev Saude Publica*, Jan 12;51(0):3. doi: 10.1590/S1518-8787.2017051006523.

National Heart, Lung, and Blood Institute. 2014. What causes asthma? <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/asthma/causes> (Accessed 8.12.16)

Nicodemus-Johnson J, Myers RA, Sakabe NJ, Sobreira DR, Hogarth DK, Naureckas ET, Sperling AI, Solway J, White SR, Nobrega MA, Nicolae DL, Gilad Y, Ober C. 2016. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. *JCI Insight*. 1(20):e90151.

Noonan CW, Semmens EO, Smith P, Harrar SW, Montrose L, Weiler E, McNamara M, Ward TJ. Randomized Trial of Interventions to Improve Childhood Asthma in Homes with Wood-burning Stoves. *Environ Health Perspect* 2017 Sep 13;125(9):097010. doi: 10.1289/EHP849.

Ober, C and Yao, T. 2011. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 242(1): 10-30. doi: [10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x)

Pereira LA. 1999. Medical School Foundation. Vitoria Project: Allergies and Respiratory Diseases Related to Air Quality. Retrospective study final report. RT845-01.

Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, Ho SM. 2009. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One*. 4(2):e4488.

Sandberg S, Paton JY, Ahola, S, McCann DC, McGuinness, D, Hillary, CR, and Oja, H. (2000). The role of acute and chronic stress in asthma attacks in children. *The Lancet* 356(9234); 982-987. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02715-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02715-X)

Serpa FS, Zandonade E, Reis JL; Borja TN, Moyses TR Campinhos FL, Braga-Neto F et al. (2014). Prevalência de asma, rinite e eczema atópico em escolares do município de Vitória, Espírito Santo, Brasil. *Rev Bras Pesq Saúde* 16(3):107-14.



Souza-Machado C, Souza-Machado A, Cruz AA. 2012. Asthma mortality inequalities in Brazil: Tolerating the unbearable. *The Scientific World Journal* 2012, Article ID 625829.

Stefanowicz D, Hackett TL, Garmaroudi FS, Günther OP, Neumann S, Sutanto EN, Ling KM, Kobor MS, Kicic A, Stick SM, Paré PD, Knight DA. 2012. DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One*. 7(9):e44213.

Thomsen SF. Genetics of asthma: an introduction for the clinician. 2015. *Eur Clin Respir J*. 16;2. doi: 10.3402/ecrj.v2.24643.

World Health Organization. 2106. Genetics and asthma. WHO's Human Genetics areas of work. <http://www.who.int/genomics/about/Asthma.pdf?ua=1>. (Accessed 8.1.16)

World Health Organization. 2013. Asthma. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/> (Accessed 8.11.16)

World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach, 2007.