

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR



**ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DE ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS,
EPIDEMIOLÓGICOS E GENÉTICOS COM A ASMA EM UMA POPULAÇÃO DO
SUL DA BAHIA**

LUCIANO GAMA DA SILVA GOMES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2013

LUCIANO GAMA DA SILVA GOMES

**ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DE ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS,
EPIDEMIOLÓGICOS E GENÉTICOS COM A ASMA EM UMA POPULAÇÃO DO
SUL DA BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.(a) Dra. Fernanda Amato Gaiotto

Co-orientadora: Prof. (a) Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello

G633

Gomes, Luciano Gama da Silva.

Análise da correlação de aspectos clínico-laboratoriais, epidemiológicos e genéticos com a asma em uma população do sul da Bahia / Luciano Gama da Silva Gomes. – Ilhéus, BA: UESC, 2012.
xiv, 56f. : Il. ; anexos.

Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia.

1. Genética molecular. 2. Asma. 3. Avaliação de riscos. 4. Imunoglobulina E. I. Título.

CDD 571.6

LUCIANO GAMA DA SILVA GOMES

ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DE ASPECTOS CLÍNICOS LABORATORIAIS
EPIDEMIOLÓGICOS E GENÉTICOS COM A ASMA EM UM A POPULAÇÃO
DO SUL DA BAHIA

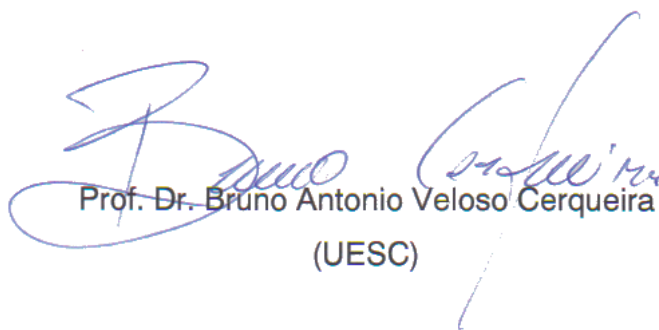
Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular

APROVADA: 28 de agosto de 2013



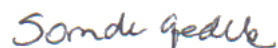
Prof^a. Dra. Carla Martins Kaneto
(UESC)



Prof. Dr. Bruno Antonio Veloso Cerqueira
(UESC)



Prof. Dr. Domingos Lázaro Souza Rios
(UNEB)



Prof^a. Dr^a. Sandra Rocha Gadelha Melo
(UESC – coorientadora)

Às pessoas de bem que veem a pesquisa
como crescimento pessoal e coletivo,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos bons espíritos que me guardam e ajudaram a ultrapassar mais uma fase da vida. Agradeço à prof. Dra. Sandra Gadelha pela orientação, confiança e dedicação ao trabalho e ter agregado conhecimento às ideias de um simples estudante recém graduado. Da mesma maneira, agradeço à prof. Dra. Fernanda Gaiotto por ter ajudado no trabalho de diversas formas e ter iluminado um pouco mais as ideias com sua sabedoria e conhecimento. Ainda, agradeço o apoio dado pela prof. Dra. Sandra Mara e pela co-orientação em um primeiro momento. Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz e aos docentes que pude conhecer e que ajudaram no meu aprendizado. À CAPES pela bolsa concedida. Ao laboratório LAP, representado pela Sra. Soraya e Sr. Ari Paranhos que tenho profunda admiração e consideração; obrigado pelas oportunidades e pelo conhecimento passado. Ao laboratório LIDI, representado pelo Sr. Neto, obrigado por abrir as portas para a pesquisa. Igualmente ao laboratório Álvaro, representado pelo Sr. Gustavo, grato por nos ter conseguido a gratuidade das dosagens. Aos pneumologistas, Dra. Rosangela, Dr. Gustavo, Dr. Silvane, Dr. Laurindo e Dr. Clovis por contribuir com a pesquisa de forma humana. Ao grupo LAFEM (Sônia, Ohana, Danielle, Deyse, Avanbergue, Gabriela); juntos, fizemos acontecer! Ao grupo Marcadores Moleculares pelo apoio e amizade. À minha família que segura a barra nos momentos mais complicados, não me deixando esmorecer. Aos grandes e bons amigos que nesse momento da vida pude fazer: Cleiziane, Livia, Joadson, Allan, Cáio, Isabella.

*“Não rimarei a palavra sono
com a incorrespondente palavra outono.
Rimarei com a palavra carne
ou qualquer outra, que todas me convém.”*

(Carlos Drummond de Andrade)

ÍNDICE

EXTRATO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos da pesquisa	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Asma	4
2.1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos da asma.....	4
2.1.2 Aspectos imunológicos gerais da asma alérgica.....	6
2.1.3 Aspectos genéticos da asma.....	8
2.1.4 Aspectos ambientais da asma.....	10
2.2 Marcadores moleculares	11
2.2.1 Marcador ISSR.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Delineamento do estudo	13
3.2 Captação dos indivíduos participantes (amostragem)	13
3.3 Extração e quantificação de DNA genômico	14
3.4 Marcadores ISSR	15
3.5 Dosagem de Imunoglobulina E total	16
3.6 Análise estatística	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
4.1 Caracterização geral da população e análise da associação de variáveis epidemiológicas e clínicas com asma	18
4.2 Análises de IgE sérica total	24

4.3 Marcadores ISSR	34
5 CONCLUSÕES	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7 ANEXOS	49
7.1 Termos de consentimento livre e esclarecido	49
7.2 Questionário	55

EXTRATO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores que afeta de forma direta a qualidade de vida do indivíduo, não só pela alteração da atividade respiratória, mas também pelos prejuízos funcionais, físicos e sociais que ocasionam. É uma doença complexa, onde fatores genéticos e ambientais estão envolvidos, já tendo sido sugerido que o peso da herdabilidade pode chegar próximo de 80%. Dessa maneira, conhecer melhor a patogênese da asma e suas causas é um caminho para a prevenção e para o desenvolvimento de novas e melhores formas de tratamento dessa patologia. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação entre variáveis demográficas, níveis de IgE sérico total e polimorfismos em marcadores ISSR com a asma em uma população do sul da Bahia. Para tal, foi conduzido um estudo tipo caso-controle, onde foram recrutados 114 indivíduos-caso e 206 indivíduos controle. Foi feita a coleta de material sanguíneo para dosagem de IgE total e análises genéticas, bem como, foi aplicado um questionário o qual tratava-se de variáveis demográficas. Em adição, foi realizado um *screening* de 20 *primers* ISSR e foi feita a comparação da genotipagem dos indivíduos selecionados para um *pool* de DNA de casos e um *pool* de DNA dos controles. As análises estatísticas foram feitas com o uso das plataformas SPSS 17.0, como também com o pacote estatístico BioEstat 5.0, na versão em português e o programa Microsoft Excel 2007. Não foi detectada associação da asma com fatores demográficos avaliados e nem com etnia autodeclarada (p -valor > 0,05). A asma foi relacionada com alergia, rinite alérgica e dermatite atópica. Além disso, pacientes asmáticos tiveram níveis significativamente maiores de IgE e esses níveis também foram relacionados com a gravidade da asma. A distribuição de níveis de IgE total entre asmáticos e não-asmáticos é, portanto, muito diferente, mas a definição de um "limite de normalidade" superior para IgE sérica total é duvidoso, porque não há um único nível de IgE que distingue os diferentes grupos com precisão. Ainda, não houve associação de marcadores ISSR com a asma, tomando-se como base os 20 *primers* e a população em estudo.

Palavras-chave: asma, fatores de risco, IgE e sul da Bahia.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease of the lower airways that directly affects the quality of life of individuals, not only by changes in respiratory activity, but also causing functional, physical and social harm. It is a complex disease in which genetic and environmental factors are involved, and it has been suggested that the heritability can reach close to 80%. Thus, the better understanding of the pathogenesis of asthma and its causes is a way for the prevention and the development of new and better ways to treat this pathology. The objective of this study was to evaluate the association between demographic variables, total serum IgE levels, and ISSR polymorphisms with asthma in a population of Southern Bahia. It was conducted a case-control study where 114 cases and 206 control subjects were involved. It was collected samples of peripheral blood for total IgE and genetic analyzes, as well as, a questionnaire with demographic variables was applied. In addition, it was performed a screening of 20 ISSR primers and it was compared the genotyping results of individuals selected for cases and control's DNA pool. The statistical analyzes were performed using SPSS Statistic 17.0, as well as with the statistical package BioEstat 5.0, in the Portuguese version, and Microsoft Excel 2007. No association was found between asthma and demographic factors, including the self-reported ethnicity ($p > 0.05$). Asthma was correlated with allergy, allergic rhinitis and atopic dermatitis. Additionally, asthmatic patients had significantly higher levels of total IgE, and these levels were also correlated with the severity of asthma. The distribution of total IgE levels between asthmatics and non-asthmatics is therefore very different, but the definition of a "normal range" for higher total serum IgE is doubtful, because there is not only one level of total IgE that distinguishes the different groups accurately. In addition, there was not association between ISSR markers with asthma, taking as a basis the 20 primers in the studied population.

Keywords: asthma, risk factors, IgE, and southern Bahia.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Distribuição das porcentagens para cada classe social de cada grupo (controles e casos)	22
Figura 2 – Distribuição das proporções das etnias autodeclaradas na população em estudo	24
Figura 3 – Histograma das dosagens de IgE sérica total, demonstrando que a distribuição não corresponde à normalidade quando consideramos os valores reais (azul), mas sim a logarítmica (amarelo).....	25
Figura 4 – Simulações de associações entre IgE total, com diferentes pontos de corte, com a asma	30
Figura 5 – Curva ROC para dosagens de IgE total e asma	31
Figura 6 - Simulações de associações entre IgE total, com diferentes pontos de corte, com a dermatite atópica	32
Figura 7 – Levantamento das OR segundo dosagem de IgE total	33
Figura 8 – Perfil do gel de agarose com o screening dos primers UBC812, UBC81, UBC816, UBC82., UBC82, UBC828, UBC86 e UBC840. (C) – pool de controles; (K) – pool de casos; (M) – Ladder 1kb.....	35
Figura 9 - Perfil do gel de agarose com o screening dos primers UBC841, UBC842, UBC844, UBC84, UBC87, UBC864, UBC871 e UBC889. (C) – pool de controles; (K) – pool de casos; (M) – Ladder 1kb.....	36
Figura 10 - Perfil do gel de agarose com o screening dos primers UBC891, UBC899, D e Terry. (C) – pool de controles; (K) – pool de casos; (M) – Ladder 1kb	37
Figura 11 - Perfil do gel de agarose do novo screening, usando outra Ta dos primers D, UBC899i (Ta = 60°C), UBC899ii (Ta = 58°C), Terry, UBC889, UBC891 e UBC871. (C) – pool de controles; (K) – pool de casos; (M) – Ladder 1kb; (B) – branco.....	38
Figura 12 - Perfil do gel de agarose da genotipagem dos indivíduos que fizeram parte dos dois pools, utilizando o primer UBC899, Ta igual a 58°C. Indivíduos de 6 a 31 são controles, enquanto, 221 a 232 são casos; (M) – Ladder 1kb	39

Tabela 1 - Conjunto de vinte primers ISSR usados para seleção de marcadores	15
Tabela 2 – Distribuição de indivíduos segundo o gênero	19
Tabela 3 – Associações (χ^2) e chance de risco (OR) entre acometimentos e a asma	21
Tabela 4 – Médias geométricas e seus desvios padrões das dosagens de IgE total entre os gêneros.....	26
Tabela 5 – Valores de referência para IgE total segundo a idade.....	27
Tabela 6 – Associações (χ^2) e chance de risco (OR) entre acometimentos e a taxa elevada de IgE total.....	29
Tabela 7 – Comparação entre a dosagem de IgE total (UI/mL) com a classificação da asma quanto a sua severidade	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFLP	do inglês <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
C	Grupo controle
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO	Monóxido de carbono
DIEESE	Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos
DP	Desvio padrão
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GINA	do inglês <i>Global Initiative for Asthma</i>
GWS	do inglês <i>Genome Wide Scan</i>
IC	Intervalo de confiança
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
IL10	Interleucina 10
IL13	Interleucina 13
ISSR	do inglês <i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
K	Grupo caso
OR	do inglês <i>Odds Ratio</i> (ou Razão de Chance)
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RAST	do inglês <i>Radioallergosorbent test</i>
RFLP	do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROC	do inglês <i>Receiver Operating Characteristic</i>

RPM	Rotação por minuto
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SPSS	do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Ta	Temperatura de anelamento do <i>primer</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	do inglês T- <i>helper</i> 1
Th2	de inglês T- <i>helper</i> 2
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
UI/mL	Unidade internacional por mililitro

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas (GINA, 2011) que afeta diretamente a qualidade de vida do indivíduo, não só pela alteração respiratória, mas também pelos prejuízos funcionais, físicos e sociais que ocasiona (TRINCA, 2011). A prevalência dessa patologia é de aproximadamente 10% na população brasileira (SOLÉ, 2006). No primeiro período de 2013 (dezembro de 2012 a março de 2013), a maior prevalência de internações de asmáticos no Brasil foi em crianças. A faixa etária de 1 a 4 anos correspondeu a aproximadamente 35% das internações, chegando a 61% se forem contabilizadas crianças até 9 anos. Além disso, só nesse período, o custo com internações contabilizando somente os casos de asma foi de aproximadamente 5,5 milhões de reais (DATASUS, 2013).

Além do mais, a asma é uma doença complexa, tendo os fatores genéticos e ambientais papéis importantes na sua etiologia. Fatores genéticos, por exemplo, são tão importantes no quadro asmático que a herdabilidade pode chegar próximo de 80% (KOPPELMAN, 1999). Diversas regiões do genoma humano sugerem suscetibilidade à asma (MEYERS, 2010), entretanto, tais associações de regiões genéticas com a doença diferem entre populações divergentes. Dessa maneira, um maior e melhor conhecimento acerca do complexo mecanismo que envolve o papel e a interação entre fatores genéticos e ambientais na asma é um caminho para perspectivas de melhoramento e inovação das formas de prevenção e tratamento dessa patologia (VIDEIRA, 2006).

De fato, muitos fatores ambientais têm sido correlacionados com a asma. Um dos fatores bem estudados é a relação com o tabagismo, incluindo tanto fumantes ativos quanto passivos. Além disso, a exposição à alérgenos, infecções virais do trato respiratório, dieta e poluição também são fatores bem relacionados com tal patologia (PEGAS, 2011). Não podemos esquecer também que fatores socioeconômicos são generosamente discutidos no ciclo da asma e associados a essa patologia (NEIDELL, 2004).

Sabe-se ainda que a asma é resultado de interações muito complexas entre células e mediadores inflamatórios (MENDES, 1998). Nesse contexto, a IgE é uma imunoglobulina de extrema importância na resposta inflamatória alérgica, tendo sido

demonstrado que o nível de IgE é maior em pessoas alérgicas, sobretudo nas que possuem asma brônquica e dermatite atópica, quando comparado com pessoas não alérgicas (SPALDIN, 2000).

Algumas citocinas que estão envolvidas na resposta imune, que colabora para o a alta expressão de IgE sérica, é alvo de muitas pesquisas de cunho genético. Entretanto, ainda há muitas ferramentas moleculares disponíveis que não são usadas rotineiramente para caracterizar grupos específicos de indivíduos humanos. O marcador ISSR, por exemplo, do inglês *Inter Simple Sequence Repeats* (ZIETKIEWICZ, 1994), é um tipo de marcador baseado na análise de sequências que flanqueiam regiões microssatélites, sequências essas que têm de 100 a 3000 pares de bases (pb). Esses fragmentos de DNA são amplificados pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizando um único primer de 16 a 20 pb, baseado na sequência microssatélite que flanqueiam os fragmentos alvo (FALEIRO, 2007). Tais marcadores foram testados, quanto ao seu caráter polimórfico, com o DNA genômico de diversas espécies, como primatas, bovinos, suínos, vegetais, inclusive humano (ZIETKIEWICZ, 1994). Ainda, esses marcadores são de fácil análise e a técnica não é laboriosa e ainda tem como vantagem o alto número de padrão de bandas, com muitas regiões polimórficas, sem necessariamente conhecer previamente a sequência genômica da espécie em estudo (FALEIRO, 2007).

Tomando como base as considerações acima, este trabalho se baseou em duas hipóteses: (1) variáveis demográficas e níveis elevados de IgE sérica total estão associados com a asma alérgica na população em estudo e (2) polimorfismos em regiões inter-SSR estão associados com a asma em populações do sul da Bahia.

1.1 Objetivos da pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar a associação entre variáveis demográficas, níveis de IgE total e polimorfismos em regiões inter-SSR e asma, em uma população do sul da Bahia.

Objetivos Específicos:

- Verificar a correlação entre asma e as seguintes variáveis: idade, gênero, escolaridade, histórico familiar, nível de renda econômico e cor autodeclarada;
- Verificar a relação entre asma, os níveis de IgE, alergia, rinite, dermatite atópica, bem como com a severidade dessa patologia;
- Avaliar o teste laboratorial de IgE sérica total no diagnóstico da asma;
- Comparar o perfil de polimorfismos em regiões inter-SSR entre casos e controles, a fim de verificar se há alguma diferença entre os grupos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Asma

2.1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos da asma

A asma é uma desordem fácil de descrever clinicamente, porém muito difícil de definir em um único conceito. Muito dessa dificuldade se deve ao fato desta patologia ser extremamente complexa. Peters e seus colaboradores definiram a asma como sendo uma obstrução reversível das vias aéreas intratorácicas (PETERS, 1990). Entretanto, vários conceitos distintos foram definidos por clínicos, fisiologistas, imunologistas e patologistas na árdua tentativa de definir especificamente o que é a asma (MENDES, 1998).

A definição mais recente e bem elaborada foi descrita por um grande comitê científico que estabelece as iniciativas globais de estratégia, manejo e prevenção da asma: GINA (*Global Initiative for Asthma*). Tal definição dita por eles é: *"A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares desempenham determinadas funções. A inflamação crônica está associada a hiper-reatividade das vias aéreas, que leva a episódios recorrentes de sibilo, falta de ar, aperto no peito e tosse, particularmente a noite ou no início da manhã. Estes episódios são normalmente associados com generalizada, porém variável, obstrução do fluxo de ar dentro do pulmão que muitas vezes é reversível espontaneamente ou com tratamento"* (GINA, 2012).

Não é de se estranhar que se chegou a uma definição teórica muito longa dessa patologia. Isso se deve exatamente à complexidade da asma, pois os fatores genéticos e ambientais estão significativamente envolvidos, ao passo que a sua patogênese ainda não está bem esclarecida (BARNES, 1998). Entretanto, a sua fisiopatologia é bem estudada. Em suma, essa obstrução é consequência de uma hiper-reatividade das vias aéreas inferiores, iniciada por eventos inflamatórios

crônicos. Esse quadro é acompanhado de lesão tecidual do epitélio e edema da mucosa, acarretando na diminuição da luz do túnel brônquico. Em consequência de tal quadro inflamatório, ocorre o espessamento da membrana basal pela fibrose subepitelial ocasionada pelos miofibroblastos, com deposição de colágeno (HOSHINO, 1998; HUANG, 2011).

Por apresentar todos esses importunos acometimentos, o indivíduo normalmente tem um replanejamento de suas atividades ao longo da vida, pois as manifestações dessa patologia interferem diretamente na qualidade de vida dos seus portadores. Tal mudança na rotina decresce a qualidade física, emocional e social dos asmáticos, principalmente na infância, cuja prevalência é maior do que em indivíduos adultos (TRINCA, 2011; SOLÉ, 2006).

Segundo o Centro de Controle de Doenças e Prevenção de Atlanta, Estados Unidos, a prevalência da asma tem crescido desde a segunda metade do século 20, aumentando de 6,7 milhões em 1980 para 17 milhões em 1998 e no início do século 21, chegando a 20 milhões de pessoas portadoras de asma apenas nos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2003).

Existem alguns estudos que demonstram uma prevalência expressiva da asma em escolares no Brasil. Tomando o país como um todo, foi determinada uma prevalência de 24,3% de asma ativa entre crianças de 6 e 7 anos. Esse número decaiu um pouco na adolescência, passando a 19,0%. Entretanto, a taxa de prevalência entre as regiões do Brasil é bem variável, tendo o norte-nordeste e o estado de São Paulo as maiores prevalências. Na Bahia, a cidade de Vitória da Conquista mostrou uma taxa elevadíssima de 30,5%, já a capital baiana, Salvador, 24,6% e Feira de Santana 21,5% (SOLÉ, 2006). Segundo Franco *et al*, a alta prevalência na região nordeste não estaria relacionada exatamente à questão social, mas sim à latitude, à privação de água e à média da temperatura anual (FRANCO, 2009).

Conforme a divisão de faixas etárias do DATASUS, segundo os dados do primeiro período de 2013, a prevalência mais elevada de internações entre asmáticos no Brasil está entre 1 e 4 anos (aproximadamente 35%). Ainda, a grande

maioria dessas internações (61%) é de crianças até nove anos. Além disso, nesse mesmo período, o custo das internações contabilizando somente os casos de asma foi de aproximadamente 5,5 milhões de reais. Em relação à região desse estudo, no município de Itabuna não foram observados registros de casos de asma, segundo o banco de dados do DATASUS visível *online*.

Em relação aos gastos com asma, apesar do DATASUS demonstrar um valor muito alto nos gastos diretos, muito pouco se sabe sobre o efeito econômico ou sobre o quanto onera as despesas de estratégias de intervenção da asma na população brasileira. Por exemplo, quanto reais por ano um paciente asmático gasta com medicações? Ainda não temos essa resposta e é uma pergunta difícil de responder no momento. Tenha-se nota de que em 1998, Weiss e colaboradores demonstraram que os Estados Unidos gastaram mais de 12 bilhões de dólares com despesas diretas (serviços hospitalares e médicos) e indiretas (perda de trabalho, faltar escola, permanecer em casa, etc.) (WEISS, 2001). Um estudo de revisão estimou que o gasto anual por pessoa em países desenvolvidos é de 326 a 1.315 dólares (GINA, 1995).

2.1.2 Aspectos imunológicos gerais da asma alérgica

A teoria da regulação imune envolve a homeostase entre a atuação do padrão de resposta T-helper 1 (Th1) e Th2. O tipo de resposta Th1 (imunidade celular) é direcionado especialmente contra vírus e outros patógenos intracelulares, e pode eliminar células cancerosas, por exemplo. O tipo Th2 (imunidade humoral) está relacionado à produção de anticorpos, principalmente contra patógenos extracelulares. Entretanto, a exacerbação de ambas as respostas pode causar diversas doenças. A exacerbação, por exemplo, da resposta Th2 está relacionada a doenças alérgicas e a asma (KIDD, 2003).

Na asma, a inflamação das vias aéreas é o primeiro mecanismo ocorrente, que acarreta em resposta broncoconstritora expressiva, estimulada por diversos tipos de antígenos encadeadores. A asma, então, é resultado de interações muito

complexas entre células e mediadores inflamatórios (MENDES, 1998). Dentre esses mediadores estão as citocinas, moléculas proteicas, nesse caso pró-inflamatórias, e produzidas por diversos tipos celulares, como: mastócitos, linfócitos T, eosinófilos, células epiteliais do trato respiratório e macrófagos (BARNES, 2002). Algumas dessas citocinas, como Interleucina 5 (IL-5), IL-6, IL-8, IL-10, IL-4 e IL-13, promovem a diferenciação e ativação de eosinófilos e levam a produção de imunoglobulina E (IgE) por parte das células B (PAUL & SEDER, 1994).

A IgE é uma imunoglobulina de extrema importância na resposta inflamatória alérgica. Tem sido demonstrado que o nível de IgE é maior em pessoas alérgicas, sobretudo nas que possuem asma brônquica e dermatite atópica, quando comparado com pessoas não alérgicas (SPALDIN, 2000). Só para ter uma ideia, a concentração de IgE no soro de indivíduos não-alérgicos pode ser 10.000 vezes menor do que a de IgG (HIBI, 1986). O caráter dessa resposta alérgica mediada pelo complexo IgE e seu receptor presente na membrana dos mastócitos e outras células apresentadoras de antígeno é de hipersensibilidade imediata. Isto se revela em sinais e sintomas característicos nos diferentes órgãos como pele (dermatite atópica ou eczema), no nariz (rinite), nos pulmões (asma) e no intestino (reações alérgicas alimentares) (WYNN, 2003). Por conta desse complicado sistema, estudiosos da área tem sugerido uma mudança de paradigma, sendo esses acometimentos citados como consequência de uma única doença (CAMARGOS, 2002).

Dessa forma, estudos como o de Borish *et al.* (2005) comprovam que indivíduos especificamente asmáticos também sucumbem dos efeitos determinantes da alta taxa de IgE sérica pelo organismo. Além do mais, essa taxa também está diretamente relacionada à severidade da doença, ou seja, quanto maior o nível médio de IgE sérica total, mais severa é a asma, considerando três níveis distintos: leve, moderada e grave (ANUPAMA *et al.*, 2005; BORISH, 2005).

Ainda comentando sobre a relevância da IgE, foi demonstrado que em pacientes com rinite, aproximadamente 4% das células B da mucosa nasal e entre 12 a 19% de células do plasma expressam IgE, sendo essa a principal fonte de IgE

(HIBI, 1986), em comparação com 1% e menos do que 1%, respectivamente, em indivíduos considerados saudáveis (KLEINJAN, 2000).

2.1.3 Aspectos genéticos da asma

Tem sido demonstrado que a asma alérgica se manifesta principalmente em indivíduos que possuem predisposição genética. Esses indivíduos têm maiores concentrações de IgE e um risco aumentando de desenvolver reações atópicas e asmáticas (KAY, 2001). De fato, muitos estudos foram feitos na tentativa de identificar geneticamente que grupo de indivíduos teria maior suscetibilidade à asma. Kopperman *et al* (1999), em sua revisão bibliográfica, reuniu um conjunto de artigos com base em estudos de gêmeos e demonstrou que a herdabilidade da asma no final do século XX chegava a 75%.

Nessa busca de entender o papel da genética na etiopatogenia e na fisiopatologia da asma, diversos genes foram apontados. Entretanto, isso ainda não foi bem compreendido, visto a complexidade multifatorial que envolve tal patologia (BARNES, 1998). Muitos estudos têm demonstrado polimorfismos em regiões de genes candidatos, associados com a asma (VIDEIRA,2006). Muitos desses polimorfismos são de genes envolvidos na rota imunológica da inflamação alérgica citada na seção anterior, como proteínas de membrana celular, além de citocinas como a IL-4, IL-13, IL-5 e a imunoglobulina E, por exemplo. Os genes das interleucinas 4 e 13 e da IgE humana, por exemplo, estão em regiões muito próximas, no braço maior do cromossomo 5 (5q31).

Falando mais um pouco sobre alguns genes avaliados e associados com a asma, temos alguns exemplos. O gene ADRB2, responsável pelo receptor beta-2-adrenérgico, foi um dos alvos de estudo de associação à asma. Esse receptor tem importância na asma, pois está presente nas células da musculatura lisa que envolve os brônquios e, quando esse sistema é ativado, há o relaxamento visceral e a dilatação da luz do túnel brônquico (BENYAHIA, 2012). Estudos envolvendo antígenos leucocitários humanos (HLA) demonstraram associação entre variações

da HLA-DQB1 e asma. Ainda, variações alélicas no gene IL4R que codifica o receptor da interleucina 4, muitas vezes estudado em conjunto com o gene da própria IL4, foram associadas à atopia. Finalmente, o splicing alternativo do gene que codifica a ADAM33, uma proteína transmembranaral implicada na hiperresponsividade brônquica, condiciona a duas variantes de transcrição. Este foi o primeiro gene candidato para a asma a ser detectado por clonagem posicional (PINTO, 2008). Esses são pouquíssimos exemplos em meio a tantos genes e regiões genéticas que já foram alvo de trabalhos científicos e que demonstraram associação com a asma.

Atualmente nos estudos da genética da asma têm sido realizadas análises mais bem elaboradas usando a metodologia de *Genome Wide Scan* (GWS), que permite fazer uma pesquisa bem extensa do genoma, além de análises de expressão gênica com *Microarrays*. A estratégia de genes candidatos, por sua vez, concentra-se no estudo de poucas variantes em genes específicos, selecionados considerando a plausibilidade biológica (VIDEIRA, 2006). Essas novas metodologias de GWS permitem identificar novos genes candidatos que ainda não são o foco de estudos de associação de certos polimorfismos, como SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) com a asma. Dessa forma, novas rotas imunológicas podem estar envolvidas na fisiopatologia e ainda não conseguimos enxergar isso.

De forma abrangente, estudos GWS tem mostrado inúmeras regiões cromossômicas correlatas ao fenótipo de asma, como 1p, 2q, 4q, 5q, 6p, 12q, 13q, 14q, 19q e 21q. Da mesma forma, para IgE total foram associadas regiões localizadas em 2q, 3q, 5q, 6p, 7q, e 12q; para atopia 3q, 4q, 6p, 11q e 17q e eosinofilia no sangue periférico em 15q (BLUMENTHAL, 2005).

Como a pesquisa genética, e nesse contexto a pesquisa da genética da asma, tem crescido exponencialmente, é provável que mais genes venham a ser identificados e associados com tal patologia (VIDEIRA, 2006). Além disso, estudos também na área de farmacogenômica devem auxiliar na definição da melhor conduta terapêutica dos pacientes asmáticos (PESSÔA, 2006).

2.1.4 Aspectos ambientais da asma

Muitos fatores ambientais têm sido correlacionados com a asma. Um dos fatores bem estudado é a relação com o tabagismo, incluindo tanto fumantes ativos e passivos. Além disso, a exposição à alérgenos, infecções virais do trato respiratório, dieta e poluição também são fatores bem relacionados com tal patologia. Descobrir os fatores e investigá-los ainda é um desafio a se pesquisar. Entender como esses fatores interagem um com o outro e com os fatores genéticos é de fundamental importância no avanço para criar e conduzir terapias mais eficazes (KOOPLERMAN, 1999).

Alguns estudos conduzidos no Brasil demonstraram que condições climáticas como a temperatura e a latitude estão relacionadas com a prevalência da asma no nordeste do país. Entretanto, um dos mais importantes indicadores socioeconômicos que demonstrou estar diretamente correlacionado com a prevalência da asma é a privação de água (FRANCO, 2009). O estudo de Franco *et al.* (2009) conseguiu demonstrar ainda que em áreas tropicais com alta umidade no ambiente, principalmente em áreas litorâneas, aumenta a proliferação de ácaros e fungos, contribuindo com o risco elevado de asma e reações alérgicas.

De fato, os fatores socioeconômicos são generosamente discutidos no ciclo da asma, pois as condições de higiene podem, em teoria, contribuir no surgimento ou como fator protetor contra a asma. A hipótese de que infecções helmínticas induziriam proteção à asma e alergia é uma conclusão discutível ainda hoje, pois isso não foi demonstrado em algumas populações, inclusive a brasileira (DOMBROWICZ, 2001; SORENSEN, 2006).

Se por um lado o status socioeconômico é um fator de risco em algumas populações, a poluição também se mostrou um determinante para o aumento da prevalência da asma. Em grandes cidades, a poluição, principalmente pela taxa elevada de monóxido de carbono (CO), se mostrou um fator de risco que é inerente a todas as classes sociais que habitam uma determinada cidade, estando igualmente expostos a esse fator de risco (NEIDELL, 2004).

2.2 Marcadores moleculares

Em termos gerais, foi definido como marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Ainda, os marcadores moleculares, revelam polimorfismos ao nível do DNA (VIGNAL, 2002).

Segundo Vignal *et al.* (2002), dois pontos de vista devem ser considerados. Por parte do geneticista, o procedimento de genotipagem deve ser simples e ter um custo o mais baixo possível, a fim de gerar uma grande quantidade de dados de genotipagem, muitas vezes necessário. Do ponto de vista estatístico, de acordo com o tipo de análise a ser executada, algumas características são importantes, tais como as relações de dominância, o conteúdo de informação, a neutralidade, as posições do mapa ou independência genética dos marcadores. Qualquer que seja o sistema escolhido, os dados devem ser os mais confiáveis possíveis.

Logicamente que nem toda variação encontrada em sequências do genoma pode levar a uma mudança fenotípica, entretanto, podemos estimar parâmetros analisando indiretamente fenótipos divergentes através dos marcadores moleculares.

Além disso, outras vantagens cercam análises utilizando os marcadores moleculares. Pode-se verificar um número extremamente grande de polimorfismos genéticos tendo a identificação direta do genótipo sem precisar considerar a influência do ambiente sob o caráter genético (FALEIRO, 2007). Dessa forma, em suma, a análise de marcadores moleculares pode ser útil para análise da diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações (SOUZA, 2008).

Na atualidade, existem diversas técnicas de genética molecular disponíveis. Cada uma dessas tecnologias apresenta vantagens e desvantagens que devem ser levadas em conta dependendo da pergunta biológica e dos objetivos da análise. Além disso, a infraestrutura, disponibilidade de recursos financeiros, bem como a disponibilidade de recursos humanos qualificados e o nível de conhecimento da

espécie em estudo (FALEIRO, 2007) são itens importantes a serem avaliados antes da escolha da técnica mais vantajosa para uma determinada realidade.

2.2.1 Marcador ISSR

O marcador ISSR, do inglês *Inter Simple Sequence Repeats* (ZIETKIEWICZ, 1994), é um tipo de marcador baseado na análise de regiões inter-microsatélites (regiões que ficam entre unidades curtas de 2 a 5 pb e repetidas em *tandem*). Esses fragmentos de 100 a 3000 pares de bases (pb) de DNA são amplificados pela reação de PCR utilizando um único primer de 16 a 20 pb com uma sequência microsatélite que se anela em fragmentos alvo complementar (FALEIRO, 2007). Tais marcadores foram testados com o DNA genômico de diversas espécies, como primatas, bovinos, suínos, vegetais, inclusive humano (ZIETKIEWICZ, 1994).

Tais marcadores são de fácil análise e a técnica não é laboriosa. A amplificação é feita simplesmente por uma PCR, seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose, com visualização de polimorfismos por diversos meios como fluorescência, brometo de etídio ou GelRed®, por exemplo. Ainda tem como vantagem o alto número de bandas, com muitas regiões polimórficas sem necessariamente conhecer previamente a sequência genômica da espécie em estudo (FALEIRO, 2007). Entretanto, carrega como desvantagem o caráter de ser um marcador do tipo dominante, sem conhecimento exato de quem é heterozigoto (RATNAPARKHE, 1998).

Apesar de não sabermos previamente a sequência alvo, o que pode ser uma vantagem em certas análises de genética de populações, os polimorfismos encontrados em ISSR são derivados da falta ou presença da sequência microsatélite por uma deleção ou inserção (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001). Ainda, os nucleotídeos ancorados no primer na terminação 5' ou 3' contribuem na caracterização de polimorfismos, pois o perfeito anelamento do *primer* seguirá de extensão da fita complementar recém sintetizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

O presente trabalho é um estudo tipo caso-controle. O nosso primeiro grupo, o caso, foi formado por pessoas portadoras de uma condição específica, nesse caso asma, e outro grupo, controle, composto por pessoas que não sofrem dessa condição. O propósito desse tipo de estudo foi identificar variáveis que ocorrem com maior ou menor frequência nos casos do que nos controles que podem ser fatores de risco ou proteção para a condição avaliada.

Nesse tipo de estudo não é necessário que o número de indivíduos-caso seja o mesmo de indivíduos-controle. Entretanto, aumentar quatro vezes mais o número de controles do que os casos não aumenta o poder do estudo substancialmente (MEDRONHO, 2002). Portanto, no presente trabalho foi usada uma base aproximada de 1:2 (um caso para dois controles). Diante disso, foram recrutados 114 indivíduos-caso e 206 indivíduos controle.

3.2 Captação dos indivíduos participantes (amostragem)

Os indivíduos-controle foram recrutados nos laboratórios de análises clínicas LAP e LIDI da cidade de Itabuna, no momento que esses faziam exames de rotina. Nenhum dos indivíduos tidos como controle relatou problemas que indicassem direta ou indiretamente a asma, sendo esse o critério de inclusão para os controles. Os indivíduos-caso foram identificados e recrutados pelos médicos pneumologistas da mesma cidade, sendo esses clinicamente acometidos pela asma. Ainda, foi tido como critério de exclusão o tabagismo, excluindo-se todos os indivíduos que fumaram mais de 100 cigarros em sua vida e/ou atualmente fumam diariamente ou ocasionalmente.

Todos os indivíduos que participaram da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 7.1) exigido pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), além de responderem ao questionário padronizado (Anexo 7.2). Dessa forma, é conveniente afirmar que esse trabalho foi submetido e aceito pelo CEP, com número de protocolo 253/2011.

Nesse mesmo momento, foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue periférico, que foram divididos em dois tubos: um com EDTA (para análises genéticas) e outro tubo de soro (para dosagem de IgE total).

3.3 Extração e quantificação de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi feita a partir do *buffy coat*, na tentativa de obter maior concentração de DNA. Dessa forma, antes de serem armazenadas em freezer, as amostras de *buffy coat* eram separadas do plasma e da papa de hemácias mediante centrifugação a 3.000 RPM durante 6 minutos. Após centrifugação, eram coletados 200 µL de *buffy coat* e esses acondicionados em microtubos devidamente identificados, a -20° C até o momento da extração de DNA. A partir disso, foi usado o QIAamp® DNA Mini Kit para a extração de DNA genômico segundo seu protocolo próprio para extração de DNA em coluna QIAamp Mini Spin.

A quantificação foi feita por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho GeneQuant, diluindo-se 2 µL de DNA extraído com 68 µL de água destilada, para que por fim, obtivéssemos 70 µL da mistura, para chegarmos a um fator de diluição igual a 35. A pureza do DNA foi avaliada pela razão A260/A280 calculada e fornecida pelo aparelho.

3.4 Marcadores ISSR

Inicialmente foi realizado um *screening* de 20 primers ISSR (tabela 1), usando dois *pools* de DNA molde. Um com 8 amostras de indivíduos-controle, cujo fenótipo não condizia com atopia, rinite, alergia, asma, dermatite ou alegasse histórico familiar de alergia. Outro, com amostras de 7 indivíduos-caso.

Tabela 1 - Conjunto de vinte primers ISSR usados para seleção de marcadores.

Nome do <i>primer</i>	Sequência 5' – 3'	Tm ^o C ¹	Ta ^o C ²
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	54,8	53
UBC81	CTCTCTCTCTCTCTT	54,8	53
UBC816	CACACACACACACAT	54,8	53
UBC82.	TCTCTCTCTCTCTCC	57,2	57
UBC82	ACACACACACACACT	54,8	53
UBC828	TGTGTGTGTGTGTGA	54,8	53
UBC86	AGAGAGAGAGAGAGYA	56,5	55
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAYT	56,5	55
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAYC	58,8	57
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAYG	58,8	57
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC	58,8	57
UBC84	CTCTCTCTCTCTCTRG	58,8	57
UBC87	ACACACACACACACYG	58,8	57
UBC864	ATGATGATGATGATG	50,8	50
UBC871	TATTATTATTATTAT	37,1	35
UBC889	DBDACACACACACAC	55,6	53 e 54
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTG	55,6	53 e 54
UBC899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	60,8	58 e 60
D	HVHCACCACCACCACCT	63	60 e 61
Terry	GTGGTGGTGGTGRC	57	55 e 57

¹ Temperatura de *melting*;

² Temperatura de anelamento do *primer* na reação de PCR.

As reações de PCR foram feitas para um volume final de 13 µL contendo: tampão PCR (1X), MgCl₂ (1,61 mM), dNTP (0,21 mM), Taq DNA polimerase (1U/µL), *primer* (1,15 µM) e DNA molde (30 ng/µL), completando-se o volume necessário de água bidestilada e autoclavada. Cada reação seguiu no termociclador Veriti™ da Applied Biosystems, de acordo com as seguintes condições de termociclagem: um ciclo a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos a 92°C por 1 minuto, Ta°C respectiva de cada *primer* (tabela 1) por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; 1 ciclo a 72°C por 7 minutos.

O produto resultante da PCR foi aplicado juntamente com 2 µL de corante tipo IV e 4 µL de GelRed® diluído em gel de agarose a 1,5% e submetido à eletroforese com tampão TBE 1X. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Ladder* 1kb da Invitrogen. Após eletroforese, o gel foi fotografado pelo fotodocumentador Transiluminator da Loccus Biotecnologia, modelo L-PIX-ST.

3.5 Dosagem de Imunoglobulina E total

A dosagem de IgE total foi feita a partir de 5 ml de sangue periférico dos indivíduos participantes, coletados em tubo sem anticoagulante (tubo para soro). Nesse tubo havia gel separador, que após centrifugação se mantinha entre as fases do plasma e a papa de hemácias.

Em seguida, esses tubos eram catalogados e identificados e progressivamente encaminhados para o Laboratório Álvaro para a dosagem de IgE total seguindo método imunológico não competitivo. Os resultados eram acessados pela plataforma online do Laboratório LAP.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com o uso das plataformas SPSS Statistic 17.0 da IBM como também o pacote estatístico BioEstat 5.0, na versão em

português e o programa Microsoft Excel 2007. Foi feita a análise de normalidade usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Usou-se a média aritmética para estimarmos a média da idade dos indivíduos participantes. Os resultados das análises que envolvem IgE foram feitas usando a média geométrica, o desvio padrão geométrico, testes não-paramétricos como o teste de qui-quadrado e teste U de Mann-Whitney. Simulações de pontos de corte para valores de referência para IgE total foram feitas nas análises diferenciadas para associações dessas dosagens com a asma e com a dermatite atópica, usando qui-quadrado. Simulações de risco também foram feitas para pontos de corte diferentes, para a variável dermatite atópica. Tais pontos de corte foram estabelecidos de forma arbitrária. A estatística da curva *ROC* foi feita para estimar pontos de corte segundo a sensibilidade e a especificidade do teste. Além disso, para estabelecer fatores de risco, foi feita regressão logística. O teste de Kruskal-Wallis foi feito para calcular se há diferença das médias de IgE total quanto a severidade da asma. Todo o *p*-valor menor do que 0,05 foi considerado significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A asma é uma patologia extremamente complexa. Compreender melhor sua etiologia e os fatores associados com a sua manifestação é importante para a elaboração de medidas de prevenção e para o desenvolvimento de melhores abordagens terapêuticas. Dessa forma, este trabalho segue mostrando e discutindo variáveis importantes que podem estar relacionadas com a asma na população em foco.

4.1 Caracterização geral da população e análise da associação de variáveis epidemiológicas e clínicas com asma.

Apesar de terem sido coletados sangue periférico e dados via questionário de 320 indivíduos (114 caso e 206 controle), devido a fatores de exclusão, foi avaliado um total de 304 indivíduos, com média de idade de $40,19 \pm 19,11$ (DP) anos, com mínimo de 6 e máximo de 88 anos, sendo 192 indivíduos do grupo controle e 112 indivíduos do grupo caso (asmáticos).

As proporções (em porcentagem) de indivíduos segundo o gênero estão mostradas na tabela 2. Foi observado que houve maior participação de indivíduos do gênero feminino (73,4%). Entretanto, as proporções de ambos os gêneros estão distribuídas de forma homogênea entre casos e controles e a variável gênero não representou um fator de risco para a asma (χ^2 p-valor = 0,17; OR = 1,44, IC = [0,86;2,42], OR p-valor = 0,17). Pegas *et al.* (2011) também mostrou que o gênero não é um indicativo de suscetibilidade para a asma.

Tabela 2 – Distribuição de indivíduos segundo o gênero.

Grupo	Gênero		Total (%)
	Feminino (%)	Masculino (%)	
Controles	146 (76,0)	46 (24,0)	192
Casos	77 (68,8)	35 (31,3)	112
Total	223 (73,4)	81 (26,6)	304 (100,0)

Se por um lado a variável gênero não influencia na asma, o fator histórico familiar de asma é um forte indicador de suscetibilidade (CRESTANI, 2004). Brenda *et al.* (2009) estudou uma população do sul do Brasil, especificamente no estado de Santa Catarina, e observaram que a chance de ter asma é duas vezes maior se há um familiar asmático (OR de 2,07, com IC entre 1,55 a 2,78). No presente estudo, foi observado que o histórico familiar de asma está associado sim com a asma (X^2 p-valor < 0,001, OR foi de 4,26, com IC entre 2,60 a 6,99), mostrando que no sul da Bahia, o risco de ter asma é maior quando se tem um familiar asmático (pai, mãe ou algum irmão sanguíneo). O que mais chama atenção ao se analisar esse tipo de variável (histórico familiar) é que, sendo positiva a sua associação com a asma, sugere-se que haja fatores genéticos envolvidos com essa patologia e eles podem estar sendo herdados, o que tem sido sugerido há algum tempo (KOPPLEMAN, 1999).

Foram avaliados também os relatos de várias manifestações clínicas e verificado quais delas estavam correlacionadas com a asma e quais chamavam mais atenção. Tais variáveis foram: ter ou não alergia, se queixar ou não de dificuldade de respirar, escorrer secreção nasal, espirros frequentes, ter coceiras pelo corpo, tosse frequente, chiado ao respirar (sibilo) e sentir, ou não, aperto no peito, conforme tabela 3. Pôde-se observar que todos os sintomas sugeridos no questionário foram praticamente exclusivos de pacientes asmáticos. Isso foi visto tanto com o grupo caso (somente asmáticos), chamado de grupo Geral 1 na tabela, como também quando reagrupamos os indivíduos, considerando caso somente aqueles que apresentaram a tríade: asma, alergia e sugestivamente dermatite atópica, grupo este denominado como Geral 2. Esse reagrupamento foi feito na tentativa de

observarmos se há diferença nas análises quando restringimos mais os fatores de inclusão para o grupo caso. Entretanto, não foi observado divergências nesse tipo de análise, todas as variáveis que eram estatisticamente significantes continuaram como tal.

Foi possível observar ainda que a dificuldade de respirar é a queixa mais frequente entre os asmáticos (83,04%), sendo ser alérgico a segunda (82,14%). Entretanto, outras variáveis chamaram atenção, como a secreção nasal (rinorréia) e espirros frequentes, que são característicos da rinite alérgica (SKONER, 2001; BOUSQUET, 2008). De fato, muitos estudos mostram que a rinite alérgica e a asma são doenças inter-relacionadas, de tal forma que sugerem a quebra do paradigma como doenças diferentes (CAMARGOS, 2002; BOUSQUET, 2008).

A variável “coceira” pode ser atribuída à dermatite atópica, que também acomete os pacientes asmáticos de forma significativa (tabela 3). Já foi demonstrado que metade dos pacientes que têm dermatite atópica adquiriram rinite alérgica e cerca de 25% asma (MENDES, 1998).

A partir dos sintomas, pelo quadro clínico e histórico familiar os pneumologistas envolvidos no trabalho puderam estadiar a asma em 65 indivíduos asmáticos. A não classificação total dos indivíduos-caso se deveu a não realização da espirometria na totalidade de pacientes. A maioria dos indivíduos (63,10%, n = 41) apresentou asma leve enquanto que 33,80% (n=22) apresentaram asma moderada e apenas 2 (3,10%) tinham asma grave. Outras considerações serão feitas acerca da classificação da asma, no próximo subcapítulo.

Tem sido sugerido que algumas das manifestações clínicas estão associadas com fatores ambientais. Muitas variáveis foram correlatas, por exemplo, o aumento da prevalência da asma, latitude, temperatura média e umidade local são exemplos (FRANCO, 2009). Outros fatores importantes são os socioeconômicos. Segundo Barker e colaboradores, o baixo perfil socioeconômico durante a infância aumenta o risco de desenvolvimento de asma em fase mais avançada de vida, devido à hipótese de que bebês com desenvolvimento pulmonar prejudicado, que nascem em lares onde infecções virais do trato respiratório são comuns, são mais vulneráveis à doença (BARKER, 2013).

Tabela 3 – Associações (χ^2) e chance de risco (OR) entre acometimentos e a asma.

Variável	Masculino		Feminino		Geral 1			Geral 2		
	n (%)		n (%)		n (C/K ¹)			n (C/K ¹)		
	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P	P	
	IC		IC		IC		IC		IC	
	81 (26,64%)		223 (73,36%)		192 (63,2%) / 112 (36,8%)			249 (81,9%) / 55 (18,1%)		
Alergia	10,40	<0,001	11,88	<0,001	10,37	<0,001				
	3,70-29,20		5,75-24,52		5,85-18,38					
Dificuldade de respirar	26,67	<0,001	41,10	<0,001	35,97	<0,001	15,33	<0,001		
	8,09-87,88		18,53-91,19		18,62-69,46			6,89-34,09		
Secreção nasal	21,50	<0,001	6,09	<0,001	7,92	<0,001	12,59	<0,001		
	5,56-83,08		3,24-11,45		4,54-13,81			6,35-24,96		
Espirros frequentes	16,09	<0,001	10,54	<0,001	11,72	<0,001	27,73	<0,001		
	5,33-48,61		5,54-20,05		6,74-20,37			10,60-72,52		
Dermatite atópica	7,88	<0,001	4,95	<0,001	4,99	<0,001				
	2,31-26,80		2,71-9,02		2,97-8,41					
Tosse frequente	33,00	<0,001	12,96	<0,001	15,33	<0,001	7,14	<0,001		
	6,87-158,64		6,42-26,15		8,20-28,63			3,80-13,44		
Sibilos	76,15	<0,001	34,00	<0,001	36,20	<0,001	7,98	<0,001		
	9,36-619,95		15,12-76,46		17,48-74,97			4,20-15,16		
Aperto no peito	8,80	0,002	9,67	<0,001	9,00	<0,001	4,04	<0,001		
	1,79-43,39		4,41-21,22		4,48-18,10			2,10-7,79		

Geral 1 - indivíduos-caso: asmáticos; Geral 2 - indivíduos-caso, asmáticos que relataram quadro de alergia e dermatite atópica;

¹ C - controles; K – casos.

Entretanto, os indicadores socioeconômicos estudados no presente trabalho, não mostraram qualquer associação com a asma. Inicialmente, avaliamos o nível social segundo a renda familiar (χ^2 p-valor = 0,12) (figura 1). As classes sociais foram agrupadas segundo o DIEESE (Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos), seguindo a seguinte divisão: Classe A1, inclui as famílias com renda mensal maior que R\$ 14.400,00; Classe A2: maior que R\$ 8.100,00; Classe B: maior que R\$ 4.600,00; Classe C: maior que R\$ 2.300,00; Classe D: maior que R\$ 1.400,00; Classe E: maior que R\$ 950,00; e Classe F: maior que R\$ 400. A figura 1 é um gráfico que demonstra a divisão de classes e as porcentagens obtidas para cada grupo.

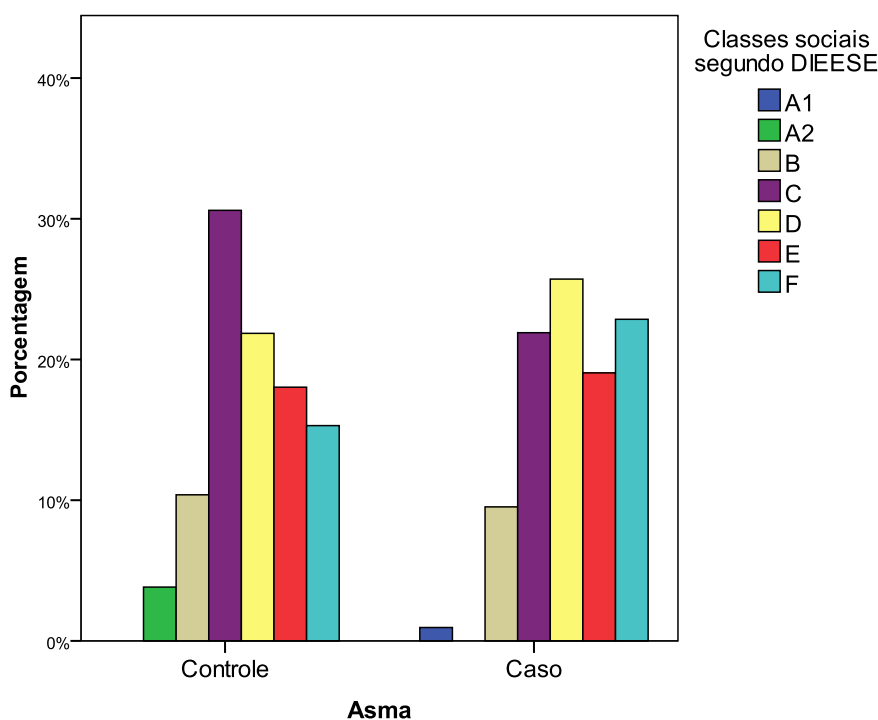


Figura 1 – Distribuição das porcentagens para cada classe social de cada grupo (controles e casos).

Outra variável de cunho social estudada foi a escolaridade. Tendo como partida que o indivíduo ao concluir o ensino fundamental e médio no Brasil estuda

por volta de oito anos, foi feita uma variável dicotômica, de quem estudou oito anos ou mais, ou estudou menos do que oito anos. Com base nisso, não observamos relação dessa variável com a asma (χ^2 p-valor = 0,46; OR = 1,20, OR p-valor = 0,46, IC entre 0,74 e 1,94). Dessa forma, na população em estudo, os fatores sociais avaliados não foram um interferente na prevalência dessa patologia.

Outra variável avaliada foi a etnia, baseada nas autodeclarações sugeridas no questionário (branco, negro, pardo, amarelo ou indígena). Não foi encontrada qualquer associação com asma na população em estudo (χ^2 p-valor = 0,76). Pardos e negros tiveram as maiores frequências seja nos casos quanto nos controles (figura 2). Grant *et al.* (2000) em seu estudo mostrou que a etnia negra sucumbe mais de mortalidade pela asma do que indivíduos brancos nos Estados Unidos. A princípio, o fundo causador dessa disparidade se refere ao dessemelhante perfil socioeconômico intimamente ligado à questão étnica nesse país. Outro estudo mostra que não só em negros, mas também em latinos, a prevalência de asma se mostra maior e possivelmente se deve ao baixo uso de medicamentos preventivos para a doença (LIEU, 2002).

No Brasil é muito difícil estabelecer uma caracterização segura acerca de raça/etnia de forma autodeclarada, o que dificulta as análises e interpretações. A população aqui presente é historicamente miscigenada, derivada principalmente de ancestrais europeus, africanos e ameríndios (ANDRADE, 2005).

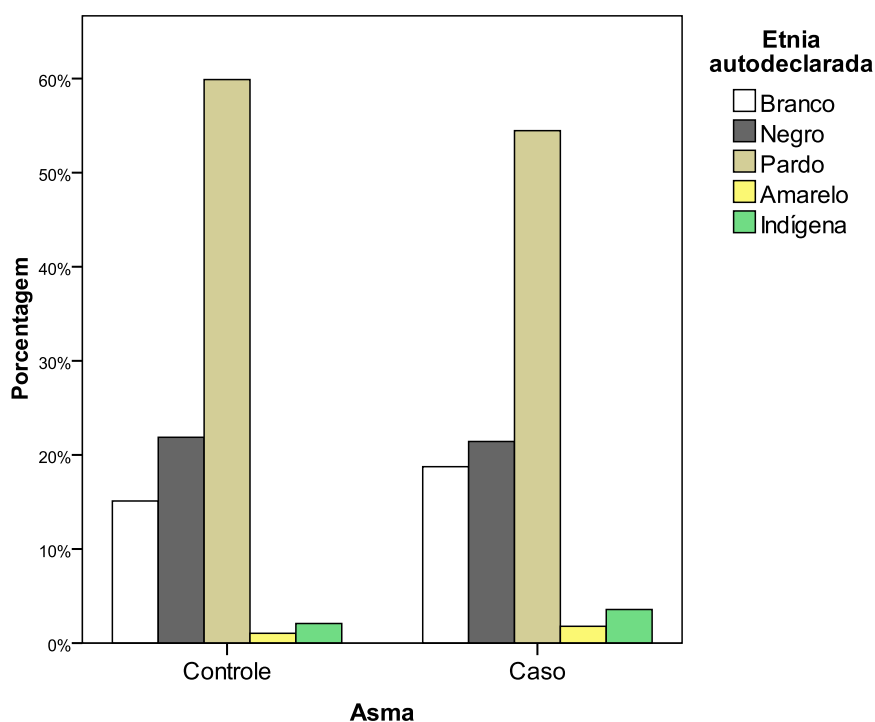


Figura 2 – Distribuição das proporções das etnias autodeclaradas na população em estudo.

4.2 Análises de IgE sérica total

Foram avaliados 298 indivíduos para as dosagens de IgE sérica total, sendo 188 controles e 110 casos. Além dos fatores de exclusão, como, por exemplo, exclusão de indivíduos fumantes, algumas dosagens não foram feitas porque as amostras não estavam adequadas ou eram insuficientes para realizar a dosagem.

O resultado do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov testando todas as dosagens de IgE total, bem como cada grupo separadamente (caso e controle), indicaram para esses três distintas categorias um p-valor menor do que 0,001. Sendo assim, a variável IgE não segue a distribuição normal. Dessa forma, todas as análises referentes a tal variável foram não-paramétricas. Como forma demonstrativa da distribuição dos dados das dosagens de IgE sérica total, foi feito dois histogramas: o primeiro feito com base nos dados das dosagens e o segundo

usando o log dessas dosagens (figura 3). Tomando como base todos os valores de IgE total obtidos, observamos grande diferença da conformação da distribuição quando consideramos os valores reais e quando consideramos o log deles. Observamos que a distribuição do log das dosagens segue a normalidade (Kolmogorov-Smirnov, p-valor = 0,27).

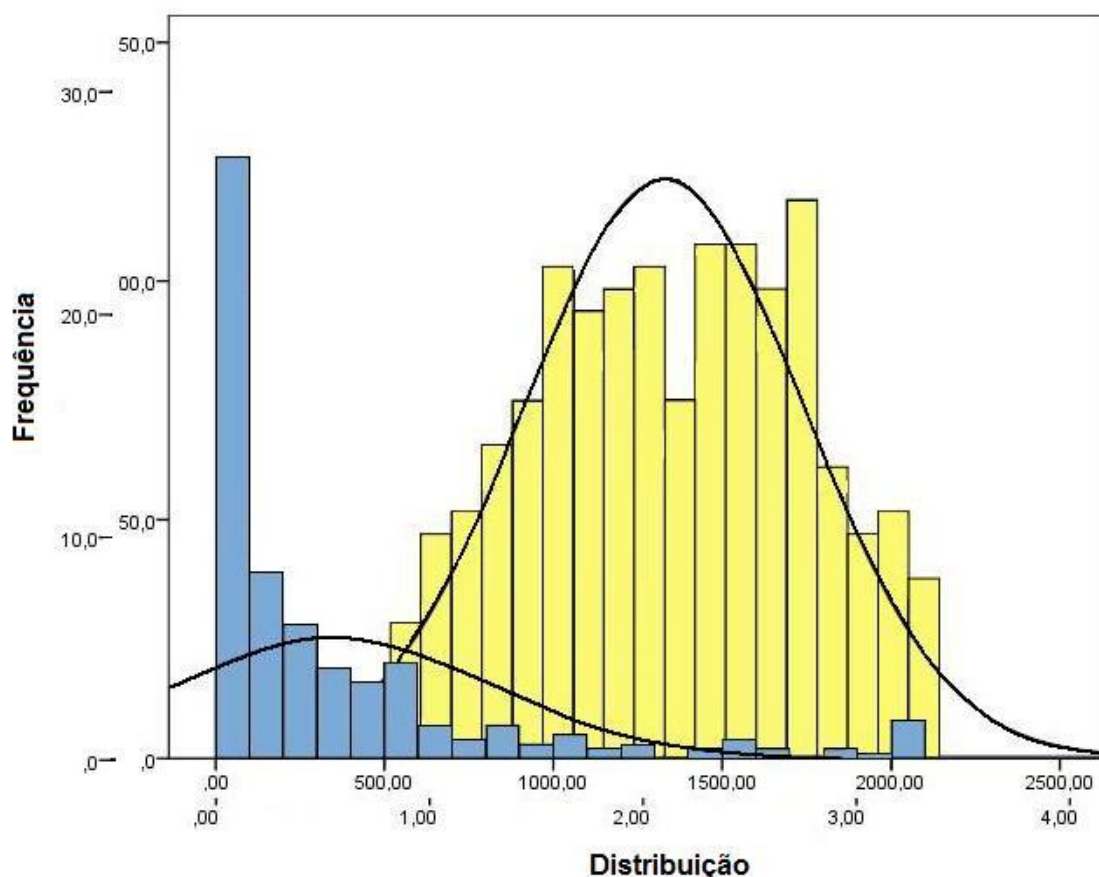


Figura 3 – Histograma das dosagens de IgE sérica total, demonstrando que a distribuição não corresponde à normalidade quando consideramos os valores reais (azul), mas sim a logarítmica (amarelo). Os valores mais próximos ao gráfico são referentes à distribuição real, enquanto que os valores mais afastados são referentes à distribuição logarítmica.

Ainda considerando as distribuições acima, ficou inviável estabelecer valores e comparações entre médias aritméticas por conta da não-normalidade. Sobre isso, alguns autores preferem discutir o assunto usando a mediana (MEDEIROS, 2006; MEHL, 2005), enquanto outros preferem estabelecer e discutir dosagem de IgE total

pela média geométrica (SPALDING, 2000; SUNYER, 1996). No presente trabalho, analisaremos apenas a média geométrica. Portanto, observou-se diferenças estatísticas significativas nas concentrações das dosagens de IgE sérica total pelo teste U de Mann-Whitney, tendo como resultado: controles - média geométrica \pm DP de $107,87 \pm 4,43$ UI/ml; casos - média geométrica \pm DP de $209,58 \pm 4,29$; p-valor $< 0,001$. Alguns trabalhos não correlacionam especificamente as dosagens de IgE com a asma, mas o fazem com alergia e atopia (MEHL, 2005; CAROSSO, 2007), porém assim como Camargos *et al.* (2002), acreditamos que esses são acometimentos correlatos e coexistem. Sendo assim, não diferente, trabalhos como o de Borish *et al.*, 2005 mostram que IgE total elevada está associada especificamente com a asma.

Como encontrado em diversos trabalhos (SPALDING, 2000; KERKHOF, 2003; DAVUTOGLU, 2000, BORISH, 2005), o presente estudo mostrou que o gênero masculino apresentou maior média de IgE sérica total do que o gênero feminino (tabela 4). O porquê da dosagem de IgE total ser maior em homens é ainda obscuro. Os trabalhos caracterizam os gêneros quanto à dosagem, porém não discutem o porquê dessa diferença.

Tabela 4 – Médias geométricas e seus desvios padrões das dosagens de IgE total entre os gêneros.

	Gênero	
	Masculino (n=84)	Feminino (n=227)
Média geométrica	223,61 UI/mL	114,85 UI/mL
DP (geométrico)	4,25	4,36
p-valor	0,001	

Para análise dos valores de IgE, foram utilizados os valores de referência demonstrados na tabela 5, de acordo com o que é praticado pelo laboratório de análises clínicas que realizou as dosagens. Com base nesses valores, estabeleceu-se os indivíduos que tinham IgE total elevada, considerando sua idade no momento

de coleta do material sanguíneo. Sendo assim, testes estatísticos como qui-quadrado e *odds ratio* foram estabelecidos para avaliar a associação entre taxas de IgE total elevada e a asma, entre outros acometimentos (tabela 6).

É importante salientar que tomou-se como base a tabela 5, pois são os valores de referência que são atualmente aplicados na população em estudo na rotina clínica da cidade de Itabuna. Entretanto, possivelmente, esses valores são referentes a estudos que se basearam em outra população, podendo até ser estrangeira; não se sabe.

Tabela 5 – Valores de referência para IgE total segundo a idade.

IGE - IMUNOGLOBULINA E TOTAL			
(Soro)	Método: Imunológico não competitivo		
V.R.:	Até um ano	< 15,0	UI/mL
	1 a 5 anos	< 60,0	UI/mL
	6 a 9 anos	< 98,0	UI/mL
	10 a 15 anos	< 200,0	UI/mL
	> 15 anos	< 160,0	UI/mL

V.R – Valores de referência;

Fonte: Resultados emitidos pelo laboratório LAP, via laboratório Álvaro.

Como pode ser visto na tabela 6, foi possível observar associação entre todas as variáveis, com exceção de “tosse frequente” e “aperto no peito”, com níveis elevados de IgE total (tabela 5). Houve, portanto, associação significativa entre asma e alergia, bem como com outras variáveis sugestivas de rinite alérgica e dermatite atópica, mostrando similaridade de resultados sugerida por outro estudo anterior (SKONER, 2001). Entretanto, quando realocamos os indivíduos (Grupo 2), considerando como casos aqueles asmáticos que relataram alergia e dermatite, as duas variáveis (tosse frequente e aperto no peito) que *a priori* não foram associadas

com os níveis de IgE se mostraram significativamente associadas com a asma nessa segunda análise. Considerando a associação entre asma, alergia e dermatite atópica, talvez, avaliar a correlação entre IgE e os acometimentos clínicos seja melhor alocando no mesmo grupo indivíduos com os três relatos.

Com base em trabalhos científicos que estabelecem limites de corte nas dosagens de IgE total, dividindo padrões entre indivíduos com quadro atópico e não-atópico, podemos afirmar que o nível de IgE inferior a 20 UI/mL não sugere diagnóstico de atopia, embora não o exclua com base somente nisso. Da mesma forma, IgE superior a 100 UI/mL, ou 160 UI/mL como aqui foi observado, não indica necessariamente quadro atópico, entretanto é mais comum entre pacientes alérgicos e asmáticos. É natural que níveis extremos estejam significativamente associados a uma ou outra possibilidade (SPALDING, 2000). Entretanto, ainda é muito difícil estabelecer valores exatos de referência, ou melhor, definir um ponto de corte seguro para distinguir quem é atópico e quem não é.

Não é objetivo principal desse trabalho definir valores de referência para IgE total na população estudada. Entretanto, na figura 4 a seguir, simulamos diferentes pontos de corte (*cutoff*) para IgE total de forma arbitrária, na tentativa de diferenciar asmáticos e não asmáticos pela dosagem de IgE total. Observamos que a partir de 20 UI/mL a associação da asma com níveis “elevados” de IgE total começa a aparecer. Isso ocorre até chegarmos aproximadamente ao ponto 1000 UI/mL, quando o número de indivíduos com essas dosagens já se torna muito baixo (figura 4), e portanto, as associações, ou não, começam a ficar cada vez mais espúrias.

Tabela 6 – Associações (χ^2) e chance de risco (OR) entre acometimentos e a taxa elevada de IgE total.

Variável	Masculino		Feminino		Geral 1		Geral 2	
	n (%)		n (%)		n (C/K ¹)		n (C/K ¹)	
	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P
	IC		IC		IC		IC	
	81 (26,64%)		223 (73,36%)		192 (63,2%) / 112 (36,8%)		249 (81,9%) / 55 (18,1%)	
Asma	2,50	0,050	2,09	0,009	2,12	0,002		
	0,98-6,36		1,19-3,67		1,31-3,42			
Alergia	4,38	0,002	2,34	0,002	2,46	<0,001		
	1,64-11,67		1,36-4,03		1,55-3,92			
Dificuldade de respirar	2,30	0,078	2,57	0,001	2,37	<0,001	15,33	<0,001
	0,90-5,85		1,47-4,49		1,47-3,82		6,89-34,09	
Secreção nasal	5,18	0,004	2,01	0,019	2,36	0,001	12,59	<0,001
	1,57-17,07		1,12-3,62		1,41-3,94		6,35-24,96	
Espirros frequentes	3,40	0,012	1,94	0,017	2,17	0,001	27,73	<0,001
	1,28-9,02		1,12-3,37		1,35-3,49		10,60-72,52	
Dermatite atópica	8,50	0,002	1,77	0,044	2,03	0,006		
	1,81-39,95		1,01-3,12		1,23-3,35			
Tosse frequente	1,86	0,24	1,61	0,12	1,59	0,08	7,14	<0,001
	0,66-5,19		0,89-2,90		0,95-2,65		3,80-13,44	
Sibilos	3,36	0,028	1,92	0,027	2,00	0,008	7,98	<0,001
	1,10-10,26		1,07-3,45		1,20-3,32		4,20-15,16	
Aperto no peito	2,31	0,23	1,35	0,38	1,37	0,31	4,04	<0,001
	0,57-9,27		0,69-2,65		0,75-2,48		2,10-7,79	

* Geral 1 - indivíduos-caso apenas asmáticos; Geral 2 - indivíduos-caso, asmáticos que relataram quadro de alergia e dermatite atópica;

¹ C – controles; K – casos.

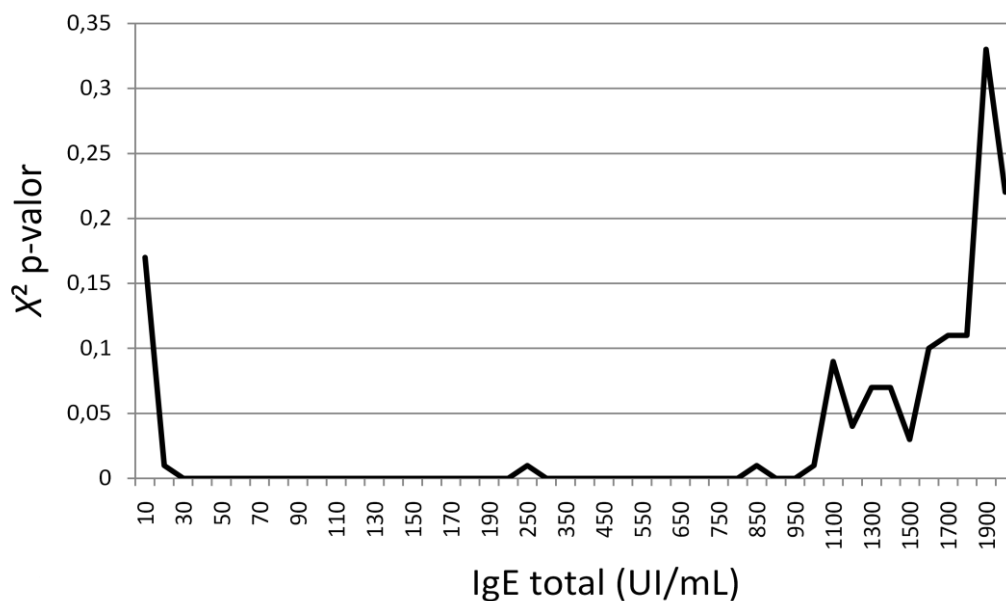


Figura 4 – Simulações de associações entre IgE total, com diferentes pontos de corte, com a asma.

Frente a essa situação, analisamos a curva *ROC* para estimar um ponto de corte melhor do que o tomado como base nos valores de referência (quadro 1) para a população em estudo. Neste contexto, a área sob a curva *ROC* foi de 0,63, com intervalo de confiança entre 0,56 e 0,69 (figura 5). A área sob a curva *ROC* é uma medida usual do desempenho desse tipo de teste. Um teste que é totalmente incapaz de discriminar indivíduos doentes e não doentes teria uma área sob a curva *ROC* de 0,5. Quanto maior a capacidade do teste em discriminar essa situação, mais a área sob a curva aproximasse de 1,00 e mais a curva se aproximaria do canto superior esquerdo do gráfico (MARTINEZ, 2003). Acima de 0,7 é considerado satisfatório (MARGOTTO, 2010).

Com base nisso, as dosagens de IgE total não discriminam com precisão satisfatória quem é asmático e quem não é asmático. Esse prejuízo de informação no presente estudo não se deve a análise de 298 indivíduos, já que Lott *et al.* (1992) estabeleceram valores de referência seguros (99% de confiança) para muitas dosagens usando apenas 198 indivíduos. Atribuímos tal resultado aos mesmos fatores sugeridos por Klink *et al.* (1990). A propagação dos valores de IgE é extremamente ampla individualmente, seja em indivíduos com ou sem doenças

alérgicas conhecidas, embora a distribuição dos níveis de IgE total seja muito diferente se considerarmos os grupos.

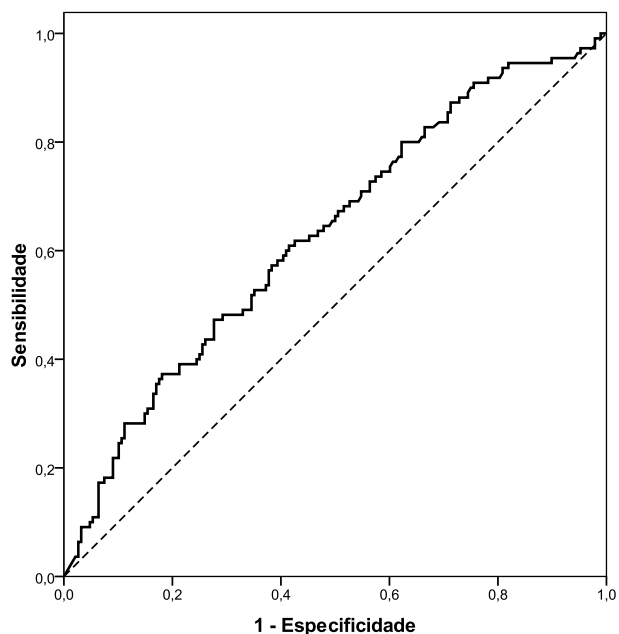


Figura 5 – Curva ROC para dosagens de IgE total e asma.

O mesmo tipo de análise de simulação foi feito tomando-se como base a dermatite atópica. Simulações de associações foram feitas com diferentes pontos de corte. Observamos que as associações começam a apresentar significância quando a dosagem de IgE total chega ao ponto de corte de 90 UI/mL (figura 6).

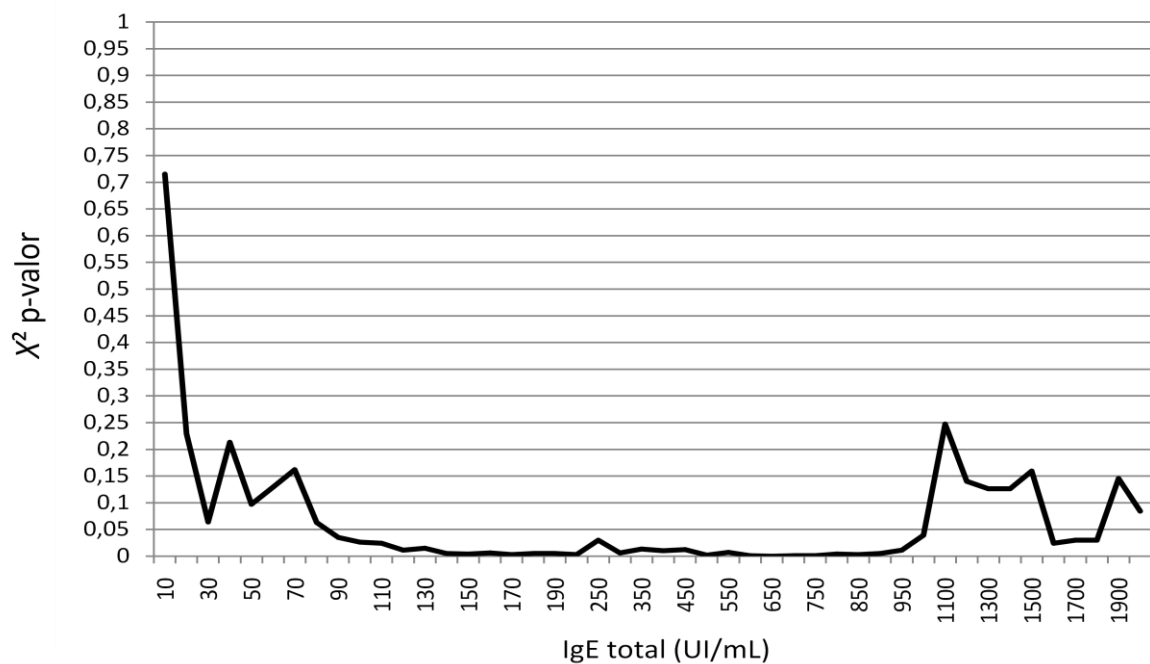


Figura 6 - Simulações de associações entre IgE total, com diferentes pontos de corte, com a dermatite atópica.

Ainda tomando-se como base os diferentes pontos de corte, simulou-se *odds ratio* para a dermatite atópica. A figura 7 nos mostra que quanto maior a dosagem de IgE total, maior o risco de se adquirir dermatite atópica. É uma forma indireta de se avaliar quantitativamente a relação entre dermatite e a dosagem de IgE total.

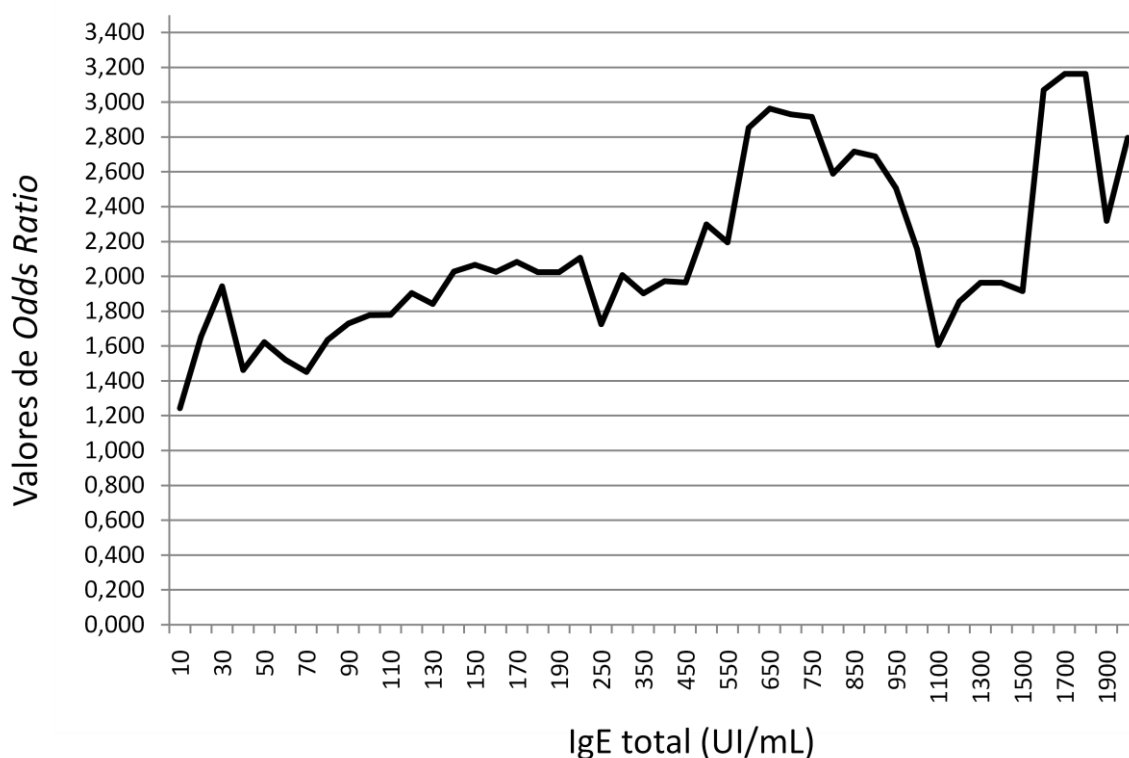


Figura 7 – Levantamento das OR segundo dosagem de IgE total.

A tabela 7 mostra as médias das dosagens de IgE total dos indivíduos acometidos pelo tipo característico de asma: leve, moderada ou grave. Podemos observar que as médias geométricas são numericamente maiores quanto mais a severidade da asma. Porém, não houve diferença estatística entre as médias dos grupos, possivelmente pelo baixo número de indivíduos que apresentaram severidade grave. Sabe-se que a dosagem de IgE sérica total reflete a severidade da asma devido a cascata imunológica envolvida na inflamação das vias aéreas, mediada pela resposta Th2 (ANUPAMA *et al.*, 2005; BORISH, 2005).

Tabela 7 – Comparação entre a dosagem de IgE total (UI/mL) com a classificação da asma quanto a sua severidade.

	Severidade da asma		
	Leve	Moderada	Grave
Média geométrica*	155,06	328,72	451,17
DP (geométrico)	4,14	3,94	1,08
n	39	21	2
p-valor	0,13		

4.3 Marcadores ISSR

Quanto à genética, sabe-se que vários trabalhos têm mostrado que a contribuição do histórico familiar e, assim, da herdabilidade para a asma é muito forte (CRESTANI, 2004; KOPPLEMAN, 1999, HOLOWAY, 2010). Entretanto, por ser uma doença multifatorial, achar o padrão genético característico que dá suscetibilidade à asma é muito difícil. Vários marcadores isoladamente têm sido estudados e associados a essa patologia. Entretanto, não há na literatura nenhum trabalho que tenha avaliado a associação entre os perfis de bandas dos marcadores ISSR em populações humanas com a asma.

As figuras 8, 9 e 10 mostram o perfil dos géis de agarose para o *screening* desse tipo de marcador na amostragem desse trabalho. A figura 11 mostra um novo *screening*, refeito modificando-se a temperatura de anelamento dos *primers* presentes nessa imagem, pois os primers UBC899, UBC889, D e Terry, ou não amplificaram inicialmente ou não foi possível ter boa visualização dos padrões de bandas no gel. Dessa forma, o ajuste da Ta foi necessário e fundamental para a boa caracterização de bandas de ISSR (GOMES, 2012).

O principal objetivo da realização do *screening* dos primers ISSR é a procura de uma ou mais bandas (marcadores) com boa visualização no gel, exclusivas do pool de DNA, ou de controles ou de casos.

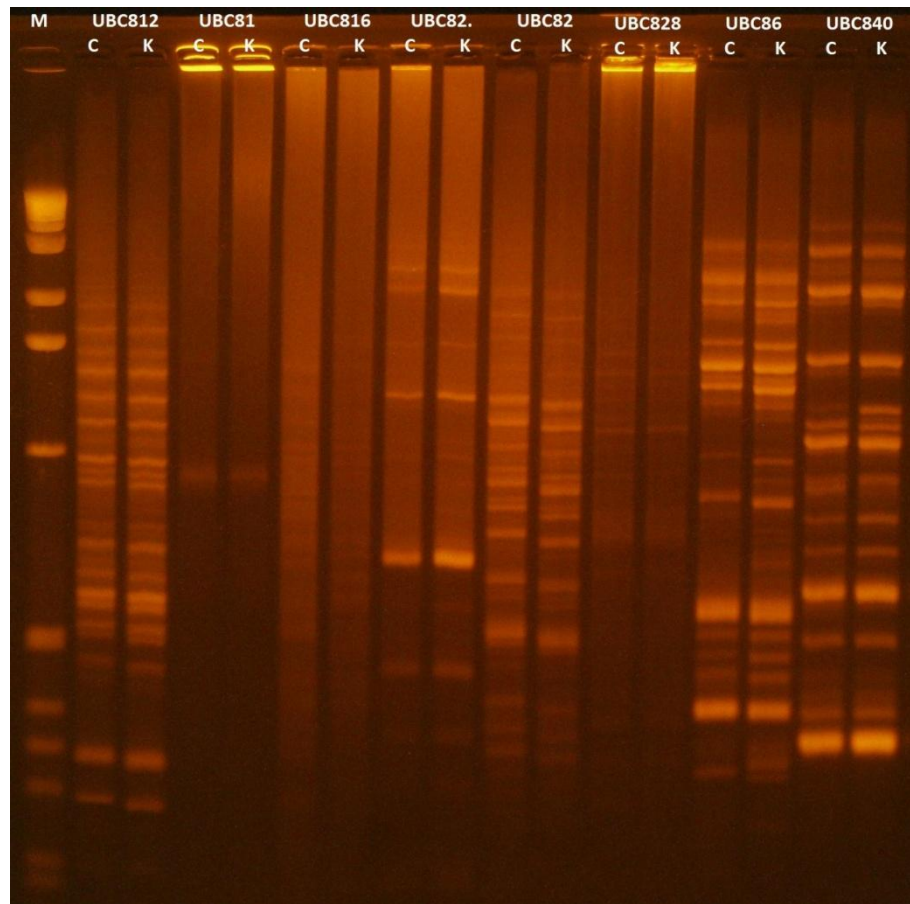


Figura 8 – Perfil do gel de agarose com o *screening* dos primers UBC812, UBC81, UBC816, UBC82., UBC82, UBC828, UBC86 e UBC840. (C) – *pool* de controles; (K) – *pool* de casos; (M) – Ladder 1kb.

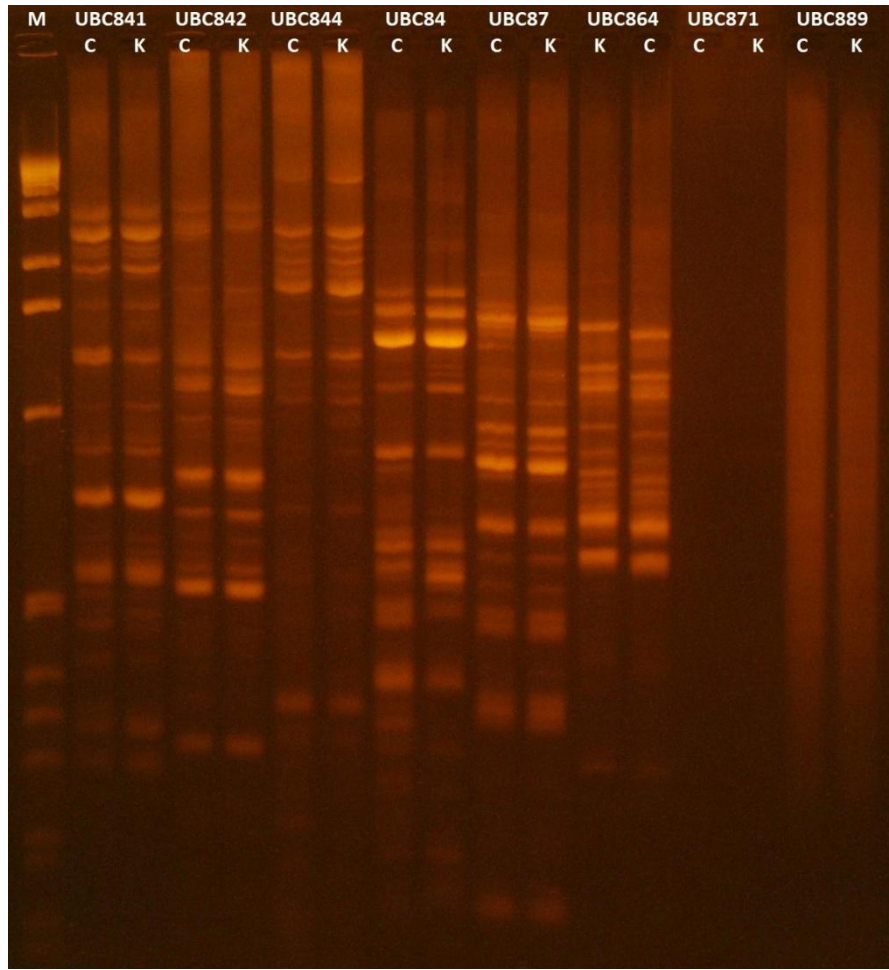


Figura 9 - Perfil do gel de agarose com o *screening* dos primers UBC841, UBC842, UBC844, UBC84, UBC87, UBC864, UBC871 e UBC889. (C) – *pool* de controles; (K) – *pool* de casos; (M) – Ladder 1kb.

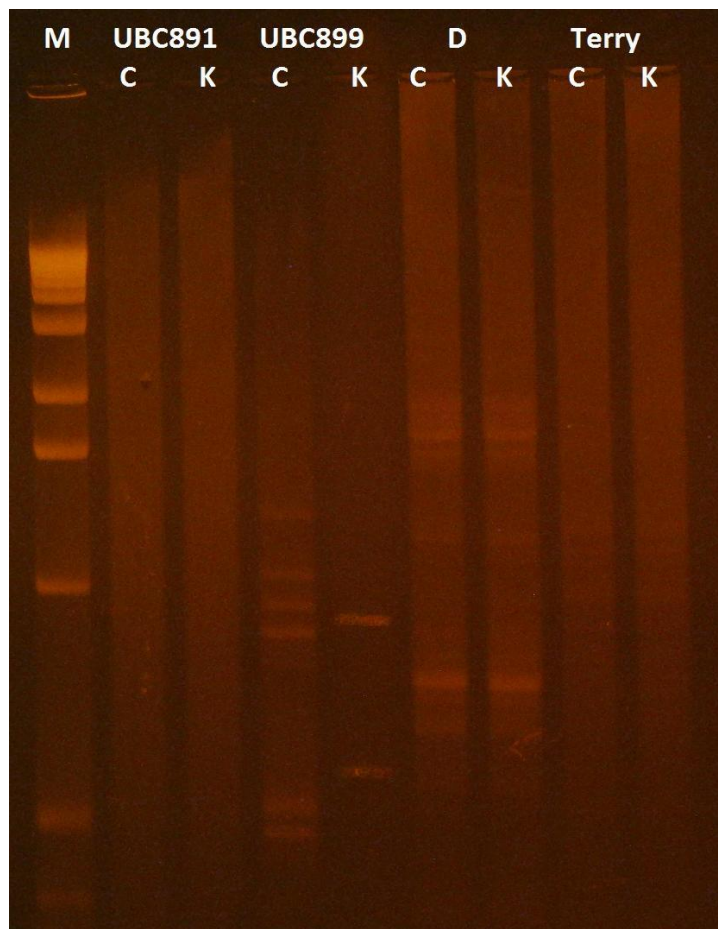


Figura 10 - Perfil do gel de agarose com o *screening* dos primers UBC891, UBC899, D e Terry. (C) – *pool* de controles; (K) – *pool* de casos; (M) – Ladder 1kb.

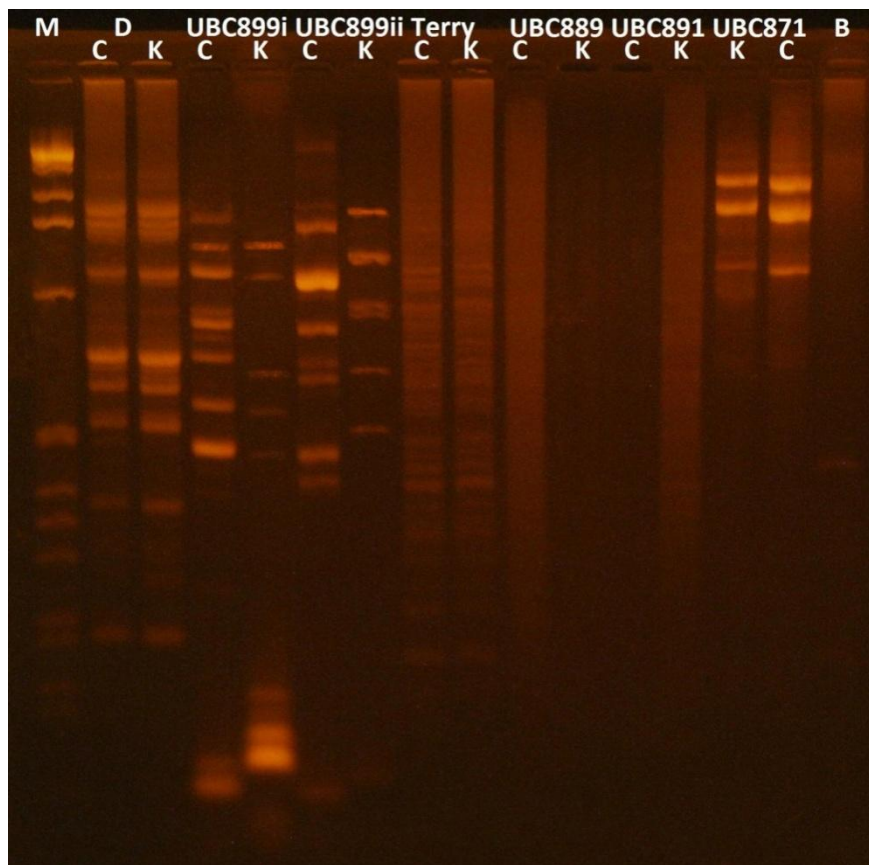


Figura 11 - Perfil do gel de agarose do novo *screening*, usando outra Ta dos primers D, UBC899i (Ta = 60°C), UBC899ii (Ta = 58°C), Terry, UBC889, UBC891 e UBC871. (C) – *pool* de controles; (K) – *pool* de casos; (M) – Ladder 1kb; (B) - branco.

Analisando os géis, figuras de 8 a 11, foi difícil observar bandas exclusivas de indivíduos com asma ou então não-asmáticos para o marcador ISSR. O *primer* que mostrou diferença aparente foi o UBC899, principalmente na Ta de 58°C. A partir disso, foram genotipadas individualmente as amostras que compunham os dois *pools* de DNA. A figura 12 mostra o perfil do gel de agarose na genotipagem desses indivíduos selecionados.

Há uma discrepância nítida entre os padrões de bandas apresentadas nos géis das figuras 11 e 12 para o *primer* UBC899, a Ta de 58°C (temperatura de anelamento a qual foi feita a genotipagem). Apresentaram-se uma quantidade menor de bandas quando feito a PCR pelo *pool* de DNA. Provavelmente, há competição entre as sequências de DNA presentes no *pool* com os substratos da reação. Na

reação de PCR, o DNA com maior homologia com o *primer* tem preferência de anelamento no momento da reação. Como resultado, a amplificação de uma amostra geneticamente mista, de muitos indivíduos (*pool*), não pode produzir os mesmos fragmentos que seriam gerados pelos indivíduos na mistura separadamente (SWEENEY, 1994).

Entretanto, analisando o gel da figura 12, observa-se que não há um loco exclusivo entre casos e/ou controles que satisfaça o objetivo de associar marcadores ISSR com a asma. Portanto, não se identificou uma banda exclusiva em um dos grupos.

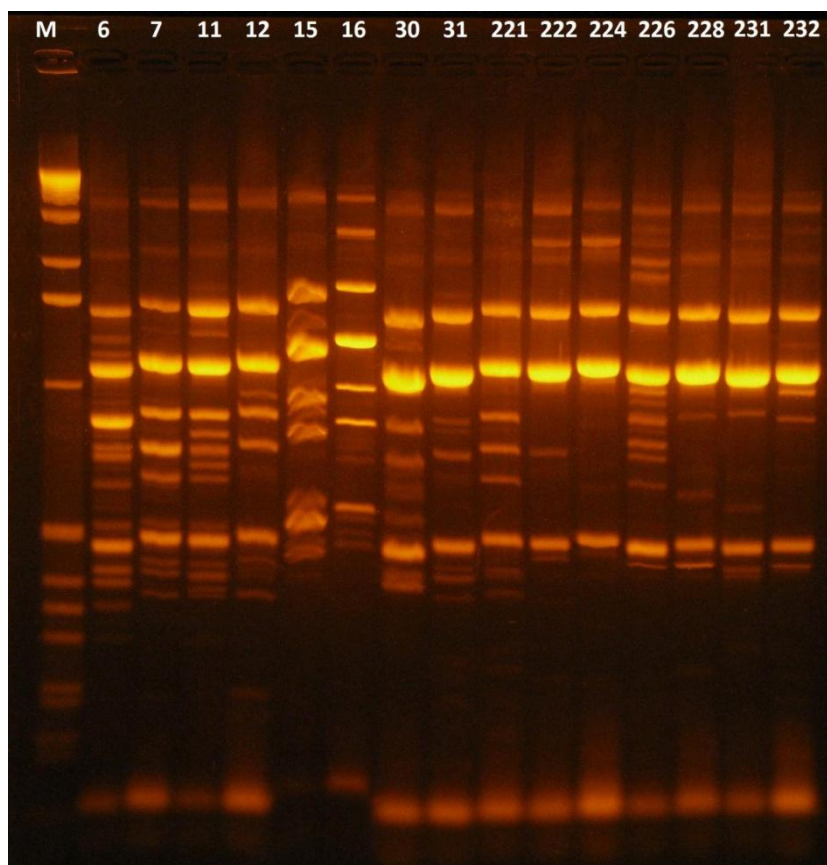


Figura 12 - Perfil do gel de agarose da genotipagem dos indivíduos que fizeram parte dos dois *pools*, utilizando o *primer* UBC899, Ta igual a 58°C. Indivíduos de 6 a 31 são controles, enquanto, 221 a 232 são casos; (M) – Ladder 1kb.

Apesar de não ter sido encontrado polimorfismos de ISSR associados à asma, os resultados indicam tratar-se de uma população altamente diversa para os pontos do genoma amostrados com esta ferramenta. Certamente, seria possível fazer associações deste tipo conforme hipotetizado neste trabalho, desde que se avaliasse muito mais porções do genoma com primers distintos.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos pelo presente trabalho, pode-se concluir que:

- Não foi encontrada associação da asma com fatores demográficos, como idade, gênero, escolaridade e renda.
- A asma está relacionada com histórico familiar, alergia, rinite alérgica, dermatite atópica, níveis elevados de IgE total e sintomas característicos dessa patologia, na população estudada;
- A distribuição de níveis de IgE total entre asmáticos e não-asmáticos é muito diferente. Entretanto, a definição de um "limite de normalidade" superior para IgE sérica total é duvidoso, já que não há um único nível de IgE que distingue os diferentes grupos com precisão;
- Não houve associação de marcadores ISSR com a asma, tomando-se como base os 20 *primers* usados e a população em estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Maria Palma.; ROCHA, Lurdes Bertol. **De Tabocas a Itabuna**. Ilhéus: Editus, 2005. 183p.

ANUPAMA, N.; SHARMA, M. V.; NAGARAJA, H. S.; BHAT, M. R. The serum immunoglobulin E level reflects the severity of bronchial asthma. **Thai Journal of Physiological Science**, v. 18, n. 3, p. 35–40, 2005.

BARKER, D. J. P.; OSMOND, C.; FORSÉN, T. J.; *et al.* Fetal And Childhood Growth And Asthma In Adult Life. **Acta paediatrica**, p. 1–19, 8 abr 2013.

BARNES, K. C.; MARSH, D. G.; BARNES, K.; MARSH, D. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunology Today**, v. 19, n. 7, p. 325–332, 1998.

BARNES, P. J. Cytokine modulators as novel therapies for asthma. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, p. 81–98, 2002.

BENYAHIA, C. *et al.* PGE2 receptor (EP4) agonists: Potent dilators of human bronchi and future asthma therapy? **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, p. 115-118, 2012.

BLUMENTHAL, M. N. The role of genetics in the development of asthma and atopy. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 5, n. 2, p. 141–5, abr 2005.

BORISH, L.; CHIPPS, B.; DENIZ, Y.; GUJRATHI, S. Total serum IgE levels in a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 95, p. 247–253, 2005.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, A. A.; *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008. **Allergy**, v. 63, p. 8–160, 2008.

BREDA, D.; FREITAS, P. F.; PIZZICHINI, E.; AGOSTINHO, F. R.; PIZZICHINI, M. M. M. Prevalência de sintomas de asma e fatores de risco associados em adolescentes

escolares de 13 e 14 anos dos municípios de Tubarão e Capivari de Baixo, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 11, p. 2497–2506, 2009.

CAMARGOS, P. A. M.; RODRIGUES, M. E. S. M.; SOLÉ, D.; SCHEINMANN, P. Asma e rinite alérgica como expressão de uma única doença: um paradigma em construção. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 123–128, 2002.

CAROSSO, A.; BUGIANI, M.; MIGLIORE, E.; ANTÒ, J. M. Reference Values of Total Serum IgE and Their Significance in the Diagnosis of Allergy in Young European Adults. **International Archive of Allergy and Immunology**, v. 142, p. 230–238, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Disponível em: www.cdc.gov. Acessado em 05/03/2013.

CRESTANI, E.; GUERRA, S.; WRIGHT, A. L.; HALONEN, M.; MARTINEZ, F. D. Parental asthma as a risk factor for the development of early skin test sensitization in children. **Asthma, rhinitis, other respiratory diseases**, p. 284–290, 2004.

DATASUS – Departamento de Informática do SUS. Disponível em www.datasus.gov.br. Acessado em 07/04/2013.

DAVUTOGLU, M.; BILICI, M.; DAGLI, A.; HASPOLAT, K.; ECE, A. ANALYSIS OF FACTORS RELATED TO TOTAL SERUM IgE LEVELS IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA. **Journal of Medical School**, p. 3–4, 2000.

DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Eosinophils, allergy and parasites. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 13, p. 716–720, 2001.

FALEIRO, F. G. **Marcadores Genéticos-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: EMBRAPA, 2007. 102 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM. 1998. 220p.

FRANCO, J.; GURGEL, R.; SOLE, D.; LÚCIA, V. Socio-environmental conditions and geographical variability of Asthma prevalence in Northeast Brazil. **Clinical Immunology**, v. 37, n. 3, p. 116-121, 2009.

GINA (Global Initiative for Asthma): National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood, Institute. Disponível em <http://ginasthma.org/>. 1995.

GINA (Global Initiative for Asthma): National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood, Institute. Disponível em <http://ginasthma.org/>. 2011.

GINA (Global Initiative for Asthma): National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood, Institute. Disponível em <http://ginasthma.org/>. 2012.

GOMES, S. O.; MENDES, R. F. DE M.; LIMA, P. S. DA C. Determinação da temperatura de anelamento com marcadores ISSR em acessos de pinhão-manso. **Anais - II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**, v. 17, 2012.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Kluwer Academic Publishers**, v. 122, p. 81–89, 2001.

GRANT, E. N.; LYTTLE, C. S.; WEISS, K. B. The Relation of Socioeconomic Factors and Racial/Ethnic Differences in US Asthma Mortality. **American Journal of Public Health**, v. 90, n. 12, p. 1923–1925, 2000.

HIBI, T.; DOSCH, H. M. Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow. **European journal of immunology**, v. 16, n. 2, p. 139–45, fev 1986.

HOLLOWAY, J. W.; ARSHAD, S. H.; HOLGATE, S. T. Mechanisms of allergic diseases Using genetics to predict the natural history of asthma? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 2, p. 200–209, 2010.

HOSHINO, M.; NAKAMURA, Y.; JAEJOON, S.; SHIMOJO, J.; ISOGAI, S. Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 102, n 5, p. 783-788, 1998.

HUANG, X. et al. Relaxin Regulates Myofibroblast Contractility and Protects against Lung Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, v. 179, n. 6, 2011.

KAY, A. B. Allergy and Allergic Diseases. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 1, p. 30–37, 2001.

KERKHOF, M.; DUBOIS, A. E. J.; POSTMA, D. S.; SCHOUTEN, J. P.; MONCHY, J. G. R. DE. Role and interpretation of total serum IgE measurements in the diagnosis of allergic airway disease in adults. *Allergy*, v. 58, p. 905–911, 2003.

KIDD, P. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. *Alternative Medicine Review*, v. 8, n. 3, p. 223–246, 2003.

KLEINJAN, A; VINKE, J. G.; SEVERIJNEN, L. W.; FOKKENS, W. J. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *The European respiratory journal*, v. 15, n. 3, p. 491–7, mar 2000.

KLINK, M.; CLINE, M. G.; BURROWS, B. Problems in defining normal limits for serum IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 85, n. 2, p. 440–444, 1990.

KOPPELMAN, G. H.; LOS, H.; POSTMA, D. S. Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. *The European respiratory journal*, v. 13, n. 1, p. 2–4, jan 1999.

LIEU, T. A.; LOZANO, P.; FINKELSTEIN, J. A.; *et al.* Racial/Ethnic variation in asthma status and management practices among children in managed Medicaid. *American Academy of Pediatrics*, v. 109, n. 5, p. 857–865, 2002.

LOTT, J. A.; MITCHELL, L. C.; MOESCHBERGER, M. L.; SUTHERLAND, D. E. Estimation of reference ranges: how many subjects are needed? **Clinical chemistry**, v. 38, n. 5, p. 648–50, maio 1992.

MARGOTTO, P. R. Curva ROC: como fazer e interpretar no SPSS (2010). Disponível em: www.paulomargotto.com.br. Acesso: em 8 agos. 2013.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnosticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 7–31, 2003.

MEDEIROS, D.; SILVA, A. R.; RIZZO, J. A.; *et al.* Total IgE level in respiratory allergy: study of patients at high risk for helminthic infection. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 4, p. 255–259, 2006.

MEDRONHO, R. A. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. 492p.

MEHL, A.; VERSTEGE, A.; STADEN, U.; *et al.* Utility of the ratio of food-specific IgE-total IgE in predicting symptomatic food allergy in children. **Allergy**, v. 60, p. 1034–1039, 2005.

MENDES, E. **Doenças alérgicas: asma, rinite alérgica, dermatite atópica**. São Paulo: SARVIER, 1998. 173p.

MEYERS, D. A. Genetics of asthma and allergy: What have we learned? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 3, p. 439–446, 2010.

NEIDELL, M. J. Air pollution, health, and socio-economic status: the effect of outdoor air quality on childhood asthma. **Journal of Health Economics**, v. 23, p. 1209–1236, 2004.

PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte Responses and Cytokines. **Cell Press**, v. 76, p. 241–251, 1994.

PEGAS, P. N.; ALVES, C. A.; SCOTTO, M. G.; *et al.* Factores de risco e prevalência de asma e rinite em crianças em idade escolar em Lisboa. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, p. 4–11, 2011.

PESSÔA, R. F.; NÉCUL, F. E.; NOEL, F. Farmacogenética e Farmacogenômica. Evidências de como a genética pode influenciar a eficácia de fármacos e a busca por novos alvos farmacológicos. **Informa**, v. 18, p. 41–48, 2006.

PETERS, S. P. Mast cells and histamine in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, n. 4, p. 642–646, 1990.

PINTO, L. A.; STEIN, R. T.; KABESCH, M. Impact of genetics in childhood asthma. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. 68–75, 2008.

RATNAPARKHE, M. B.; TEKEOGLU, M.; MUEHLBAUER, F. J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. **Theory Applicate Genetic**, v. 97, p. 515–519, 1998.

SKONER, D. P. Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. 2–8, 2001.

SOLÉ, D.; WANDALSEN, G. F.; CAMELO-NUNES, I. C.; NASPITZ, C. K. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Phase 3. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 341–346, 2006.

SORENSEN, R. U.; SAKALI, P. Does parasitic infection protect against allergy? **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 4, p. 241–242, 2006.

SOUZA, G. A. DE; RODRIGUES, M.; CARVALHO, D. O.; MARTINS, E. R. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, n. 1, p. 843–849, 2008.

SPALDING, S. M.; WALD, V.; BERND, L. A. G. IgE sérica total em atópicos e não-atópicos na cidade de Porto Alegre. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 93–97, 2000.

SUNYER, J.; ANTÓ, J. M.; CASTELLSAGUÉ, J.; SORIANO, J. B.; ROCA, J. Total serum IgE is associated with asthma independently of specific IgE levels. **European Respiratory Journal**, n. 9, p. 1880–1884, 1996.

SWEENEY, P. M.; DANNEBERGER, T. K. Random Amplified Polymorphic DNA in Perennial Ryegrass: A Comparison of Bulk Samples vs . Individuals. **HortScience**, v. 29, n. 6, p. 624–626, 1994.

TRINCA, M. A.; BICUDO, I. M. P.; PELICIONI, M. C. F. A interferência da asma no cotidiano das crianças. **Revista brasileira Crescimento Desenvolvimento Humano**, v. 21, n. 1, p. 70–84, 2011.

VIDEIRA, P. A.; BORREGO, L. M.; TRINDADE, H. Os factores genéticos da asma. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. XII, p. 683–708, 2006.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275–305, 2002.

WEISS, K. B.; SULLIVAN, S. D. The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 1, p. 3–8, 2001.

WYNN, T. A. IL-13 Effector functions. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 425–56, 2003.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reation amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176–183, 1994.

7ANEXOS

7.1 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TCLE Casos

<p>Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.</p>

(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores. De forma clínica, ela é caracterizada pelo aumento da dificuldade de respirar. Sabemos também que a asma é hereditária, havendo interação entre a genética do indivíduo e o ambiente onde ele vive. A melhor compreensão da genética envolvida na asma pode representar avanço importante para os esforços futuros de prevenção e tratamento dela.

O (A) senhor(a) está sendo convidado(a) formalmente a participar da pesquisa: **Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.**

O(a) senhor(a) foi selecionado(a) por possuir quadro clínico da asma. Compreenda que a sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento, não fazendo mais parte das nossas análises nesta pesquisa.

O objetivo desse estudo é avaliar diferenças genéticas que podem estar relacionadas à asma em indivíduos de Itabuna.

A participação nesta pesquisa consistirá na coleta de sangue (10mL). Caso o senhor(a) opte em realizar a coleta no laboratório selecionado pelos pesquisadores, no momento no qual estiver sendo feita a coleta para os exames de rotina (solicitados pelo médico), será feita a coleta de mais dois tubos de sangue, não sendo necessária uma nova picada. Caso o senhor(a) tenha outro laboratório de sua preferência, não há qualquer problema. Posteriormente, entraremos em contato apenas para verificar os resultados dos exames de rotina e marcar um dia para realizarmos a coleta de sangue para a pesquisa na sua residência. Não há qualquer diferença entre essa coleta e aquelas feitas normalmente no laboratório. A pesquisa será realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz e qualquer dúvida você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, através do telefone 3680-5267.

Podemos afirmar que não correrá risco algum. Poderá sofrer apenas o desconforto da retirada de sangue, que será feito no momento de coleta para os seus exames solicitados pelo seu médico. Como qualquer coleta de sangue feita em laboratórios, esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Tal coleta será realizada por um profissional competente e devidamente treinado.

As informações, dados e resultados gerados sobre a sua pessoa serão devidamente arquivados em local seguro, os quais só terão acesso pessoas de confiança envolvidas diretamente com esta pesquisa. O material biológico, no caso o DNA, obtido a partir do sangue coletado (caso autorizado por você), ficará guardado em freezer a -70°C por cinco anos, no Laboratório de Farmacogenômica da UESC. O material ficará armazenado para

TCLE Controles

Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.
--

(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores. De forma clínica, ela é caracterizada pelo aumento da dificuldade de respirar. Sabemos também que a asma é hereditária, havendo interação entre a genética do indivíduo e o ambiente onde ele vive. A melhor compreensão da genética envolvida na asma pode representar avanço importante para os esforços futuros de prevenção e tratamento dela.

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) formalmente a participar da pesquisa: **Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.**

O(A) senhor(a) foi selecionado(a) por não possuir dados relevantes que possam sugerir um quadro clínico de asma, fazendo parte, então, do nosso grupo controle. Compreenda que a sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento, não fazendo mais parte das nossas análises nesta pesquisa.

O objetivo desse estudo é avaliar diferenças genéticas que podem estar relacionadas à asma em indivíduos de Itabuna.

A participação nesta pesquisa consistirá na coleta de sangue (10mL). Caso o senhor(a) opte em realizar a coleta no laboratório selecionado pelos pesquisadores, no momento no qual estiver sendo feita a coleta para os exames de rotina (solicitados pelo médico), será feita a coleta de mais dois tubos de sangue, não sendo necessária uma nova picada. Caso o senhor(a) tenha outro laboratório de sua preferência, não há qualquer problema. Posteriormente, entraremos em contato apenas para verificar os resultados dos exames de rotina e marcar um dia para realizarmos a coleta de sangue para a pesquisa na sua residência. Não há qualquer diferença entre essa coleta e aquelas feitas normalmente no laboratório. A pesquisa será realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz e qualquer dúvida você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, através do telefone 3680-5267.

Podemos afirmar que não correrá risco algum. Poderá sofrer apenas o desconforto da retirada de sangue, que será feito no momento de coleta para os seus exames solicitados pelo seu médico. Como qualquer coleta de sangue feita em laboratórios, esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Tal coleta será realizada por um profissional competente e devidamente treinado.

As informações, dados e resultados gerados sobre a sua pessoa serão devidamente arquivados em local seguro, os quais só terão acesso pessoas de confiança envolvidas diretamente com esta pesquisa. O material biológico, no caso o DNA, obtido a partir do sangue coletado (caso autorizado por você), ficará guardado em freezer a -70°C por cinco anos, no Laboratório de Farmacogenômica da UESC. O material ficará armazenado para repetição de algum teste já realizado, ou para realização de novos testes relacionados a estudos de susceptibilidade à asma. Após esses cinco anos o material será descartado.

Como benefício, receberá os resultados dos exames, bem como, se solicitado, os resultados obtidos ao final da pesquisa, os quais serão apresentados pelo pesquisador responsável. Os benefícios em relação ao estudo dos polimorfismos podem não ser diretos para você, mas poderão fornecer mais informações acerca da sua patologia, a asma, podendo auxiliar estudos futuros de prevenção e tratamento.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que se seguem.

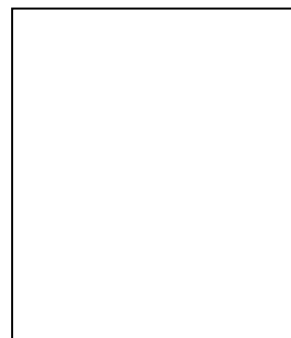
Termo de consentimento livre após esclarecimento	
<p>Eu, _____</p> <p>_____</p> <p>li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a que serei submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo.</p> <p>Assim sendo, concordo em participar do estudo,</p> <p>Itabuna, ____/____/____</p>	
<p>_____</p> <p>Assinatura do voluntário</p>	<p>Nome: Identidade: Telefone pessoal: Telefone para contato: Nome do contato:</p>
<p>_____</p> <p>Sandra Rocha Gadelha Mello - Mat: 734757678 Pesquisador responsável – DCB</p>	<p>Telefones Contato: (73) 3680-5267 E-mail: srgmello@uesc.br</p>

_____, ____/____/____
 Local dia mês ano

A rogo do Sr. _____, assinam:

 Assinatura da Testemunha 1

 Assinatura da Testemunha 2



Marca do polegar

TCLE Para menores de 18 anos

Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.

(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores. De forma clínica, ela é caracterizada pelo aumento da dificuldade de respirar. Sabemos também que a asma é hereditária, havendo interação entre a genética do indivíduo e o ambiente onde ele vive. A melhor compreensão da genética envolvida na asma pode representar avanço importante para os esforços futuros de prevenção e tratamento dela.

O(A) menor está sendo convidado(a) formalmente a participar da pesquisa: **Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.**

O(a) menor foi selecionado(a) por possuir quadro clínico da asma, ou não. As pessoas com asma farão parte do nosso grupo de casos, enquanto, as pessoas que não apresentam quadro de asma, farão parte do nosso grupo controle. A nossa intenção é diferenciar esses dois grupos. Compreenda que a participação não é obrigatória. A qualquer momento poderá desistir de participar e retirar este consentimento, não fazendo mais parte das nossas análises nesta pesquisa.

O objetivo desse estudo é avaliar diferenças genéticas que podem estar relacionadas à asma em indivíduos de Itabuna.

A participação nesta pesquisa consistirá na coleta de sangue (10mL). Caso o senhor(a) opte em levar o menor para realizar a coleta no laboratório selecionado pelos pesquisadores, no momento no qual estiver sendo feita a coleta para os exames de rotina (solicitados pelo médico), será feita a coleta de mais dois tubos de sangue, não sendo necessária uma nova picada. Caso o senhor(a) tenha outro laboratório de sua preferência, não há qualquer problema. Posteriormente, entraremos em contato apenas para verificar os resultados dos exames de rotina e marcar um dia para realizarmos a coleta de sangue para a pesquisa na sua residência. Não há qualquer diferença entre essa coleta e aquelas feitas normalmente no laboratório. A pesquisa será realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz e qualquer dúvida você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, através do telefone 3680-5267.

Podemos afirmar que não correrá risco algum. O menor poderá sofrer apenas o desconforto da retirada de sangue, que será feito no momento de coleta para os seus exames solicitados pelo seu médico. Como qualquer coleta de sangue feita em laboratórios, esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Tal coleta será realizada por um profissional competente e devidamente treinado.

As informações, dados e resultados gerados serão devidamente arquivados em local seguro, os quais só terão acesso pessoas de confiança envolvidas diretamente com esta pesquisa. O material biológico, no caso o DNA, obtido a partir do sangue coletado (caso autorizado por você), ficará guardado em freezer a -70°C por cinco anos, no Laboratório de Farmacogenômica da UESC. O material ficará armazenado para repetição de algum teste já realizado, ou para realização de novos testes relacionados a estudos de susceptibilidade à asma. Após esses cinco anos o material será descartado.

7.2 Questionário



Associação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-4 e IL-13 com a asma, em uma população do sul da Bahia.

1. Dados pessoais

Nome: _____

Nascimento: ____/____/____

Estado civil: () solteiro(a) () casado(a) () viúvo(a) () divorciado(a)

Filhos: () Não () Sim Quantos(as)? _____

Endereço: _____

Tel: (____) _____ E-mail: _____

Escolaridade: _____

Como você classifica sua cor / raça?

1 () branco; 2 () preto; 3 () pardo; 4 () amarelo; 5 () indígena

Qual a sua faixa de renda familiar bruta mensal?

2. Comportamento

Atualmente você fuma? () Não () Sim Quantos cigarros por dia? _____

Anteriormente na sua vida você já fumou? () Não () Sim Quantos anos? _____

Você tem história familiar de asma? () Não () Sim Quem? _____

Algum médico já te diagnosticou como tendo alergia? () Não () Sim

A que? _____

Caso tenha alergia, você já fez algum tipo de tratamento? () Não () Sim

Qual? _____

Há quanto tempo sabe que tem alergia? _____ Não tenho alergia ()

Qual destes sintomas você apresenta?

() dificuldade de respirar

() Chiado no peito

() escorre secreção do nariz

() Aperto no peito

() coceiras

() espirros constantes

() tosse frequente

Faz uso contínuo de alguma medicação? () Não () Sim

Para qual problema? _____

Qual(is) medicamento(s) é (são) usado(s)? _____

3. Estado de saúde

Você sabe se é portadora de algum outro problema de saúde? () Não () Sim

() problemas renais () problemas hepáticos () problemas da tireóide () outros

Qual(is)? _____