

PRICILA FERRARI MOREIRA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DE PACIENTES  
SIBILANTES RECORRENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N244a  
2019 Nascimento, Pricila Ferrari Moreira, 1982-  
Avaliação do perfil inflamatório e oxidativo de pacientes  
sibilantes recorrentes / Pricila Ferrari Moreira Nascimento. –  
Viçosa, MG, 2019.  
xi, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Silvia Almeida Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Chiado. 2. Inflamação. 3. Stress oxidativo. 4. Asma.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Enfermagem e Medicina. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde. II. Título.

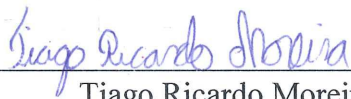
CDD 22. ed. 612.21

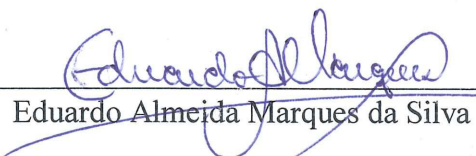
PRICILA FERRARI MOREIRA NASCIMENTO


**AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DE PACIENTES  
SIBILANTES RECORRENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de março de 2019.

  
Tiago Ricardo Moreira

  
Eduardo Almeida Marques da Silva

  
Silvia Almeida Cardoso  
(Orientadora)

## **DEDICATÓRIA**

À minha princesa Sophia e a meu amado companheiro Caio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser tão misericordioso e compassivo.

Ao meu esposo Caio e à minha filha Sophia, por terem tido paciência e me incentivarem em todos os momentos.

À minha querida mãe Carolina que por muitas vezes acolheu minha filha enquanto eu não podia estar presente.

À Silvia, pelo carinho, disponibilidade, amizade e por sempre me apoiar e não me deixar desistir, transmitindo toda sua sabedoria e conhecimento. Pessoa e profissional admirável que vou ser grata eternamente.

Aos professores Leandro e Eduardo, por disponibilizarem seu laboratório para execução deste trabalho.

Aos professores Rodrigo, Patrícia e Leandro pela orientação.

Aos professores Tiago e Eduardo por aceitarem compor a banca.

A uma grande amiga em especial que fiz neste período e que me ajudou muito a chegar onde estou. Emília, você é maravilhosa! Obrigada por tudo.

A amiga Mariana, minha fiel escudeira que sempre esteve presente em todos os momentos e que vou levar para a vida toda.

Aos demais amigos que fiz durante esta jornada inesquecível, em especial a Mirna que é parte fundamental deste projeto.

Aos pacientes voluntários, pela colaboração. Sem vocês este trabalho não existiria.

Aos funcionários da Divisão de Saúde que auxiliaram na coleta das amostras dos voluntários.

Aos alunos de graduação do curso de Medicina da UFV, que dedicaram seu tempo ajudando na coleta de dados junto aos voluntários.

Ao Departamento de Medicina, de modo especial aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação, pelo engajamento e comprometimento para que tudo desse certo.

À UFV, por fazer parte da realização do meu sonho.

## RESUMO

NASCIMENTO, Pricila Ferrari Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Avaliação do perfil inflamatório e oxidativo de pacientes sibilantes recorrentes.** Orientadora: Silvia Almeida Cardoso. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Rodrigo de Barros Freitas e Patrícia de Oliveira Salgado.

A sibilância caracteriza-se por um ruído semelhante a um assobio que se manifesta durante a respiração e resulta de alguma obstrução ou estreitamento das vias aéreas, decorrente de causas estruturais ou funcionais. O presente estudo tem como objetivo avaliar a relação e correlação entre o perfil inflamatório e oxidativo de pacientes pediátricos sibilantes recorrentes, atendidos no Centro de Atenção Especializada do município de Viçosa. Setenta e oito voluntários em seguimento no ambulatório, no qual seus responsáveis aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura de TCLE e TA, foram divididos em três grupos de acordo com a faixa etária ( $\leq 36$ , 37-72 e  $\geq 73$  meses). Após a coleta do sangue por punção venosa, foi realizada avaliação hematológica, detecções séricas de imunoglobulina E total (IgE) e proteína C reativa ultrasensível (PCRus). O perfil oxidativo foi avaliado pela determinação da capacidade antioxidante total por redução férrica (FRAP) e dos marcadores de dano (peroxidação lipídica e proteína carbonilada). Não foi observada diferença significativa nos níveis de IgE e PCR, entre os três grupos avaliados. Entretanto observou-se uma correlação positiva significativa entre as detecções de PCRus e leucócitos, assim como PCRus e neutrófilos, para o grupo de pacientes acima de 73 meses de idade. O grupo de idade intermediária apresentou valores significativamente reduzidos de FRAP sérico, entretanto observaram-se valores significativamente elevados dos marcadores de dano oxidativo no grupo de pacientes acima de 73 meses de idade. Ao determinar a correlação entre os marcadores inflamatórios e oxidativos, novamente apenas o grupo acima de 73 meses apresentou significância entre as medidas da capacidade antioxidante total sérica e marcadores inflamatórios. De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que embora não tenha sido observada alteração nos marcadores inflamatórios avaliados, para o grupo acima de 73 meses, esse grupo apresentou alteração significativa dos marcadores de dano relacionados ao estresse oxidativo. Interessantemente observamos que existe correlação entre as detecções de marcadores inflamatórios e a capacidade antioxidante total sérica para o grupo de sibilantes com mais de 6 anos de idade.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Pricila Ferrari Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Evaluation of inflammatory and oxidative profile in patients with recurrent wheezing.** Advisor: Silvia Almeida Cardoso. Co-advisors: Leandro Licursi de Oliveira, Rodrigo de Barros Freitas and Patrícia de Oliveira Salgado.

Wheezing is characterized by and whistle-like noise that manifests itself during respiration and results from some obstruction or narrowing of the airways, due to structural or functional causes. Wheezing is a clinical expression of numerous respiratory-related conditions. Although asthma is the leading cause of wheezing during childhood. The present study aims to evaluate the inflammatory and oxidative profile of pediatric patients with recurrent wheezing. Seventy-eight volunteers agreed to participate in the study through a Free and Clarified Consent Term, and were divided into three groups according to their age ( $\leq 36$ , 36 to 72 and  $\geq 73$  months). Blood was collected for hematological evaluation, serum detections of total immunoglobulin E (IgE), and C-reactive protein (PCRus). The oxidative profile was evaluated by total antioxidant capacity by iron reduction (FRAP), malondialdehyde (MDA) and carbonylated protein markers. There was no significant difference in the IgE and PCRus levels among the three groups evaluated. However, a significant positive correlation was observed for PCRus with total leukocyte and with neutrophils for the group of patients  $\geq 73$  months of age. The intermediate age group presented significantly reduced FRAP values in the serum, while significant values of oxidative damage markers were observed in the group of patients  $\geq 73$  months of age. When determining the correlation between inflammatory and oxidative markers, only the  $\geq 73$  months group showed significant differences between the measurements of serum total antioxidant capacity and inflammatory markers. We conclude that although there were no alterations in the inflammatory markers observed, the group  $\geq 73$  months stands out with significant alterations of the oxidative stress markers and their correlations with the inflammatory profile.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCA = Ácido Bicinconínico

CAT = Catalase

CEP-UFV = Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa

DEM = Departamento de Enfermagem e Medicina

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

DNPH = Dinitrifetilhidrazina

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EPO = Peroxidase Eosinofílica

FceR1 = Receptor de alta afinidade

FRAP = Capacidade de Redução Férrica

GM – CSF = Fator estimulador de colônias de Granulócitos-Macrófagos

GPx = Glutathione Peroxidase

GSH = Glutathione

GSSG = Glutathione Dissulfídica

GST = Glutathione Transferase

H<sub>2</sub>O = Água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de Hidrogênio

IgE = Imunoglobulina E

IL = Interleucina

ISAAC = *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*

MDA = Malondialdeído

MPO = Mieloperoxidase

NADPH = Hidrogênio Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

NO = Óxido Nítrico

NO<sup>+</sup> = Cátion Nitrosil

O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Superóxido

OH<sup>-</sup> = Radicais Hidroxila

ONO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Peroxinitrito

PCRus = Proteína C Reativa Ultrassensível

RN/L = Razão Neutrófilo por Linfócito

RNS = Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio

SOD = Superóxido Dismutase

TA = Termo de Assentimento

TALE = Termo de Assentimento Livre Esclarecido

TBARS = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCLE = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCRS = Estudo Respiratório Infantil de Tucson

Th2 = Células T tipo 2

UFV = Universidade Federal de Viçosa

## **LISTA DE TABELAS**

Artigo

Tabela 1 - Análise hematológica dos grupos de diferentes faixas etárias, Viçosa-MG.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo

Figura 1 – Detecção sérica de IgE (A) e PCRus (B) em pacientes sibilantes (pág. 19).

Figura 2 – Gráfico de dispersão e correlação de Spearman (r) (pág. 20).

Figura 3 – Capacidade antioxidante total no soro de voluntários sibilantes (pág. 21).

Figura 4 – Quantificação de marcadores de dano tecidual em voluntários sibilantes (pág. 21).

Figura 5 – Gráfico de dispersão e correlação de Spearman (r) (pág. 22).

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
3 OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
3.1.1 Objetivos Específicos.....	12
4 PRODUTO FINAL .....	13
ANEXO A – Parecer Consubstancial do CEP - UFV.....	26
ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo .....	32
ANEXO C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido .....	33
ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	37
ANEXO E – Questionário sobre sintomas respiratórios .....	41

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O corpo do trabalho compreende uma introdução geral, objetivos geral e específicos, um artigo científico e uma conclusão geral. O artigo intitulado “**Evaluation of inflammatory and oxidative profile in patients with recurrent wheezing**” foi formatado de acordo com as normas da revista *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, (Qualis A2 – Medicina I), para a qual o artigo foi submetido.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Sibilância

A sibilância é um sinal respiratório inespecífico, determinado como um som musical de alta frequência, audível com ou sem estetoscópio e resultante da obstrução do fluxo das vias aéreas. No início da vida representa um distúrbio comum caracterizado por obstrução das vias respiratórias, com uma significativa morbidade (Tenero, 2016). A sibilância é um sintoma multifatorial e, em crianças pequenas, geralmente está relacionado à bronquiolite ou à apresentação precoce da asma. Outras condições menos comuns também associadas à sibilância são anormalidades anatômicas congênitas, aspiração de corpo estranho, outros distúrbios pulmonares (por exemplo, fibrose cística) e distúrbios cardíacos, imunológicos e gastrointestinais, que precisam ser considerados em casos com apresentação atípica (Ducharme *et al.*, 2014).

Existem evidências consideráveis de que o reconhecimento da asma levou a uma busca por marcadores solúveis que seriam úteis na avaliação da inflamação das vias aéreas (Venge, 1994). A asma é uma doença inflamatória com alguns fenótipos clínicos em adultos e crianças. Suas características são hiper-reatividade brônquica, inflamação crônica das vias aéreas e obstrução ao fluxo aéreo (Buses *et al.*, 2001).

Por muitos anos, os autores focaram seus estudos para identificar precocemente crianças com sibilância recorrente, em risco de desenvolver asma, na idade escolar. Eles propuseram vários fenótipos para uma caracterização mais precisa e para traçar planos personalizados de tratamento. Em 1995, Martinez e colaboradores introduziram uma classificação com foco em três fenótipos: "sibilância transitória" (crianças que sibilam nos primeiros três anos de vida e que não mais sibilam aos 6 anos de idade), "sibilância persistente" (crianças que sibilam nos primeiros três anos de vida e continuam sibilando aos 6 anos de idade) e "sibilância de início tardio" (crianças que não sibilam nos três primeiros anos, mas sibilam aos 6 anos), com enfoque na aparência e persistência dos sintomas. Estudos posteriores apontam que identificar os fatores desencadeantes da sibilância não é uma tarefa fácil de ser realizada na prática clínica (Savenije *et al.*, 2012).

Entende-se por sibilância recorrente episódios tipicamente associados a infecções do trato respiratório superior que se repetem por 6 a 8 vezes por ano em crianças de até 5 anos de idade (Global Strategy, 2017), podendo, também, ser definida especificamente para crianças de

até 1 ano de idade como episódios que se repetem 3 ou mais vezes neste período (Mallol *et al.*, 2010).

Sugere-se que uma criança com dois ou três episódios de sibilância em um ano, durando menos de 10 dias, sem sintomas entre episódios, tem provavelmente um broncoespasmo viral com baixa probabilidade de desenvolver asma (Global Initiative, 2015). Por outro lado, uma criança com episódios recorrentes e mais longos, histórico familiar de atopia associado à sibilância induzida por exercício, tem maior probabilidade de desenvolver asma. Crianças com fenótipo atópico associado a níveis elevados de IgE têm o sintoma que persiste na adolescência (Martinez *et al.*, 1995). Ao contrário, crianças com sibilância persistente não atópica geralmente têm o primeiro episódio durante os primeiros anos de vida e o episódio de sibilância tornam-se menos frequentes na adolescência (Stein *et al.*, 1999).

## **1.2 Fatores de risco associados à sibilância recorrente e asma na infância.**

Vários estudos demonstraram que a asma é multifatorial, resultando da interação entre fatores genéticos e ambientais (Lasso-Pirot *et al.*, 2015). Os fatores ambientais mais importantes são as infecções respiratórias por vírus (Camara *et al.*, 2004), o tabagismo passivo (Lannero *et al.*, 2006), os fatores psicossociais (Klennert *et al.*, 2003) e as condições socioeconômicas da família (Mallol *et al.*, 2010). A hipótese da higiene propõe que menos infecções no início da vida e menor exposição a micróbios pode modular o sistema imunológico de Th1 a Th2 (Le Cann *et al.*, 2011). Vitamina D e oligoelementos podem atuar como anti-inflamatórios e agentes antioxidantes na imunidade do hospedeiro. Uma redução desses elementos na ingestão de dieta aumenta o dano oxidativo e desarranjo do sistema imunológico (Soutar *et al.*, 1997). Uma dieta pobre em antioxidantes torna o hospedeiro mais vulnerável a espécies reativas de oxigênio.

Estudos genéticos sobre asma revelaram um grande número de genes associados com o sistema imunológico que são potencialmente envolvidos na patogênese da doença (Renkonen *et al.*, 2010). Em 2007 Yang e colaboradores mostraram que o nível elevado de IgE no sangue do cordão umbilical, sexo masculino, fumo passivo e histórico parental de atopia são fatores de risco preditivos para sibilância recorrente. No Estudo Respiratório Infantil de Tucson (TCRS) a predisposição para a alergia pareceu ser principal fator de risco em crianças com sibilância (Martinez *et al.*, 1995).

## **1.3 Processo inflamatório na sibilância recorrente.**

A inflamação é o aspecto central na sibilância recorrente e na asma. O processo inflamatório característico da asma é complexo e envolve múltiplas células e mediadores. Todas as células do aparelho respiratório, mesmo as constitutivas, tradicionalmente consideradas como não tendo potencial inflamatório (célula epitelial e célula endotelial vascular) participam das alterações típicas da asma. Os produtos dessas células envolvidos na inflamação típica incluem citocinas de padrão Th2, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e radicais reativos de oxigênio entre outros (Campos, 2007).

Mastócitos são células imunes relacionadas à asma e às respostas alérgicas em geral (Theoharides *et al.*, 2006, Bradding *et al.*, 2006). Muitos estudos demonstram a participação de diversas células inflamatórias como mastócitos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos T auxiliar do tipo 2 na patogenia da asma (Mahajan e Mehta, 2006). Por outro lado, subtipos de células T auxiliares recentemente identificados como Th9 e Th17 têm sido apresentados como participantes na imunologia da asma, sendo suas principais funções produzir respectivamente IL-9 e IL-17, ambas citocinas pró-inflamatórias (Landgraf-Rauf *et al.*, 2016). Um dos mecanismos mais conhecidos de ativação de mastócitos é a ligação de IgE ao seu receptor de alta afinidade FcεR1 na superfície do mastócito. Após a ligação da IgE, os mastócitos liberam histamina, protease de mastócitos, proteoglicanas, quimiocinas e algumas citocinas (MacGlashan *et al.*, 1998, Gruber, 1989).

Muitos desses mediadores inflamatórios se associam a doenças respiratórias como a asma. A inflamação crônica das vias aéreas presente na asma é uma resposta predominante de células T tipo 2 (Th2), que resulta em níveis elevados de IgE total e específica para alérgenos e eosinofilia brônquica (Bryce *et al.*, 2006, Feleszko *et al.*, 2006).

Um estudo feito com 630 lactentes que apresentavam infecção do trato respiratório superior ou bronquiolite demonstrou que a infecção por rinovírus humano frequentemente desencadeou bronquiolite e doenças do trato respiratório superior em bebês previamente saudáveis, sendo a principal causa de hospitalização ou consultas ambulatoriais. O estudo descreveu maior gravidade da doença em crianças cujas mães tinham histórico de atopia (Miller EK *et al.*, 2011). Em um outro estudo de coorte baseado na comunidade de 198 crianças com risco de atopia, seguido do nascimento até a idade de 5 anos, aspirados para identificação viral foram coletados durante doenças respiratórias. A infecção por rinovírus (48,3%) foi o vírus predominante observado, seguido pelo vírus sincicial respiratório (10,9%). Ao final do estudo, 28,3% das crianças apresentavam sibilos atuais e havia associação entre infecção do trato respiratório inferior, particularmente infecção por rinovírus, e sibilos recorrentes. A associação estava presente nas crianças com sensibilização precoce e não naquelas sem história de atopia.

Marcadores inflamatórios das vias aéreas foram avaliados em condensados de respiração exalados por pré-escolares com histórico de sibilância persistente, demonstrando elevação de IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 e moléculas de adesão quando comparados a crianças sem sibilância (Van de Kant KD *et al.*, 2011).

Em um estudo retrospectivo destinado a estabelecer fatores preditivos para a persistência da asma durante a adolescência em uma população de lactentes sibilantes recorrentes, 227 lactentes com menos de 36 meses de idade que tinham uma história de pelo menos três episódios de sibilância diagnosticados pelo médico foram avaliados. Aos 13 anos, a asma ativa foi avaliada por questionário. Os resultados indicaram que os fatores de risco para a asma que persistem na adolescência foram: sensibilização alérgica a múltiplos alérgenos transportados pelo ar, dermatite atópica inicial, sibilância recorrente grave e hipereosinofilia. A conclusão do estudo foi que a atopia é um importante fator de risco para a persistência da asma (Amat *et al.*, 2011).

O aumento da concentração sérica de proteína C reativa (PCR) indica inflamação sistêmica em crianças com sibilância recorrente e pode ser usado como um marcador de inflamação das vias aéreas. Crianças com asma e rinite alérgica apresentam concentrações maiores de PCR do que o grupo controle sadio (Abu-Zeid *et al.*, 2009). Fujita e colaboradores observaram que pacientes adultos com asma também apresentam níveis elevados de PCR entretanto não existe diferença significativa nas dosagens de PCR entre indivíduos atópicos e não atópicos (Fujita *et al.*, 2007).

A sensibilização alérgica precoce a diferentes antígenos, também é relacionada com o desequilíbrio inflamatório observado na sibilância recorrente. Altos títulos de imunoglobulinas IgE aumentam significativamente o risco de episódios de sibilância, desencadeada por rinovírus, em crianças asmáticas (Soto-Quiros *et al.*, 2013). Entretanto crianças predispostas a sibilância persistente apresentam altos níveis de IgE total já nos primeiros meses de vida, precedendo a sensibilização alérgica. Dessa forma, demonstra-se que a alta produção de IgE total se relaciona a uma alteração comum no desenvolvimento do sistema imune desses indivíduos (Sherril *et al.*, 1999).

#### **1.4 Estresse oxidativo na sibilância recorrente.**

Além das células e citocinas, outros mediadores inflamatórios também podem estar relacionados com a fisiopatologia da asma. As espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), por exemplo, têm sido avaliadas em diversos estudos e relacionadas à patogenia da asma

(Kleniewska e Pawliczak, 2017) e de outras doenças crônicas como diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e Alzheimer, artrite reumatoide e doenças cardiovasculares (Phaniendra *et al.*, 2015).

As ROS são também conhecidas como agentes oxidantes e, dependendo da configuração de seus elétrons, podem ser divididas em dois grupos: radicais livres (moléculas contendo 1 ou mais elétrons não pareados) e formas não radicais (formadas pelo compartilhamento de elétrons entre dois radicais livres). As ROS podem ser originadas de fontes endógenas ou exógenas. Mitocôndrias, células fagocíticas, peroxissomos e enzimas do citocromo P450 se destacam na produção destas espécies. Durante o processo de respiração aeróbica realizada pelas células, as mitocôndrias promovem a redução do oxigênio produzindo água, gerando superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^\cdot$ ). As células fagocíticas, por sua vez, apresentam a capacidade de produzir  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  que são utilizados na destruição de células infectadas por vírus, bactérias e outros patógenos. Os peroxissomos, organelas celulares ricas em enzimas responsáveis pela degradação de ácidos graxos e outras moléculas, também produzem ROS como subprodutos de suas reações. E, finalmente, diversas reações mediadas pelas enzimas do citocromo P450 são capazes de gerar ROS (Ames *et al.*, 1993). Entre as fontes exógenas, podemos citar: fumaça de cigarro, luz ultravioleta, radiação ionizante, poluentes, solventes orgânicos, metais e alguns medicamentos como agentes quimioterápicos (Jesenak *et al.*, 2017).

As RNS, por sua vez, são compostos de nitrogênio que, assim como as ROS, apresentam alta reatividade química. São representadas por óxido nítrico (NO), cátion nitrosil ( $NO^+$ ) e peroxinitrito ( $ONO_2^-$ ) (Kleniewska e Pawliczak, 2017). O NO tem destaque entre as RNS. Ele é gerado em tecidos biológicos a partir da reação de oxidação da arginina a citrulina por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase. É uma espécie bem abundante e importante em diversas funções fisiológicas como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa e regulação imunológica (Valko *et al.*, 2007).

Em concentrações adequadas, as ROS/RNS se mostram benéficas ao organismo e desempenham importante papel em diversos processos fisiológicos, atuando, por exemplo, na defesa contra organismos infecciosos ou em uma série de vias de sinalização celular (Valko *et al.*, 2007). Para a manutenção destas concentrações, o organismo apresenta um sistema antioxidante que neutraliza estas espécies reativas e promove um estado de equilíbrio redox. No entanto, quando existe um desequilíbrio entre a produção das ROS/RNS e a capacidade antioxidante do organismo, origina-se um fenômeno denominado de estresse oxidativo/nitrosativo, que está amplamente relacionado a danos celulares (Kurutas, 2016).

O excesso de ROS no organismo gera danos a várias biomoléculas por promover alterações estruturais e/ou funcionais. Entre as principais biomoléculas que sofrem com a ação dos ROS podemos citar os lipídeos, as proteínas e o DNA. A peroxidação lipídica ocorre quando radicais livres reagem com lipídeos, sendo que principal dano celular resultante deste processo está relacionado com a membrana celular, uma vez que compromete sua permeabilidade podendo até mesmo causar o seu rompimento (Kleniewska e Pawliczak, 2017). Durante a peroxidação lipídica ocorre a formação de hidroperóxidos lipídicos e uma variedade de aldeídos, sendo o malondialdeído (MDA) o mais utilizado como biomarcador deste processo devido à facilidade de reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ayala *et al.*, 2014). Devido à sua abundância nos sistemas biológicos, as proteínas representam um alvo bem significativo das ROS. Na maioria das vezes, a oxidação das proteínas é irreversível e as modificações são estruturais, o que pode gerar diminuição de sua função ou até mesmo desnaturação (Kleniewska e Pawliczak, 2017), podendo contribuir para uma variedade de patologias. Na molécula de DNA, as bases constituem o alvo das ROS e sua oxidação pode gerar mutações ou deleções tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial, podendo resultar em alterações funcionais de vários tipos de proteínas (Rahal *et al.*, 2014).

### **1.5 Mecanismo antioxidante.**

O mecanismo antioxidante responsável por equilibrar os efeitos das ROS/RNS pode ser representado por sistemas enzimáticos ou não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos derivam da dieta e são representados por moléculas de baixa massa molecular como vitaminas E e C, betacaroteno e glutatona, e os enzimáticos são representados por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona transferase (GST) (Birben *et al.*, 2012). A SOD tem papel essencial no consumo dos radicais superóxido. Atua catalisando a reação de dismutação do  $O_2^-$  com formação de oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. (Perry *et al.*, 2010). A CAT se apresenta como um tetrâmero composto de 4 monômeros idênticos, cada um com um grupo heme em seu sítio ativo e atua como peroxidase, sendo responsável pela degradação de  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$  em reação que envolve a participação de íons ferro e Hidrogênio Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida - NADPH (Birben *et al.*, 2012). A GPx também converte  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ , mas por meio da oxidação de glutatona (GSH) a glutatona dissulfídica (GSSG) (Kleniewska e Pawliczak, 2017). A GST catalisa a conjugação de glutatona a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico e representa um dos principais

mecanismos de eliminação de xenobióticos (Huber e Almeida, 2008). Por meio destas reações, as enzimas antioxidantes desempenham um papel crucial na proteção das células contra a ação maléfica do excesso das ROS/RNS.

Concentrações elevadas de NO, por exemplo, também podem levar a alterações estruturais e funcionais de proteínas ou reagir com superóxido, levando à formação de outras moléculas, como o peróxido nítrico, um potente agente oxidante que pode atuar no DNA ou em lipídeos (Valko *et al.*, 2007).

Portanto, considerando estudos anteriores que relacionam a inflamação e o estresse oxidativo à patologia da asma, o presente estudo tem por objetivo avaliar o perfil inflamatório e oxidativo de crianças sibilantes atendidas no Centro de Atenção Especializada do município de Viçosa-MG através das dosagens de IgE e PCR séricas e dos marcadores séricos de dano tecidual como a peroxidação lipídica (MDA) e proteínas carboniladas (PC) além de verificar a capacidade antioxidante total no soro e avaliação da capacidade de redução férrica (FRAP), por fim determinar suas relações e correlações com o desenvolvimento da sibilância.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ZEID, A; DAHABRAH, M. Pattern of inflammatory markers in children with asthma and allergic rhinitis. Middle East. **J. Fam. Med**, 7 (3): 3–5. 2009.

AMAT, F; VIAL, A; PEREIRA, B; PETIT, I; LABBE, A; JUST, J. Predicting the Long-Term Course of Asthma in Wheezing Infants Is Still a Challenge. **ISRN Allergy**, 1–5. 2011.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90 (17): 7915-22. 1993.

AYALA, A. et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014: 31. 2014.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, 5 (1): 9-19. 2012.

BRADDING, P.; WALLS A.F.; HOLGATE, S.T. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 117 (6): 1277-1284. 2006.

BRYCE, P. J.; MATHIAS, C.B.; HARRISON, K.L.; WATANABE, T.; GEHA, R.S.; OETTGEN, H.C. The H1 histamine receptor regulates allergic lung response . **Journal of Clinical Investigation**, 116 (6): 1624-1632. 2006.

BUSES, W.W; LEMANSKE, R.F. Asthma. **New England Journal of Medicine**, 344 (3): 350-362. 2001.

CAMARA, A.A; SILVA, J.M; FERRIANI, V.P; TOBIAS, K.R; MACEDO, I.S; PADOVANI, M.A. Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. **J Allergy Clin Immunol**, 113: 551-7. 2004.

CAMPOS, H.S. Asthma: its origins, inflammatory mechanisms and the role of the corticosteroid. **Rev Bras Pneumol Sanit**, 15 (1): 47-60. 2007.

DUCHARME, F.M.; TSE, S.M.; CHAUHAN, B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. **Lancet**, 383: 1593-604. 2014.

FELESZKO, W.; JAWORSKA, J.; HAMELMANN, E. Toll-like receptors: novel targets in allergic airway disease (probiotics, friends and relative. **European Journal of Pharmacology**, 533 (1-3): 308-318. 2006.

FUJITA, M; UEKI, S; ITO, W et al. C-reactive protein levels in the sérum of asthmatic patients. **Ann. Allergy Asthma Immunol**, 99: 48–53. 2007.

GLOBAL Strategy for Asthma Management and Prevention (2017). Disponível em: <<http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em novembro 2017.

Global initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Available online: [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report2015\\_Tracked.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report2015_Tracked.pdf)

GRUBER, B. Activation of rheumatoid synovial mast cells. Role of IgE-associated antiglobulins. **Monographs in Allergy**, 26 (1): 120-134. 1989.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutaciona e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, 31 (5): 1170-1179. 2008.

JESENAK, M.; ZELIESKOVA, M.; BABUSIKOVA, E. Oxidative Stress and Bronchial Asthma in Children-Causes or Consequences? **Front Pediatr**, 5: 162. 2017.

KLENIEWSKA, P.; PAWLICZAK, R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma. **Biomed Pharmacother**, 94: 100-108. 2017.

KLINNERT, M.D; PRICE, M.R; LIU, A.H; ROBINSON, J.L. Morbidity patterns among low-income wheezing infants. **Pediatrics**, 112: 49. 2003.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J**, 15 (1): 71. 2016.

LANDGRAF-RAUF, K.; ANSELM, B.; SCHAUB, B. The puzzle of immune phenotypes of childhood asthma. **Mol Cell Pediatr**, 3 (1): 27. 2016.

LANNERO, E; WICKMAN, M; PERSHAGEN, G; NORDVALL, L Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE). **Respir Res**, 7: 3. 2006.

LASSO-PIROT, A; DELGADO-VILLALTA, S; SPANIER, A.J. Early childhood wheezers: identifying asthma in later life. **J Asthma Allergy**, 8: 63-73. 2015.

LE CANN, P.; BONVALLOT, N.; GLORENNEC, P et al. Indoor environment and children's health: recent developments in chemical, biological, physical and social aspects. **Int J Hyg Environ Health**, 215: 1-18. 2011.

MACGLASHAN, D.J; LAVENS-PHILLIPS, S; KATSUSHI, M. IgE-mediated desensitization in human basophils and mast cells. **Frontiers in Bioscience**, 3(1): 746-756. 1998.

MAHAJAN, S.; MEHTA, A. A. Role of Cytokines in Pathophysiology of Asthma. **Iran Jour Pharm Ther**, 5: 1-14. 2006.

MALLOL, J.; GARCÍA-MARCOS, L.; SOLÉ, D et al. International prevalence of recurrent wheezing during the first year of life: variability, treatment patterns and use of health resources. **Thorax**, 65: 1004-9. 2010.

MARTINEZ, F. D.; WRIGHT, A. L.; TAUSSIG, L. M et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. **N Engl J Med**, 332: 133-8. 1995.

MILLER, E.K; WILLIAMS, J.V; GEBRETSADIK, T et al. Asthma and lower airway disease: host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. **J Allergy Clin Immunol**, 127: 883–891. 2011.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochim Biophys Acta**, 2: 245-262. 2010.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J Clin Biochem**, 30 (1): 11-26. 2015.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int**, 2014: 761264. 2014.

REDDEL, H.K.; BATEMAN, E.D.; BECKER, A.; BOULET, L.P.; CRUZ, A.A.; DRAZEN, J.M. et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. **Eur Respir J**. 46 (3): 622-39. 2015.

RENKONEN, J; JOENVAARA,S; PARVIAINEN, V et al. Network analysis of single nucleotide polymorphisms in asthma. **J Asthma Allergy**, 3: 177-86. 2010.

SAVENIJE, O.E; MAHACHIE JOHN, J.M; GRANELL, R et al. Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. **J Allergy Clin Immunol**, 134: 170-7. 2014.

SIGURIS,N; BJARNASON,R; KIELLMAN, B; BJORKSTEN, B. Asthma and IgE antibodies after RSV bronchiolitis; prospective cohort study with matched controls. **Pediatrics**, 95 (4): 500-5. 1995.

SOUTAR, A.; SEATON, A.; BROWN, K. Bronchial reactivity and dietary antioxidants. **Thorax**, 52: 166-70. 1997.

STEIN, R. T.; SHERRILL, D.; MORGAN, W. J. et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. **Lancet**, 354: 541-5. 1999.

TENERO, L.; PIAZZA, M.; PIACENTINI, G. Recurrent wheezing in children. **Translational Pediatrics**, 5 (1): 31–36. 2016.

THEOHARIDES, T.C.; KALOGEROMITROS, D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1088 (3): 78-99. 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, 39 (1): 44-84. 2007.

VAN DE Kant, K.D.; JANSEN, M. A.; KLAASSEN, E. M. et al. Elevated inflammatory markers at preschool age precede persistent wheezing at school age. **Pediatr Allergy Immunol**, 23: 259–264. 2012.

VENGE, P. Soluble markers of allergic inflammation. **Allergy**, 49 (1): 1-8. 1994.

WANG, E. E.; LAW, B. J.; STEPHENS, D. Pediatric investigators collaborative network on infections in canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalised with RSV lower respiratory tract infection **J. pediatr**, 126 (2): 212-9. 1995.

WELLIVER, R.C; SUN, M; RINALDO, D; OGRA, P.L. Predictive value of RSV specific IgE responses for recurrent wheezing following bronchiolitis. **Pediatr**, 109: 776-80. 1986.

YANG, K.D; OU, C.Y; CHANG, J.C et al. Infant frequente wheezing correlated to Clara cell protein 10 (CC10) polymorphism and concentration, but not allergy sensitization, in a perinatal cohort study. **J Allergy Clin Immunol**, 120: 842-8. 2007.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo central a avaliação do perfil inflamatório e oxidativo de pacientes sibilantes recorrentes de diferentes faixas etárias atendidos em serviço de referência de pneumologia pediátrica no município de Viçosa e determinar sua relação com o desenvolvimento da sibilância.

##### 3.1.1 Objetivos Específicos

- Realizar análise hematológica dos voluntários por leucograma;
- Dosar IgE total e PCR séricas;
- Determinar os marcadores séricos de dano tecidual (peroxidação lipídica e proteínas carboniladas);
- Verificar a capacidade antioxidante total no soro, por intermédio da avaliação da capacidade de redução férrica (FRAP);
- Determinar a relação entre os marcadores inflamatórios e oxidativos.

## 4 PRODUTO FINAL

### 4.1 Artigo Original

#### **Evaluation of inflammatory and oxidative profile in patients with recurrent wheezing.**

Pricila Ferrari Moreira Nascimento, BS, <sup>a#</sup> Emília Torres Costa Marques, MSc, <sup>a#</sup> Mirna Brito Peçanha, MD, MSc, <sup>a</sup> Palloma Porto Almeida, BS, <sup>b</sup> Daniel Silva Sena Bastos, MSc, <sup>b</sup> Rodrigo de Barros Freitas, Phd, <sup>a</sup> Eduardo Almeida Marques da Silva, Phd, <sup>b</sup> Leandro Licursi de Oliveira, Phd, <sup>b</sup> Silvia Almeida Cardoso, Phd, <sup>a\*</sup>.

a Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Ciências da Saúde, Departamento de Medicina e Enfermagem. Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais – Brasil.

b Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais – Brasil.

# These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Silvia Almeida Cardoso, Phd, Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa. 36570-900 - Viçosa, Brasil. E-mail: [silvia.cardoso@ufv.br](mailto:silvia.cardoso@ufv.br)

#### **ABSTRACT**

**Background:** Wheezing is a clinical expression of numerous respiratory-related conditions. Although asthma is the leading cause of wheezing during childhood.

**Objective:** The present study aims to evaluate the inflammatory and oxidative profile of pediatric patients with recurrent wheezing.

**Methods:** Seventy-eight volunteers agreed to participate in the study through a Free and Clarified Consent Term, and were divided into three groups according to their age ( $\leq 36$ , 36 to 72 and  $\geq 73$  months). Blood was collected for hematological evaluation, serum detections of total immunoglobulin E (IgE), and C-reactive protein (PCRus). The oxidative profile was evaluated by total antioxidant capacity by iron reduction (FRAP), malondialdehyde (MDA) and carbonylated protein markers.

**Results:** There was no significant difference in the IgE and PCRus levels among the three groups evaluated. However, a significant positive correlation was observed for PCRus with total leukocyte and with neutrophils for the group of patients  $\geq 73$  months of age. The intermediate age group presented significantly reduced FRAP values in the serum, while significant values of oxidative damage markers were observed in the group of patients  $\geq 73$  months of age. When determining the correlation between inflammatory and oxidative markers, only the  $\geq 73$  months group showed significant differences between the measurements of serum total antioxidant capacity and inflammatory markers.

**Conclusion:** We conclude that although there were no alterations in the inflammatory markers observed, the group  $\geq 73$  months stands out with significant alterations of the oxidative stress markers and their correlations with the inflammatory profile.

**Clinical Implications:** Oxidative stress markers correlate with inflammatory markers only for recurrent sibilants over 73 months of age.

Keywords: Wheezing, inflammation, oxidative stress, asthma.

## INTRODUCTION

Wheezes are multifactorial symptoms that indicate partial airway obstruction and relate to early-onset asthma in young children [1]. Wheezing among young children is classified into three phenotypes: Transient Early Wheezing, Late-onset Wheezing, and Wheezing. Children who wheeze in the first three years of life but grow out of wheezing by age six years exhibit Transient Early Wheezing. Children who do not wheeze in early life but who present persistent wheezing at age six have Late-onset wheezing. Finally, children who wheeze in early life and continue to the age of six have general Wheezing [2]. A family history of allergies and other atopic illnesses are risk factors for the development of wheezing episodes and persistent asthma [3,4]. With a complex etiology, asthma may result from the interaction between genetic and environmental factors [5], like virus-related respiratory infections [6], passive smoking [7], and psychosocial factors [8].

Recurrent wheezing results in an inflammatory imbalance related to early allergic sensitization to different antigens, with IgE production and participation of mast cells, eosinophils, lymphocytes and activated macrophages in the inflammatory process [9,10]. These cells also act in the pathogenesis of asthma, through the IL-5 [11] and IL-9 cytokines [12], IgE [13] and reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) mediators [14]. Children predisposed to persistent wheezing present high levels of total IgE in the first months of life, preceding allergic sensitization. In asthmatic children, high titers of IgE increase the risk of rhinovirus-triggered wheezing episodes [15]. The C-reactive protein (PCR) can be present at high levels, although in asthmatic adults there is no significant difference in PCR between atopic and non-atopic patients [16].

Moreover, oxidative stress is a component of asthma development and persistence [17]. The production of ROS/RNS can generate lipid peroxidation as well as damage to proteins and DNA, with functional changes [18, 14]. Also, it can enhance hyperactivity and contraction of airway smooth muscle, increase vascular permeability with airway edema, and impair response to bronchodilators through the synthesis of cytokines, which contributes to asthma endurance [17].

Wheezing and coughing are the clinical expressions of numerous respiratory-related conditions. Although asthma is the leading cause of wheezing during childhood [10], most cases present spontaneous remission. This study aimed to determine the inflammatory and oxidative profile of children with recurrent wheezing, among different ages, evaluated at the Specialized Care Center of Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

## **METHODOLOGY**

### **Study design**

Seventy-eight pediatric patients from the Pulmonology Department of the Specialized Care Center (Viçosa, Minas Gerais) agreed to participate voluntarily in the study. The patients were selected based on the following criteria: (i) recurrent wheezing patients of both sexes; (ii) who were in attendance in the mentioned center and were between 0 and 18 years old; (iii) residing in Viçosa or the surrounding region. The study excluded patients who had other associated diseases like heart disease, cystic fibrosis, gastroesophageal reflux disease, pneumonia, pulmonary tuberculosis, bronchopulmonary dysplasia, cerebral palsy, pulmonary congenital malformations, immunodeficiencies and postinfectious bronchiolitis obliterans. Participants were divided into three groups according to their age:  $\leq 36$  months (lactents), between 37 to 72 months (pre-school) and  $\geq 73$  months. The study was submitted to and approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (n. 1,713,903), and all patients signed the Free and Clarified Consent Term (FCCT) and, when applicable, the Term of Assent (TA).

### **Sample collection**

The samples were collected from November 2016 to September 2017. Data collection was performed by the application of a semi-structured questionnaire based on the *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC), through a duly trained professional. The blood sample was collected by a qualified professional in the Laboratory of Clinical Analysis of the Health Division of UFV, by venous puncture. Two tubes were collected, one with an anticoagulant for hematological analysis and one without anticoagulant, to obtain the blood serum. After clot retraction, the material was centrifuged and aliquoted for future analyses.

### **Evaluation of inflammatory and hematological markers**

Serum samples were used for the determination of total IgE and PCRus, using the Turbiquest IgE (Lab Test) and Ultra-Sensitive C Reactive Protein (Bioclin) kits, respectively, following the manufacturers' instructions. The hematological analysis was performed by impedance and the hemogram and leukogram of each patient were determined. Specific reference values were considered for each group.

### **Evaluation of oxidative markers**

Serum dosage of total antioxidant capacity was based using a modified ferric reduction capacity (FRAP) method (13). Ten  $\mu\text{L}$  of sample/standard was added to 220  $\mu\text{L}$  of FRAP solution in polystyrene microplates, followed by incubation for 30 minutes in the dark. The trolox solution was used as the oxidizing agent, starting from an initial concentration of two  $\text{mmol.L}^{-1}$ . The readings were performed in a Multiskan GO Microplate Spectrophotometer spectrophotometer (Thermo Scientific) at a wavelength of 570 nm. Concentrations relative to the samples were obtained from the standard curve and are reported in  $\mu\text{M}$ .

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) evaluated lipid peroxidation. The samples were incubated to the thiobarbituric acid solution (1:2), shaken for 10 minutes and subjected to a 90 °C water bath for 40 minutes. Then, 600  $\mu\text{L}$  of n-Butanol was added and the solutions were centrifuged at 1200 x g at room temperature for 5 minutes. The supernatant was used for reading in Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific) at a wavelength of 532 nm. The absorbances obtained were divided by the molar extinction coefficient of the TBA ( $\epsilon = 0.156 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) and the concentrations of malondialdehyde (MDA) were expressed in  $\text{nmol.L}^{-1}$ . The measurement of total protein dosage of each of the samples was performed using the bicinchoninic acid (BCA) method. The final concentration of MDA was obtained by the ratio of MDA concentrations to total protein concentrations, and the results are reported as  $\text{nmol/mg}$ .

The carbonylated protein concentration was based on the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay (16). Absorbance reading was performed at a wavelength of 370 nm in the Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). The total protein concentration in the sample was determined by reading the results from the sample in the Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) at 280 nm. The final concentration of the carbonylated protein is reported in  $\text{nmol/mg}$  of total protein.

### **Statistical analysis**

The analyzed variables did not present normal distribution in the Shapiro-Wilk test; therefore, we applied the non-parametric Kruskal-Wallis test for multiple comparisons. The results were expressed as median  $\pm$  interquartile rang. Spearman's distribution and correlation were performed between PCRus and hematological markers, and between total antioxidant capacity (FRAP) and hematological and inflammatory markers. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ . Analyzes were performed using the GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

## RESULTS

Total immunoglobulin E (IgE) and inflammatory C-reactive protein (PCRus) tests were performed. The patients were divided into three groups according to their age ( $\leq 36$ , 37 to 72 and  $\geq 73$  months). There were no significant difference in IgE and PCR levels among the three groups evaluated (Fig.1A e B).

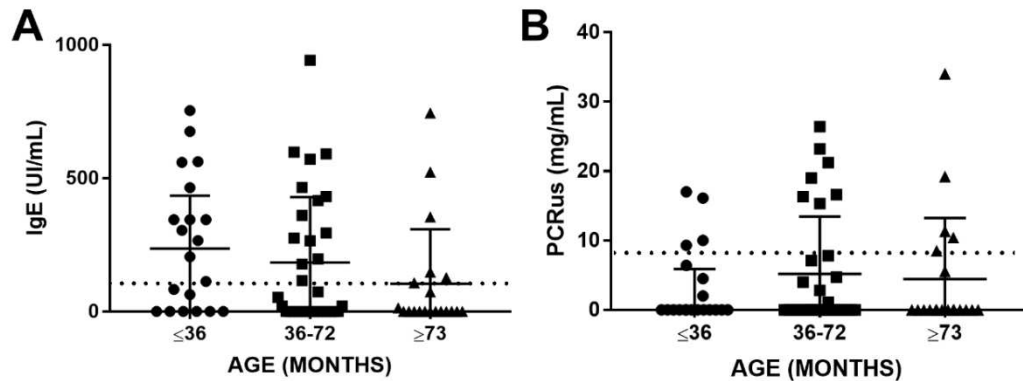


Figure 1. Serum IgE (A) and PCRus (B) detection in patients with recurrent wheezing. Volunteers with  $\leq 36$  months (n = 20); between 37 to 72 months (n = 32); and  $\geq 73$  months (n = 20). Dotted line (...) represents the reference value for serum IgE detection (100UI/mL) and PCRus (8mg / mL).

Although there was no difference in IgE serum levels, 60% of the lactents had levels above the reference value for this immunoglobulin. The pre-school group and the third group had 44% and 30% of the individuals, respectively, with values above the reference. Further, the third group not only presented a lower percentage of individuals with values above the reference but also presented the lowest total IgE serum measurements (Figure 1A). In the detection of PCRus, there was no difference in the percentage of individuals with values above the reference. The lactents, the pre-school and the third groups presented 20%, 22%, and 25%, respectively, of individuals with these values for CRP (Figure 1B).

There was no significant difference in the quantification of total and differential count of leukocytes among the three groups (Table 1). However, the lactents ( $\leq 36$  months) had a neutrophil-lymphocyte ratio lower than the other two groups.

Table 1: Total and differential count of leukocytes in peripheral blood.

	$\leq 36$ (n = 26)	37-72 (n = 34)	$\geq 73$ (n = 40)
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Leukocytes ( $10^3$ )	10.1 $\pm$ 3.1	13.0 $\pm$ 1.6	7.4 $\pm$ 2.2
Lymphocytes ( $10^3$ )	4.9 $\pm$ 2.2	4.6 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.8
Neutrophils ( $10^3$ )	4.3 $\pm$ 1.8	8.6 $\pm$ 1.6	3.9 $\pm$ 1.6
Eosinophils ( $10^3$ )	0.5 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3
Monocytes ( $10^3$ )	0.3 $\pm$ 0.2	3.48 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.09
NLR	0.87	1.35	1.35

SD: standard deviation, NLR: neutrophil-lymphocyte ratio.

The correlation between the inflammatory markers was verified by Spearman test. A significant positive correlation between the serum detections of PCRus and leukocytes or neutrophils was observed only in the group of patients with  $\geq 73$  months of age (Figure 2).

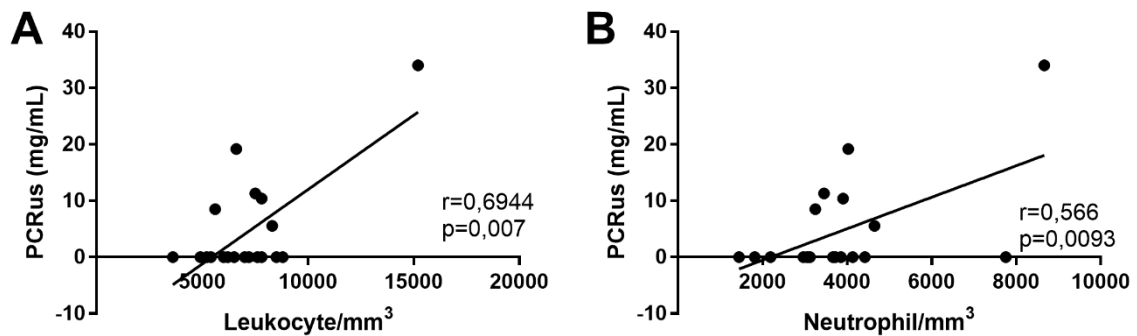


Figure 2: Spearman correlation (r). Variables PCRus/Leukocytes (A) and PCRus/Neutrophils (B), in patients  $\geq 73$  months. Statistically significant  $p < 0.05$ .

The evaluation of total antioxidant capacity in the patients' serum was determined through Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). The pre-school subjects (37 to 72 months) had a significantly lower serum antioxidant capacity than the other two groups (Figure 3).

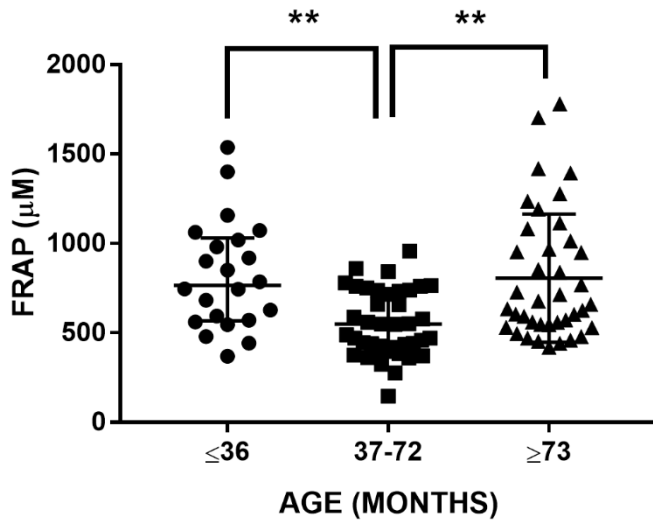


Figure 3: Total antioxidant capacity in the serum of volunteers with recurrent wheezing. Evaluation of iron reduction capacity (FRAP) in volunteers of different ages:  $< 36$  (n = 22), 36 to 72 (n = 42) and  $\geq 73$  months (n = 39). \*\* p < 0.01 Kurskal-Wallis

Carbonylated protein and lipid peroxidation analysis were performed to verify tissue damage resulting from oxidative stress (Figure 4). The pre-school group (37 to 72 months) presented significantly lower values of carbonylated proteins compared to the other two groups (Figure 4A). Lipid peroxidation showed significantly higher dosages in the group  $\geq 73$  months compared to the lactents' group (Fig. 4B). For both markers, the older group presented a larger dispersion.

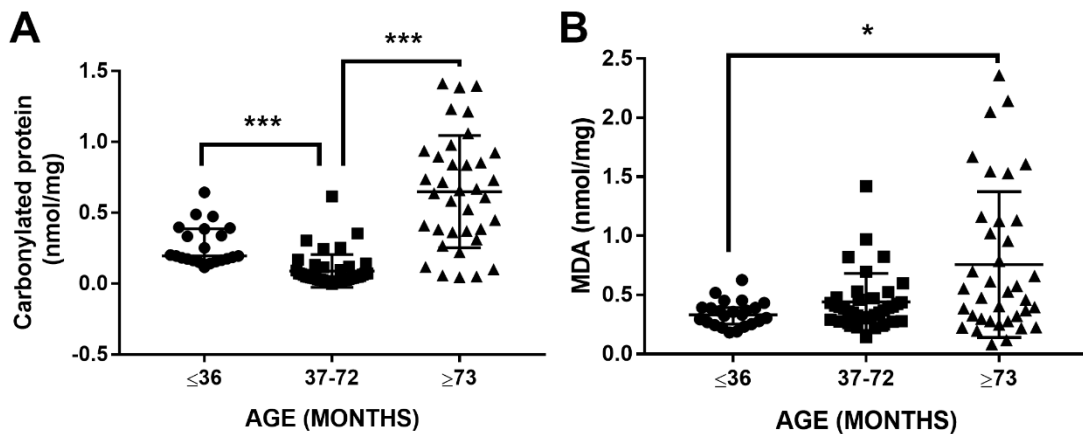


Figure 4: Quantification markers of tissue damage in volunteers with recurrent wheezing. Evaluation of carbonylated proteins (A) and lipid peroxidation determined by MDA (B) in volunteers of different ages:  $< 36$  (n = 23 in A and n = 22 in B); 36 to 72 (n = 37 in A and n = 39 in B) and  $\geq 73$  months (n = 39).

42 in B) and  $\geq 73$  months ( $n = 37$  in A and 36 in B). \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.005$ , Kruskal-Wallis.

Using the Spearman analysis, the correlation between inflammatory and oxidative markers was determined. Only in the older age group ( $\geq 73$  months), a significant correlation between serum total antioxidant capacity (FRAP) and inflammatory markers (PCRus, Total leukocytes, and Eosinophil) was observed (Figure 5). The FRAP measurements showed a correlation with PCRus  $r = 0.6081$  (Figure 5A), Total leukocytes  $r = 0.5731$  (Figure 5B) and Eosinophil  $r = 0.5786$  (Figure 5C).

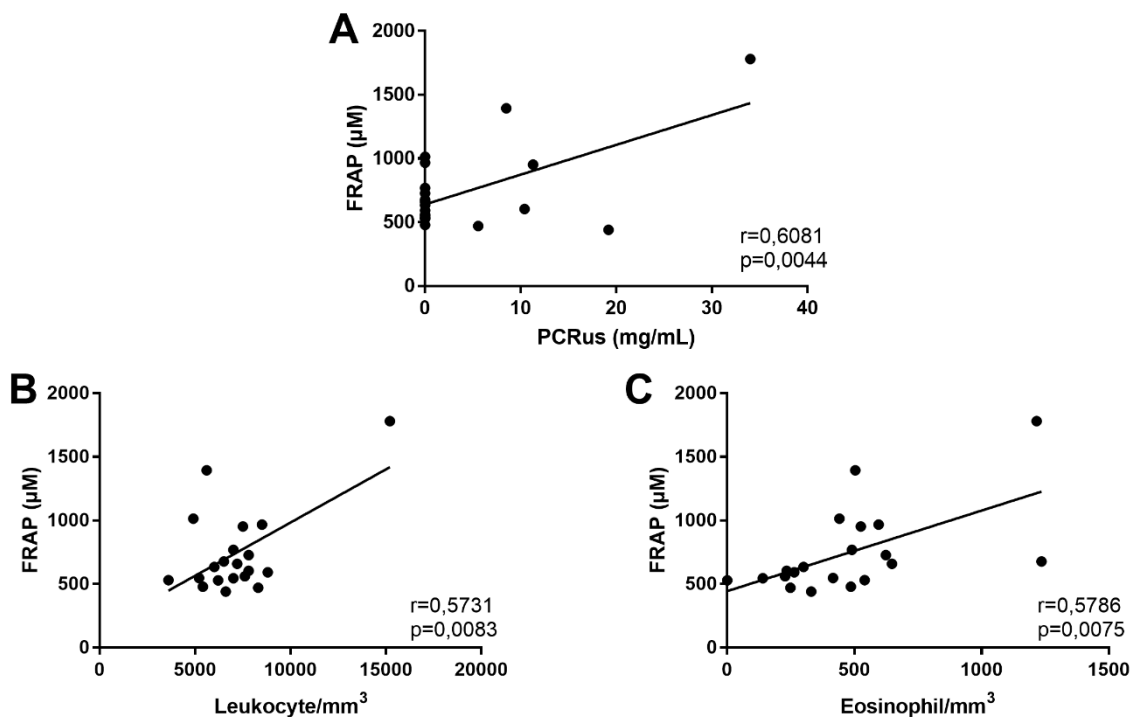


Figure 5: Spearman scatters plot and correlation (r). Variables FRAP/PCRus (A), FRAP/Total leukocytes (B), and FRAP/Eosinophils (C). Statistically significant  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

We report for the first time the inflammatory and oxidative profile of pediatric patients with recurrent wheezing from the Pulmonology Department of the Specialized Care Center in the municipality of Viçosa, Minas Gerais. The children were divided into three groups according to their age:  $\leq 36$  months (lactents), between 37 to 72 months (pre-school) and  $\geq 73$  months. We performed an IgE and PCRus analysis for evaluation of inflammatory markers, as well as

a leukogram analysis for differential leukocytes count. The serum dosage of FRAP and MDA were used as oxidative stress parameters.

The IgE immunoglobulin is a mediator that plays a central role in the allergic responses of respiratory diseases, such as asthma [19]. In our data, the IgE analysis shows no difference between the groups, although 60% of the lactents had IgE levels above the values of reference. Lactents at the age of nine months with elevated serum IgE levels have a high risk of developing recurrent wheezing [2]. This increased level can be observed in association with both atopic and non-atopic patients [20]. However, the recurrent wheezing without other allergy symptoms is common and is often associated with viral respiratory infections [21]. We did not find significant differences between PCRus among the groups. The correlation between serum IgE and PCR in patients is controversial. Although some authors can indicate a positive correlation between them [22], with high values of PCR in wheezing children from 6 to 36 months of age, a report from another group indicates no correlation between PCR and IgE levels, or even with eosinophil [23].

Systemic inflammation within the first months of life is also a risk factor for episodes of wheezing [24]. The hematological profile showed no difference among the groups; however, the infant group had a lower neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) than the two older groups. The NLR was reported significantly increased in wheezing and/or asthmatic patients and kept stable in different genders [25,26,27], with a positive correlation with NLR and PCR in other pulmonary diseases [28]. In our study, it was demonstrated that a positive correlation between PCR to leukocytes and neutrophils occurs only in patients older than 6 years. Patients with recurrent wheezing can present with increased neutrophils counts while lymphocytes decreased markedly, along with an increase in total serum IgE [27]. Curiously, we observed that the infant group, which presented a higher percentage of individuals with IgE levels above its reference, also presented the lowest value of the inflammatory NLR.

Oxidative stress plays a major role in airway inflammation that can lead to asthma symptoms such as wheezes. Infections with virus and exposure to tobacco smoke can also increase ROS generation, hence creating oxidative stress [29]. We found significant differences in serum detections of FRAP and carbonylated proteins only in the pre-school group. This group had significantly lower detection of carbonylated proteins compared to the other two groups that indicate lower oxidative damage in proteins. However, the value of FRAP was also significantly lower in this group, which indicates that the wheezes, and a probable association with asthma, affects the disease's pathogenesis through a reduction in the antioxidant capacity. MDA was found to be significantly increased in children older than six years compared to younger groups.

There is a positive correlation between MDA, the age of asthmatic patients, and the duration of the disease, whereas there is an age-related increase oxidative damage [30,29].

There was a positive correlation between serum FRAP and inflammatory markers (PCR, leukocyte, and eosinophil) only in the children above 73 months of age. The antioxidant status in the airway is established by immune cells through the release of antioxidant enzymes (i.e. myeloperoxidase and superoxide dismutase) [31], which can be associated to the correlation of FRAP with immune cells observed in our data. In this way, recurrent wheezing patients, older than 6 years, have a relationship between inflammation and other immune responses. Despite this, the PCR level had no significant difference between the groups. High levels of CRP and FRAP are observed in asthmatic patients and is linked with increased cellular activation [32, 33].

Oxidative stress and inflammatory markers seem to play a role in wheezing children. Our data showed different alterations in these measures among the subjects. It was observed that there was a reduction in FRAP and carbonylated protein only in preschool children. A positive correlation between oxidative markers and immune cells show a significant difference only in children above six years old. These may contribute to the different phenotypes of wheezing episodes in children, though the profiles presented vary.

**Acknowledgments:** This study was supported by the Brazilian funding agency Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01023-18). We thank the families who participated, the research staff who supported the data collection, and the staff of Laboratory of Clinical Analysis of the Health Division of UFV.

**Conflict of interest:** the authors declare that they have no conflicts of interest.

## REFERENCES

- [1] Ducharme FM, Tse SM, Chauhan B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. *Lancet*. 2014;383(9928):1593-604.
- [2] Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and Wheezing in the First Six Years of Life. *New England Journal of Medicine*. 1995;332(3):133-8.
- [3] Amat F, Vial A, Pereira B, Petit I, Labbe A, Just J. Predicting the long-term course of asthma in wheezing infants is still a challenge. *ISRN Allergy*, 2011;27:493624.
- [4] Bozaykut A, Paketcib A, Sezera RG, Paketcic C. Evaluation of Risk Factors for Recurrent Wheezing Episodes. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2013;5(5):395-400.
- [5] Lasso-Pirot A, Delgado-Villalta S, Spanier AJ. Early childhood wheezers: identifying asthma in later life. *J Asthma Allergy*. 2015;13(8):63-73.
- [6] Ferriani VPL, Silva JM, Camara AA, Tobias KR, Macedo M, Cardoso R, Arruda E, Platts-Mills TAE, Arruda LK. Risk factors for persistent wheezing in young children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(2):S97.
- [7] Lannerö E, Wickman M, Pershagen G, Nordvall L. Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life. *Respiratory Research*. 2006;7(3):1-6.
- [8] Klinnert MD, Price MR, Liu AH, Robinson JL. Morbidity patterns among low-income wheezing infants. *Pediatrics*. 2003;112:49-57.
- [9] Sherrill DL, Stein R, Halonen M, Holberg CJ, Wright A, Martinez FD. Total serum IgE and its association with asthma symptoms and allergic sensitization among children. *J Allergy Clin Immunol*. 104(1):28036.
- [10] Wright A L. Epidemiology of asthma and recurrent wheeze in childhood. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2002;22(1):33-44;
- [11] Wang FP, Liu T, Lan Z, Li SY, Mao H. Efficacy and safety of anti-interleukin-5 therapy in patients with asthma: a systematic review and meta-analysis. *Plos One*. 2016;22(11).
- [12] Hauber HP, Hamid Q. The role of interleukin-9 in asthma. *Allergology International*. 2005;54(1):71-8.
- [13] Froidure A, Mouthuy J, Durham SR, Chanez P, Sibille Y, Pilette C. Asthma phenotypes and IgE responses. *European Respiratory Journal*. 2016;47(1):304-19.
- [14] Kleniewska P, Pawliczak R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma. *Biomed Pharmacother*. 2017;94:100-8.
- [15] Soto-Quiros M, Avila L, Platts-Mills TAE, Hunt JF, Erdman DD, Carper H, Murphy DD, Odio S, James HR, Patrie JT, Hunt W, O'Rourke AK, Davis MD, Steinke JW, Lu X, Kennedy J, Heymann PW. High Titers of IgE Antibody to Dust Mite Allergen and the Risk for Wheezing Among Asthmatic Children Infected with Rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(6):1499–505.
- [16] Fujita M, Ueki S, Ito W, Chiba T, Takeda M, Saito N, Kayaba H, Chihara J. C-reactive protein levels in the serum of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007;99(1):48-53.
- [17] Jesenak M, Zelieskova M, Babusikova E. Oxidative Stress and Bronchial Asthma in Children—Causes or Consequences? *Frontiers in Pediatrics*. 2017;24(5):1-8.
- [18] Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal* (2016) 15:71.
- [19] Bousquet J, Vignola AM, Demoly P. 2003. Links between rhinitis and asthma. *Allergy*, 58 (8): 691-706.
- [20] Speight AN, Lee DA, Hey EN. Underdiagnosis and undertreatment of asthma in childhood. *British Medical Journal*. 1983;286(6373),1253–6.
- [21] Carlsen KH. What distinguishes the asthmatic amongst the infant wheezers? *Pediatric*

Allergy and Immunology : Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology. 1997;8:(10),40–5.

[22] Bostanci I, Ozmen S, Sen HS, Dibek EM, Zorlu P. Importance of high sensitivity C-reactive protein in the evaluation of wheezing in children. *Pediatrics International*. 2016;58,1101-4.

[23] Livnat G, Yoseph RB, Nir V, Hakim F, Yigla M, Bentur L. Evaluation of High-Sensitivity Serum CRP Levels Compared to Markers of Airway Inflammation and Allergy as Predictors of Methacholine Bronchial Hyper-Responsiveness in Children. *Lung*. 2015;193(1):39-45

[24] Burgess SL, Lu M, Ma JZ, Naylor C, Donowitz JR, Kirkpatrick BD, Haque R, Petri WA. Inflammatory markers predict episodes of wheezing during the first year of life in Bangladesh. *Respir Med*. 2016;110:53–7.

[25] Gungen AC, Aydemir Y. The correlation between asthma disease and neutrophil to lymphocyte ratio. *Research Journal of Allergy and Immunology*. 2017;1(1), 1-4.

[26] Nacaroglu HT, Isgüder R, Bent S, Erdem Bahceci S, Ceylan G, Korkmaz HA, Can D. Can neutrophil/lymphocyte ratio be a novel biomarker of inflammation in children with asthma? *European Journal of Inflammation*. 2016;4(2):109-12.

[27] Jiang C, Hu H, Zhu W, Xu J, Lou B, Sun Q, Yang X, Meng L, Lu S. Neutrophil–Lymphocyte Ratio in Children with Recurrent Wheezing. *Pediatric Allergy, Immunology and Pulmonology*. 2017;30(4).

[28] Günay E, Sarinç Ulaşlı S, Akar O, Ahsen A, Günay S, Koyuncu T, Ünlü M. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in chronic obstructive pulmonary disease: A retrospective study. *Inflammation*. 2014;37(2):374-80.

[29] Singh Yadav A, Saini M. Evaluation of Systemic Antioxidant Level and Oxidative Stress In Relation to Lifestyle and Disease Progression in Asthmatic Patients. *Journal of Medical Biochemistry*. 2016;35(1), 55–62.

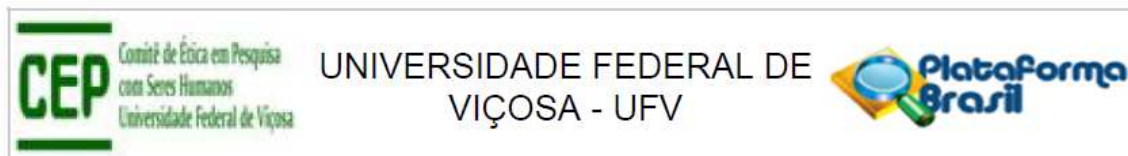
[30] Radović J, Vojinović J, Bojanić V, Jevtović-Stoimenov T, Kocićs G, Milojković M, Pavlović D. Lipid peroxidation and oxidative protein products in children with episodic fever of unknown origin. *Journal of Medical Biochemistry*. 2013;33(2), 197–202.

[31] Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2006;533(1-3):222-39.

[32] Akiibinu MO, Kolawole TO. Markers of Oxidative Stress and C-reactive Protein Levels in Asthmatics. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2014;5(4),93–6.

[33] Sahoo RC, Acharya PR, Noushad TH, Anand R, Acharya VK, Sahu KR. A study of high-sensitivity C-reactive protein in bronchial asthma. *Indian J Chest Dis Allied Sci*. 2009;51(4), 213–216.

## ANEXO A – Parecer Consubstancial do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa.

**Pesquisador:** Sílvia Almeida Cardoso

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 57579316.7.0000.5153

**Instituição Proponente:** Departamento de Medicina e Enfermagem

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.713.903

#### Apresentação do Projeto:

Conforme resumo apresentado no formulário online da Plataforma: "Trata-se de um estudo transversal realizado em pacientes pediátricos, encaminhados para seguimento em Serviço de Pneumologia, no Centro de Referência Estadual de Atenção Especializada no município de Viçosa em Minas Gerais no qual o presente trabalho visa identificar fatores associados a sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço."

#### Objetivo da Pesquisa:

De acordo com os pesquisadores,

**Objetivo primário:** "Identificar fatores associados com sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de pneumologia pediátrica no município de Viçosa"

**Objetivo secundário:** - Avaliação do perfil de exposição aos fatores de risco, dos pacientes atendidos no Centro Estadual de Atenção especializada no município de

Viçosa. - Dosagem de vitamina D no soro. - Quantificação de metabólitos de nicotina na urina. - Determinação do perfil de citocinas e óxido nítrico no soro. - Imunofenotipagem de células sanguíneas. - Identificação dos antígenos mais prevalentes na população estudada".



Continuação do Parecer: 1.713.903

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os pesquisadores apresentam no formulário online da Plataforma os seguintes Riscos: "Todos os procedimentos (questionário, coleta de amostra biológica e teste de sensibilidade cutânea) serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserva a intimidade e tranquilidade do paciente. Questionário Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em constrangimento ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e a mãe será informada que poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas. O tempo de aplicação do questionário é de 15 minutos Coleta de material biológico: Na coleta de uma amostra de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos: no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para minimizar o risco desse procedimento, a coleta de sangue será feito por profissional treinado para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. No exame de urina: A coleta de uma amostra da urina será realizada pelo responsável legal da criança, após orientações por profissional treinado. O risco na coleta desse material é o constrangimento da criança. Para tal, a coleta é feita por seu responsável legal ou pelo mesmo (crianças com capacidade para tal), em banheiro compatível para a criança (o local possui banheiro masculino, feminino e para portadores de necessidades especiais). As amostras biológicas (sangue e urina) serão codificadas para garantir o anonimato e descartadas após análise. Teste de Sensibilidade Cutânea: Será realizado um Teste de Sensibilidade Cutânea para cada paciente. Os riscos desses exames, apesar de causarem algum desconforto são raros. As complicações sistêmicas do procedimento são raras. Para minimizar tal risco, o procedimento será realizado por médico treinado e a criança deverá permanecer no serviço 60 minutos após o teste cutâneo de sensibilidade. O Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências, pois presta atendimento a uma população de risco (cardiopatas, hipertensos, diabéticos, nefropatas e etc...) além do próprio profissional que realiza o exame ser treinado para socorro nesse tipo de eventos. Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa.

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900  
 UF: MG Município: VICOSA  
 Telefone: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br

**Recomendações:**

Quando da coleta de dados, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as suas páginas e assinado, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa ou responsável legal, bem como pelo pesquisador responsável, ou pessoa(s) por ele delegada(s), devendo todas as assinaturas constar na mesma folha.

Não é necessário apresentar os TCLEs assinados ao CEP/UFV. Uma via deve ser mantida em arquivo pelo pesquisador e a outra é do participante da pesquisa.

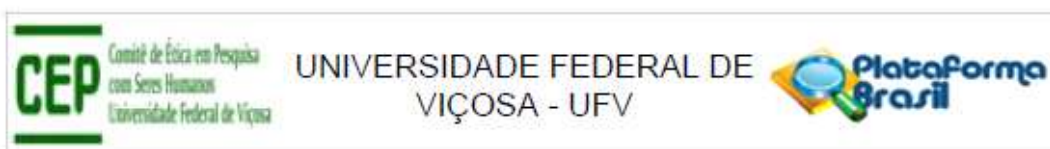
<b>Endereço:</b> Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
<b>Bairro:</b> Campus Universitário <b>CEP:</b> 36.570-900
<b>UF:</b> MG <b>Município:</b> VICOSA
<b>Telefone:</b> (31)3899-2492 <b>E-mail:</b> cep@ufv.br

Página 03 de 05

e os seguintes Benefícios: "Como benefícios da pesquisa, espera-se a detecção precoce de fatores

<b>Endereço:</b> Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
<b>Bairro:</b> Campus Universitário <b>CEP:</b> 36.570-900
<b>UF:</b> MG <b>Município:</b> VICOSA
<b>Telefone:</b> (31)3899-2492 <b>E-mail:</b> cep@ufv.br

Página 02 de 05



Continuação do Parecer: 1.713.903

associados a sibilância recorrente permitindo seu diagnóstico, acompanhamento, prevenção e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade de vida dos pacientes pediátricos, para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento destes pacientes com doenças respiratórias. "

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

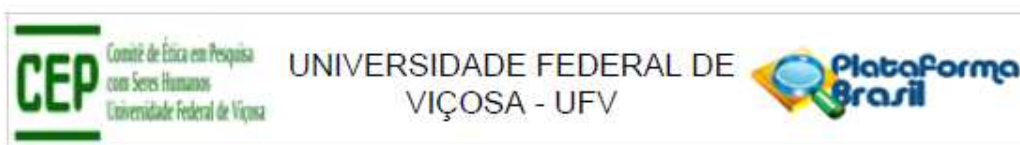
O presente estudo pretende realizar um estudo transversal no qual será aplicado um questionário estruturado, que contempla tanto dados das características gerais da sibilância recorrente e de variáveis como: fatores biológicos gerais, sociodemográficos, ambientais e relacionados à atopia. Também será coletado amostras biológicas de sangue e urina, para análise de vitamina D, marcadores inflamatórios e metabólitos de nicotina respectivamente. Também será realizado Teste de sensibilidade cutânea.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores apresentaram os seguintes documentos:

- 1-PB informações
- 2- carta resposta
- 3-autorização modificada
- 4-Termo de assentimento
- 5-TCLE modificado
- 6-Projeto modificado
- 7-questionário
- 8-declaração instituição
- 9- declaração de manuseio biológico
- 10-TCLE

Considerações sobre os documentos:sem pendências



Continuação do Parecer: 1.713.903

Ausência	tcle.docx	30/06/2016 16:01:30	Mima Peçanha Brito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.docx	30/06/2016 16:01:01	Mima Peçanha Brito	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/06/2016 16:00:13	Mima Peçanha Brito	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

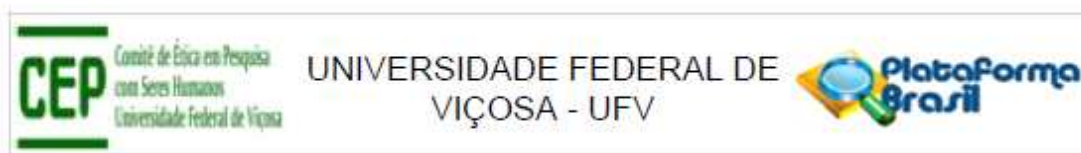
Não

VICOSA, 06 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
HELEN HERMANA MIRANDA HERMSDORFF  
(Coordenador)

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 36.570-900  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



Continuação do Parecer: 1.713.903

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ao término da pesquisa é necessário apresentar, via notificação, o Relatório Final (modelo disponível no site [www.cep.ufv.br](http://www.cep.ufv.br)). Após ser emitido o Parecer Consubstanciado de aprovação do Relatório Final, deve ser encaminhado, via notificação, o Comunicado de Término dos Estudos.

Projeto analisado durante a 6ª reunião de 2016, realizada no dia 04 de agosto de 2016.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_745400.pdf	25/08/2016 14:12:26		Aceito
Outros	cartaresposta.doc	25/08/2016 14:09:28	Mima Peçanha Brito	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	autorizacaomodificada.pdf	22/08/2016 09:51:14	Mima Peçanha Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeassentimentolivreeesclarecido.docx	22/08/2016 09:31:55	Mima Peçanha Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclemodificado.docx	22/08/2016 09:31:17	Mima Peçanha Brito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomodificado.docx	22/08/2016 09:27:24	Mima Peçanha Brito	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	questionario.docx	30/06/2016 16:04:41	Mima Peçanha Brito	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declacaodeinstituicaoefraestrutura.pdf	30/06/2016 16:03:20	Mima Peçanha Brito	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaodemauseiobiologico.pdf	30/06/2016 16:02:24	Mima Peçanha Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	tcle.docx	30/06/2016 16:01:30	Mima Peçanha Brito	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900  
 UF: MG Município: VICOSA  
 Telefone: (31)3899-2492 E-mail: [cep@ufv.br](mailto:cep@ufv.br)

## ANEXO B – Submissão do artigo original

**The Journal of Allergy and Clinical Immunology**  
**Evaluation of inflammatory and oxidative profile in patients with recurrent wheezing.**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Section/Category:</b>	Asthma and lower airway disease
<b>Keywords:</b>	Wheezing, inflammation, oxidative stress, asthma.
<b>Corresponding Author:</b>	Silvia Almeida Cardoso, PhD Universidade Federal de Viçosa Viçosa, BRAZIL
<b>First Author:</b>	Pricila Ferreira Moreira Nascimento, BS
<b>Order of Authors:</b>	Pricila Ferreira Moreira Nascimento, BS
	Emília Torres Costa Marques, MSc
	Mirna Brito Peçanha, MD, MSc
	Palloma Porto Almeida, BS
	Daniel Silva Sena Bastos, MSc
	Rodrigo de Barros Freitas, Phd
	Eduardo Almeida Marques da Silva, Phd
	Leandro Licursi de Oliveira, Phd
	Silvia Almeida Cardoso, PhD
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	BRAZIL
<b>Abstract:</b>	Background  Wheezing is a clinical expression of numerous respiratory-related conditions. Although asthma is the leading cause of wheezing during childhood.  Objective

## ANEXO C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Você \_\_\_\_\_ está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa, sendo que seu representante legal, Sr (a) \_\_\_\_\_ autorizou sua participação.**

Nesta pesquisa pretendemos detectar os fatores que podem provocar chiado no peito.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: avaliação dos prontuários das crianças acompanhadas no ambulatório de Pneumologia Infantil, responder um questionário e realizar exames (de sangue, urina e teste alérgico).

O questionário será realizado no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa. O tempo de aplicação do questionário é de 15 minutos. A coleta do material biológico (sangue e urina) e o teste alérgico serão feitos por profissionais treinados para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. Todos os exames serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserva a sua intimidade e tranquilidade. O referido serviço tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências. Será coletado apenas uma amostra de sangue e uma amostra de urina bem como também será realizado somente um teste alérgico.

Como benefícios da pesquisa, espera-se a detecção precoce de problemas de saúde associados ao chiado no peito, permitindo seu diagnóstico, acompanhamento, prevenção e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade de vida das crianças.

O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento das crianças que tem chiado no peito.

Um dos riscos envolvidos na pesquisa consiste em constrangimento ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e você poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas, sem que isso implique em qualquer alteração na forma como você será atendido (a) na unidade.

No exame de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos: no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto

que desaparece em poucos dias, mas os profissionais estão aptos a resolver o problema e prestar as devidas orientações.

No exame de urina: A coleta de uma amostra da urina será realizada por você ou pelo seu responsável legal, após orientações por profissional treinado. O risco na coleta desse material é o seu constrangimento. Para tal, a coleta é feita por seu responsável legal ou por você mesmo, em banheiro compatível para você. (o local possui banheiro masculino, feminino e para portadores de necessidades especiais).

No teste alérgico: será realizado, por médico treinado, um teste chamado de “teste alérgico”, onde colocamos uma gota (no braço ou nas suas costas) do que poderá ser um dos causadores de alergia e será procedida uma pequena puntura com uma lanceta estéril (algo semelhante a uma picada de muriçoca) para verificarmos se você tem ou não alergia ao que está sendo pesquisado. Os riscos desses exames, apesar de causarem algum desconforto, são raros. É muito raro a criança ter uma crise de chiado devido à realização do teste alérgico. Você deverá permanecer no serviço 60 minutos após o teste alérgico. O Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências, além do próprio profissional que realiza o exame ser treinado para socorro nesse tipo de eventos.

Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa e as amostras biológicas (sangue e urina) serão descartadas após análise.

Você continuará recebendo o acompanhamento no ambulatório de pneumologia mesmo após o encerramento e /ou interrupção da pesquisa.

Não haverá nenhum custo para você participar deste estudo e nem você receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou o retirar seu consentimento e interromper a sua participação, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. O seu nome ou o material que indique a sua participação não serão liberados sem a sua permissão. Este termo de assentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa” e a outra será fornecida a você. Os dados e instrumentos

utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Nesta pesquisa não será necessário a utilização de recursos como filmagens, fotos ou gravações.

**AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

Eu, \_\_\_\_\_ e meu responsável legal \_\_\_\_\_, fomos informados (a) dos objetivos da pesquisa “**Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa**” de maneira clara e detalhada, esclarecemos nossas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de assentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas, bem como ao meu responsável legal.

Nome do participante \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Endereço: Departamento de Medicina e Enfermagem Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário

Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31) 3899-3176

Email: mirnabrito966@gmail.com

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492 Email: [cep@ufv.br](mailto:cep@ufv.br)  
[www.cep.ufv.br](http://www.cep.ufv.br)

Viçosa - MG, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_

## **ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O (A) participante \_\_\_\_\_, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa**

Nesta pesquisa pretendemos detectar os fatores que podem provocar chiado no peito.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: avaliação dos prontuários das crianças acompanhadas no ambulatório de Pneumologia Infantil, responder um questionário e realizar exames (de sangue, urina e teste alérgico).

O questionário será realizado no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa. O tempo de aplicação do questionário é de 15 minutos. A coleta do material biológico (sangue e urina) e o teste alérgico serão feitos por profissionais treinados para esses procedimentos e para orientação de possíveis complicações. Todos os exames serão realizados no Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa em dia e horário previamente estabelecido, em local adequado que preserva a intimidade e tranquilidade do paciente. O referido serviço tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências. Será coletado apenas uma amostra de sangue e uma amostra de urina bem como também será realizado somente um teste alérgico.

Como benefícios da pesquisa, espera-se a detecção precoce de problemas de saúde associados ao chiado no peito, permitindo seu diagnóstico, acompanhamento, prevenção e tratamento adequados e visando melhorias na qualidade de vida das crianças.

O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento das crianças que tem chiado no peito.

Um dos riscos envolvidos na pesquisa consistem em constrangimento ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local adequado e individualmente e a mãe será informada que poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas, sem que isso implique em qualquer alteração na forma como ela e sua criança é atendida na unidade.

No exame de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos: no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto

que desaparece em poucos dias, mas os profissionais estão aptos a resolver o problema e prestar as devidas orientações ao paciente.

No exame de urina: A coleta de uma amostra da urina será realizada pelo responsável legal da criança, após orientações por profissional treinado. O risco na coleta desse material é o constrangimento da criança. Para tal, a coleta é feita por seu responsável legal ou pelo mesmo (crianças com capacidade para tal), em banheiro compatível para a criança (o local possui banheiro masculino, feminino e para portadores de necessidades especiais).

No teste alérgico: será realizado, por médico treinado, um teste chamado de “teste alérgico”, onde colocamos uma gota (em um dos braços ou nas costas da criança) do que poderá ser um dos causadores de alergia na sua criança e será procedida uma pequena puntura com uma lanceta estéril (algo semelhante a uma picada de muriçoca) para verificarmos se a sua criança tem ou não alergia ao que está sendo pesquisado. Os riscos desses exames, apesar de causarem algum desconforto, são raros. É muito raro a criança ter uma crise de chiado devido à realização do teste alérgico. A criança deverá permanecer no serviço 60 minutos após o teste alérgico. O Centro Estadual de Atenção Especializada em Viçosa tem disponível todo material necessário para o atendimento de eventuais urgências, além do próprio profissional que realiza o exame ser treinado para socorro nesse tipo de eventos.

Os exames complementares utilizados para a pesquisa serão realizados em laboratórios vinculados a Universidade Federal de Viçosa e as amostras biológicas (sangue e urina) serão descartadas após análise.

O seu filho (a) continuará recebendo o acompanhamento no ambulatório de pneumologia mesmo após o encerramento e /ou interrupção da pesquisa.

Não haverá nenhum custo para seu filho participar deste estudo e nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, ele tem assegurado o direito à indenização. O (a) participante tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou o (a) Sr.(a) de retirar seu consentimento e interromper a participação do voluntário sob sua responsabilidade, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A participação dele (a) é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição e do participante quando finalizada. O (a) participante não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. O nome ou o material que indique a participação do voluntário não serão liberados sem a sua permissão. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Centro Estadual de

Atenção Especializada em Viçosa” e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a identidade do participante com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Nesta pesquisa não será necessário a utilização de recursos como filmagens, fotos ou gravações.

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492 Email: [cep@ufv.br](mailto:cep@ufv.br)  
[www.cep.ufv.br](http://www.cep.ufv.br)

**AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

Eu , \_\_\_\_\_, c o n t a t o  
\_\_\_\_\_, responsável pelo participante  
\_\_\_\_\_, autorizo sua participação e declaro  
que fui informado(a) dos objetivos da pesquisa “**Fatores associados à sibilância recorrente e asma, em pacientes atendidos em serviço de referência de Pneumologia Pediátrica no Município de Viçosa**” de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Nome do Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Endereço: Departamento de Medicina e Enfermagem Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário

Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31) 3899-3176

Email: mirnabrito966@gmail.com

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar: CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Viçosa Edifício Arthur Bernardes, piso inferior Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário Cep: 36570-900 Viçosa/MG Telefone: (31)3899-2492 Email: [cep@ufv.br](mailto:cep@ufv.br)  
[www.cep.ufv.br](http://www.cep.ufv.br)

Viçosa - MG, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

## ANEXO E – Questionário sobre sintomas respiratórios

### Questionário sobre sintomas respiratórios

Prezada(o) Mãe (Pai ou responsável): Por favor, preencha (responda) o questionário abaixo sobre problemas respiratórios da sua criança.

Pedimos para que NÃO deixe quadradinhos em branco.

<p><b>RESPONDENTE</b> Pessoa que irá preencher os dados: 1 <input type="checkbox"/> Mãe 2 <input type="checkbox"/> Pai 3 <input type="checkbox"/> Outro (nome/parentesco): _____</p> <p><b>DATA (HOJE):</b> ___/___/___ <b>CODIGO</b> _____</p> <p><b>NOME</b> Nome da criança: _____ <b>ID</b> Idade atual(meses): _____ <b>SEXO</b> 1 <input type="checkbox"/> Fem 2 <input type="checkbox"/> Masc</p> <p><b>LUGAR</b> Município: _____ <b>FONE</b> Telefone para contato: (___) _____</p> <p><b>ENDEREÇO:</b> _____</p> <p><b>DN</b> Data de nascimento (DD/MM/AAAA): ___/___/___ <b>PN</b> Peso ao nascer (kg): _____</p> <p><b>PA</b> Peso atual (kg): _____ <b>EN</b> Estatura ao nascer (cm): _____ <b>EA</b> Estatura atual (cm): _____</p>
---

Por favor, coloque um X no quadradinho que corresponda a sua resposta correta ou preencha os espaços:

- 1** **1º CHIADO** Com que idade sua criança teve o primeiro episódio de chiado no peito - primeira bronquite? Idade (meses): \_\_\_\_\_
- 2** **CHIADO 12º MESES** Sua criança teve chiado no peito, bronquite ou sibilância nos seus primeiros 12 meses de vida? 1  SIM 2  NÃO
- 3** **QTOS CHIADOS 1º ANO** Quantos episódios de chiado no peito (bronquite ou sibilância) ele teve no primeiro ano de vida?

1  Nenhum  
2  Menos de 3 episódios  
3  3 a 6 episódios  
4  Mais de 6 episódios
- 4** **TRAT. ALIVIO** Sua criança recebeu tratamento com medicamentos inalados para aliviar o chiado no peito (broncodilatadores) por nebulizadores ou inaladores (bombinhas), ex: Salbutamol, Aerolin®, Berotec®, Brycanil®? 1  SIM 2  NÃO 3  NÃO SEI
- 5** **TTO. PROFILÁTICO** Sua criança recebeu tratamento com Corticóides (cortisonas) inalados (bombinhas), ex: Symbicort®, Flixotide®, Seretide®, Clenil®, Beclosol®, Budesonida, Busonid®, Pulmicort®, Beclometasona/Fluticasona etc? 1  SIM 2  NÃO 3  NÃO SEI

- 6 **TTO.ANTILEUCO** Sua criança recebeu tratamento com Antileucotrienos (Singulair®, Montelair®, Piemont®)? 1  SIM 2  NÃO 3  NÃO SEI
- 7 **TTO.PROFILATCOATUAL** Atualmente, sua criança está recebendo tratamento anti-inflamatório? Ex: Corticoides: Symbicort®, Flixotide®, Seretide®, Clenil®, Beclosol®, Budesonida, Busonid®, Pulmicort®, Beclometasona, Fluticasona ou Antileucotrienos, Singulair®, Montelair®, Piemont® 1  SIM 2  NÃO 3  NÃO SEI
- 8 **CHIADO.ULTIMAS.4SEM** Se respondeu sim à pergunta de número 7, sua criança apresentou chiado nas últimas 4 semanas? 1  SIM 2  NÃO 3  NÃO SEI
- 9 **DESPERTARNOTURNO12M** Nestes últimos doze meses quantas vezes você acordou durante a noite devido à tosse, ou chiado no peito da sua criança? 1  Nunca  
2  Raras vezes (<1x ao mês)  
3  Algumas vezes (algumas semanas em alguns meses)  
4  Frequentemente (>= 2 noites por semana, quase todos os meses)
- 10 **EMERGENCIA12M** Nestes últimos doze meses o chiado no peito (sibilância) da sua criança foi tão forte a ponto de ser necessário levá-lo a um serviço de emergência (Hospital, Clínica ou Posto de Saúde)? 1  SIM 2  NÃO
- 11 **CHIADOINTENSO12M** Nestes últimos doze meses o chiado no peito (sibilância) da sua criança foi tão intenso a ponto de você vê-lo com muita dificuldade para respirar (com falta de ar)? 1  SIM 2  NÃO
- 12 **INTERNAÇÃO** Sua criança já foi hospitalizado (internado em hospital) por bronquite? 1  SIM 2  NÃO
- 13 **DIAG.ASMA** Algum médico lhe disse alguma vez que sua criança tem asma? 1  SIM 2  NÃO
- 14 **PNM** Sua criança já teve pneumonia? 1  SIM 2  NÃO
- 15 **INTERNAÇÃO.PNM** Sua criança já foi hospitalizado por pneumonia? 1  SIM 2  NÃO
- 16 **EUMO.CASA** Alguma pessoa que a criança tem contato fuma (pai, mãe, avós, tios)? 1  NÃO  
2  SIM (MÃE)  
3  SIM (PAI)  
4  SIM (OUTROS)

- 17 **CIGARROSDIA** Quantos cigarros essa pessoa fuma por dia ?  
1  ½ maço  
2  1 maço  
3  acima de 1 maço
- 18 **CIGARROSTEMPO** Quanto tempo sua criança fica em contato com essa pessoa?  
1  Diário  
2  Semanal  
3  Mensal
- 19 **VC. FUMA** Você fuma?  
1  SIM    2  NÃO
- 20 **MAE.FUMA** A mãe da criança fumou durante a gravidez?  
1  SIM    2  NÃO
- 21 **HE.ASMA** Sua criança tem familiares com asma?  
1  NÃO  
2  SIM (MÃE)  
3  SIM (PAI)  
4  SIM (OUTROS)
- 22 **HF. RINITE** Sua criança tem familiares com alergia no nariz ou rinite alérgica?  
1  NÃO  
2  SIM (MÃE)  
3  SIM (PAI)  
4  SIM (OUTROS)
- 23 **HP.DERM.AT.** Sua criança tem alergia de pele (dermatite alérgica)?  
1  SIM    2  NÃO
- 24 **CESAREA** Sua criança nasceu por cesariana (parto cesárea)?  
1  SIM    2  NÃO
- 25 **CRECHE** A sua criança está frequentando escola ou creche este ano?  
1  SIM    2  NÃO
- 26 **IDADE.CRECHE** Com que idade sua criança entrou na creche?  
Idade (meses): \_\_\_\_\_
- 27 **ALIMENTOS.IND.** Com que frequência você dá à sua criança algum dos seguintes produtos (não feitos em casa): iogurte, pudim, salgadinhos (chips), chocolate, refrigerantes, suco de frutas de caixinha ou de garrafa, geleia artificial?  
1  Nunca  
2  Uma vez por semana  
3  Uma vez ao mês  
4  Todos os dias da semana

- 28 **COMBUST.DOME.ST.** Que tipo de combustível você usa para cozinhar na sua casa?  
 1  Gás encanado 2  carvão  
 3  gás de bujão  
 4  eletricidade  
 5  fogão a lenha  
 6  outro
- 29 **AR COND** Você tem ar condicionado em sua casa?  
 1  SIM 2  NÃO
- 30 **PET.NASC** Você tinha algum animal de estimação (cachorro, gato, passarinho, coelho) em sua casa quando sua criança nasceu?  
 1  NÃO  
 2  SIM  
 CACHORRO/GATO  
 3  SIM (OUTROS)
- 31 **PET.ATUAL** Você tem algum bicho de estimação na sua casa atualmente? (cachorro, gato, passarinho, coelho)?  
 1  NÃO  
 2  SIM  
 CACHORRO/GATO  
 3  SIM (OUTROS)
- 32 **OBJETOSPOEIRA** Você tem na sua casa objetos que acumulam poeira tais como: almofadas, carpete, cortinas e bichos de pelúcia?  
 1  SIM 2  NÃO
- 33 **BANHO.CASA** Você tem banheiro com pia, chuveiro e vaso sanitário dentro de casa?  
 1  SIM 2  NÃO
- 34 **COZINHA.INTERNA** A cozinha da sua casa (ou o lugar onde a comida é preparada) é dentro da casa?  
 1  SIM 2  NÃO
- 35 **VC.ESCOLARIDADE** Marque qual o seu grau de escolaridade:  
 1  Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos)  
 2  Educação média ou secundária incompleta (nove a 11 anos).  
 3  Educação média ou secundária completa e nível superior (doze ou mais anos)
- 36 **ESCOLARIDADE,MAE** Marque qual o grau de escolaridade da mãe da criança:  
 1  Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos)  
 2  Educação média ou secundária incompleta (nove a 11 anos).  
 3  Educação média ou secundária completa e nível superior (doze ou mais anos)

- 37 ESCOLARIDADE, PAI** Marque qual o grau de escolaridade do pai da criança:  
 1  Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos)  
 2  Educação média ou secundária incompleta (nove a 11 anos).  
 3  Educação média ou secundária completa e nível superior (doze ou mais anos)
- 38 LM, EXCLUSIVO** Por quantos meses a mãe deu somente leite do peito para esta criança (sem dar sucos, papinhas ou outro tipo de leite)? Idade (meses): \_\_\_\_\_
- 39 RESFRIADOS<sup>1</sup> 12 MESES** Quantos resfriados (episódios de espirros, tosse e secreção nasal com ou sem febre) sua criança no primeiro ano de vida? Nº de episódios: \_\_\_\_\_
- 40 ID, 1º RESFRIADO** Com que idade sua criança se resfriou pela primeira vez? Idade (meses): \_\_\_\_\_
- 41 ALERGIAS DE PELE, 1º 12 MESES** Sua criança tem ou teve alguma alergia de pele durante o primeiro ano de vida? (manchas vermelhas na pele com coceira, alergia à fralda, alergia à picada de mosquito, comida, metais, etc.) 1  SIM 2  NÃO
- 42 POLUIÇÃO** Você considera que o lugar onde você vive é um lugar com poluição atmosférica (fumaça de fábricas, alto tráfego de veículos, etc.)? 1  NÃO  
 2  SIM MUITO  
 3  SIM MODERADO  
 4  SIM POUCO
- 43 MOFO** Existe mofo (bolor) ou manchas de umidade em sua casa? 1  SIM 2  NÃO
- 44 VACINAÇÃO DIA** Sua criança tem as vacinas em dia? 1  SIM 2  NÃO
- 45 IRMÃOS** Quantos irmãos ou irmãs sua criança tem? Nº: \_\_\_\_\_
- 46 PESSOAS, CASA** Quantas pessoas (adultos e crianças) vivem atualmente na sua casa? Nº: \_\_\_\_\_
- 47 TRAB, MÃE** A mãe da criança tem atualmente um trabalho remunerado? 1  SIM 2  NÃO
- 48 TRAB, PAI** O pai da criança tem atualmente um trabalho remunerado? 1  SIM 2  NÃO
- 49 RENDA, FAM.** Qual a renda atual da família (em salários mínimos)? Nº salários: \_\_\_\_\_

- 50 **RAÇA** Qual é a raça da sua criança? 1= Branca  
2= Não branca  
Negro  
Mulato  
pardo  
3= Asiática (japonês,  
chinês)  
4= Indígena
- 51 **CORT.ORAL** Sua criança recebeu tratamento com corticóides orais para controlar as crises de chiado? (Predsim®, Prelone®, Decadron®)? 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI
- 52 **VITD.2ANOS** Sua criança recebeu suplementação de vitamina D até 2 anos de idade (ADERA, AD-TIL, PROTOVIT). 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI
- 53 **VITD.ATUAL** Sua criança está recebendo atualmente suplementação de vitamina D (ADERA, AD-TIL, PROTOVIT) 1= SIM 2= NÃO 3= NÃO SEI