

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HEVERTTON LUIZ BOZZO SILVA DOS SANTOS

**MUTAÇÕES DO GENE *VDR* E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D
EM CRIANÇAS COM ASMA**

CURITIBA

2012

HEVERTTON LUIZ BOZZO SILVA DOS SANTOS

**MUTAÇÕES DO GENE *VDR* E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D
EM CRIANÇAS COM ASMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente. Área de Concentração: Alergia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Co-orientadora: Prof. Dra. Lilian Pereira-Ferrari

CURITIBA

2012

Dedico esta obra aos meus pais Jorge e Liane, por seu amor, sua disposição em me proporcionar a melhor educação e por me apoiarem incondicionalmente na conquista dos meus objetivos.

À minha amada Jordana, por seu carinho, sua companhia nas horas difíceis e por tornar minha vida mais feliz.

Aos meus amigos, por todo o apoio que me concederam.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário**, por seus ensinamentos, seu incentivo e sua amizade de quase 10 anos.

À **Prof.^a Dra. Lilian Pereira-Ferrari**, por todo o apoio, orientação e paciência fundamentais para a elaboração e execução deste trabalho.

À **Prof.^a Dra. Liya Regina Mikami**, por seu auxílio e orientação na análise genética das amostras.

À **Prof.^a Dra. Mônica Nunes Lima**, por seu auxílio na análise estatística.

Ao **Prof. Dr. Herberto José Chong Neto**, por suas sugestões, dicas de estatística e sua grande amizade.

Ao **Prof. Dr. Carlos Antônio Riedi**, por seu auxílio em várias partes deste trabalho, por sua amizade e por sua dedicação à minha formação profissional.

Ao **Dr. Marco Antônio Largura**, que viabilizou a execução das análises bioquímicas, abrindo as portas de sua “casa”, o laboratório PR-ANÁLISE– Análises e Pesquisas Clínicas de Curitiba.

Ao **Dr. Álvaro Largura**, por sua paciência, sugestões e por suas ideias, inestimáveis para minha compreensão e interpretação deste estudo.

À **Prof. Dra. Suzana Nesi-França**, por seu auxílio na interpretação dos resultados bioquímicos.

Ao **Dr. Deivis Junior Paludo**, por sua importante contribuição na realização os testes bioquímicos.

Ao Técnico de laboratório **Alisson Aparecido Pereira Trespach**, por sua inestimável dedicação durante o processamento das amostras bioquímicas.

Às acadêmicas do curso de biomedicina das Faculdades Integradas do Brasil - UNIBRASIL, **Silvia de Souza e Silva** e **Estela de Paula**, por seu envolvimento, dedicação e parceria, fundamentais para a realização deste projeto.

Ao meu bom amigo **Marcos Geraldini**, que além de dar seus valorosos “pitacos” nesta obra, gentilmente me hospedou em sua casa, em minhas vindas à Curitiba.

Aos meus **colegas do Serviço de Alergia e Imunologia do HC-UFPR** que me auxiliaram no recrutamento dos pacientes e coleta das amostras.

RESUMO

Introdução: A vitamina D (VD) é tema de diversos estudos com objetivo de determinar sua influência nos mecanismos imunológicos, incluindo os alérgicos. É provável que mutações ou polimorfismos do gene do receptor de VD (*VDR*) se relacionem com os níveis séricos de VD, e assim, com a frequência de asma. O objetivo deste estudo é verificar a relação dos polimorfismos do *VDR* com o diagnóstico de asma e com os níveis séricos de VD em asmáticos. **Métodos:** Estudo observacional analítico transversal prospectivo realizado com crianças entre 7 e 14 anos, divididas em 3 grupos: um grupo de asmáticos, em uso de corticóide inalatório (CTCI) há mais de 1 ano; um grupo de asmáticos sem necessidade de CTCI para o controle da doença há mais de 1 ano; um grupo de não asmáticos e não alérgicos de acordo com o questionário ISAAC e níveis de IgE, sem diagnóstico estabelecido de doenças crônicas. Dados clínicos dos asmáticos foram obtidos dos prontuários padronizados. Resultados de espirometria e testes cutâneos alérgicos foram registrados. Foi avaliada a presença do polimorfismo CDX2 do promotor do *VDR* por PCR alelo específica, assim como polimorfismos inespecíficos dos exons 2 e 3 por PCR-SSA. IgE total e IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, e *Lolium perenne* foram obtidos de todos os indivíduos. Níveis de 25(OH)VD, cortisol matinal, PTH, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina foram determinados nos asmáticos. **Resultados:** No total, 77 crianças foram avaliadas. A média de idade foi 10,8 (\pm 2,2 anos), 57% do gênero masculino, e todos provenientes de Curitiba (latitude aproximada 25° negativos) e região metropolitana. 38 pertenciam ao grupo de asmáticos em uso de CTCI, 22 sem CTCI e 17 no grupo de não asmáticos. Entre os asmáticos, 8 atingiram critérios de obesidade (OMS). Mais de 90% dos asmáticos tiveram diagnóstico de rinite alérgica. O polimorfismo CDX2 em homozigose esteve presente em 23% dos asmáticos e ausente entre os controles ($p=0,03$). Menores níveis de VEF1% foram encontrados entre os asmáticos ($p=0,001$), homozigotos para o CDX2. Variações nas sequências dos exons 2 e 3 obtidos por PCR-SSCA, não foram relacionadas com a asma ou com os demais testes neste grupo. Deficiência ou insuficiência de VD foi diagnosticada em 98% dos indivíduos. Não houve associação entre os níveis de VD e os polimorfismos encontrados. Baixos níveis de cortisol foram observados em 28,3% dos asmáticos ($p=0,01$), entretanto o grupo de asmáticos sem prescrição de CTCI apresentou valores similares de cortisol. **Conclusão:** Observou-se associação positiva entre a presença do polimorfismo CDX2 em homozigose com diagnóstico de asma, e com menores valores de VEF1%. Baixos níveis de VD estiveram presentes nesta amostra, não havendo distinção entre o grupo de asmáticos e não asmáticos. Assim como o CDX2, sugere-se que outros polimorfismos do *VDR*, capazes de modificar a interação celular com a vitamina, estejam associados com a prevalência de asma, e, talvez, com a dificuldade de controle da doença.

Palavras-chave: Asma; Vitamina D; Receptor de Vitamina D; *VDR*; Polimorfismos; CDX2.

ABSTRACT

Background: Vitamin D (VD) is the subject of several studies aiming to determine their influence on immunoallergic pathways. Polymorphisms or mutations on VD receptor (*VDR*) are probably related with VD serum levels, and thus with asthma. The aim of this study was to investigate the relationship between *VDR* polymorphisms, asthma diagnosis and VD serum levels. **Methods:** Cross-sectional analytic study with children between 7 and 14 years divided into three groups. A group of asthmatics on inhaled corticosteroid treatment (ICT) for more than one year. An asthmatics group without ICT to control the disease for over 1 year. A group of non-asthmatic and non-allergic according to the ISAAC questionnaire and IgE levels, without an established chronic diseases diagnosis. Clinical data were obtained from standardized medical records. Results of pulmonary function and allergy skin test were evaluated. Presence of *VDR* promoter polymorphism CDX2 was evaluated by allele specific PCR, as well as exon 2 and 3 non-specific polymorphisms by PCR-SSA. Levels of total IgE and specific IgE to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, and *Lolium perenne* were obtained from all patients. Morning cortisol, 25 (OH) VD, PTH, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase were determined in asthmatics. **Results:** 77 individuals were evaluated. The mean age was 10.8 years (+ 2.2 years), 57% were male, and all from or nearby Curitiba (latitude -25 °). 38 belonged to the group of asthmatics on ICT, 22 without ICT and 17 in the group without asthma. Among asthmatics, 8 reached obesity criteria (WHO). Over 90% of the patients were diagnosed with concomitant allergic rhinitis. Homozygous CDX2 polymorphism is present 23% of asthmatics and absent among controls ($p = 0.03$). Lower levels of FEV1% were found among the CDX2 Homozygotes asthmatics ($p = 0.001$). Exons 2 and 3 sequence variations (SSCA), were not related to asthma or other tests performed in this group. VD deficiency or insufficiency was diagnosed 98% of subjects. There was no association between VD levels and evaluated polymorphisms. Low cortisol levels were observed in 28.3% of asthmatic patients ($p = 0.01$), however the group of asthmatics without ICT prescription showed similar levels of cortisol. **Conclusion:** There is a positive association between presence of CDX2 polymorphism with asthma diagnosis and lower levels of FEV1%. Low VD levels were found in these groups, without distinction between asthmatics and nonasthmatics. As CDX2, it is possible that other *VDR* polymorphisms, able to modify vitamin-cell interaction, are associated with the prevalence of asthma, and perhaps, with the difficulties in disease control.

Keywords: Asthma; Vitamin D; Vitamin D Receptor; *VDR*; Polymorphisms; CDX2.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	DADOS DEMOGRÁFICOS DOS SUJEITOS DA PESQUISA	54
TABELA 2 –	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GRUPO DE ASMÁTICOS.....	55
TABELA 3 –	RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS POR GRUPOS.....	56
TABELA 4 –	VALORES DA MEDIANA DA IGE EM KUI/L POR GRUPO	57
TABELA 5 –	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE VD (EM ng/mL) E VARIÁVEIS LABORATORIAIS, VEF1% OU NÚMERO DE TCA POSITIVOS	58
TABELA 6 –	FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES DO <i>VDR</i> DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ASMA	59
TABELA 7 –	NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE ASMA DE ACORDO COM O GENÓTIPO.....	60
TABELA 8 –	ASSOCIAÇÃO ENTRE NECESSIDADE DE USO DE CORTICOTERAPIA INALATÓRIA E POLIMORFISMOS	60
TABELA 9 –	RESULTADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS REALIZADOS PARA COMPARAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS NOS EXAMES BIOQUÍMICOS E FUNÇÃO PULMONAR, EM GRUPOS DIVIDIDOS DE ACORDO COM O POLIMORFISMO DO <i>VDR</i> ESTUDADO.....	61
TABELA 10 –	MEDIANA DOS VALORES DE IGE DE ACORDO COM O GENÓTIPO DO REGIÃO PROMOTORA DO GENE	62
TABELA 11 –	RESULTADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS PARA RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES FORMAS DE AGRUPAMENTO E VALORES DE IGE	63

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – VITÂMEROS DA VITAMINA D.....	17
QUADRO 2 – RESUMO DE ALGUNS ARTIGOS ORIGINAIS UTILIZADOS NESTA REVISÃO.....	31
QUADRO 3 – EXAMES REALIZADOS NO LABORATÓRIO PARANÁLISE E MÉTODO EMPREGADO	45
QUADRO 4 – SOLUÇÕES ADOTADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	47
QUADRO 5 – INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS	48
QUADRO 6 – TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR	49
QUADRO 7 – TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA E DOMÍNIOS DO VDR.....	20
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE DO VDR.....	25
FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DA HIPÓTESE QUE INDICA POSSÍVEIS EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE VD NA PATOGÊNESE DA ASMA	29
FIGURA 4 – ARTIGOS PUBLICADOS, POR ANO, DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS MEDLINE®, ATÉ O DIA 15/03/2012.....	30
FIGURA 5 – NÍVEIS SÉRICOS DE VD EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DO SCORAD	33
FIGURA 6 – MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DA VD3 E RESPOSTA DA CATELICIDINA.....	34
FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS PRESCRIÇÕES DE AUTO-INJETOR DE ADRENALINA NOS EUA EM 2005	36
FIGURA 8 – ALGORITMO DE EXCLUSÕES.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	– Adenosina monofosfato-cíclico
ATAQ	– <i>Asthma Therapy Assessment Questionnaire</i>
BD	– Broncodilatador
BP	– Broncoprovocação
cDNA	– Ácido desoxirribonucleico complementar
CTC	– Corticóide
CTCI	– Corticóide inalatório
CTCVO	– Corticóide via oral
CVF	– Capacidade vital forçada
DA	– Dermatite atópica
DBD	– DNA <i>binding domain</i> - Domínio de união ao DNA
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
GINA	– <i>Global Initiative for Asthma</i>
HC	– Hospital de Clínicas
HRE	– <i>Hormone response element</i> – Elemento de resposta hormonal
IL	– Interleucina
IMC	– Índice de massa corporal
ISAAC	– <i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
IT	– Imunoterapia
LBD	– <i>Ligand binding domain</i> - Domínio de união ao ligante
mVDR	– Receptor de vitamina D de membrana
NHR	– <i>Nuclear hormone receptor</i> - Receptor nuclear hormonal
NK	– <i>Natural killer</i>
nVDR	– Receptor de vitamina D nuclear
PCR	– Reação em cadeia de polimerase
RFLP	– Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
RN	– Recém-nascido
Rpm	– Rotações por minuto
SCORAD	– <i>Scoring atopic dermatites</i>
SCP	– Polimorfismo do códon de início
SSCA	– <i>Single strand conformational analysis</i>
TGF-beta	– <i>Transforming growth factor beta</i>
Th	– Linfócito T <i>helper</i>
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
UTR	– <i>Untranslated region</i>
VD	– Vitamina D
VDR	– Receptor de vitamina D
VEF1%	– Volume expiratório forçado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo Geral.....	16
1.2.2 Objetivos Específicos.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 VITAMINA “D” OU CALCIFEROL	17
2.2 RECEPTOR DE VITAMINA “D”.....	19
2.2.1 Domínio A/B.....	20
2.2.2 <i>DNA binding domain</i> (DBD) – domínio de ligação ao DNA.....	20
2.2.3 <i>Ligand Binding Domain</i> (LBD) - domínio de união ao ligante	21
2.2.4 <i>Hormone response element</i> (HRE) - elemento de resposta hormonal	22
2.2.5 Mecanismos de ação do <i>VDR</i>	23
2.3 GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA “D”	24
2.3.1 Polimorfismos do gene do <i>VDR</i>	24
2.4 RELAÇÃO DA VITAMINA “D” COM AS DOENÇAS ALÉRGICAS	27
2.4.1 VD e asma	27
2.4.2 Dermatite atópica.....	32
2.4.3 Alergia alimentar e anafilaxia	34
2.4.4 Imunoterapia	36
2.4.5 VD e o sistema imunológico	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 TIPO DE ESTUDO	38
3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO	38
3.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA.....	38
3.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	39
3.3.2 Critérios de exclusão	39
3.4 PROCEDIMENTOS.....	40
3.4.1 Dados coletados dos prontuários.....	40
3.4.2 Descrição do Questionário.....	41
3.4.3 Avaliação bioquímica	45

3.4.4 Avaliação genética.....	46
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3.6 ÉTICA EM PESQUISA.....	51
3.6.1 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e termo de assentimento.....	51
3.6.2 Monitorização da pesquisa.....	52
3.7 FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS...	52
4 RESULTADOS	53
4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA.....	53
4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GRUPO DE ASMÁTICOS.....	54
4.3 RESULTADOS DOS EXAMES BIOQUÍMICOS.....	55
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE VITAMINA D COM OS DEMAIS EXAMES LABORATORIAIS, VEF1% E TESTES ALÉRGICOS.....	57
4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM O DIAGNÓSTICO DE ASMA.....	58
4.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE DIFERENTES GENÓTIPOS DO PROMOTOR DO VDR COM O DIAGNÓSTICO DE ASMA.....	59
4.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM A NECESSIDADE DO USO DE CORTICÓIDE INALATÓRIO PARA CONTROLE DA ASMA.....	60
4.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM OS DEMAIS EXAMES LABORATORIAIS, VEF1% E TESTES ALÉRGICOS.....	61
4.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM OS NÍVEIS DE IGE.....	62
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS.....	84
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	98

1 INTRODUÇÃO

Asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar (GINA 2011). Resulta de uma interação entre genética, exposição ambiental e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e manutenção dos sintomas. A prevalência de asma e doenças alérgicas tem aumentado mundialmente a partir dos anos 1960. Atualmente, o impacto da doença em países desenvolvidos e em desenvolvimento é significativo e está aumentando rapidamente. Há mais de 300 milhões de pessoas afetadas no mundo, principalmente nos países industrializados mais afastados do equador. A asma é uma das principais causas de morbidade em crianças, sendo 90% dos casos diagnosticados até os seis anos de idade. Continua sendo a doença crônica mais comum na infância em todo o mundo e gera muitos gastos em saúde pública (STIRBULOV *et al.*,2006).

O estudo mundial ISAAC (*International Study of Asthma and Allergy in Children*) contribuiu para mostrar que asma e doenças alérgicas têm maior prevalência em países desenvolvidos. Pesquisas foram realizadas para tentar explicar esse padrão e a hipótese mais aceita é a da higiene. Essa hipótese surgiu das observações originais da associação inversa entre o tamanho da família e o risco de atopia, e presume que famílias menores em países ocidentais desenvolvidos têm menor exposição a infecções nos primeiros anos de vida. Essa menor exposição pode resultar em asma e atopia, devido ao desenvolvimento inapropriado do sistema imunológico pela regulação inadequada da resposta imunológica T_H1 e pela falta de desvio imunológico de T_H2 predominante para uma resposta equilibrada entre T_H1 e T_H2 . Embora essa hipótese seja atraente e tenha evidências que a apoiam, os estudos sobre asma têm sido inconsistentes e, individualmente, a hipótese não pode explicar todos os aspectos da epidemia de asma, como a ligação entre asma e obesidade, a alta prevalência em centros urbanos mais pobres e o aumento concomitante de doenças autoimunes mediadas por T_H1 . Além disso, há algo a mais contribuindo para a epidemia e,

provavelmente, alguma exposição ambiental (ou falta dela) possa explicar os padrões epidemiológicos de asma e alergia mais completamente. (GINA, 2011)

Formulou-se uma hipótese de que, conforme a população torna-se mais próspera e ocidentalizada, passa mais tempo em ambientes fechados, com menor exposição à luz solar, e desta forma, aumenta a frequência de hipovitaminose D. Esta deficiência estaria relacionada à maior incidência de asma e outras doenças alérgicas (CAMARGO, 2007; DEVEREUX, 2007).

A VD é um hormônio obtido em grande parte, da síntese cutânea dependente da interação com a radiação UV. Existe uma grande variedade de tecidos onde seus receptores foram encontrados, e desta forma, exerce funções em diversos sistemas do organismo (LAMBERG-ALLARDT, 2006).

É necessária a exposição solar para manter níveis adequados de VD, visto que o aporte dietético responde por uma pequena parte do requerimento diário desta vitamina. Desta forma, hábitos da sociedade moderna como pouca exposição ao sol, utilização de protetor solar, assim como a maior prevalência de obesidade, ou o uso de certos fármacos, podem ser uma explicação para deficiência desta vitamina, que tem sido diagnosticada frequentemente em estudos populacionais em diversas regiões do planeta. (HOLICK, 2007)

Com relação à alergologia, a deficiência perinatal de vitamina D pode afetar o desenvolvimento dos pulmões e do sistema imunológico fetal e isso pode ser exacerbado por deficiência de vitamina D pós-natal. (SANDHU, CASALE, 2010). Baixos níveis de VD foram associados a maior frequência de asma, exacerbações de asma e maior gravidade das crises (CAMARGO *et al.*, 2007), maior gravidade da dermatite atópica (PERONI *et al.*, 2011) e maior frequência de anafilaxia (CAMARGO *et al.*, 2007b).

Algumas explicações para tais efeitos foram estudadas, entretanto, a exata relação da vitamina D com as doenças alérgicas permanece desconhecida.

Sabe-se que, para exercer sua função, a VD requer que seu receptor seja produzido e que funcione corretamente. O VDR é um receptor nuclear de estrutura proteica com aproximadamente 437 aminoácidos. É codificado por um gene que se encontra no cromossoma 12 e é composto de 11 exons (LABUDA *et al.*, 1992).

Mutações no gene do *VDR* já foram associadas à câncer colorretal, puberdade precoce, dermatite atópica e outras doenças alérgicas em certas populações (FANG *et al.*, 2003; GARLAND *et al.*, 2006; FERRAREZI, 2011).

É possível que mutações no gene do *VDR* possam alterar o mecanismo de ação, impedindo ou dificultando a atividade da VD, ainda em indivíduos com níveis normais desta vitamina.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- 1) Identificar a frequência de três polimorfismos do gene do *VDR* em crianças entre 7 e 14 anos, com diagnóstico de asma, acompanhadas no ambulatório de alergia e imunologia do Hospital de Clínicas - UFPR.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar se existe relação entre os polimorfismos CDX2 da região promotora e de polimorfismos dos exons 2 e 3 do gene do *VDR* com o diagnóstico de asma.
- 2) Determinar os níveis séricos de vitamina D e sua relação com os polimorfismos do gene do *VDR*.
- 3) Determinar se existe relação entre os polimorfismos do gene do *VDR* e os níveis séricos de cálcio.
- 4) Verificar se existe relação entre os polimorfismos do gene do *VDR* e a necessidade de corticoterapia para controle da asma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VITAMINA “D” OU CALCIFEROL

A VD, uma vitamina lipossolúvel, é um hormônio obtido a partir da reação da radiação ultravioleta tipo B com o colesterol animal ou com o ergosterol vegetal. O primeiro passo para a biossíntese de vitamina D envolve a ação da radiação ultravioleta entre 290 nm e 315 nm proveniente do sol sobre o 7-deidrocolesterol, na pele. Com a exposição solar, o 7-deidrocolesterol é convertido a pré-vitamina D₃, que é então transformada em vitamina D₃ por isomerização. A vitamina D₃ posteriormente sofre hidroxilação no fígado pela 25-hidroxilase, tornando-se o principal metabólito circulante, a 25(OH)D₃. Em seguida, no rim, pela ação da 1-alfa-hidroxilase, transforma-se na sua forma biologicamente ativa, a 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25[OH]₂D₃) (LAMBERG-ALLARDT, 2006).

A 1-alfa-hidroxilase está presente em diversas células do organismo, incluindo as pulmonares, o que sugere que a VD pode ser ativada em outros tecidos, além do rim. Na realidade, a VD é um grupo de vitâmeros, ou seja, polímeros de uma vitamina, com atividade biológica similar no organismo (Quadro 1). A VD₂ e a VD₃ são comumente chamadas de calciferol.

QUADRO 1 – VITÂMEROS DA VITAMINA D

Vitamina D ₁	Composto molecular do ergocalciferol com lumisterol
Vitamina D ₂	Ergocalciferol (proveniente do ergosterol)
Vitamina D ₃	Colecalciferol (proveniente do 7-deidrocolesterol na pele).
Vitamina D ₄	22-dihidroergocalciferol
Vitamina D ₅	Sitocalciferol (proveniente do 7-deidrositosterol)

FONTE: Adaptado de *Dorland's illustrated medical dictionary* (2009).

Funcionalmente, a VD controla o metabolismo fosfo-cálcico assim como está envolvida na função neuromuscular, na inflamação, influencia também a ação de muitos genes que regulam a proliferação, diferenciação e apoptose celular (BLANCO, 1998).

A VD é encontrada em quantidades mínimas nos alimentos. A gema de ovo, o leite e o fígado contem alguma quantidade de VD. A carne de alguns peixes de águas profundas como salmão, atum e sardinha é um pouco mais rica nesta vitamina.

A biossíntese é responsável por 90% da VD sérica, sendo os 10% restantes provenientes da dieta. Considerando-se que a exposição solar não é uniforme em toda a população, devido à hábitos e posição geográfica, não é fácil estabelecer com exatidão o requerimento dietético diário do ser humano, complementar à produção endógena da VD (BLANCO, 1998; SANDHU, CASALE, 2010).

Considera-se adequada a exposição solar de braços e pernas, no período entre 10 e 15 horas, duas vezes por semana para produzir níveis ótimos da vitamina. O tempo da exposição varia conforme o fototipo, mas está entre cinco e trinta minutos. Esta exposição é capaz de gerar VD suficiente, inclusive, para armazenamento na gordura, para uso posterior, no período de inverno (HOLICK, 2010).

Existe maior incidência de câncer de pele em indivíduos com maior exposição à radiação solar. Contudo, alguns autores observaram menor frequência de outros tipos de câncer, como próstata, cólon e mama em populações de áreas de maior latitude, talvez um indício de que a menor exposição solar seria preventiva para tais moléstias. Tal informação não é consenso entre os pesquisadores e é alvo de discussão (GARLAND *et al.*, 2006).

O uso de protetor solar tem impacto sobre a síntese cutânea da VD, diminuindo intensamente sua produção. Com fator de proteção solar (FPS) 8, esta redução é de 92,5% enquanto com FPS 15, pode chegar a 99% (HOLICK, 2007).

A exposição à radiação solar, suficiente para provocar um mínimo eritema, em um indivíduo vestindo trajes de banho pode ser equivalente à ingestão de aproximadamente 20.000 UI de vitamina D2 (HOLICK 2010; HOLICK, 2007).

Níveis acima de 30 ng/mL são considerados ideais, abaixo de 30 ng/mL, insuficiência e inferiores a 15 ng/mL, deficiência (HOLICK, 2007). A VD age de forma similar a um hormônio. Os níveis sanguíneos devem ter limites ótimos, acima ou abaixo dos quais pode haver consequências clínicas.

Ainda que a exposição solar necessária para manter a suficiência de VD seja pequena, níveis séricos baixos são encontrados em grandes porções da população. Em levantamento realizado em 6000 indivíduos entre um e 21 anos de idade, nos Estados Unidos, encontrou-se que 70% tinham níveis subótimos de VD, 61% insuficientes (<30ng/mL) e 9% deficientes (<15ng/mL). Este estudo também identificou o gênero feminino como população de risco, além de afro e méxico-americanos, indivíduos que tomam leite (fortificado) menos de uma vez por semana e ainda entre aqueles que ficam mais de 4 horas/dia diante do televisor ou computador (KUMAR *et al.*, 2009).

Além dos níveis séricos, para seu correto funcionamento a VD depende da presença do *VDR*.

2.2 Receptor de vitamina “D”

O receptor da vitamina D (*VDR*) é também conhecido como NR1H1 (subfamília de receptores nucleares 1, grupo I, membro 1), e é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição (MOORE *et al.*, 2006). Também pertencem à esta família os receptores de hormônio tireoideano, receptor de ácido retinóico, assim como “receptores órfãos”, para os quais os ligantes ainda não foram identificados (BRUCE, EVANS 1998; WEATHERMAN *et al.*, 1999).

Há receptores de vitamina D praticamente em todos os tecidos, como cérebro, ilhotas pancreáticas, osso, musculatura esquelética, rim, intestino, pele, mama, paratireoide, hipófise, linfócitos e monócitos (BRAIDMAN, ANDERSON, 1985).

Trata-se de uma proteína de 427 aminoácidos e assim como os demais receptores hormonais nucleares, o *VDR* pode ser dividido de acordo com a função de seus domínios (Figura 1). Na região amino terminal existe um domínio A/B de 20 aminoácidos de comprimento. O domínio de ligação do DNA (DBD), ou domínio C, localiza-se entre os aminoácidos 21 e 92. O domínio D ou região vinculadora flexível está aproximadamente entre os aminoácidos 93 e 123. Ao lado deste, encontra-se o domínio E/F ou domínio de ligação, situado entre os aminoácidos 124 e 427 (JONES *et al.*, 1998).

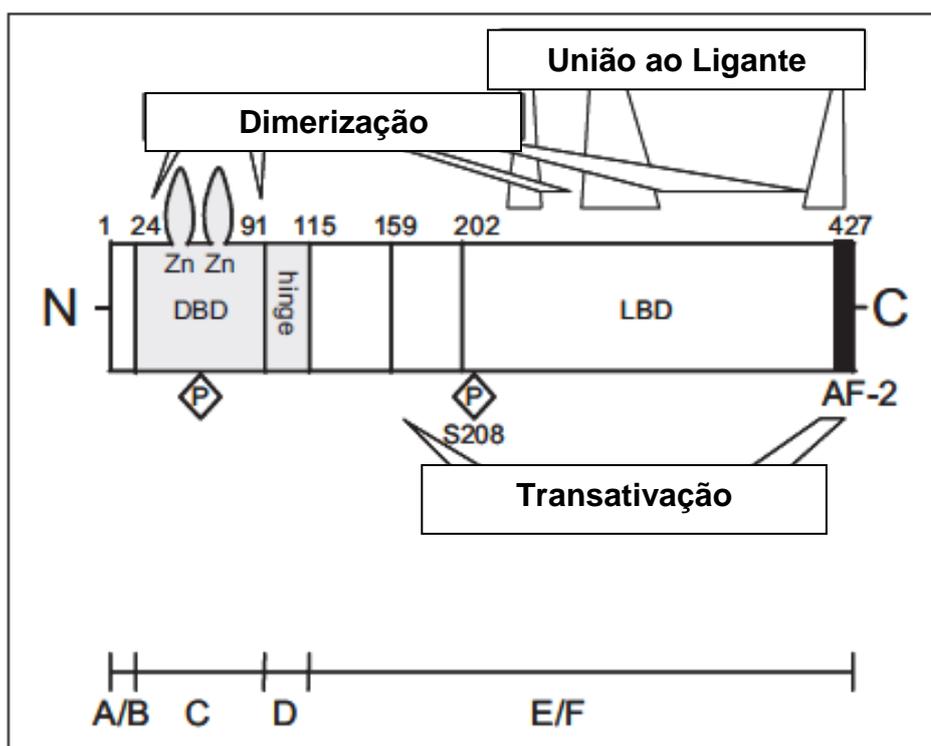


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA E DOMÍNIOS DO VDR
 NOTA: A/B, região aminoterminal; C, DBD; D, região vinculadora flexível; E/F, domínio de ligação.
 FONTE: adaptado de Bouillon (2008).

2.2.1 Domínio A/B

O domínio aminoterminal A/B varia muito entre os membros da família dos NHR tanto em relação aos aminoácidos que o compõem, quanto em seu tamanho. No VDR, esta região é mais curta que nos demais receptores hormonais nucleares (NHR) (ARANDA, PASCUAL, 2001).

A remoção deste domínio parece não afetar a união ao ligante, ao DNA ou as propriedades de transativação do VDR (ISSA *et al.*, 1998).

2.2.2 DNA binding domain (DBD) – domínio de ligação ao DNA

Os receptores nucleares hormonais regulam a transcrição através da união à sequências genômicas específicas, conhecidas como elementos de resposta hormonal (HRE). O DBD ou domínio de ligação com o DNA é mediador desta interação, exercendo

papel fundamental na dimerização do receptor. Este domínio, quando isolado, em solução, não sofre dimerização sem um HRE apropriado (HARD *et al.*, 1990).

A estrutura tridimensional desta região está descrita (SHAFFER, GEWIRTH, 2002), e compartilha as mesmas características estruturais dos outros NHR (KHORASANIZADEH, RASTINEJAD, 2001).

O centro do DBD é composto de dois “dedos” de zinco, cada um com quatro moléculas de cisteína, coordenadoras da união dos átomos de zinco. Tanto os átomos de zinco, quanto os resíduos de cisteína são necessários para manter a estrutura tridimensional do núcleo em dupla hélice. A hélice I é responsável pela união específica do HRE no DNA. A hélice II está envolvida na dimerização do receptor (KHORASANIZADEH, RASTINEJAD, 2001).

Existem relatos de alterações nestas regiões do receptor que podem interferir na afinidade e estabilidade do VDR (SHAFFER, GEWIRTH 2002).

A sequência C-terminal do DBD tem influência sobre a dimerização do receptor e também sobre a afinidade e especificidade de ligação (SHAFFER, GEWIRTH, 2002). E ainda, tem seu papel no acúmulo do VDR no núcleo celular (LUO *et al.*, 1994).

2.2.3 *Ligand Binding Domain* (LBD) - domínio de união ao ligante

O LBD ou domínio de união ao ligante é um domínio globular multifuncional. É responsável pela união hormonal, fundamental para a dimerização e interação com correpressores e coativadores, e juntos, são considerados elementos críticos para a regulação das atividades transcricionais (HSIEH *et al.*, 1998, WEATHERMAN *et al.*, 1999).

Este domínio pode apresentar três estruturas distintas, dependendo do tipo de ligante que se une ao sítio de ligação; apo-receptor (receptor sem ligante), holo-agonista (ligante agonista) e holo-antagonista (ligante antagonista) (NAYERI, CARLBERG, 1997; MORAS, GRONEMEYER 1998). Existe uma grande diferença conformacional entre os apo e os holo-receptores, que sugerem que a união hormonal leva a mudanças estruturais nos LBD. As mais expressivas são vistas no segmento C-terminal da hélice 12, que é completamente reposicionada com a união ao ligante (BOURGUET *et al.*, 1995; MORAS, GRONEMEYER, 1998; BLONDEL *et al.*, 1999; EGEA *et al.*, 2000).

Esta alteração estrutural gera um receptor transcricionalmente ativo por romper uniões com correpressores e leva à formação de uma superfície que permite a interação com moléculas coativadoras (DARIMONT *et al.*, 1998, NOLTE *et al.*, 1998, SHIAU *et al.*, 1998).

Quando a hélice 12 está situada em uma posição diferente, não ocorre a união com coativadores, o que leva, por consequência, à inativação da transcrição (BRZOZOWSKI *et al.*, 1997, SHIAU *et al.*, 1998, PIKE *et al.*, 1999, BOURGUET *et al.* 2000).

À cristalografia do LBD da *VDR*, observa-se que a hélice 12, cuja posição é crítica para a união com coativadores e fatores de transcrição, tem dois pontos de contato com o grupo metil da 1,25-(OH)VD. Tais ligações são estabilizadas por resíduos de aminoácidos das hélices 3, 5 e 11. Alguns destes resíduos interagem diretamente com a 1,25-(OH)VD, sugerindo que esta pode controlar a posição da hélice 12 (ROCHEL *et al.*, 2000).

2.2.4 *Hormone response element* (HRE) - elemento de resposta hormonal

Receptores hormonais nucleares regulam a transcrição através da união aos HRE, ou elementos de resposta hormonal, localizados na região 5' do gene alvo. Os HRE são compostos por duas sequências hexaméricas (ARANDA, PASCUAL 2001).

A diversidade entre os HRE se dá pela distância entre estas sequências. De acordo com o número de pares de bases que separam as cadeias, são conhecidos como DR1 (1 par), DR2 (2 pares), DR3 (3 pares) e assim por diante (UMESONO *et al.*, 1991; MANGELSDORF, EVANS, 1995; ZHAO *et al.*, 2000). Este é o fator chave para a identificação, contribuindo para a especificidade de união.

A inserção de apenas um par de base neste espaço ocasiona modificações estruturais que rompem as interações proteína-proteína e proteína-DNA (RASTINEJAD *et al.*, 2000). Tais alterações dependem mais da distância entre as cadeias de HRE que da composição da sequência entre as mesmas (ZHAO *et al.*, 2000; KHORASANIZADEH, RASTINEJAD, 2001; RASTINEJAD 2001).

Vários HRE naturais foram identificados, e na maioria dos casos, são do tipo DR3, que é a estrutura preferencial para o sítio de união do *VDR*. Entretanto, outros tipos,

como o DR4 e DR6 tem demonstrado atividade funcional (CALBERG *et al.*, 1993, SCHRÄDER *et al.*, 1995).

2.2.5 Mecanismos de ação do VDR

As vias moleculares envolvidas na ação biológica da VD não são totalmente conhecidas. A clonagem molecular do VDR demonstrou que a VD exerce funções como muitos outros hormônios esteróides, ligando-se e ativando fatores de transcrição nucleares (HAUSSLER *et al.*, 1998).

Existem mais de 2700 sítios de ligação para o receptor da vitamina D ao longo do genoma, localizados próximo a genes associados à suscetibilidade para doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, doença de Crohn, lúpus e artrite reumatóide, e para doenças neoplásicas, como a leucemia linfocítica crônica e o câncer colorretal (RAMAGOPALAN *et al.*, 2010).

Estudos indicam que a VD regula, direta ou indiretamente, um grande número de genes (0,8-5% do genoma total) e que está envolvida em diversas funções celulares, como na regulação do crescimento celular, no reparo do DNA, na diferenciação, apoptose e transporte de membrana (WALTERS, 1992).

Existem duas vias de ação da VD. A via genômica é ativada pela ligação do hormônio com o VDR nuclear. Estes receptores se ligam a sequências regulatórias dos genes-alvo, modulando a atividade transcricional da região promotora. A via não genômica seria ativada, supostamente, pela ligação da VD a um receptor de membrana não clássico (mVDR), levando a uma sequência de alterações intracelulares transitórias, com duração de segundos ou minutos, não dependentes da síntese de proteínas. Seus efeitos envolvem alterações transitórias no transporte transmembrana de íons como o cálcio ou algumas vias de transdução de sinais (AMPC, calmodulina, etc.) (WALTERS, 1992). Nessas vias, ocorre alteração da atividade de determinadas proteínas celulares, envolvidas na produção das respostas celulares.

Provavelmente as vias genômica e não genômica são complementares, uma vez que a ativação de segundos mensageiros fosforila (ativa) e amplifica as atividades genômicas do VDR (BOUILLON *et al.*, 2008).

A vitamina D é mais flexível que os demais hormônios. Esta flexibilidade resulta em uma grande variabilidade conformacional proteica. A princípio, esta diversidade

conformacional molecular aumenta a disponibilidade para a ligação com receptores nucleares e de membrana, para mediar tanto as respostas biológicas rápidas quanto as genômicas (NORMAN *et al.*, 2001).

Conformações diferentes tornariam os receptores capazes de se ligarem a diferentes análogos gerando diferentes funções em diferentes órgãos alvo (CARLBERG *et al.*, 2001).

2.3 GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA “D”

O *VDR* humano é produto de um único gene, localizado no braço longo do cromossoma 12 (LABUDA *et al.*, 1992). É composto de 11 exons, e somado aos seus introns, chega à 75 kb. A parte terminal não codificante 5' tem 3 exons (1A, 1B e 1C). Oito exons adicionais (de 2 à 9) codificam a porção estrutural do produto do gene. A sequência promotora está localizada anteriormente ao exon 1A, é rica em GC e não contém um “TATA box” evidente. Um detalhe exclusivo do gene *VDR* é um exon adicional (V), que não existe em outros genes de NHR. Este exon codifica um peptídeo de inserção de cerca de 40 aminoácidos que se localiza no LBD do receptor (MIYAMOTO *et al.*, 1997).

2.3.1 Polimorfismos do gene do *VDR*

O DNA humano é composto de aproximadamente de 3,3 bilhões de pares de bases. Cerca de 3% do genoma consiste em sequências codificantes, e há 30.000 - 40.000 genes codificadores de proteínas. Ao comparar dois indivíduos não aparentados, 99,9% da sequência do DNA é idêntica. Os 0,1% restantes consistem em variações ou polimorfismos na sequência do DNA. Existem diversos tipos de variações, e são classificadas de diferentes maneiras, como por exemplo, pela natureza física da variação da sequência, pelo efeito sobre a formação da proteína e pela susceptibilidade associada a uma doença (FERRAREZI, 2011).

Essas variações estáveis e transmitidas de maneira mendeliana são o substrato molecular da diversidade fenotípica dos indivíduos. A possibilidade de detectar esses polimorfismos do DNA genômico fornece um conjunto de marcadores que torna possível

Este polimorfismo, também referido como o polimorfismo do códon de início (SCP) foi posteriormente definido usando a enzima de restrição FokI em um teste RFLP. Assim, duas variantes de proteína podem existir correspondentes aos dois sítios de início disponíveis: uma versão longa da proteína *VDR* (o alelo "T" ou o alelo "f", e também conhecido como a forma M1, ou seja, a metionina em primeira posição) e uma proteína mais curta em três aminoácidos (o alelo "C" detectado como o alelo "F"; também conhecido como a forma M4, ou seja, a metionina na quarta posição) (ARAI *et al.*, 1997).

Uma abordagem mais detalhada para estudar os polimorfismos poderia determinar a ordem dos pares de base de uma mesma sequência do gene do *VDR* em um grupo de indivíduos diferentes.

Na análise da região codificante do gene do *VDR* em 59 indivíduos com tumores da paratireoide, não foram relatados polimorfismos além dos já descritos TaqI e FokI. Porém foram encontrados dois polimorfismos intrônicos perto dos exons 2 e 8 (BROWN *et al.* 2000).

Outro polimorfismo do *VDR*, encontrado por análise da sequência determinada é o CDX2. Foi relatada uma variação G-A da sequência na região promotora 1a do gene do *VDR* em japoneses (ARAI *et al.*, 2001). O polimorfismo G-A está em um sítio de ligação para um fator de transcrição intestinal específico, chamado CDX2 (YAMAMOTO *et al.*, 1999). Posteriormente, demonstrou-se que o polimorfismo CDX2 situa-se no promotor 1e do *VDR* (FANG *et al.*, 2003).

Alguns outros polimorfismos foram encontrados na área do promotor, incluindo exons internos e vizinhos de 1F-1C, e 2-9, e na região 3' não traduzida (3'UTR) (UITTERLINDEN *et al.*, 2004).

Parece que os polimorfismos ocorrem mais em áreas de regulação que em exons de codificação. Variações na sequência de proteína podem resultar em grandes efeitos funcionais, tal como mudanças na afinidade com o ligante. É provável que estas sejam variações polimórficas e que variações populacionais existam em áreas do gene que regulam o nível de expressão, tais como a região 5' do promotor e da região 3' não traduzida (UITTERLINDEN *et al.*, 2004).

Muitas das mutações do gene do *VDR* humano causadoras de resistência à VD e raquitismo se devem à mutações na região codificadora do *LBD*, pois dificultam ou impedem a ligação da 1,25 - (OH) 2D (SZPIRER *et al.*, 1991; MALLOY *et al.*, 1999)

O *VDR* está ativamente se deslocando entre o citosol e o núcleo, mutações genéticas que afetam os mecanismos desta translocação também podem prejudicar o funcionamento do *VDR*.

Mutações que causam deleção em uma sequência do gene, *frameshift* (nucleotídeos modificados, traduzidos em aminoácidos diferentes), *splicing* (sequências interpretadas como novo ponto de corte do DNA), ou códons de terminação prematuros, destroem tanto a expressão quanto a atividade de ligação, e assim, anulam o funcionamento do *VDR* (HOCHBERG, 2003; MALLOY, FELDMAN, 2003).

Uma variante polimórfica, sem os três primeiros aminoácidos na porção amino terminal do domínio A/B do *VDR*, aumenta sua potência de transativação devido a uma melhor interação com um fator de transcrição (JURUTKA *et al.*, 2000). Os dois dedos de zinco do DBD são absolutamente essenciais porque muitas mutações nesta região causam resistência ao *VDR* em crianças.

Esta região também é importante para a translocação nuclear da *VDR* (HSIEH *et al.*, 1998). A região da dobradiça do *VDR* é 20-50 aminoácidos mais longa que na maioria dos demais NHRs e é importante para a flexibilidade do *VDR* por permitir tanto a interação DNA através do DBD, como também pela interação do LBD com as proteínas coativadoras (ROCHEL *et al.*, 2000).

2.4 RELAÇÃO DA VITAMINA “D” COM AS DOENÇAS ALÉRGICAS

2.4.1 VD e asma

Estudos demonstram que a deficiência de VD associa-se com padrões epidemiológicos observados na “epidemia” de asma. Por exemplo, a deficiência, é mais comum em obesos, afro-americanos e populações ocidentais, e coincide com a população que tem maior risco também para asma. Existem evidências de que a VD pode exercer função sobre a responsividade das vias aéreas, função pulmonar, controle da asma, e talvez, relacione-se com a resistência aos corticosteroides (SANDHU, CASALE, 2010).

Revisões sistemáticas e meta-análises mostram o potencial benefício do uso de VD na asma (SANDHU, CASALE, 2010; NURMATOV *et al.*, 2011; GINDE,

SUTHERLAND, 2010). Contudo, atualmente não se dispõe de evidência nível “A” sobre a função da VD sobre as doenças alérgicas (ALLAN, DEVEREUX, 2011).

Avaliação realizada com mais de 14.000 indivíduos, determinando os níveis séricos de VD e função pulmonar, demonstrou que maiores concentrações da vitamina estão relacionadas a maior volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada. Neste grupo, encontrou-se menores níveis séricos de VD em negros não hispânicos, méxico-americanos e fumantes (BLACK, SCRAGG, 2005).

O segmento de uma coorte pediátrica, de casos e controles, com quase mil asmáticos, mostrou que estes têm níveis menores de VD (EHLAYEL *et al.*, 2011).

Alguns mecanismos de ação da VD sobre as doenças alérgicas têm sido propostos. Em experimento com cobaias *knock out* para o gene do *VDR* se observou o desenvolvimento acelerado de mastócitos e que a interação VD-*VDR* exerce função importante na diferenciação, maturação e função deste tipo celular (BARONI *et al.*, 2007).

A VD estimula as células T regulatórias a produzir mais IL-10 inibindo o perfil Th2 e parece reverter o defeito de produção de IL-10 em asmáticos resistentes ao tratamento com corticóides (CTC).

É proposto que em indivíduos que tem baixa exposição solar, dieta inadequada, ou pertencem a população de risco para deficiência de VD, exista um meio com menor concentração de IL-10, o que leva a maior inflamação da via aérea, e, além disto, resistência aos CTC (Figura 3). Níveis baixos de VD estimulam a proliferação do músculo liso bronquial e a liberação de citocinas proinflamatórias, levando a obstrução e hiperresponsividade brônquica (SANDHU, CASALE, 2010).

O momento em que ocorre a exposição à VD (ou falta dela) parece ter importantes implicações sobre a forma como células do sistema imunológico respondem. Linfócitos T *naive* do cordão umbilical podem se comportar de maneira diferente das células T adultas do sangue periférico a esta exposição.

Em uma coorte composta por 1194 duplas de mães com seus filhos, avaliou-se a ingestão materna de VD durante a gravidez a partir de questionário validado de frequência e hábito alimentar. O resultado observado foi maior incidência de sibilância recorrente aos 3 anos nos filhos de mulheres que referiram dieta mais pobre nesta vitamina (CAMARGO *et al.*, 2007).

Na avaliação de 616 crianças asmáticas da Costa Rica, comparou-se níveis séricos de VD, marcadores de alergia e gravidade da asma. Níveis elevados de VD estiveram associados à menor eosinofilia periférica, menor IgE total, menor pápula no *prick test* e menor índice de internamentos e uso de CTC nas crises. Entre os indivíduos estudados 28% tinham níveis subótimos de VD. Contudo, ainda que a exposição seja supostamente intensa na Costa Rica, devido a sua localização geográfica, a pele bronzeada, do indivíduo que tem exposição solar constante, pode dificultar a produção cutânea da vitamina (BREHM *et al.*, 2009).

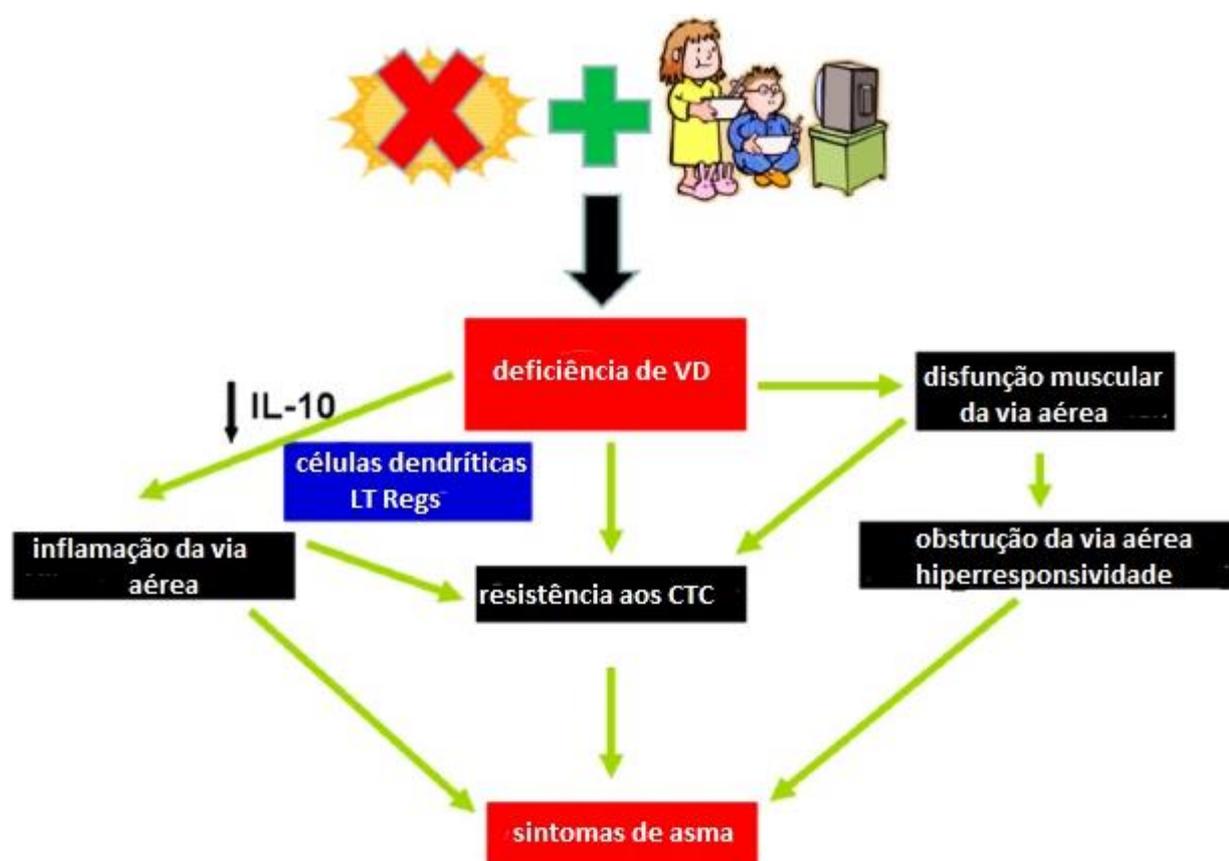


FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DA HIPÓTESE QUE INDICA POSSÍVEIS EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE VD NA PATOGÊNESE DA ASMA

FONTE: adaptado de Sandhu (2010).

Seguindo a tendência, uma coorte da Nova Zelândia, acompanhada desde 1997, avaliou amostras de sangue do cordão umbilical, armazenadas no momento do parto.

Este estudo também demonstrou efeito benéfico da VD sobre a asma em crianças. Foi observada, neste grupo, associação entre maiores níveis de VD no cordão e menor risco de infecções respiratórias aos 3 meses de idade, e também, menor risco de sibilância aos 15 meses, 3 e 5 anos (CAMARGO *et al.*, 2011).

Por outro lado, avaliação similar em adolescentes, concluiu que a suplementação com óleo de fígado de bacalhau (fonte de VD) antes dos 15 anos, se associa com maior frequência de asma e rinite (HUGHES *et al.*, 2011).

Ainda que níveis de VD no cordão possam explicar o risco de sibilância alguns anos mais tarde, os níveis maternos de VD durante a gestação podem alterar o desenvolvimento do sistema imunológico intra-útero ou ainda, nos primeiros meses de vida (SANDHU, CASALE, 2010).

Existe um crescente interesse nas ações da VD sobre o sistema imunológico e as doenças alérgicas. Em uma rápida pesquisa no banco de dados MEDLINE®, com os termos *vitamin D + asthma*, foram encontrados 252 artigos publicados até o dia da pesquisa (15/03/2012) e houve um aumento nos últimos anos (Figura 4). Alguns dos artigos originais utilizados para elaboração desta revisão estão dispostos no quadro 2.

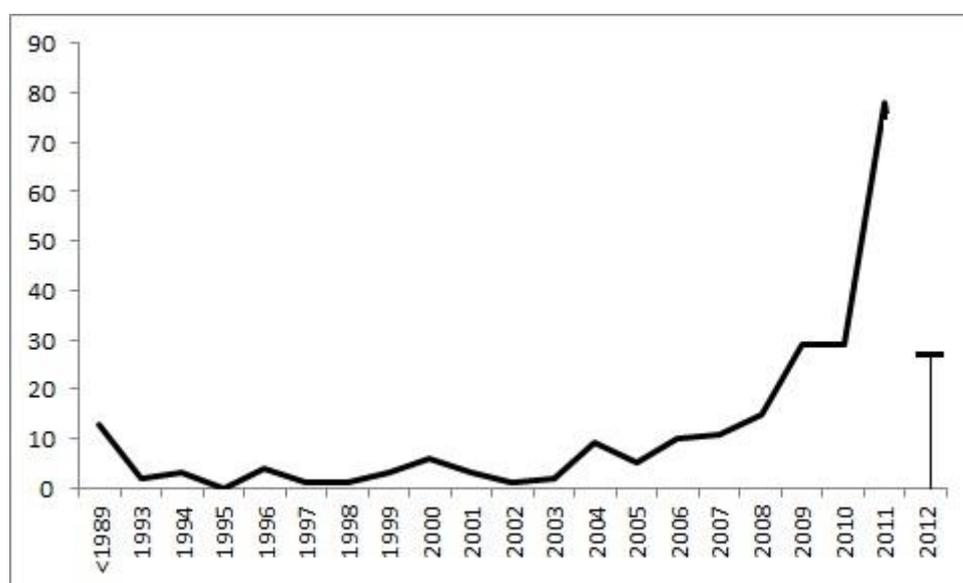


FIGURA 4 – ARTIGOS PUBLICADOS, POR ANO, DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS MEDLINE®, ATÉ O DIA 15/03/2012

NOTA: Termos pesquisados: Vitamin D + Asthma. Total 252 artigos. Entre janeiro de 2012 até o dia 15/3/2012 já haviam sido publicados 27 artigos.

FONTE: O autor (2012).

Continua

QUADRO 2 – RESUMO DE ALGUNS ARTIGOS ORIGINAIS UTILIZADOS NESTA REVISÃO

ANO	1º AUTOR	POPULAÇÃO	MÉTODO	RESULTADOS
2006	Kull	4089 RN	IgE específica, follow up, questionário	Suplementação com VD e A hidrossolúveis aumenta 2x o risco de asma e sensibilização alérgica, à idade de 4 anos comparada com a suplementação de óleo de amendoim
2007	Camargo	1.1511.534 prescrições de EpiPen®	Prescrição e venda por estado americano	Existe um gradiente norte-sul para a prescrição de EpiPen® nos EUA. Sugere que a menor exposição solar pode estar relacionada com maior incidência de anafilaxia.
2009	Bäck	123 crianças	Inquérito alimentar e follow-up	Maior consumo de VIT D3 na infância esta associado a maior risco de DA aos 6 anos.
2009	Hyppönen	9377 adultos	25(OH)D3 + questionário	Comparado com indivíduos com níveis normais (100-125 nmol/l), aqueles com VD < 25nmol/L tem níveis de IgE 29% superior e os com níveis >135nmol/L, 56% superior.
2009	Majak	54 crianças asmáticas alérgicas à ácaros	Randomizado Duplo cego, Placebo 3 grupos: IT + Placebo IT + CTCVO IT + CTCVO + VD	A IT com CTCVO parece prejudicar a indução de linfócitos T reguladores, prejudicando a imunoterapia. Este efeito não se observa no grupo CTC+VD. A VD parece anular esta influência negativa do CTC sobre a IT.
2009	Brehm	616 crianças	IgE sérica, Função pulmonar, crises de asma, 25(OH)D	Baixos níveis de VD estão associados à mais hospitalizações, maior resposta ao BD e maiores níveis de IgE.
2010	Gorman	Ratos	Lavado bronco-alveolar	1,25(OH)2D3 aumenta a capacidade do linfócito T CD4+, CD25+ em suprimir a resposta TH2.
2010	Camargo	922 RN	Sangue do cordão, questionário, follow up	Níveis de 25(OH)D no cordão tiveram relação inversa com risco de infecção respiratória e sibilância na infância.
2010	Sutherland	54 adultos asmáticos	25(OH)D, Função pulmonar BP resposta à dexta (MKP-1)	Em asmáticos, maiores concentrações de VD estão associadas com melhora da função pulmonar, menor hiperresponsividade e melhor resposta aos CTC.
2010	Vassalo	1002 crianças	Revisão de prontuários de indivíduos com reação alérgica alimentar	Alergia alimentar é mais comum em crianças de Boston nascidas no outono e inverno.
2010	Nwaru	931 crianças	Coorte, follow up	Consumo de frutas cítricas na gestação pode aumentar risco de sensibilização da prole, enquanto a suplementação com VD pode ter efeito benéfico.
2010	Brehm	1024 crianças asmáticas	25(OH)D3 sérica, e clínica	Insuficiência de VD é comum em asmáticos e prediz mais exacerbações no período de 4anos Suficiência de VD confere proteção contra exacerbações graves.

2010	Urashima	234 crianças	Randomizado duplo-cego, com placebo	Suplementação de VD durante o inverno pode reduzir a incidência de Influenza A.
2011	Hughes	353 adultos	Enquete e Laboratório	A relação inversa entre diagnóstico de asma e latitude não é decorrente da exposição à radiação UV mas pode ser explicado por outros fatores como a temperatura. Óleo de fígado de bacalhau antes dos 15 anos está associado com maior frequência de asma e rinite.
2011	Ehlayel	976 crianças	Caso-controle, clínica e laboratório	Asmáticos tem menores níveis de VD. Deficiência de VD é maior entre indivíduos com asma, DA, rinite, urticária e alergia alimentar.
2011	Sharief	6590 adultos e crianças	Enquete e laboratório	Deficiência (<15 ng/mL) 25(OH)D está associada à maior sensibilização IgE mediada em crianças e adolescentes.
2011	Majak	48 crianças	Prospectivo, ATAQ, VEF1, 25(OH)D sérica.	Asmáticos recebendo CTCI tiveram queda dos níveis de VD em 6 meses Asmáticos recebendo CTCI + VD tiveram menos exacerbações e discreto aumento dos níveis de VD.
2011	El-shazly	16 adultos	Cultura de células NK	NK produz menos IL8 na presença de VIT D3.
2011	Peroni	37 crianças	SCORAD	Altos níveis de VD estão associados à menor SCORAD na DA.
2011	Hartmann	Ratos	Cultura de linfócitos B	Calcitriol e outro agonista do VDR diminui intensamente a produção de IgE por Linfócitos B periféricos.
2011	Alyasin	100 crianças	Caso-controle 25(OH)D e função pulmonar	Relação inversa entre níveis de VD e valores da função pulmonar.
2012	Arshi	50 adultos	Sem controles Comparação com estudos publicados	Menores níveis de VD entre pacientes com rinite. Menores níveis de VD entre mulheres

NOTA: RN - recém-nascido; NK - *natural killer*; DA - dermatite atópica; SCORAD - escore de dermatite atópica; ATAQ – questionário de avaliação de tratamento da asma; BD - broncodilatador; BP - broncoprovocação; dexam - dexametasona; CTC - corticóide; , CTCVO - corticóide via oral; CTCI - corticóide inalatório; IT - imunoterapia

FONTE: O autor (2012).

2.4.2 Dermatite atópica (DA)

A dieta materna pobre em VD está associada com maior prevalência de eczema em sua prole (WILLERS *et al.*, 2007). Contrariamente, a maior ingestão de vitamina D3 no primeiro ano de vida da criança foi associada com maior frequência do diagnóstico de atopia aos 6 anos (BÄCK *et al.*, 2009).

Na avaliação dos níveis séricos de VD em indivíduos com DA, encontrou-se que, maiores índices no SCORAD, ou seja, maior intensidade de sintomas, estão associados a menores concentrações da vitamina. Esta relação pode ser observada graficamente na figura 5 (PERONI *et al.*, 2011).

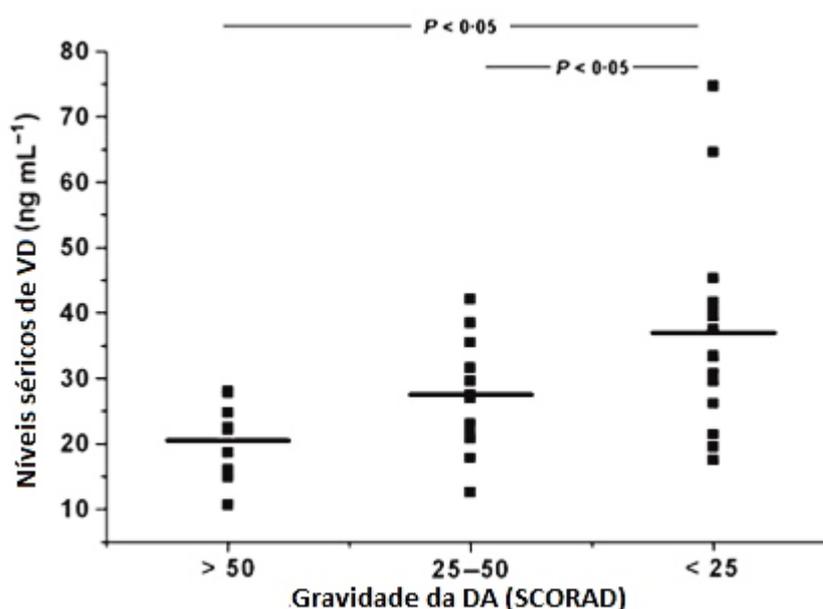


FIGURA 5 – NÍVEIS SÉRICOS DE VD EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DO SCORAD

NOTA: As linhas horizontais indicam os valores médios de cada grupo.

FONTE: adaptado de Peroni (2011).

Um dos mecanismos de atuação da VD na DA está relacionado com a produção e funcionamento das catelicidinas. Estas pertencem à família de peptídeos antimicrobianos (SCHAUBER, GALLO, 2008) e estão envolvidas na resposta imunológica aos vírus, bactérias e fungos (BRAFF, GALLO, 2006; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2005). Também agem sinergicamente com mediadores inflamatórios endógenos para incrementar a indução de efetores inflamatórios específicos de várias outras vias (YU *et al.*, 2007). Como resultado, as catelicidinas podem aumentar a migração celular e secreção de quimocinas e outras moléculas sinalizadoras das células ativadas (SCHAUBER, GALLO, 2008; NIYONSABA, 2007). Na pele saudável e íntegra, a produção de catelicidina acontece em pequenas quantidades. A lesão ou infecção tissular estimulam a atividade da 1-alfa-hidroxilase (CYP27B1) de monócitos e queratinócitos a ativar mais VD localmente, o que estimula a expressão e atividade das

catelicidinas (Figura 6) (SCHAUBER *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2006). Vários grupos de pesquisa têm comprovado esta influência da vitamina D sobre a produção de catelicidinas pelos queratinócitos (WANG *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2005).

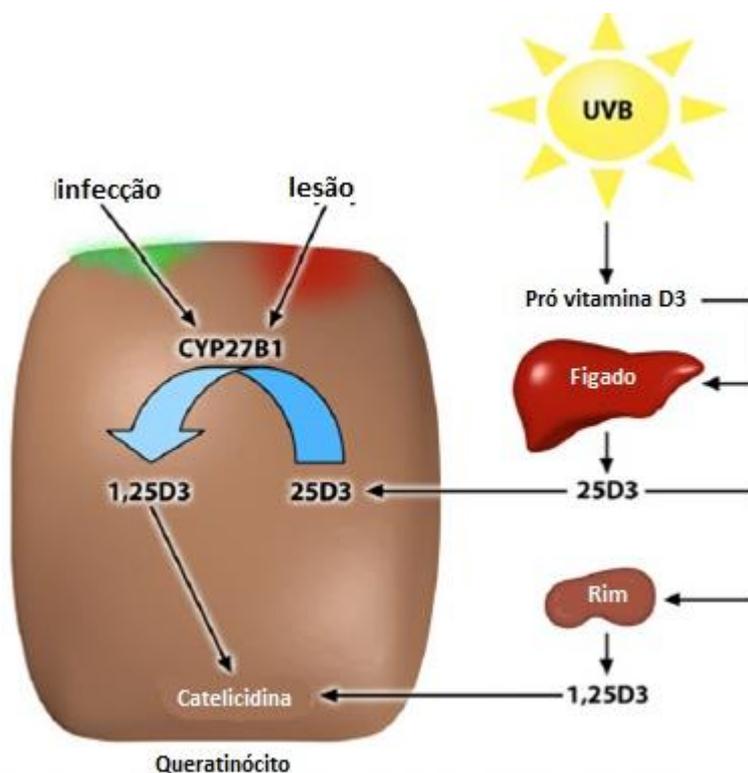


FIGURA 6 – MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DA VD3 E RESPOSTA DA CATELICIDINA

NOTA: O metabolismo extra-renal da VD3 pelos queratinócitos fornece um sistema para o rápido controle da expressão da catelicidina. A ativação da 25D3 em 1,25D3 requer 2 passos de hidroxilação que ocorrem sequencialmente no fígado e no rim. Entretanto, queratinócitos também expressam uma 1-alfa-hidroxilase (CYP27B1) que ativa a 1,25D3. A expressão desta hidroxilase nos queratinócitos é estimulada pela lesão e infecção tecidual.

FONTE: adaptado de SCHAUBER (2007).

Devido aos potenciais efeitos da VD em suprimir a resposta inflamatória e aumentar a atividade dos peptídeos antimicrobianos, sua suplementação pode ser uma intervenção útil no tratamento da dermatite atópica (HATA *et al.*, 2005).

2.4.3 Alergia alimentar e anafilaxia

Na alergia alimentar, a hipótese de maiores níveis de VD estarem associados a menores índices de alergias, não encontra respaldo. À exemplo, existem relatos de que,

em comunidades agrícolas alemãs com menor suplementação alimentar de VD, existe menor prevalência de doenças alérgicas. Tal argumento foi reforçado com a observação do aumento da frequência de diagnóstico de alergias na Baviera após 1960. À época, implantou-se um programa de suplementação alimentar de VD no país, visando combater o raquitismo (WIJST, 2005).

Em coorte de recém-nascidos, que receberam suplementação de VD nos primeiros meses de vida, observou-se risco aumentado de desenvolver alergia alimentar (MILNER *et al.*, 2004).

Porém, alguns autores afirmam que é possível que a correção da deficiência de VD possa estimular a imunidade da mucosa intestinal, promover uma ecologia microbiana mais saudável e também a aumentar a tolerância aos alérgenos em indivíduos com alergia alimentar (VASSALLO, CAMARGO, 2010).

Quanto à anafilaxia, em uma tentativa de explicar sua associação com os níveis séricos de VD, um grupo avaliou as taxas regionais de prescrições de um auto-injetor de adrenalina (EpiPen) no ano de 2004 em todos estados dos EUA. Com o número médio de prescrições por habitante notou-se que em estados da região nordeste (Connecticut, Rhode Island, Massachusetts, Vermont, New Hampshire) ocorreram as maiores frequências, com 8 à 12 prescrições para cada 1000 habitantes.

Enquanto isto, nos estados do sul e na Califórnia e Mississippi, foram prescritas 3 receitas para cada grupo de 1000 habitantes. O esquema dos resultados pode ser observado na Figura 7.

Este estudo demonstrou um gradiente norte-sul para a prescrição destes dispositivos nos Estados Unidos e serviu de base para formular-se a hipótese de que onde mais se prescreveu EpiPen®, ocorre menor exposição solar, e que tal fato poderia, de alguma forma, estar relacionado com maior incidência de anafilaxia. Nesta hipótese sugere-se relação com a menor produção cutânea de VD e assim, menores níveis séricos (CAMARGO *et al.*, 2007).

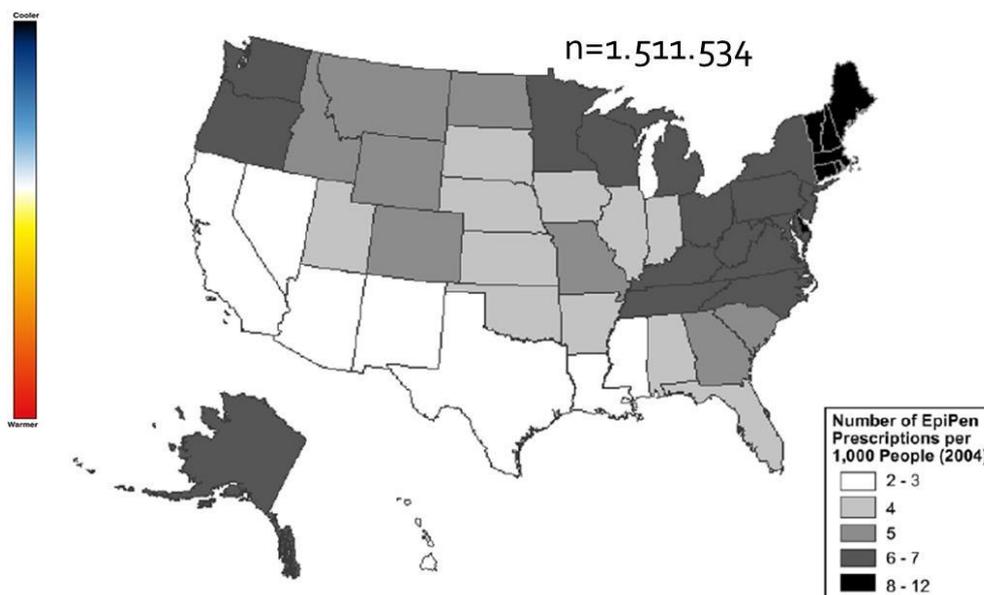


FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS PRESCRIÇÕES DE AUTO-INJETOR DE ADRENALINA NOS EUA EM 2005

NOTA: observa-se um gradiente norte-sul, que pode estar associado à exposição solar.

FONTE: adaptado de Camargo (2007).

2.4.4 Imunoterapia

Poucos estudos relacionam VD com imunoterapia (IT). Um deles avaliou a influência dos CTC orais e da VD sobre os primeiros efeitos clínicos e imunológicos de IT. Asmáticos sensíveis a ácaros foram divididos em grupos e recebiam os medicamentos 3 a 4 horas antes da dose de imunoterapia, na fase de indução. Após 12 meses de IT subcutânea, a média diária da dose corticóide inalado foi reduzida em 25% no grupo que recebia apenas CTC. Já no grupo controle houve 50% redução da dose de CTC.

A intervenção com CTC pode dificultar a indução de linfócitos T reguladores. Tal efeito não foi observado no grupo que recebeu CTC associado à VD. Assim, postula-se que a VD anula a influência negativa do CTC sobre a IT, aumentando a expressão de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF-beta (MAJAK *et al.*, 2009).

2.4.5 VD e o sistema imunológico

A VD pode exercer sua função em vários sistemas, visto que seu receptor foi localizado em vários tecidos do organismo incluindo as células mononucleares do sangue periférico, células dendríticas e linfócitos T (BHALLA *et al.*, 1983; BRENNAN *et al.*, 1987).

A forma hormonal da vitamina D3, a 1,25 (OH) 2D3, inibe a linfocina promotora de crescimento (IL-2), que é produzida pelos linfócitos T humanos ativados *in vitro* pelo mitógeno fitohemaglutinina (TSOUKAS, 1984).

Tem sido observado que esta vitamina diminui a proliferação de linfócitos Th1 e Th2, reduz a produção de intérferon gama, IL-5 e aumenta a produção de IL-4 (MAHON *et al.*, 2003).

A VD tem efeitos inibitórios sobre os LT *naive* na produção de IFN-gama induzido por IL-12, assim como a produção de IL-4 e IL-13 induzida por IL-4 (PICHLER *et al.*, 2002). Com isto, em indivíduos com deficiência de VD, existe favorecimento à predominância da resposta Th1 e em indivíduos com altos níveis de vitamina D, além de ocorrer a supressão dos efeitos Th1, também pode ocorrer o incremento das respostas Th2 (BOONSTRA *et al.*, 2001).

Em modelos murinos de inflamação eosinofílica pulmonar, quando os animais são tratados precocemente com VD, ocorre a proliferação de células T induzida por alérgenos e no lavado broncoalveolar, observa-se recrutamento deficiente de eosinófilos, diminuindo a resposta inflamatória alérgica (MATHEU *et al.*, 2003).

No entanto, estes resultados variáveis podem estar relacionados com a dose de VD, com os níveis séricos desta vitamina e com o momento em que ocorre a exposição (LT *naive*, LT maduros).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional analítico transversal, com coleta de dados prospectiva, realizado pela análise dos dados clínicos obtidos de prontuários de pacientes em acompanhamento por asma em ambulatório especializado assim como da análise bioquímica e genética dos indivíduos envolvidos.

3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

O período de inclusão e coleta de amostras foi de junho a dezembro de 2010 para o grupo de casos, realizado no ambulatório do Serviço de Alergia do HC-UFPR. Os controles foram envolvidos no estudo de abril à novembro de 2011 no centro de coleta do Laboratório do HC-UFPR.

As análises genéticas foram realizadas no segundo semestre de 2011 no laboratório de Genética da Escola de Saúde das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL de Curitiba. As bioquímicas em janeiro e fevereiro de 2012 no laboratório PR-ANÁLISE– Análises e Pesquisas Clínicas de Curitiba.

3.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA

A população estudada foi de pacientes de 7 à 14 anos, em acompanhamento no ambulatório do Serviço de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Esta faixa etária foi escolhida por conveniência, uma vez que este ambulatório atende somente à população pediátrica.

A amostra foi selecionada para constituir 2 grupos:

- 1) Indivíduos com diagnóstico de asma persistente, selecionados por conveniência, segundo GINA 2010, em uso de corticóide inalatório para controle,

em dose diária ≥ 400 ug de beclometasona ou o equivalente em outras formulações, por período superior a 1 ano.

2) Indivíduos com diagnóstico de asma intermitente, selecionados por conveniência, sem necessidade de corticóide inalatório para controle, seguindo os mesmos critérios de GINA 2010.

Um terceiro grupo de Indivíduos, sem diagnóstico de alergias, não asmáticos e não atópicos, pareados por idade com os asmáticos, selecionados por aleatoriamente, de acordo com sua chegada, no dia da coleta de exames solicitadas por outros ambulatórios do HC-UFPR. Este grupo foi designado para servir de controle para a presença de polimorfismos do gene *VDR* em não asmáticos.

3.3.1 Critérios de inclusão

Grupo de asmáticos: crianças com idade de 7 à 14 anos, selecionadas por conveniência, em acompanhamento por asma no ambulatório do Serviço de Alergia do HC-UFPR, cujos pais concordaram com sua participação no estudo. A vontade da criança foi respeitada e o termo de assentimento foi obtido quando necessário.

Grupo de não asmáticos (grupo de comparação para os polimorfismos): crianças com idade 7 à 14 anos, selecionadas por conveniência, no dia em que realizavam coleta de sangue para exames de rotina de outras especialidades, e sem critérios para o diagnóstico de asma de acordo com questionário ISAAC. A vontade da criança foi respeitada e o termo de assentimento foi obtido.

3.3.2 Critérios de exclusão

- 1) Indivíduos com diagnósticos de doenças crônicas associadas como nefropatia e doenças reumáticas.
- 2) Não asmáticos que responderam afirmativamente à alguma das perguntas do questionário ISAAC.
- 3) Solicitação de retirada do termo de consentimento.

3.4 PROCEDIMENTOS

No dia da consulta, os pais dos pacientes eram abordados e convidados a participar da pesquisa, de acordo com seu diagnóstico. Após o preenchimento do termo de consentimento, e de assentimento quando cabível, os seguintes procedimentos eram realizados:

- coleta de dados dos prontuários (incluindo resultados de testes alérgicos e de provas de função pulmonar).
- coleta de amostra de sangue.

No caso do grupo de comparação, indivíduos que responderam o questionário ISAAC (Anexo 1) negativamente para todas as perguntas, no dia em que coletavam sangue para exames solicitados por outros ambulatórios do HC-UFPR, foram convidados a participar da pesquisa com amostra de sangue para análise genética e bioquímica.

3.4.1 Dados coletados dos prontuários

O serviço de Alergia Pediátrica utiliza um prontuário padronizado que minimiza a discrepância dos dados avaliados durante a consulta.

Dados pessoais como data de nascimento, gênero e procedência, história familiar de doenças alérgicas, peso, estatura, índice de massa corporal (IMC), diagnósticos e medicamentos em uso foram coletados. Também foram analisados os resultados dos testes alérgicos e espirometrias.

Foram considerados obesos aqueles com IMC superior ao escore Z +2, de acordo com a idade e gênero, conforme a classificação da OMS de 2007.

Os diagnósticos de asma foram realizados utilizando-se os critérios propostos pelo GINA, assim como os tratamentos instituídos. Diagnósticos de urticária, dermatite atópica, rinoconjuntivite e outras alergias foram estabelecidos de acordo com os protocolos disponíveis atualmente.

A história familiar foi considerada positiva na presença de relato consistente de dermatite atópica, urticária, asma ou rinite.

O teste alérgico é realizado rotineiramente nos pacientes e consta das seguintes substâncias: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Lolium perenne*, epitélio de cão, epitélio de gato, *Blattella germânica*, além de controles positivo (histamina) e negativo (solução salina). Os resultados são anotados em milímetros, considerando-se os 2 maiores eixos. Consideram-se positivos aqueles em que o valor médio dos eixos medidos supera em 3 ou mais milímetros o resultado obtido para este cálculo obtido no local do controle negativo.

Os dados de função pulmonar, realizadas rotineiramente, foram obtidos dos prontuários. As espirometrias são realizadas pelo Serviço de Pneumologia do HC-UFPR.

Considerou-se normal o VEF1% e CVF acima de 80% com relação ao predito para cada sujeito do exame.

A prova broncodilatadora é considerada positiva em indivíduos com espirometria normal quando ocorre variação no VEF1% superior a 10% com relação ao valor obtido antes do uso do salbutamol. Para aqueles com diagnóstico de distúrbio ventilatório obstrutivo, considera-se positiva quando a variação é de 7% e de 200 mL.

3.4.2 Descrição do Questionário

O questionário aplicado somente aos indivíduos recrutados para compor o grupo de não asmáticos, destina-se à pesquisa de sintomas de asma, rinite e eczema atópico. Tais questões foram obtidas do questionário padrão ISAAC para escolares de 13 e 14 anos (Anexo 1).

Este instrumento tem como função, questionar sintomas que indiquem asma. Com relação à rinite, distingue indivíduos com e sem rinite na população geral. Estabelece quais indivíduos com rinite são prováveis atópicos e oferece algumas indicações da gravidade da rinite entre os afetados.

A parte do questionário que investiga eczema é considerada como o mínimo de informações a serem obtidas em estudos populacionais de doenças alérgicas de pele em crianças.

Sua validação foi realizada em amplo estudo piloto e definiu-se a forma final do questionário, bem como a sensibilidade de cada questão para o diagnóstico (PEARCE *et al.*, 1993; ISAAC MANUAL, 1993; ASHER *et al.*, 1995). Em Curitiba, foi realizada a validação do questionário na língua portuguesa, que demonstrou alta sensibilidade e

especificidade (ESTEVES *et al.* 1999). As questões utilizadas são descritas a seguir, de forma resumida com a devida justificativa:

1. Você alguma vez teve chio de peito? Esta pergunta é baseada no questionário da *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*. Não menciona a palavra ataques de sibilância para identificar crianças com sintomas respiratórios persistentes que não são obviamente caracterizados como episódios ou crises. Essa parece ser uma questão de muita sensibilidade.

2. Você teve chio de peito nos últimos 12 meses? A limitação a um período de 12 meses reduz erros de memória e torna o trabalho independente do mês de execução. Essa tem sido a pergunta mais útil para se estabelecer a prevalência da doença sibilante (ASHER *et al.*, 1995).

3. Quantos ataques de chio de peito você teve nos últimos 12 meses?

4. Nos últimos 12 meses, em média, quantas vezes seu sono foi interrompido por chio de peito? Essas questões oferecem duas alternativas para quantificar a frequência das crises de sibilância. A dificuldade com o conceito de “ataques” e a dificuldade em quantificar a frequência de asma recorrente, levou à inclusão dessas questões para identificar e quantificar sibilos persistentes.

5. Nos últimos 12 meses, você teve chio de peito tão forte que não podia falar mais de duas palavras entre cada respiração? Existe uma carência de informações epidemiológicas relativas à asma aguda e grave, que é relevante para estudos comparativos internacionais de admissão hospitalar e estatísticas de mortalidade. Esta questão busca suprir essa falha.

6. Você alguma vez teve asma? Todos são questionados sobre história de diagnóstico de asma, pois ocasionalmente a asma pode ser diagnosticada na ausência de sibilos (com base em tosse noturna recorrente, por exemplo).

7. Você teve chio de peito após exercício físico nos últimos 12 meses? Embora esta questão devesse ser colocada como complemento à questão 2, em alguns estudos populacionais foi notado que ela serve para identificar algumas crianças que negam história de sibilância.

8. Nos últimos 12 meses, você teve tosse seca durante à noite, não associada a gripe ou resfriado ou a qualquer outra infecção pulmonar? Tosse noturna é considerada

uma forma alternativa de apresentação da asma, e esta questão foi incluída para aumentar a sensibilidade do questionário, embora sua especificidade em estudos populacionais não esteja esclarecida.

9. Você alguma vez teve problemas com espirros, corrimento de nariz ou nariz trancado, sem estar com gripe ou resfriado?

10. Nos últimos 12 meses, você teve problemas de espirros, corrimento de nariz ou nariz trancado, sem estar com gripe ou resfriado? Estas questões mostraram um valor preditivo de 80% na detecção de rinite em um estudo realizado em adultos (16-65 anos) na cidade de Londres (ISAAC MANUAL, 1993).

11. Nos últimos 12 meses, você teve problemas de nariz acompanhados por olho lacrimejante e coceira nos olhos? Estes sintomas têm alto valor preditivo positivo (78%) na detecção de atopia em indivíduos com rinite sazonal (ISAAC MANUAL, 1993; SIBBALD RINK, 1991).

12. Nos últimos 12 meses, você teve problemas de nariz em quais meses? A alternativa de definir os meses de piora permite separar os indivíduos com sintomas sazonais daqueles com problemas perenes. Pode ser usado em qualquer país, com qualquer clima, com classificação precisa e sem definições subjetivas de sazonalidade. O número de meses que uma pessoa está afetada pode ser usado como indicador quantitativo de gravidade. Exacerbações sazonais tiveram um valor preditivo de 71% na detecção de atopia entre pacientes com rinite perene e sazonal (ISAAC MANUAL, 1993). Para pacientes com rinite alérgica perene a prevalência de atopia foi de 49% (SIBBALD, RINK, 1991).

13. Nos últimos 12 meses, quanto o seu problema de nariz interferiu nas suas atividades diárias? Não obstante esta seja uma questão de medida qualitativa de gravidade bastante grosseira, ela correlaciona-se bem com outros indicadores de morbidade, incluindo relato de gravidade de sintomas, interferência com atividades específicas e procura por serviços médicos.

14. Você alguma vez teve febre do feno? / Você alguma vez teve rinite alérgica? No questionário padrão, a Questão 14, referente à “febre do feno”, foi aplicada a 2.351 escolares e posteriormente substituída pela questão: Você alguma vez teve rinite alérgica? Essa mudança foi necessária para facilitar a compreensão e tentar evitar

falsos resultados, uma vez que durante a aplicação dos questionários observou-se que esta pergunta gerava muitas dúvidas. Essa modificação foi realizada e validada anteriormente em outro projeto de pesquisa (ESTEVES, 1998). A pergunta tem como objetivo investigar a rotulação de rinite em relação à prevalência dos sintomas.

15. Você alguma vez teve grosseirão de pele que vem e vai no intervalo de 6 meses? Esta questão foi avaliada para servir de triagem em um estudo piloto realizado no Reino Unido para discriminar dermatite atópica leve a moderada de um eczema não atópico e outras dermatoses inflamatórias em pacientes atendidos pela primeira vez. A resposta positiva a esta pergunta foi obtida em todos os 36 casos de dermatite atópica em pacientes com idade entre 5 a 19 anos e em 91% de 120 casos de todas as idades. Considerada isolada, teve especificidade de apenas 44% para o grupo de 5 a 19 anos e 48% para todo o grupo estudado (ISAAC MANUAL, 1993).

16. Você alguma vez teve grosseirão de pele com coceira nos últimos 12 meses? Da mesma forma como para asma e rinite, procura-se interrogar apenas aquelas crianças com episódios recentes, para evitar informações incorretas ou esquecidas.

17. Nos últimos 12 meses, você teve grosseirão de pele em alguns dos lugares abaixo? (Nas dobras dos cotovelos ou joelhos, nádegas ou tornozelos, em volta do pescoço, orelhas ou olhos). As Questões 16 e 17 associadas apresentam alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de eczema atópico (WILLIAMS, *et al.*, 1999).

18. Este grosseirão melhorou completamente alguma vez nos últimos 12 meses?

19. Nos últimos 12 meses, em média quantas vezes você acordou por conta do grosseirão de pele e da coceira? Estas duas questões foram incluídas para avaliar a gravidade da dermatite, uma verificando a cronicidade e outra a morbidade (EUROPEAN TASK FORCE ON ATOPIC DERMATITIS, 1993). Uma pergunta sobre a extensão das lesões foi incluída e rejeitada nos estudos piloto.

20. Você alguma vez teve eczema? Esta questão pode ser modificada de acordo com diferentes rotulações que podem aparecer em diferentes países.

3.4.3 Avaliação bioquímica

Foram coletados 10 mL de amostra sanguínea de cada indivíduo, divididos em um frasco sem anticoagulante e outro com anticoagulante (EDTA).

Após a centrifugação a 3000 r.p.m. por 15 minutos, separou-se o soro das amostras sem anticoagulante e o *buffy-coat* (camada de concentrado de leucócitos) para extração de DNA da amostra anticoagulada. As alíquotas foram armazenadas a –70°C, até o momento das análises laboratoriais.

Os participantes foram submetidos a análises bioquímicas, realizadas pelo laboratório PR-ANÁLISE– Análises e Pesquisas Clínicas de Curitiba, utilizando-se os métodos padronizados, conforme consta no Quadro 3. Todos os testes listados foram realizados nas amostras obtidas dos asmáticos enquanto nas amostras do grupo de comparação, apenas foram realizadas as determinações de IgE total e específicas.

QUADRO 3 – EXAMES REALIZADOS NO LABORATÓRIO PARANÁLISE E MÉTODO EMPREGADO

EXAME	MÉTODO
Fósforo	Colorimétrico/automatizado
Cálcio	Colorimétrico/automatizado
Fosfatase alcalina	Enzimático
PTH	Eletroquimioluminescência
Cortisol basal	Quimioluminescência
25(OH)VD	Quimioluminescência
IgE esp <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	ImmunoCAP
IgE esp <i>Blomia tropicalis</i>	ImmunoCAP
IgE esp <i>Lolium perenne</i>	ImmunoCAP
IgE total	Imunológico não competitivo

NOTA: IgE determinada pelo equipamento ImmunoCAP 100®, Phadia. PTH e 25(OH)VD determinadas pelo equipamento Liaison 4000®, DiaSorin. Demais testes determinados pelo equipamento COBAS®, Roche-Hitachi. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de laudo e transcritos para a planilha eletrônica.

FONTE: O autor (2012).

3.4.4 Análise genética

Polimorfismos do gene do *VDR* foram pesquisados nas regiões dos exons 2 e 3 e na região do promotor nas amostras do grupo de asmáticos e nas do grupo de comparação.

3.4.4.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada a partir do buffy-coat (fração de uma amostra de sangue anticoagulado, que após centrifugação em gradiente de densidade, contém a maioria dos glóbulos brancos e plaquetas). A técnica para a obtenção de DNA Foi adaptada e baseia-se nas seguintes etapas (LAHIRI, NURNBERGER, 1991):

- Lise dos núcleos dos leucócitos;
- Precipitação das proteínas;
- Precipitação e ressuspensão do DNA;

Adicionou-se o buffy-coat e 125 μ L do detergente Nonidet P-40. Em seguida, o volume foi completado para 8 mL com tampão TKM1 (Quadro 4) e logo, homogeneizado, para misturar o detergente e iniciar a lise de células. Esta mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos.

O precipitado recebeu o tampão TKM1 para completar o volume de 14 mL, seguido de agitação e centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido com micropipeta, adicionando 800 μ L de tampão TKM2 (Quadro 4). Esta mistura foi transferida para um microtubo de 1,5 ml e recebeu a adição de 50 μ L de SDS a 10% e em seguida, incubado em banho-maria a 55°C por 12 horas.

Após a incubação, foi adicionado 300 μ L de NaCl saturado (6M) e foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido, que continha o DNA, foi transferido para um tubo de ensaio e recebeu 2 volumes de etanol 100% a -20°C. O tubo de ensaio foi invertido várias vezes, até a precipitação do DNA.

O DNA obtido foi retirado do tubo de ensaio, lavado com etanol 70% a 4°C e transferido para um microtubo de 1,5 ml, e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O

sobrenadante foi descartado e amostra de DNA foi seca em temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA foi ressuspensionado em 100 μ L de solução tampão TE e incubado em banho-maria até entrar em solução.

3.4.4.2 Determinação da concentração de DNA

As concentrações de DNA contida em cada amostra foi determinada por espectrofotometria, em densidade óptica a 260 nm e 280 nm, e logo, e em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C .

QUADRO 4 – SOLUÇÕES ADOTADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

TKM 1		
Componente	Concentração	Volume
Tris-HCl pH 7.6	1,0 M	5 ml
KCl (Merck)	1,0 M	5 ml
MgCl ₂ (Merck)	1,0 M	5 ml
EDTA (Merck)	0,1M	10 ml
H ₂ O bidestilado até completar o volume de 500 ml		
TKM 2		
Componente	Concentração	Volume
Tris HCl pH 7.6	1,0 M	0,5 ml
KCl	1,0 M	0,5 ml
MgCl ₂	1,0 M	0,5 ml
EDTA	0,1 M	1,0 ml
NaCl	1,0 M	20,0 ml
H ₂ O bidestilado até completar o volume de 500 ml		

FONTE: Adaptado Lahiri (1991).

3.4.4.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Esta técnica (MULLIS *et al.*, 1986) possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA por meio do uso de dois iniciadores (*primers*), que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada. As reações foram realizadas em termociclador

Biocycler®, com ciclos repetidos de desnaturação térmica do DNA, hibridação dos iniciadores e a extensão da nova fita de DNA, promovida pela enzima Taq DNA polimerase Applied Biosystems®, levando ao acúmulo exponencial da sequência de DNA alvo.

Para a avaliação do região promotora do gene, utilizou-se a PCR-alelo específica, utilizando-se *primers* específicos para o alelo normal e outro para o alelo mutante.

Para a avaliação dos genes dos exons 2 e 3, utilizou-se a técnica de PCR-SSCA (*polymerase chain reaction - single strand conformational analysis*), que consiste na análise da fita simples do produto obtido pela PCR, gerada pela desnaturação do DNA. Esta técnica permite a detecção de alterações conformacionais no DNA que podem ser geradas por apenas uma mutação pontual, podendo ser percebidas pela modificação da mobilidade eletroforética da fita de DNA (McPHENRSON, MOLLER, 2001).

A reação de PCR foi preparada para cada um dos três polimorfismos avaliados (promotor, exon 2 e exon 3) conforme descrito à seguir. Os iniciadores ou *primers* utilizados estão apresentados no Quadro 5.

QUADRO 5 – INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS

EXON 3	
3a	sense 5' AGGGTGAAGGAGCCGGAAGTTCAGTGAC 3'
3b	antisense 5' CTTTCCCTGACTCCACTTCAGGCCCAA 3'
EXON 2	
2a	sense, 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3'
2b	antisense, 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'
PROMOTOR	
A-for	5'-TCCTGAGTAACTAGGTCACAA-3'
A-rev	5'-ACGTTAAGTTCAGAAAGATTAATTC-3'
G-for	5'-AGGATAGAGAAAATAATAGAAAACATT-3'
G-rev	5'-AACCCATAATAAGAAATAAGTTTTTAC-3'

NOTA: sequência de iniciadores obtidos de FANG *et al.*, 2003 (promotor); NCBI (*National Center for Biotechnology Information - EUA*) e MECHICA *et al.*, 1997 (exons 2 e 3)

FONTE: O autor, (2012).

A) Promotor: uma alíquota de DNA de aproximadamente 150ng foi submetida à amplificação por PCR em uma reação contendo 18 uL de PCR supermix Invitrogen®, aproximadamente 20 pM de cada primer iniciador específico (para alelo A: iniciadores A-

for; A-rev e G-for e para alelo G: iniciadores G-for; G-rev e A-rev). Os iniciadores A-rev e G-for geram um fragmento que é utilizado como controle interno de amplificação em ambas as reações (Quadro 6).

Os ciclos de amplificação foram os mesmos para cada par de iniciadores utilizando a programação descrita abaixo (FANG *et al.*, 2003): 1) 94°C/ 5 min.; 2) 94°C/ 45 seg.; 3) 56°C/ 45 seg.; 4) 72°C/ 45 seg.; repetir por 28 vezes do passo 2 ao 4; 5) 72°C/ 5 min.

B) Exon 2: uma alíquota de DNA de aproximadamente 150ng foi submetida à amplificação por PCR em uma reação contendo 18 uL de PCR supermix Invitrogen®, aproximadamente 20 pM de cada primer iniciador (2a e 2b).

Os ciclos de amplificação foram os mesmos para cada par de iniciadores, com o seguinte ciclo: 1) 94°C/ 2 min.; 2) 94°C/ 20 seg.; 3) 60°C/ 20 seg.; 4) 72°C/ 30 seg.; repetir por 20 vezes do passo 2 ao 4; 5) 94°C/ 20 seg.; 6) 50°C/ 20 seg.; 7) 72°C/ 30 seg.; repetir por 15 vezes do passo 2 ao 4; 8) 94°C/ 20 seg.; 9) 50°C/ 20 seg.; 10) 50°C/ 20 seg.; 11) 72°C/ 7 min.; 12) 94°C/ 5 min.; 13) 65°C/ 5 min.

C) Exon 3: uma alíquota de DNA de aproximadamente 150ng foi submetida à amplificação por PCR em uma reação contendo 18 uL de PCR supermix Invitrogen®, aproximadamente 20 pM de cada primer iniciador (3a e 3b).

Os ciclos de amplificação foram os mesmos para cada par de iniciadores (VAN ETTEN *et al.*, 2007), com o seguinte ciclo: 1) 80°C por 1 min.; 2) 94°C por 1 min.; 3) 48°C por 1 min.; 4) 72°C por 1 min.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C por 10 min.

QUADRO 6 – TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR

ALELO	TAMANHO DO FRAGMENTO (EM PB)
Promotor alelo G	110
Promotor alelo A	235
Promotor controle	297
Exon2	267
Exon3	220

FONTE: O autor (2012)

3.4.4.4 Eletroforese

Para confirmar se houve amplificação do DNA de cada uma das sequências, obtidas por PCR, foi realizada eletroforese de alíquotas do produto. Estas alíquotas foram misturadas com o tampão de aplicação (*loading buffer* – Sigma), e aplicadas a um gel de agarose. O tampão de eletroforese foi o TBE (Tris/Borato/EDTA) 1x e o gel de agarose 1% foi utilizado (FARAH, 2007; CAMPBELL, 2006; ZAHA *et al.*, 2003).

A eletroforese da região do promotor foi realizada em gel de agarose 2,5% a 125V por 1 hora.

Para a análise do produto por SSCA dos exons 2 e 3, uma alíquota de 5 μ L do produto de PCR foi adicionada a 6 μ L de corante SSCA (4,75 mL de formamida, 0,0125g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 μ L de EDTA 0,4 M, 16,7 μ L de NaOH 3 M e 108,3 μ L de água bidestilada) e aquecida a 94°C por cinco minutos (McPHENRSON, 2001).

Após a desnaturação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (29:1) e corado com nitrato de prata (WITTKKE *et al.*, 2004).

Os géis foram corados com brometo de etídio (EtBr) e revelada em luz ultra violeta (UV). Os resultados foram obtidos pela interpretação visual comparativa das bandas obtidas pela eletroforese dos produtos de cada paciente com as bandas controle. Os géis foram fotografados para arquivamento.

O tamanho do fragmento esperado para cada um dos alelos testados pode ser observado no quadro 6 (MILLSTEIN *et al.*, 2006).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram armazenados em planilha eletrônica *Microsoft Excel*[®] e posteriormente processados estatisticamente com o *software Action*[®].

Os testes estatísticos foram escolhidos de acordo com o tipo de distribuição das variáveis contínuas estudadas, simétricas ou assimétricas, numero de grupos e seu caráter de independência (Quadro 7).

Os valores de p superiores à 0,05 obtidos pelos testes utilizados foram considerados não significativos, e, portanto, de aceitação da hipótese zero ou nula de cada teste, determinando igualdade entre os grupos ou medidas avaliadas.

QUADRO 7 – TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS

DISTRIBUIÇÃO	TESTES	
	2 GRUPOS	> 2 GRUPOS
Paramétrico	Teste t de Student	ANOVA
Não Paramétrico	Mann–Whitney–Wilcoxon	Kruskal–Wallis

NOTA: testes selecionados de acordo com número de grupos e característica dos mesmos.

FONTE: O autor, 2012

Relações univariadas entre níveis séricos de 25-hidroxivitamina D e características demográficas dos pacientes foram determinadas usando o coeficiente de correlação de Spearman, uma vez que este não é exigente quanto à normalidade de distribuição dos dados.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para cada uma das variáveis contínuas a fim de estabelecer a normalidade da distribuição da amostra.

3.6 ÉTICA EM PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexos 2 e 3). Os termos de consentimento e assentimento livre e esclarecido foram avaliados pelo comitê antes de sua utilização (Anexos 4 e 5).

3.6.1 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e termo de assentimento

O TCLE foi obtido de todos os envolvidos, após esclarecimentos sobre os detalhes da pesquisa. Para crianças entre 12 e 14 anos, o termo de assentimento

também foi obtido. No grupo de 7 a 12 anos, a vontade da criança foi respeitada. A versão completa dos termos está disponível nos anexos 6 e 7.

3.6.2 Monitorização da pesquisa

Os TCLEs e os termos de assentimento obtidos estão arquivados no serviço de alergia e imunologia do HC-UFPR e tem acesso restrito aos pesquisadores envolvidos (Anexo 8).

Os dados obtidos tanto dos prontuários como das análises sanguíneas foram armazenados em planilha eletrônica, e estão disponíveis apenas para o grupo de pesquisadores. Entretanto, os nomes dos pacientes foram suprimidos, respeitando a identidade de cada indivíduo.

3.7 FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS

O pesquisador principal recebeu bolsa de fomento à pesquisa do CNPq entre os anos de 2009 e 2012. Os professores e médicos residentes do Serviço de Alergia Pediátrica do HC-UFPR participaram das reuniões de discussão em todas as etapas do projeto.

As análises genéticas foram realizadas no laboratório do Genética do Departamento de Biomedicina das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL de Curitiba. Os resultados foram discutidos e apresentados na forma de trabalho de conclusão de curso, e fomentados pela própria UNIBRASIL.

Todos os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório PR-ANÁLISE– Análises e Pesquisas Clínicas de Curitiba por cortesia.

Tanto os testes genéticos quanto os bioquímicos foram acompanhados pelo pesquisador principal.

4 RESULTADOS

Dos 121 pacientes foram envolvidos no estudo, 30 compunham o grupo de comparação e 91 o grupo de casos. Após as exclusões ocorridas por retiradas de TCLE, inadequação da amostra para avaliação laboratorial ou outras, restaram 77 indivíduos, divididos em 3 grupos (Figura 8):

- Asmáticos em uso de CTCl;
- Asmáticos sem CTCl;
- Grupo de comparação para os polimorfismos, composto por não alérgicos.

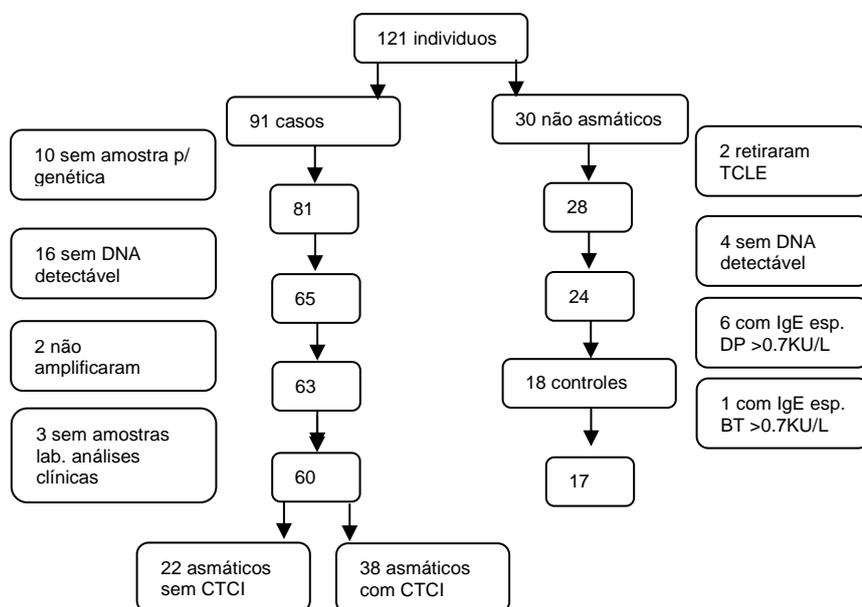


FIGURA 8 – ALGORITMO DE EXCLUSÕES

FONTE: O autor (2012)

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA

Entre os 77 participantes avaliados, 44 (57,0%) eram do gênero masculino e 33 (43,0%) do gênero feminino. A idade dos participantes variou de 7,0 aos 14,7 anos com média de 10,8 anos ($\pm 2,2$ anos) e mediana de 11,1 anos. Os dados resumidos podem ser verificados na Tabela 1.

TABELA 1 – DADOS DEMOGRÁFICOS DOS SUJEITOS DA PESQUISA

DADOS DEMOGRÁFICOS	ASMA (n=60)	CONTROLES (n=17)
Gênero (M:F)	39:21	5:12
Idade (anos) Média	10,8 ± 2,1	10,9 ± 2,4

FONTE: O autor (2012)

Quando avaliados individualmente, os grupos de asmáticos em uso de corticóide inalatório, asmáticos sem uso de corticóide inalatório e não alérgicos apresentaram similaridades. Todos os participantes foram provenientes do município de Curitiba e região metropolitana. Geograficamente, Curitiba localiza-se à -25° de latitude e -49° de longitude.

4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GRUPO DE ASMÁTICOS

Entre os 60 indivíduos incluídos neste grupo, 22 (36,6%) não utilizavam corticóide inalatório para o controle da asma e 38 (63,4%) faziam uso da medicação. Mais de 90% dos indivíduos do grupo de asmáticos tinham diagnóstico de rinite alérgica (97% entre os que fazem uso de CTC). A frequência do diagnóstico de conjuntivite alérgica, dermatite atópica e outras alergias como urticária e alergia alimentar podem ser observadas na Tabela 2. Quase três quartos dos asmáticos apresentavam história familiar consistente para rinite, asma ou dermatite atópica. Notou-se a presença de fumantes nos lares daqueles pacientes que utilizavam medicamento para controle da asma (28,9%) assim como nos lares dos que não o faziam (40,9%).

A frequência de internações dos asmáticos em uso de CTCL foi significativamente superior à do grupo sem tratamento. Os testes de função pulmonar foram realizados em 50 asmáticos.

O índice de massa corporal (IMC) médio entre meninos foi $18,2 \pm 3,0 \text{ Kg/m}^2$ e entre meninas foi $18,6 \pm 3,5 \text{ Kg/m}^2$. Oito crianças atingiram critério de obesidade (OMS, 2007), com IMC acima do segundo desvio padrão para o escore Z.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GRUPO DE ASMÁTICOS

VARIÁVEL	SEM CORTICÓIDE (22)		COM CORTICÓIDE (38)		
	N	%	n	%	p*
Rinite	20	90,9	37	97,4	0,54
Conjuntivite	15	68,2	22	57,9	0,58
DA	3	13,6	5	13,2	1,00
Outras alergias	2	9,1	2	5,3	0,61
Hx Familiar	16	72,7	27	71,1	1,00
Hx Tabagismo	9	40,9	11	28,9	0,40
Internações	4	18,2	17	44,7	0,05
TCA	22	100	36	94,7	0,52
DVO	3\19	15,8	7\31	22,6	0,72
PBD	4\19	21,1	11\31	35,5	0,35
VEF1% (Mediana)	102		98		
Tempo de doença (Média)	9,10		8,71		
Desvio padrão	2,23		2,47		

NOTA: * Teste exato de Fisher; DA, dermatite atópica; Hx, história; TCA, teste cutâneo alérgico; DVO, distúrbio ventilatório obstrutivo; PBD, proba broncodilatadora

FONTE: O autor (2012)

4.3 RESULTADOS DOS EXAMES BIOQUÍMICOS

Os níveis de vitamina D utilizados como referência vigentes à época da realização do estudo foram os seguintes: Níveis inferiores a 30 ng/mL: insuficiência; inferiores a 15 ng/mL, deficiência; acima de 30 ng/mL, normalidade. Quase 98% dos indivíduos testados estavam com níveis inadequados de VD. Entretanto, não houve diferença entre os 2 grupos avaliados com este exame.

Os resultados dos testes laboratoriais realizados para todos os asmáticos avaliados estão dispostos na Tabela 3.

Considerou-se normal o nível de cortisol entre 5,5 e 30 ug/dL, conforme o método utilizado (Quimioluminescência). Baixos níveis de cortisol foram observados em 17 (28,3%) dos asmáticos, destes 8 sem uso de CTCL e 9 utilizando o tratamento (p=0,34).

Os níveis de PTH são considerados normais entre 15,0 a 65,0 pg/mL de acordo com o método empregado (Eletroquimioluminescência). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (p=0,37).

Os níveis normais de cálcio e fósforo considerados foram de 8,5 a 10,5 mg/dL e 4,0 a 7,0 mg/dL respectivamente, pelo método colorimétrico automatizado. Não houve diferença estatística entre os resultados observados ($p=0,11$ e $0,20$, respectivamente).

Níveis entre 110 e 340 U/L foram considerados normais para fosfatase alcalina. Não houve diferença entre as médias encontradas nos grupos ($p=0,85$).

TABELA 3 – RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS POR GRUPOS

EXAME	NÍVEIS	ASMA				<i>p</i>
		Sem Corticóide (22)		Com Corticóide (38)		
		n	%	n	%	
25(OH)VD (ng/mL)	<10 (d)	1	4,5	3	7,9	1,00+
	10-30 (i)	21	95,5	34	89,5	
	>30 (n)	0	0	1	2,6	
	Média	16,6 ± 4,8		17,9 ± 5,6		
Cortisol Matinal (ug/dL)	<5,5	8	36,4	9	23,7	0,37+
	5,5-30 (n)	14	63,6	29	76,3	
	>30	0	0	0	0	
	Mediana	6,3		6,8		
PTH (pg/mL)	<15	1	4,5	0	0	0,45+
	15-65 (n)	20	90,9	37	97,4	
	>65	1	4,5	1	2,6	
	Média	34,0 ± 12,4		32,6 ± 11,2		
Cálcio (mg/dL)	<8,5	5	22,7	4	10,5	0,26+
	8,5-10,5 (n)	17	77,3	34	89,5	
	>10,5	0	0	0	0	
	Mediana	9,1		9,3		
Fósforo (mg/dL)	<4	3	13,6	6	15,8	1,00+
	4-7 (n)	19	86,4	32	84,2	
	>7	0	0	0	0	
	Média	4,4 ± 0,4		4,6 ± 0,6		
FAL (U/L)	<110	0	0	4	1	0,28+
	110-340	22	100	33	86,8	
	>340	0	0	1	0,2	
	Média	198,5 ± 45,6		195,6 ± 67,7		

NOTA: DP, desvio padrão; n, normalidade; i, insuficiência; d, deficiência. *, teste t de Student; ** Mann-Whitney-Wilcoxon; +, teste de Fisher.

FONTE: O autor (2012)

Os resultados da IgE total e das específicas para *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis* e *Lolium perenne* realizadas nos asmáticos e no grupo de comparação (controles) podem ser observados na Tabela 4. Por fins estatísticos os valores de IgE total superiores a 5000 UI/mL foram arredondados para 5001 UI/mL. Os valores de IgE específica acima de 100 KU/L, pela mesma razão, foram arredondados para 101 KU/L. Observou-se diferença significativa entre todos os grupos. Esta diferença foi observada, em todos os casos, na comparação múltipla, realizada 2 a 2, entre os grupos de controles *versus* asmáticos com ou sem corticóides ($p < 0,001$).

TABELA 4 – VALORES DA MEDIANA DA IGE EM KUI/L POR GRUPO

IgE	SEM CORTICÓIDE (n=22)	COM CORTICÓIDE (n=38)	CONTROLES (n=17)	p*
	n (amplitude)	n (amplitude)	n (amplitude)	
IgE DP	97,0 (100,9)	101,0 (100,8)	0,1 (0,63)	<0,001
IgE BT	15,9 (101,0)	21,6 (100,5)	0,1 (1,0)	<0,001
IgE Lol	0,1 (9,8)	0,3 (58,8)	0,02 (0,2)	<0,001
IgE Total	628,5 (3664,8)	1104,0 (4839,0)	153,0 (911,6)	<0,001

NOTA: IgE total em UI/mL. IgEs específicas em KU/L. DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*; BT: *Blomia tropicalis*; Lol: *Lolium perenne*

FONTE: O autor (2012)

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE VITAMINA D COM OS DEMAIS EXAMES LABORATORIAIS, VEF1% E TESTES ALÉRGICOS

Quando foi avaliada a correlação dos níveis séricos de vitamina D com os outros exames laboratoriais realizados nos 60 asmáticos, e também com os valores de VEF1% e número de alérgenos positivos obtidos pelo TCA (realizados respectivamente em 47 e 60 dos asmáticos), não se encontrou coeficiente de correlação significativo pelo teste de Spearman. Os resultados estão dispostos na Tabela 5. O teste de correlação de Pearson foi aplicado às variáveis com distribuição normal e não mostrou associação significativa em nenhum caso.

TABELA 5 – CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE VD (EM ng/mL) E VARIÁVEIS LABORATORIAIS, VEF1% OU NÚMERO DE TCA POSITIVOS

VARIÁVEL	ρ (RHO DE SPEARMAN)	p
Cálcio (mg/dL)	-0,04	0,71
Fósforo (mg/dL)	0,02	0,85
Cortisol (ug/dL)	0,17	0,17
PTH (pg/mL)	-0,21	0,09
FAL (U/L)	-0,15	0,22
IgE DP (KU/L)	0,12	0,32
IgE BT (KU/L)	-0,19	0,14
IgE Lol (KU/L)	-0,08	0,49
IgE Tot (UI/mL)	0,00	0,98
VEF1% (n=47)	0,13	0,39
nTCA+ (n=60)	-0,14	0,27

NOTA: DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*; BT: *Blomia tropicalis*; Lol: *Lolium perenne*.

FONTE: O autor (2012)

4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM O DIAGNÓSTICO DE ASMA.

Três genótipos da região promotora foram avaliados em todos os 77 indivíduos. O polimorfismo CDX2 esteve presente em 71,4% da população avaliada (43 asmáticos e 12 não asmáticos). Embora sem nível de significância estatística ($p=0,06$), parece existir uma tendência à associação entre genótipo da região do promotor e o diagnóstico de asma (Tabela 6).

A presença de polimorfismos do exon 3 foi pouco frequente, ocorrendo em sete dos 69 indivíduos testados. Não se observou associação significativa entre a presença do polimorfismo e o diagnóstico de asma. Não foram encontrados indivíduos com variações genéticas do exon 2 neste grupo.

TABELA 6 – FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES DO VDR DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ASMA

REGIÃO	GENÓTIPO	ASMA		CONTROLE		p*
		N	%	n	%	
Promotor	GG	17/60	28,3	5/17	29,4	0,06
	GA	29/60	48,3	12/17	70,6	
	AA	14/60	23,3	0	0,0	
Exon 2	Usual	51/51	100	14/14	100	-
Exon 3	Variante	7/52	13,5	0	0,0	0,18
	Usual	45/52	86,5	17/17	100,0	

NOTA: * Teste exato de Fisher

FONTE: O autor (2012)

4.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE DIFERENTES GENÓTIPOS DO PROMOTOR DO VDR COM O DIAGNÓSTICO DE ASMA.

A fim de melhor avaliar a associação entre a presença do polimorfismo CDX2 (substituição de G por A) com o diagnóstico de asma, os indivíduos foram comparados da seguinte forma: Grupo de homozigotos para o alelo A (AA) *versus* grupo Gx, composto por homozigotos para o alelo G (GG) e pelos heterozigotos (GA). E posteriormente, grupo GG *versus* grupo Ax, composto por AA e AG.

Desta forma, 46 asmáticos e 17 controles apresentaram Gx enquanto 14 asmáticos e nenhum controle apresentaram AA no locus em questão. A análise da tabela de contingência mostra associação entre a homozigose para o alelo A e o diagnóstico de asma ($p=0,03$), conforme a Tabela 7.

Quando realizada a avaliação Ax *versus* GG, não se encontrou associação com o diagnóstico de asma ($p=1,0$).

TABELA 7 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE ASMA DE ACORDO COM O GENÓTIPO

GENÓTIPO	ASMA (n=60)	CONTROLES (n=17)	p*
AA	14	0	0,03
Gx	46	17	

NOTA: * teste exato de Fisher

FONTE: O autor (2012)

4.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM A NECESSIDADE DO USO DE CORTICÓIDE INALATÓRIO PARA CONTROLE DA ASMA

Não foi observada associação entre a necessidade de corticoterapia inalatória e os polimorfismos estudados (Tabela 8).

TABELA 8 – ASSOCIAÇÃO ENTRE NECESSIDADE DE USO DE CORTICOTERAPIA INALATÓRIA E POLIMORFISMOS

GENE	GENÓTIPO	ASMÁTICOS		
		CTCI	S/CTCI	p
Promotor (n=60)	AA	9 (15%)	5 (8,3%)	1,00
	Gx	29 (48,3%)	17 (28,4%)	
Exon 3 (n=52)	Usual	27 (51,9%)	18 (34,6%)	1,00
	Variante	4 (7,7%)	3 (5,8%)	

NOTA: Valores de p correspondentes ao teste exato de Fisher.

FONTE: O autor (2012)

4.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM OS DEMAIS EXAMES LABORATORIAIS, VEF1% E TESTES ALÉRGICOS

Os asmáticos foram divididos de acordo com a presença de polimorfismos apresentados para o exon 3 em 2 grupos (genótipo usual e genótipo variante). Quanto à região promotora, foram divididos em 3 grupos, de acordo com o polimorfismo apresentado (GG, GA e AA). A comparação dos resultados dos exames realizados entre os grupos pode ser observada na Tabela 9.

TABELA 9 – RESULTADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS REALIZADOS PARA COMPARAÇÃO DOS VALORES DE P OBTIDOS NOS EXAMES BIOQUÍMICOS E FUNÇÃO PULMONAR, EM GRUPOS DIVIDIDOS DE ACORDO COM O POLIMORFISMO DO VDR ESTUDADO

VARIÁVEL	EXON 3	PROMOTOR
25(OH)VD (ng/mL)	0,37*	0,30+
Cálcio (mg/dL)	0,91**	0,37++
Fósforo (mg/dL)	0,78**	0,58++
Cortisol (ug/dL)	0,51**	0,04++
PTH (pg/dL)	0,45*	0,73+
FAL (U/L)	0,94*	0,80+
VEF1%	0,91*	0,004+
nTCA+	0,85**	0,31++

NOTA: * Teste t de Student; ** teste de Mann–Whitney–Wilcoxon; + ANOVA; ++ Kruskal–Wallis; nTCA+ número de testes alérgicos positivos

FONTE: O autor (2012).

Não houve diferença entre os grupos para os níveis de VD, cálcio, fósforo, PTH, e número de testes alérgicos positivos. Quanto ao cortisol, observou-se diferença entre os grupos, separados de acordo com o polimorfismo da região promotora em GG, GA e AA ($p=0,04$).

Uma diferença significativa ($p=0,004$) para o valor de VEF1% foi observada entre os asmáticos, quando agrupados de acordo com os genótipos da região do promotor (GG, GA e AA).

Quando comparadas as médias de VEF1% dos grupos Gx *versus* AA, observou-se diferença significativa ($p=0,001$). Tal relação não foi observada na análise Ax *versus* GG ($p= 0,71$).

4.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO VDR COM OS NÍVEIS DE IGE

Os valores das medianas das IgE total e específicas foram obtidas à partir da distribuição dos pacientes em 3 grupos, de acordo com o genótipo do gene do promotor e podem ser observados na Tabela 10.

TABELA 10 – MEDIANA DOS VALORES DE IGE DE ACORDO COM O GENÓTIPO DO REGIÃO PROMOTORA DO GENE

IgE	GG	GA	AA	p^*
IgE DP	44,7	33,2	101,0	0,01
IgE BT	16,5	3,2	27,3	0,08
IgE Lol	0,3	0,1	0,6	0,06
IgE Total	775,0	498,0	1108,5	0,06

NOTA: * teste de Kruskal-Wallis. DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*; BT: *Blomia tropicalis*; Lol: *Lolium perenne*.

FONTE: O autor (2012).

Outras formas de agrupamento foram utilizadas a fim de localizar diferenças entre os níveis de IgE da seguinte forma:

- Diagnóstico: asma em corticoterapia, asma sem corticoterapia e não asmáticos;
- Promotor: de acordo com o genótipo GG, GA ou AA;
- Gx: homozigotos para o alelo A e Gx (GA e GG);
- Ax: homozigotos para o alelo G e Ax;
- Exon 3: genótipo usual e variante.

Os resultados dos testes estatísticos empregados de acordo com estas formas de agrupamento estão dispostos na Tabela 11.

TABELA 11 – RESULTADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS PARA RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES FORMAS DE AGRUPAMENTO E VALORES DE IGE

GRUPOS	IgE DP	IgE BT	IgE Lol	IgE TOTAL
Diagnóstico*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Promotor*	0,01	0,08	0,06	0,07
Gx**	0,01	0,09	0,09	0,03
Ax**	0,88	0,40	0,40	0,97
Exon 3**	0,03	0,01	0,01	0,14

NOTA: * Teste de Kruskal-Wallis ; ** Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon; DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*; BT: *Blomia tropicalis*; Lol: *Lolium perenne*.

FONTE: O autor (2012).

5 DISCUSSÃO

O polimorfismo da região promotora, G>A, conhecido como CDX2 (substituição de G por A), é frequente neste grupo (71,4% da população testada) e está associado positivamente com o diagnóstico de asma, quando em homozigose ($p=0,03$). A presença de variações na sequência do exon 3 (SSCA) é pouco frequente e não está relacionada com a asma neste grupo. O polimorfismo do exon 2 não ocorre neste grupo.

Nos heterozigotos para qualquer mutação, incluindo a mutação CDX2, ocorre a expressão de duas proteínas diferentes. Entretanto, a influência da alteração estrutural da proteína variante, na expressão do fenótipo (suficiente para causar consequências clínicas) determina o padrão de dominância (BEIGUELMAN, 2008).

Neste caso, supondo-se arbitrariamente que nos heterozigotos, 50% da proteína seja expressa normalmente, pode-se sugerir que, na asma, o alelo G tem padrão dominante, estando associado a menor prevalência da mesma.

Além de estar associada à maior prevalência de asma, a presença do alelo A também mostrou relação com valores mais baixos de VEF1% obtidos entre os asmáticos. Embora piores valores de função pulmonar tenham sido associados a maior gravidade da doença, a presença da mutação CDX2 não determinou neste grupo, maior gravidade da doença, estando similarmente distribuída tanto entre asmáticos em tratamento com corticoterapia inalatória (asma persistente) quanto entre aqueles que não necessitam de tratamento (asma intermitente).

Variações genéticas do exon 3 foram pouco frequentes na população estudada e não exercem influência no diagnóstico, no tratamento, ou ainda nos parâmetros laboratoriais avaliados.

Apesar de associado ao diagnóstico de asma, o polimorfismo CDX2 mostrou efeito protetor em outros estudos. Foi relacionado à maior taxa de transcrição do promotor, e por consequência, possível incremento na absorção intestinal de cálcio (YAMAMOTO *et al.*, 1999). Também foi associado com menor risco de fraturas, de osteoporose e maior densidade óssea (FANG *et al.*, 2003).

Outros polimorfismos vêm sendo estudados, e de fato, associados à maior frequência de asma e outras doenças alérgicas em estudos populacionais (RABY *et al.*, 2003; WJST *et al.*, 1999; MALERBA *et al.*, 2000; PON *et al.*, 2004). Entretanto, permanece incerta a influencia destes polimorfismos sobre o funcionamento do VDR e

sobre o funcionamento de outros genes. Ainda não é claro como estas mutações se relacionam com asma e as demais alergias.

Pacientes em uso de CTCl para o tratamento da asma, especialmente quando em doses altas, podem desenvolver osteopenia ou ainda, osteoporose (BARNES, PEDERSEN, 1993; KAMADA *et al.*, 1996). É possível que portadores do polimorfismo CDX2 sofram menos deste efeito colateral, uma vez que podem ter melhor aproveitamento do cálcio proveniente da dieta. Resta estabelecer se asmáticos portadores da mutação estão de fato protegidos destes efeitos.

Deficiência ou insuficiência de VD foi verificada em 98% dos indivíduos avaliados. Não houve relação entre os níveis de VD com nenhum dos polimorfismos estudados, e da mesma forma, não se observou relação da vitamina com o uso de corticóide inalatório. Não há correlação entre os valores de VD com as variáveis laboratoriais e testes alérgicos. Existem relatos na literatura de associação inversa entre níveis de VD e valores de VEF1% (ALYASIN, *et al.*, 2011), entretanto, neste grupo, esta associação não foi observada.

Níveis séricos mais baixos de VD, foram relacionados com maior frequência de doença alérgica ou asma. Ainda que se utilizem como artifício neste grupo, valores de referência menos rigorosos, que consideram suficientes valores superiores a 20 ng/dL (AHMED *et al.*, 2011), mais de três quartos dos sujeitos avaliados não atingem valores adequados da vitamina.

O grupo de não asmáticos, designado para servir de controle para os polimorfismos, foi composto por crianças envolvidas no estudo no dia em que realizavam coleta de exames de rotina mediante negativa verbal de outras doenças. É possível que neste grupo existam indivíduos portadores de doenças crônicas consideradas fatores de risco para hipovitaminose D. Desta forma, este grupo não foi selecionado adequadamente para a avaliação dos níveis de vitamina D.

A ocorrência de hipovitaminose D vem sendo relatada amplamente mesmo entre indivíduos saudáveis. (GREENE-FINESTONE *et al.*, 2011; MARWAHA *et al.*, 2005; THACHER *et al.*, 2006; GORDON *et al.*, 2004; MAEDA *et al.*, 2007). Uma explicação possível para os baixos níveis séricos de VD encontrados nos estudos pode ser a inadequação dos valores de referência utilizados (SOUBERBIELLE *et al.*, 2010). Inicialmente, a determinação dos valores de referência foi baseada em indivíduos considerados saudáveis que tinham pouca exposição solar (HADDAD *et al.*, 1971). É

evidente que este método é pouco acurado, visto que hoje, sabe-se que os níveis da VD estão relacionados com exposição solar, dieta, latitude de residência, cor da pele e estilo de vida, idade (HOLLIS 2005, MAEDA *et al.*, 2007). Estes fatos determinaram a necessidade de estabelecerem-se novos valores de referência. Assim, o nível sérico de VD que se associa à incidência de doenças, foi fixado em 30ng/dL (SOUBERBIELLE *et al.*, 2010; HOLICK *et al.*, 2011).

A VD é um hormônio e sua ação está relacionada com diversos sistemas, é possível que variações das concentrações sanguíneas desta vitamina influenciem os níveis de outros hormônios.

O achado de níveis séricos baixos de cortisol ocorreu em 17 (20%) dos asmáticos, entretanto, a frequência foi similar entre os usuários e não usuários de CTCl. Assim, não é possível afirmar que tais níveis se devem ao uso do medicamento.

Talvez, a utilização de corticóide tópico nasal para o controle da rinite (presente em aproximadamente 90% deste grupo) esteja relacionado com tal resultado. Outra hipótese é a prescrição de corticóide para tratamento de doenças agudas ou crises, que pode ter ocorrido em outros centros, e desta forma, não estão registrados no prontuário, e podem ter sido omitidos ou esquecidos ou ainda, ser desconhecido pelos entrevistados.

Testes da função do eixo hipotálamo-hipofisário, que avaliam a produção basal de cortisol, indicam que a absorção dos corticóides intranasais pode ocorrer, e, em variados graus, suprimir a produção endógena de cortisol (WIHL *et al.*, 1997). Ainda que esta supressão seja considerada um marcador biológico da atividade sistêmica dos corticóides, não indica disfunção adrenal clínica. Com isto, tem-se sugerido que doses pequenas ou moderadas de corticóide tópico nasal, tenham efeitos sobre o eixo hipotálamo hipofisário, sem repercutir clinicamente (ALLEN, 2000).

Alterações dos níveis de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e PTH foram pouco frequentes e ocorreram em número semelhante de asmáticos com e sem tratamento com CTCl.

Entre os asmáticos, níveis elevados de IgE total, IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* foram encontrados. Tal achado está de acordo com os resultados relatados por outros autores (ROSARIO, VILELA, 1997).

Níveis séricos de IgE estão inversamente associados aos níveis séricos de VD (BREHM *et al.* 2009; HYPPÖNEN *et al.*, 2009; SHARIEF *et al.* 2011).

Assim como acontece na vigência de baixos níveis de VD (BREHM *et al.* 2010; EHLAYEL *et al.*, 2011), a sensibilização aos alérgenos domiciliares como os ácaros da poeira é frequente em crianças asmáticas (SPORIK *et al.*, 1990). A exposição natural aos alérgenos leva ao incremento da reação inflamatória e aumento da responsividade brônquica (PIACENTINI *et al.*, 1993), bem como o aumento da contagem de eosinófilos no lavado bronco-alveolar (RAK *et al.*, 1991), da mesma forma que a hipovitaminose D (GORMAN *et al.*, 2010; SUTHERLAND *et al.*, 2010; ALYASIN *et al.*, 2011).

Embora a VD se relacione com a asma de forma similar à IgE, faltam estudos experimentais que demonstrem como ocorre realmente esta interação.

Este estudo fornece informações sobre a associação entre polimorfismo CDX2, da região promotora do gene do receptor de vitamina D com o diagnóstico de asma, e com menores valores de VEF1%.

Existem algumas limitações a serem consideradas. Entre elas, o possível uso não reportado de corticóide no grupo de asmáticos sem prescrição de corticóide inalatório para controle da doença. Outra limitação está no grupo de comparação, que foi desenhado para servir de controle apenas para as mutações.

Um estudo de intervenção com o grupo de asmáticos, pode demonstrar se existe diminuição da necessidade de corticóide para o controle da doença após suplementação de VD. Atualmente, alguns estudos estão em andamento e devem responder à questões sobre doses adequadas de VD para o tratamento de doenças alérgicas, efeitos na prole de mães que receberam suplementação da vitamina durante a gestação, efeitos dos polimorfismos no desenvolvimento de doenças alérgicas, entre outros. Estes estudos podem ser consultados no endereço eletrônico <<<http://www.clinicaltrials.gov>>>.

Uma vez que a hipovitaminose D vem sendo relacionada à maior frequência de asma e outras doenças alérgicas, pode haver envolvimento do receptor desta vitamina no mecanismo da doença. Assim como o CDX2, é possível que outros polimorfismos ou mutações no gene do receptor de VD, capazes de modificar a interação celular com a vitamina, estejam associados com a prevalência de asma, e, talvez, com a dificuldade de controle da doença.

6 CONCLUSÕES

- 1) Foi frequente a presença do polimorfismo CDX2 (71,4%). Os polimorfismos não especificados dos exons 2 e 3 ocorreram discretamente (7% e 2%, respectivamente) entre crianças asmáticas de 7 à 14 anos, em acompanhamento no ambulatório de alergologia do HC-UFPR.
- 2) O polimorfismo CDX2 esteve associado com o diagnóstico de asma bem como com piores resultados obtidos em provas de função pulmonar (VEF1%)
- 3) Não houve correlação entre os níveis de vitamina D e os polimorfismos estudados.
- 4) Não houve correlação entre os níveis séricos de cálcio com os polimorfismos estudados.
- 5) Não se observou associação estatisticamente significativa entre a necessidade do uso de corticoterapia inalatória para o controle da asma, e os polimorfismos estudados.

REFERÊNCIAS

AHMED SF, FRANEY C, MCDEVITT H, SOMERVILLE L, BUTLER S, GALLOWAY P, *et al.*, Recent trends and clinical features of childhood vitamin D deficiency presenting to a children's hospital in Glasgow. **Arch Dis Child**, 96: 694–696, 2011.

ALYASIN S, MOMEN T, KASHEF S, ALIPOUR A, AMIN R. The relationship between serum 25 hydroxy vitamin d levels and asthma in children. **Allergy Asthma Immunol Res.** 3(4):251-5, 2011.

ALLAN K, DEVEREUX G. Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment. **J Am Diet Assoc**, 111:258-68, 2011.

ALLEN D. Systemic effects of intranasal steroids: an endocrinologist's perspective. **J Allergy Clin Immunol**, 106:S179-90, 2000.

ARANDA A, PASCUAL A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiol Rev.**81(3):1269-304, 2001.

ASHER MI, KEIL U, ANDERSON HR, BEASLEY R, CRANE J, MARTINEZ, F *et al.*, International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods. **Eur Respir J**, 8, 483-91, 1995.

BÄCK O, BLOMQUIST HK, HERNELL O, STENBERG B. Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? **Acta Derm Venereol**; 89:28–32, 2009.

BAKER AR, MCDONNELL DP, HUGHES M, CRISP TM, MANGELSDORF DJ, HAUSSLER MR, PIKE JW, SHINE J, O'MALLEY BW. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**; 85, 3294–3298, 1988.

BARNES PJ, PEDERSEN S. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. Report of a workshop held in Eze, France, October 1992. **Am Rev Respir Dis**, 148:S1–S26, 1993.

BARONI E, BIFFI M, BENIGNI F, *et al.*, VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J Leukoc Biol.**; 81:250–62, 2007.

BEIGUELMAN B. **Genética de populações humanas**. 1ª ed., Ribeirão Preto: SBG, 2008.

BHALLA AK, AMENTO EP, CLEMENS TL, HOLICK MF, KRANE SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. **J Clin Endocrinol Metab**, 57:1308–10, 1983.

BLACK PN, SCRAGG R. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin d and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. **Chest**, 128(6):3792-8, 2005.

BLANCO A. Vitaminas. Em Blanco A. **Química biológica**, 6a edição, Buenos Aires: El Ateneo; P 475-48, 1981.

BLONDEL A, RENAUD J-P, FISCHER S, MORAS D, KARPLUS M. Retinoic acid receptor: A simulation analysis of retinoic acid binding and the resulting conformational changes. **J Mol Biol**, 291: 101-115, 1999.

BLUMBERG B, EVANS RM. Orphan nuclear receptors-new ligands and new possibilities. **Genes Dev**, 15;12(20):3149-55, 1998.

BOONSTRA A, BARRAT FJ, CRAIN C, HEATH VL, SAVELKOUL HF, O'GARRA A. 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4 (1) T cells to enhance the development of Th2 cells. **J Immunol**, 167:4974–80, 2001.

BOSSÉ Y, LEMIRE M, POON AH, DALEY D, HE JQ, SANDFORD A, *et al.*, Asthma and genes encoding components of the vitamin D pathway. **Respir Res**. 24;10:98, 2009.

BOUILLON R, CARMELIET G, VERLINDEN L, VAN ETTEN E, VERSTUYF A, LUDERER HF, *et al.* Vitamin D and Human Health: Lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine Reviews**, 29:726-76, 2008.

BOURGUET, W, RUFF M, CHAMBON P, GRONEMEYER H, MORAS D. Crystal-structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR. **Nature**, 375: 377-382, 1995.

BOURGUET W, VIVAT V, WURTZ JM, CHAMBON P, GRONEMEYER H, MORAS D. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. **Mol Cell**, 5: 289-298, 2000.

BRAFF MH, GALLO RL. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. **Curr Top Microbiol Immunol**, 306:91-110, 2006.

BREHM JM, CELEDÓN JC, SOTO-QUIROS ME, AVILA L, HUNNINGHAKE GM, FORNO E, *et al.* Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. **Am J Respir Crit Care Med**, 179:765-71, 2009.

BRENNAN A, KATZ DR, NUNN JD, BARKER S, HEWISON M, FRAHER LJ, *et al.*, Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. **Immunology**, 61:457–61, 1987.

BRAIDMAN IP, ANDERSON DC. Extra-Endocrine Functions of Vitamin D. **Clin Endocrinol**, 23: 445 – 460, 1985.

BRZOZOWSKI AM, PIKE AC, DAUTER Z, HUBBARD RE, BONN T, ENGSTROM O, *et al.*, Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. **Nature**, 389: 753-758, 1997.

CAMARGO CA JR, RIFAS-SHIMAN SL, LITONJUA AA, RICH-EDWARDS JW, WEISS ST. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. **Am J Clin Nutr**, 85:788-95, 2007.

CAMARGO CA JR, CLARK S, KAPLAN MS, LIEBERMAN P, WOOD RA. Regional differences in EpiPen prescriptions in the United States: the potential role of vitamin D. **J Allergy Clin Immunol**, 120:131-6, 2007. (B)

CAMARGO CA JR, INGHAM T, WICKENS K, THADHANI R, SILVERS KM, *et al.*; New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study Group. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. **Pediatrics**, 127:e180-7, 2011.

CAMPBELL MK. Bioquímica. 3ª Ed. Artmed. Porto Alegre. 2006.

CARLBERG C, QUACK M, HERDICK M, BURY Y, POLLY P, TOELL A. Central Role of VDR Conformations for Understanding Selective Actions of Vitamin D3 Analogues. **Steroids**, 66 : 213 –221, 2001.

CARLBERG C, BENDIK I, WYSS A, MEIER E, STURZENBECKER LJ, GRIPPO JF, *et al.*, Two nuclear signalling pathways for vitamin D. **Nature**, 361: 657-660, 1993.

DARIMONT BD, WAGNER RL, APRILETTI JW, STALLCUP MR, KUSHNER PJ, BAXTER JD, *et al.*, Structure and specificity of nuclear receptor–coactivator interactions. **Genes Dev**, 12: 3343-3356, 1998.

DEVEREUX G, LITONJUA AA, TURNER SW, CRAIG LC, MCNEILL G, MARTINDALE S, *et al.* Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. **Am J Clin Nutr**;85:853-9, 2007.

EGEA PF, KLAHOLZ PB, MORAS D. Ligand protein interactions in nuclear receptors of hormones. **FEBS Lett**, 476: 62-67, 2000.

EHLAYEL MS, BENER A, SABBAH A., Is high prevalence of vitamin D deficiency evidence for asthma and allergy risks? **Eur Ann Allergy Clin Immunol**, 43:81-8, 2011.

ESTEVEES, P.C.; TRIPPIA, S.G.; ROSÁRIO FILHO, N.A.; CALEFFE, L.G. Validação do questionário do ISAAC para rinite alérgica perene e sazonal (polinose). **Rev Bras Alerg Immunopatol**, 22, 106-13, 1999.

ESTEVEES PC. Prevalência de rinite alérgica perene e sazonal em escolares de 13 e 14 anos e adultos na cidade de Curitiba. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 1998.

FANG Y, VAN MEURS JB, BERGINK AP, HOFMAN A, VAN DUIJN CM, VAN LEEUWEN JP, *et al.*, Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. **J Bone Miner Res**, 18(9):1632-41, 2003.

FARACO JH, MORRISON NA, BAKER A, SHINE J, FROSSARD PM. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. **Nucleic Acids Res**, 17, 2150, 1989.

FARAH SB. DNA: segredos e mistérios. 2ª Ed. São Paulo: Savier, 2007.

FERRAREZI, DAF. Variações alélicas no gene do receptor da vitamina D (*VDR*) e risco de doença arterial coronariana em pacientes diabéticos tipo 2. Ferrarezi, DAF. -- São Paulo, 2011. Tese(doutorado) - faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

GARANTY-BOGACKA B, SYRENICZ M, GORAL J, KRUPA B, SYRENICZ J, WALCZAK M, *et al.*, Serum 25-hydroxyvitamin D (25-OH-D) in obese adolescents. **Endokrynol Pol**, 62(6):506-11, 2011.

GARLAND CF, GARLAND FC, GORHAM ED, LIPKIN M, NEWMARK H, HOLICK MF., The role of vitamin D in cancer prevention. **Am J Public Health**, 96:252-61, 2006.

GINDE AA, SUTHERLAND ER. Vitamin D in asthma: panacea or true promise? **J Allergy Clin Immunol**, 126:59-60, 2010.

GINA - Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention – Updated 2008. Available at www.ginasthma.org.

GORDON CM, DEPETER KC, FELDMAN HA, GRACE E, EMANS SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. **Arch Pediatr Adolesc Med** 158:531–537, 2004.

GREENE-FINESTONE LS, BERGER C, DE GROH M, HANLEY DA, HIDIROGLOU N, SARAFIN K, *et al.* 25-Hydroxyvitamin D in Canadian adults: biological, environmental, and behavioral correlates. **Osteoporos Int**, 22:1389–1399, 2011.

GROSS C, ECCLESHALL TR, MALLOY PJ, VILLA ML, MARCUS R, FELDMAN D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. **J Bone Miner**, 11, 1850– 1855, 1996.

HADDAD JG, CHYU KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. **J Clin Endocrinol Metab**, 33:922-925, 1971.

HARD T, KELLENBACH E, BOELEN R, MALER BA, DAHLMAN K, FREEDMAN LP, et al. Solution structure of glucocorticoid receptor DNA-binding domain. **Science**, 249: 157-160, 1998.

HATA TR, KOTOL P, JACKSON M, NGUYEN M, PAIK A, UDALL D, et al., Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. **J Allergy Clin Immunol**, 122:829-31, 2008.

HAUSSLER MR, WHITFIELD GK, HAUSSLER CA, HSIEH JC, THOMPSON PD, SELZNICK SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. **J Bone Miner Res**, 13:325–349, 1998.

HOCHBERG Z. Rickets--past and present. Introduction. **Endocr Dev.**;6:1-13, 2003.

HOLICK, MF. Vitamin D Deficiency. **N Engl J Med**, 357:266-81, 2007.

HOLICK, MF. Let the sunshine in, em Holick, MF. **The vitamin D solution**, 1a edição, New York; capítulo 8, 2010.

HOLICK MF, BINKLEY NC, BISCHOFF-FERRARI HA, GORDON CM, HANLEY DA, HEANEY RP, et al., Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**. 96(7):1911-30, 2011.

HOLLIS BW. Circulating 25-hydroxy vitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. **J. Nutr.** 135:317-322, 2005.

HSIEH JC, SHIMIZU Y, MINOSHIMA S, SHIMIZU N, HAUSSLER CA, JURUTKA PW, et al., Novel nuclear localization signal between the two DNA-binding zinc fingers in the human vitamin **D receptor**. **J Cell Biochem**, 70:94–109, 1998.

HSIEH JC, WHITFIELD GK, OZA AK, DANG HT, PRICE JN, GALLIGAN MA, et al. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. **Inflamm Res**, 47: 451-475, 1998.

HUGHES AM, LUCAS RM, PONSONBY A-L, CHAPMAN C, COULTHARD A, DEAR K, *et al.*, The role of latitude, ultraviolet radiation exposure and vitamin D in childhood asthma and hayfever: an Australian multicenter study. **Pediatr Allergy Immunol**, 22: 327–33, 2011.

INTERNATIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGIES IN CHILDHOOD (ISAAC MANUAL).Disponível em: <http://isaac.auckland.ac.nz>. Acesso em: fevereiro de 2012.

INTERNATIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGIES IN CHILDHOOD (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. **Lancet**, 351, 1225-32, 1998.

ISSA LL, LEONG GM, EISMAN JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. **Inflamm Res**,47(12):451-75, 1998.

JONES G, STRUNGNELL SA, DELUCA HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. **Physiol Rev**, 78: 1193-1231, 1998.

JURUTKA PW, REMUS LS, WHITFIELD GK, THOMPSON PD, HSIEH JC, ZITZER H, *et al.*, The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. **Mol Endocrinol**, 14:401–420, 2000.

KAMADA AK, SZEFLER SJ, MARTIN RJ, BOUSHEY HA, CHINCHILLI VM, DRAZEN JM, *et al.* Issues in the use of inhaled glucocorticoids. The Asthma Clinical Research Network. **Am J Respir Crit Care Med**, 153: 1739–48, 1996.

KHORASANIZADEH S, RASTINEJAD F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements.**Trends Biochem Sci**, 26: 384-390, 2001.

KUMAR J, MUNTNER P, KASKEL FJ, HAILPERN SM, MELAMED ML. Prevalence and associations of 25-hydroxyvitamin D deficiency in US children: NHANES 2001-2004.; **Pediatrics**, 124: 362-70, 2009.

LAHIRI, DK, NUMBERGER JR, JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, 11; 19(19): 5444, 1991.

LAMBERG-ALLARDT C. Vitamin D in foods and as supplements. **Prog Biophys Mol Biol**, 92:33–38, 2006.

LIU PT, STENGER S, LI H, WENZEL L, TAN BH, KRUTZIK SR, *et al.*, Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, 311:1770-3, 2006.

LOPEZ-GARCIA B, LEE PH, YAMASAKI K, GALLO RL. Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. **J Invest Dermatol**, 125:108-15, 2005.

LUO Z, ROUVINEN J, MÄENPÄÄ PH. A peptide C-terminal to the second Zn finger of human vitamin D receptor is able to specify nuclear localization. **Eur J Biochem**, 223: 381-387, 1994.

MAEDA SS, KUNII IS, HAYASHI L, LAZARETTI-CASTRO M. The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil. **Braz J Med Biol Res**, 40:1653-9. 2007

MAHON BD, WITTKE A, WEAVER V, CANTORNA MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. **J Cell Biochem**, 89:922–32, 2003.

MAJAK P, RYCHLIK B, STELMACH I. The effect of oral steroids with and without vitamin D3 on early efficacy of immunotherapy in asthmatic children. **Clin Exp Allergy**, 39:1830-41, 2009.

MALERBA G, LAUCIELLO MC, SCHERPBIER T, TRABETTI E, GALAVOTTI R, *et al.* Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children. **Am J Respir Crit Care Med**, 162:1587–1590, 2000.

MALLOY PJ, PIKE JW, FELDMAN D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. **Endocr Rev** 20:156–188, 1999.

MALLOY PJ, FELDMAN D. Hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. **Endocr Dev**, 6:175–199, 2003.

MANGELSDORF DJ, EVANS RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, 83: 841-850, 1995.

MARQUES, CDL, DANTAS, AT, FRAGOSO, TS, DUARTE, ALBP. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Rev. Bras. Reumatol**, 50(1): 67-80, 2010.

MARWAHA RK, TANDON N, REDDY DR, AGGARWAL R, SINGH R, SAWHNEY RC, *et al.* Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India. **Am J Clin Nutr**, 82:477–482, 2005.

MATHEU V, BÄCK O, MONDOC E, ISSAZADEH-NAVIKAS S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. **J Allergy Clin Immunol**, 112:585–92, 2003.

McPHERNSON, MJ, MOLLER, SG. **PCR**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001.

MECHICA JB, LEITE MO, MENDONCA BB, FRAZZATTO ES, BORELLI A, LATRONICO AC. A novel nonsense mutation in the first zinc finger of the vitamin D receptor causing hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D₃-resistant rickets. **J Clin Endocrinol Metab**, 82(11):3892-4, 1997.

MILLSTEIN, J, CONTINI, DV, GILLILAND, FD, GAUDERMAN, WJ. A testing framework for identifying susceptibility genes in the presence of epistasis. **Am J Hum Genet**. 78(1):15-27. 2006.

MILNER JD, STEIN DM, MCCARTER R, MOON RY. Early infant multivitamin supplementation is associated with increased risk for food allergy and asthma. **Pediatrics**.114:27-32, 2004.

MIYAMOTO K, KESTERSON RA, YAMAMOTO H, TAKETANI Y, NISHIWAKI E, TATSUMI S, *et al.*, Structural organization of the human vitamin D receptor. **Mol Endocrinol**. 11(8):1165-79 1997.

MOORE DD, KATO S, XIE W, MANGELSDORF DJ, SCHMIDT DR, XIAO R, KLIEWER SA. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors:

constitutive androstane receptor, pregnene X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. **Pharmacol**; 58 (4): 742–59, 2006.

MORAS D, GRONEMEYER H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Curr. Opin. Cell Biol**, 10: 384-391, 1998.

MORRISON NA, YEOMAN R, KELLY PJ, EISMAN JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. **Proc Natl Acad Sci USA**, 89, 6665–6669, 1992.

MORRISON NA, QI JC, TOKITA A, KELLY PJ, CROFTS L, NGUYEN TV, SAMBROOK PN, EISMAN JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**, 367, 284– 287, 1994.

MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp Quant Biol**, 51:263-273, 1986.

NAYERI S, CARLBERG C. Functional conformations of the nuclear 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. **Biochem J**, 327: 561-568, 1997.

NIYONSABA F, USHIO H, NAKANO N, NG W, SAYAMA K, HASHIMOTO K, *et al.*, Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. **J Invest Dermatol**, 127:594-604, 2007.

NOLTE RT, WISELY GB, WESTIN S, COBB JE, LAMBERT MH, KUROKAWA R, *et al.*, Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Nature**, 395: 137-143, 1998.

NORMAN AW, HENRY HL, BISHOP E, SONG X, BULA C, OKAMURA WH. Different shapes of the steroid hormone 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃. act as agonists for two different receptors in the Vitamin D endocrine system to Mediate Genomic and Rapid Responses. **Steroids**, 66 : 147 – 158, 2001.

NURMATOV U, DEVEREUX G, SHEIKH A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. **J Allergy Clin Immunol**; 127:724-33, 2011.

PALOMER X, GONZALES-CLEMENTE JM, BLANCO-VACA F. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Obes Metab**, 10: 185–197, 2008.

PEARCE, N.; WEILAND, S.; KEIL, U.; LANGRIDGE, P.; ANDERSON, H.R.; STRACHAN, D.; *et al.*, Self-reported prevalence of asthma symptoms in children in Australia, England, Germany, and New Zealand: an international comparison using the ISAAC protocol. **Eur Respir J**, 6, 1455-61, 1993.

PERONI DG, PIACENTINI GL, CAMETTI E, CHINELLATO I, BONER AL., Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. **Br J Dermatol**, 164:1078-82, 2011.

PIACENTINI GL, MARTINATI L, FORNARI A, COMIS A, CARCERERI L, BOCCAGNI P. Antigen avoidance in a mountain environment: influence on basophil releasability in children with allergic asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 92(5):644–50, 1993.

PICHLER J, GERSTMAYR M, SZÉPFALUSI Z, URBANEK R, PETERLIK M, WILLHEIM M. 1 alpha, 25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. **Pediatr Res**, 52:12–8, 2002.

PIKE ACW, BRZOZOWSKI AM, HUBBARD RE, BONN T, THORSELL AG, ENGSTRÖM O, *et al.*, Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. **EMBO J**, 18: 4608-4618, 1999.

POON A, LAPRISE C, LEMIRE M, MONTPETIT A, SINNETT D, SCHURR E, HUDSON TJ. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. **Am J Respir Crit Care Med**, 170:967–973, 2004.

RABY BA, SILVERMAN EK, LAZARUS R, LANGE C, KWIATKOWSKI DJ, WEISS ST. Chromosome 12q harbors multiple genetic loci related to asthma and asthma-related phenotypes. **Hum Mol Genet**, 12:1973–1979, 2003.

RAK S, BJORNSON A, HAKANSON L, SORENSON S, VENGE P. The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of eosinophil chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure. **J Allergy Clin Immunol**, 88(6):878–88, 1991.

RAMAGOPALAN SV, HEGER A, BERLANGA AJ, MAUGERI NJ, LINCOLN MR, BURRELL A, *et al.* A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. **Genome Research**, 20:1352-60, 2010.

RASTINEJAD F, WAGNER T, ZHAO Q & KHORASANIZADEH S. Structure of the RXR-RAR DNAbinding complex on the retinoic acid response element DR1. **EMBO J**, 19: 1045-1054, 2000.

RASTINEJAD F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. **Curr Opin Struct Biol**, 11: 33-38, 2001.

ROCHEL N, WURTZ JM, MITSCHLER A, KLAHOLZ B, MORAS D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. **Mol Cell**, 5:173–179, 2000.

ROSARIO NA, VILELA MM. Quantitative skin prick tests and serum IgE antibodies in atopic asthmatics. **J Investig Allergol Clin Immunol**. 7(1):40-5, 1997.

SAIJO T, NAITO E, ITO M, TAKEDA E, HASHIMOTO T, KURODA Y. Therapeutic effect of sodium dichloroacetate on visual and auditory hallucinations in a patient with MELAS. **Neuropediatrics**, 22, 166–167, 1991.

SANDHU MS, CASALE TB. The role of vitamin D in asthma. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 105:191-9, 2010.

SCHAUBER J, DORSCHNER RA, CODA AB, BUCHAU AS, LIU PT, KIKEN D, *et al.*, Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. **J Clin Invest**, ;117:803-11, 2007.

SCHAUBER J, GALLO RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system, **J Allergy Clin Immunol**, 122: 261–6, 2008.

SCHRÄDER M, NAYERI S, KAHLEN J-P, MÜLLER KM, CARLBERG C. Natural vitamin D3 response elements formed by inverted palindromes: Polarity-directed ligand sensitivity of *VDR*-RXR heterodimer-mediated transactivation. **Mol Cell Biol**, 15: 1154-1161, 1995.

SCHULZE J, SMITH HJ, FUCHS J, HERRMANN E, DRESSLER M, ROSE MA, ZIELEN S. Methacholine challenge in young children as evaluated by spirometry and impulse oscillometry. **Respir Med**. [Epub ahead of print], 2012.

SHAFFER PL, GEWIRTH DT. Structural basis of *VDR*-DNA interactions on direct repeat response elements. **EMBO J**, 21: 2242-2252, 2002.

SHIAU AK, BARSTAD D, LORIA PM, CHENG L, KUSHNER PJ, AGARD DA, *et al.*, The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. **Cell**, 95: 927-937, 1998.

SOUBERBIELLE JC, BODY JJ, LAPPE JM, PLEBANI M, SHOENFELD Y, LARGURA A, *et al.* Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. **Autoimmun Rev**, 9(11):709-15, 2010.

SPORIK R, HOLGATE ST, PLATTS-MILLS TA, COGSWELL JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. **N Engl J Med**, 323(8):502-7, 1990.

STIRBULOV R, BERND LAG, SOLE D, *et al.* IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.** – Vol. 29, Nº 5, 2006.

SZPIRER J, SZPIRER C, RIVIERE M, LEVAN G, MARYNEN P, CASSIMAN JJ, *et al.* The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (*VDR*) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. **Genomics**; 11 (1): 168-73, 1991.

THACHER TD, FISCHER PR, STRAND MA, PETTIFOR JM. Nutritional rickets around the world: causes and future directions. **Ann Trop Paediatr**, 26(1):1-16, 2006.

TSOUKAS CD, PROVVEDINI DM, MANOLAGAS SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3: a novel immunoregulatory hormone. **Science**, 224:1438-40, 1984.

UITTERLINDEN AG, FANG Y, VAN MEURS JB, POLS HA, VAN LEEUWEN JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, Sep 1;338(2):143-56, 2004.

UMESONO K, MURAKAMI KK, THOMPSON CC, EVANS RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. **Cell**, 65:1255-1266, 1991.

VAN ETTEN E, VERLINDEN L, GIULIETTI A, RAMOS-LOPEZ E, BRANISTEANU DD, FERREIRA GB, E. *et al.* The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. **Eur J Immunol**. 37(2): 395-405. 2007.

VASSALLO MF, CAMARGO CA JR. Potential mechanisms for the hypothesized link between sunshine, vitamin D, and food allergy in children. **J Allergy Clin Immunol**, 126:217-22, 2010.

WALTERS MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. **Endocr Rev**, 13:719-64, 1992.

WANG T-T, NESTEL F, BOURDEAU V, NAGAI Y, WANG Q, LIAO J, *et al.*, Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **J Immunol**, 173:2909-12, 2004.

WEATHERMAN RV, FLETTERICK RJ, SCANLAN TS. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. **Annu Rev Biochem**, 68: 559-581, 1999.

WEBER G, HEILBORN JD, CHAMORRO JIMENEZ CI, HAMMARSJO A, TORMA H, STAHL M. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. **J Invest Dermatol**, 124:1080-2, 2005.

WIHL JA, ANDERSSON KE, JOHANSSON SA. Systemic effects of two nasally administered glucocorticosteroids. **Allergy**, 52:620-6, 1997.

WJST M, FISCHER G, IMMERVOLL T, JUNG M, SAAR K, RUESCHENDORF F, REIS A, *et al.* German Asthma Genetics Group. A genome-wide search for linkage to asthma. **Genomics**; 58:1-8, 1999.

WIJST, M . Another explanation for the low allergy rate in the rural Alpine foothills. **Clin Mol Allergy**. 3: 7, 2005.

WILLERS SM, DEVEREUX G, CRAIG LC. Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. **Thorax**, 62:773–9, 2007.

WILLIAMS H, ROBERTSON C, STEWART A, AÏT-KHALED N, ANABWANI G, ANDERSON R *et al.*, Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the international study of asthma and allergies in childhood. **J Allergy Clin Immunol**, 103, 125-38, 1999.

WITTKE, A, WEAVER, V, MAHON, BD, AUGUST, A, CANTORNA, MT. Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. **J Immunol**. p. 3432-3436. 2004 .

YAMAMOTO H, MIYAMOTO K, LI B, TAKETANI Y, KITANO M, INOUE Y, MORITA K, *et al.* The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. **J Bone Miner Res**, 14:240–247, 1999.

YE WZ, REIS AF, VELHO G. Identification of a novel Tru9I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. **J Hum Genet**, 45, 56– 57, 2000.

YU J, MOOKHERJEE N, WEE K, BOWDISH DM, PISTOLIC J, LI Y, *et al.*, Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. **J Immunol**, 179:7684-91, 2007.

ZAHA, A. *et al.* **Biologia Molecular Básica**. 3ª Ed. Mercado Aberto. Porto Alegre. 2003.

ZHAO Q, CHASSE SA, DEVARAKONDA S, SIERK ML, AHVAZI B, RASTINEJAD FJ. Structural basis of RXR-DNA interactions. **Mol Biol**, 296: 509-520, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO APLICADO AOS CONTROLES:

Número _____

1. *Você alguma vez teve chio de peito?* Sim Não
2. *Você teve chio de peito nos últimos 12 meses?* Sim Não
3. *Quantos ataques de chio de peito você teve nos últimos 12 meses?(_____)*
4. *Nos últimos 12 meses, em média, quantas vezes seu sono foi interrompido por chio de peito? (_____)*
5. *Nos últimos 12 meses, você teve chio de peito tão forte que não podia falar mais de duas palavras entre cada respiração?* Sim Não
6. *Você alguma vez teve asma?* Sim Não
7. *Você teve chio de peito após exercício físico nos últimos 12 meses?* Sim Não
8. *Nos últimos 12 meses, você teve tosse seca durante à noite, não associada a gripe ou resfriado ou a qualquer outra infecção pulmonar?`* Sim Não
9. *Você alguma vez teve problemas com espirros, corrimento de nariz ou nariz trancado, sem estar com gripe ou resfriado?* Sim Não
10. *Nos últimos 12 meses, você teve problemas de espirros, corrimento de nariz ou nariz trancado, sem estar com gripe ou resfriado?* Sim Não
11. *Nos últimos 12 meses, você teve problemas de nariz acompanhados por olho lacrimejante e coceira nos olhos?* Sim Não
12. *Nos últimos 12 meses, você teve problemas de nariz em quais meses?* Sim Não
13. *Nos últimos 12 meses, quanto o seu problema de nariz interferiu nas suas atividades diárias?* Sim Não
14. *Você alguma vez teve rinite alérgica?* Sim Não
15. *Você alguma vez teve grosseirão de pele que vem e vai no intervalo de 6 meses?* Sim Não
16. *Você alguma vez teve grosseirão de pele com coceira nos últimos 12 meses?* Sim Não

17. Nos últimos 12 meses, você teve grosseirão de pele em alguns dos lugares abaixo? (Nas dobras dos cotovelos ou joelhos, nádegas ou tornozelos, em volta do pescoço, orelhas ou olhos). Sim Não

18. Este grosseirão melhorou completamente alguma vez nos últimos 12 meses? Sim Não

19. Nos últimos 12 meses, em média quantas vezes você acordou por conta do grosseirão de pele e da coceira? Sim Não

20. Você alguma vez teve eczema? Sim Não

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Curitiba, 28 de janeiro de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Nelson Augusto Rosário Filho
Carlos Antonio Riedi
Lilian Pereira Ferrari
Herberto Chong Neto
Neste

Prezados Pesquisadores:

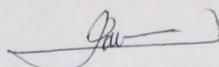
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “MUTAÇÕES DO GENE DO RECEPTOR E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CRIANÇAS COM ASMA EM TRATAMENTO COM CORTICOSTERÓIDES INALATÓRIOS”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 26 de janeiro de 2010. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0001.0.208.000-10
Registro CEP: 2131.026/2010-01

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 28 de julho de 2010.

Atenciosamente,

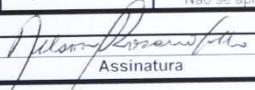
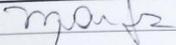


Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 3 – REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA


MINISTÉRIO DA SAÚDE
 Conselho Nacional de Saúde
 Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0001.0.208.000-10	
Projeto de Pesquisa Mutações do gene do receptor e níveis séricos de vitamina D em crianças com asma em tratamento com corticosteróides inalatórios			
Area(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 15748626934	Pesquisador Responsável Nelson Augusto Rosário Filho	 Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 06/01/2010	Recebimento: 		Assinatura

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

ANEXO 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO APROVADO

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Mutações do gene do receptor e níveis séricos de vitamina D em crianças com asma em tratamento com corticosteróides inalatórios”.

Investigador: Dr. Nelson Rosário Filho

Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas - UFPR

Endereço: R. Pe. Camargo, 530 sala 103 – Curitiba/PR CEP: 80060-240 fones: (41) 3360 7938 e 9101-5181

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A asma é a doença crônica mais comum da infância. O tratamento da asma inclui a inalação de corticóides para controle das crises. Estes medicamentos podem alterar o metabolismo do cálcio e de vitamina D, o que pode interferir com o crescimento da criança asmática. Alguns asmáticos têm deficiência da vitamina D e isto pode ser responsável por dificuldades no tratamento da doença. A vitamina D funciona no organismo estimulando um receptor que por sua vez determina a ação da vitamina.

PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar as dosagens sanguíneas de cálcio, vitamina D e outros elementos relacionados à vitamina D. As dosagens de vitamina D revelarão se seu filho (a) tem deficiência, o que poderia estar relacionada à asma e se os genes dos receptores para a atuação da vitamina sofreram alguma mudança.

Versão Fevereiro/2010

1
Leomar Albini
Leomar Albini
COREN 33.333

MEMBRO DO COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA DO HC/UFPR

ANEXO 5 – TERMO DE ASSENTIMENTO PARA ADOLESCENTES APROVADO.

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Titulo do Projeto: "Mutações do gene do receptor e níveis séricos de vitamina D em crianças com asma em tratamento com corticosteróides inalatórios".

Investigador: Dr. Nelson Rosário Filho

Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas - UFPR

Endereço: R. Pe. Camargo, 530 sala 103 – Curitiba/PR CEP: 80060-240 fones: (41) 3360 7938 e 9101-5181

INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

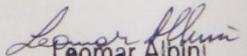
A asma é a doença crônica mais comum da infância. O tratamento da asma inclui a inalação de corticóides para controle das crises. Estes medicamentos podem alterar o metabolismo do cálcio e de vitamina D, o que pode interferir com o crescimento da criança asmática. Alguns asmáticos têm deficiência da vitamina D e isto pode ser responsável por dificuldades no tratamento da doença. A vitamina D funciona no organismo estimulando um receptor que por sua vez determina a ação da vitamina.

PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar as dosagens sanguíneas de cálcio, vitamina D e outros elementos relacionados à vitamina D. As dosagens de vitamina D revelarão se seu filho (a) tem deficiência, o que poderia estar relacionada à asma e se os genes dos receptores para a atuação da vitamina sofreram alguma mudança.

Versão Dezembro/2009

1


Leomar Albin

COREN 33.333

MEMBRO DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO 6 - TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Mutações do gene do receptor e níveis séricos de vitamina D em crianças com asma em tratamento com corticosteróides inalatórios”.

Investigador: Dr. Nelson Rosário Filho

Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas - UFPR

Endereço: R. Pe. Camargo, 530 sala 103 – Curitiba/PR CEP: 80060-240 fones: (41) 3360 7938 e 9101-5181

INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A asma é a doença crônica mais comum da infância. O tratamento da asma inclui a inalação de corticóides para controle das crises. Estes medicamentos podem alterar o metabolismo do cálcio e de vitamina D, o que pode interferir com o crescimento da criança asmática. Alguns asmáticos têm deficiência da vitamina D e isto pode ser responsável por dificuldades no tratamento da doença. A vitamina D funciona no organismo estimulando um receptor que por sua vez determina a ação da vitamina.

PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar as dosagens sanguíneas de cálcio, vitamina D e outros elementos relacionados à vitamina D. As dosagens de vitamina D revelarão se seu filho (a) tem deficiência, o que poderia estar relacionada à asma e se os genes dos receptores para a atuação da vitamina sofreram alguma mudança.

Versão Dezembro/2009

SELEÇÃO

Serão selecionados pacientes asmáticos, idade entre 4 e 14 anos, acompanhados no ambulatório de Alergia, Imunologia e Pneumologia do Hospital de Clínicas UFPR. Constituirão três grupos: 1- de pacientes que necessitam corticóide por terem doença mais intensa; 2- de pacientes com asma leve e que não usam corticóide; 3- grupo de crianças não asmáticas e não atópicas, que freqüentam outros ambulatórios do Departamento de Pediatria.

PROCEDIMENTOS

Será obtida uma amostra de 8 mL de sangue através de punção da veia do antebraço, com agulha e seringa. O desconforto da picada é passageiro e não há riscos deste procedimento, exceto que poderá ficar um pequeno hematoma (mancha de sangue) no local, que também é passageira.

As análises das mutações serão restritas aos genes do receptor da vitamina D, mas a amostra do seu sangue será armazenada por 5 anos e poderá ser re-analisada futuramente em caso de surgimento de novos métodos laboratoriais ou de novas descobertas sobre a vitamina D. Nesse caso pediremos sua nova autorização para isto.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe Dr. Nelson Rosário, telefone 3360 7938 e 91015181 . Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Assentimento Informado.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA

ANEXO 7 – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO UTILIZADO

Título do Projeto: “Mutações do gene do receptor e níveis séricos de vitamina D em crianças com asma em tratamento com corticosteróides inalatórios”.

Investigador: Dr. Nelson Rosário Filho

Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas - UFPR

Endereço: R. Pe. Camargo, 530 sala 103 – Curitiba/PR CEP: 80060-240 fones: (41) 3360 7938 e 9101-5181

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A asma é a doença crônica mais comum da infância. O tratamento da asma inclui a inalação de corticóides para controle das crises. Estes medicamentos podem alterar o metabolismo do cálcio e de vitamina D, o que pode interferir com o crescimento da criança asmática. Alguns asmáticos têm deficiência da vitamina D e isto pode ser responsável por dificuldades no tratamento da doença. A vitamina D funciona no organismo estimulando um receptor que por sua vez determina a ação da vitamina.

PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar as dosagens sanguíneas de cálcio, vitamina D e outros elementos relacionados à vitamina D. As dosagens de vitamina D revelarão se seu filho (a) tem deficiência, o que poderia estar relacionada à asma e se os genes dos receptores para a atuação da vitamina sofreram alguma mudança.

SELEÇÃO

Serão selecionados pacientes asmáticos, idade entre 4 e 14 anos, acompanhados no ambulatório de Alergia, Imunologia e Pneumologia do Hospital de Clínicas UFPR. Constituirão três grupos: 1- de pacientes que necessitam corticóide por terem doença mais intensa; 2- de pacientes com asma leve e que não usam corticóide; 3- grupo de crianças não asmáticas e não atópicas, que freqüentam outros ambulatórios do Departamento de Pediatria.

PROCEDIMENTOS

Será obtida uma amostra de 8 mL de sangue através de punção da veia do antebraço, com agulha e seringa. O desconforto da picada é passageiro e não há riscos deste procedimento, exceto que poderá ficar um pequeno hematoma (mancha de sangue) no local, que também é passageira.

As análises das mutações serão restritas aos genes do receptor da vitamina D, mas a amostra do seu sangue será armazenada por 5 anos e poderá ser re-analisada futuramente em caso de surgimento de novos métodos laboratoriais ou de novas descobertas sobre a vitamina D. Nesse caso pediremos sua nova autorização para isto.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe Dr. Nelson Rosário, telefone 3360 7938 e 91015181 . Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper a participação de meu filho (a) a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO RESPONSÁVEL
(Se menor ou incapacitado)

ASSINATURA

DATA

NOME DO INVESTIGADOR
(Pessoa que aplicou o TCLE)

ASSINATURA

DATA

ANEXO 8 - DECLARAÇÃO DE ARMAZENAMENTO

Curitiba, 7 de Janeiro de 2010.

Ilmo Dr. Renato Tâmbara Filho
Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos
Hospital de Clínicas da UFPR

Recebido pelo CEP
Em: ____/____/____
Por: _____
Carimbo:

Ref: Protocolo: **“Mutações do gene do receptor e níveis séricos de vitamina D em crianças com asma em tratamento com corticosteróides inalatórios”**.

Declaro que as amostras de sangue analisadas neste estudo serão armazenadas em freezer, com temperatura -80°C , localizado em nosso serviço, à Rua Padre Camargo 530, sala 103, durante o prazo de 5 anos. No caso de não ser mais utilizado para outras pesquisas será devidamente descartado atendendo as normas sanitárias vigentes.

Atenciosamente,

Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Investigador Principal

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Relação entre vitamina D e doenças alérgicas

Vitamin D and allergic diseases

Hevertton L. B. S. Santos¹, Nelson A. Rosário Filho¹

Resumo

Objetivo: A vitamina D (VD) tem sido tema de diversos estudos com objetivo de determinar sua influência nos mecanismos imunológicos, incluindo os alérgicos. Esta revisão pretende apresentar o conhecimento atual, sobre a relação dos níveis séricos de vitamina D e doenças alérgicas.

Fonte de dados: Artigos originais, artigos de revisão e consensos obtidos à partir da pesquisa dos termos *vitamin D*, *allergy*, *asthma*, *rhinitis*, *food allergy*, *atopic dermatitis*, no banco de dados Pubmed®, publicados nos últimos 10 anos. Os artigos mais relevantes, de acordo com o objetivo do artigo, foram utilizados.

Síntese dos dados: Vários mecanismos de ação da VD sobre o sistema imunológico foram propostos. O momento em que ocorre a exposição à VD durante a vida pode ser ter efeito protetor quanto ao desenvolvimento de asma e outras doenças respiratórias. Como exemplo, filhos de mães suplementadas com VD na gestação tem menor incidência de sibilância recorrente. A VD tem participação na síntese de catelecidinas, e níveis altos destas estão relacionados à menor persistência dos sintomas de dermatite atópica. A menor exposição solar está inversamente relacionada à frequência de prescrição de adrenalina para reações anafiláticas. A VD também pode ter efeito potencializador da imunoterapia. Algumas observações, contrariando a corrente maior, demonstram que em comunidades isoladas, onde não se faz suplementação de VD, existe menor incidência de alergia alimentar.

Conclusão: Evidências epidemiológicas e experimentais demonstram a relação da VD e alergia. Estudos sobre a suplementação de VD, tanto para a prevenção primária de alergias, quanto para a modificação da doença existente são necessários e ajudarão a melhor compreender as doenças alérgicas.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2012;35(1):15-24: Vitamina D, alergia, asma, dermatite atópica, imunidade.

Introdução

Os receptores de vitamina D (VDR) estão amplamente distribuídos pelos tecidos do organismo. Desta forma, tem-se observado que ela está envolvida em muitos processos, além dos tradicionalmente conhecidos. Nos últimos anos, a vitamina D (VD) vem sendo tema de diversos estudos

Abstract

Objective: Vitamin D (VD) has been the subject of several studies aiming to determine their influence on immunological mechanisms, including allergic. This review aims to present the current knowledge on the relationship of serum vitamin D levels and allergic diseases.

Data source: Original articles, review articles and consensus obtained from the search terms of vitamin D, allergy, asthma, rhinitis, food allergy, atopic dermatitis, the database Pubmed®, published in the last 10 years. The most relevant articles in accordance with the purpose of this paper were used.

Data synthesis: Multiple mechanisms of action of VD on the immune system have been proposed. The moment of exposure to VD, during life, may have a protective effect on the development of asthma and other respiratory diseases. As an example, children of mothers who received supplemental RV during pregnancy have a lower incidence of recurrent wheezing. VD participates in the synthesis of cathelicidins, and high VD levels are related to the lower persistence of atopic dermatitis symptoms. The less sunlight exposure is inversely related to frequency of adrenaline prescription for anaphylactic reactions. VD may also have a potentiating effect on immunotherapy. Some contradictory observations show that in isolated communities, where there is no supplementation of VD, lower incidence of food allergy is reported.

Conclusion: Epidemiological and experimental evidences demonstrate the relationship between the VD and allergy. Studies on VD supplementation, as much for allergy primary prevention, as for modification of existing disease are needed and will help the better understanding of allergic diseases.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2012;35(1):15-24: Vitamin D, allergy, asthma, atopic dermatitis, immunity.

com objetivo de determinar sua influência em processos imunoalérgicos.

Apesar de não existir consenso sobre quais são os níveis séricos ideais da VD, valores altos ou baixos parecem ter influência sobre os mecanismos das doenças alérgicas. O

1. Serviço de Alergia e Imunologia Pediátrica, Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná.

momento de exposição (ou falta dela) à VD pode ter importância no desenvolvimento de asma e outras alergias. O objetivo desta revisão é analisar as informações contidas nos artigos considerados como mais relevantes, sobre a relação entre níveis séricos de VD e doenças alérgicas.

Vitamina D

A VD é uma vitamina lipossolúvel, obtida a partir da reação da radiação ultravioleta tipo B com o colesterol animal ou com o ergosterol vegetal. O primeiro passo para a biossíntese de VD envolve a ação da radiação ultravioleta entre 290 nm e 315 nm proveniente do sol sobre o 7-deidrocolesterol, na pele. Com a exposição solar, o 7-deidrocolesterol é convertido a pré-vitamina D₃, que é então transformada em vitamina D₃ por isomerização. A vitamina D₃ posteriormente sofre hidroxilação no fígado pela 25-hidroxilase, tornando-se o principal metabólito circulante, a 25(OH)D₃. E depois, no rim, pela ação da 1-alfa-hidroxilase, transforma-se na sua forma biologicamente ativa, a 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25[OH]₂D₃)¹.

A 1-alfa-hidroxilase está presente em diversas células, do organismo, incluindo as pulmonares, o que sugere que a VD pode ser ativada em outros tecidos, além do rim. Na realidade, a VD é um grupo de vitâmeros, ou seja, polímeros de uma vitamina, com atividade biológica similar no organismo (Tabela 1). A VD₂ e VD₃ são comumente chamadas de calciferol.

Funcionalmente, a VD controla o metabolismo fosfo-cálcico assim como está envolvida na função neuromuscular, na inflamação, e também influencia a ação de muitos genes que regulam a proliferação, diferenciação e apoptose celular².

A VD não é abundante nos alimentos comuns. A gema de ovo, o leite e o fígado contem alguma quantidade de VD. A carne de alguns peixes de águas profundas como salmão, atum e sardinha são mais ricas nesta vitamina.

O organismo sintetiza os precursores de VD, que, na pele, pela exposição aos raios UVB, se convertem em pré-vitamina D₃, que, por sua vez, no fígado, é metabolizada em VD. Este processo é responsável por 90% da VD sérica, sendo os 10% restantes provenientes da dieta. Considerando-se que a exposição solar não é uniforme em

toda a população, devido a hábitos, posição geográfica, clima, etc., não é fácil estabelecer com exatidão o requerimento dietético diário do ser humano, complementar à produção endógena da VD^{2,3}.

Considera-se adequada a exposição solar de braços e pernas, no período entre das 10 às 15 horas, duas vezes por semana para produzir níveis ótimos da vitamina. O tempo da exposição varia conforme o fototipo, mas está entre 5 e 30 minutos. Esta exposição é capaz de gerar VD suficiente, inclusive, para armazenamento na gordura, para uso posterior, no período de inverno⁴.

Existe maior incidência de câncer de pele em indivíduos com maior exposição à radiação solar. Contudo, alguns autores observaram menor frequência de outros tipos de câncer, como próstata, cólon e mama em populações de áreas de maior latitude, talvez um indício de que a menor exposição solar seria preventiva para tais moléstias. Tal informação não é consenso entre os pesquisadores e é alvo de discussão⁵.

O uso de protetor solar tem impacto sobre a síntese cutânea da VD, diminuindo intensamente a produção cutânea. Com fator de proteção solar (FPS) 8, esta redução é de 92,5% enquanto com FPS 15, pode chegar a 99%⁶.

A exposição à radiação solar, suficiente para provocar um mínimo eritema, em um indivíduo vestindo trajes de banho, pode ser equivalente à ingestão de aproximadamente 20.000 UI de vitamina D^{2,4,6}.

Para manter níveis entre 30-60 ng/mL é necessário a dose diária de 400 UI para crianças entre zero e um ano de idade, 600 UI para indivíduos entre um e 70 anos, e 800 UI/dia para aqueles acima de 70 anos. Novos consensos tem considerado níveis inferiores a 30 ng/mL como deficiência e inferiores a 15 ng/mL como insuficiência⁶. A VD age como se fora um hormônio. Os níveis sanguíneos devem ter limites ótimos, acima ou abaixo dos quais pode haver consequências clínicas.

Ainda que a exposição solar necessária para manter a suficiência de VD seja pequena, níveis séricos baixos são encontrados em grandes porções da população. Em levantamento realizado em 6.000 indivíduos entre um e 21 anos de idade, nos Estados Unidos, encontrou-se que 70% tinham níveis subótimos de VD, 61% insuficientes

Tabela 1 - Vitâmeros da vitamina D*

Vitamina D ₁	Composto molecular do ergocalciferol com lumisterol
Vitamina D ₂	Ergocalciferol (proveniente do ergosterol)
Vitamina D ₃	Colecalciferol (proveniente do 7-deidrocolesterol na pele)
Vitamina D ₄	22-dihidroergocalciferol
Vitamina D ₅	Sitocalciferol (proveniente do 7-dehidrositosterol)

* Adaptado de *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*.

(< 30 ng/mL) e 9% deficientes (< 15 ng/mL). Este estudo também identificou gênero feminino como população de risco, além de afro e méxico-americanos, indivíduos que tomam leite (fortificado) menos de uma vez por semana e ainda entre aqueles que ficam mais de quatro horas/dia diante do televisor ou computador⁷.

Além dos níveis séricos, para seu correto funcionamento a VD depende da presença de receptores de VD (VDR). O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição, assim como os receptores de hormônio tireoideano, receptor de ácido retinoico⁸.

Após sua ativação pela VD, o VDR forma um heterodímero com o receptor de retinoide-X e se liga a elementos de resposta hormonal no DNA, resultando em expressão ou transrepressão de proteínas específicas. Em humanos, o VDR é codificado pelo gene VDR. Descreve-se a existência de grande número de variações na estrutura deste receptor, conhecidas como polimorfismos. Estes polimorfismos podem determinar defeitos ou até, a incapacidade completa de ligação do VDR com a VD, ocasionando consequências da

hipovitaminose D, ainda em indivíduos com níveis ótimos ou elevados⁹.

Os principais artigos utilizados para elaboração desta revisão, estão dispostos na Tabela 2.

Vitamina D e Asma

Estudos demonstram que a deficiência de VD associa-se a padrões epidemiológicos observados na "epidemia" de asma. Por exemplo, a deficiência, é mais comum em obesos, afro-americanos e populações ocidentais, e coincide com a população que tem maior risco também para asma. Existem evidências de que a VD pode exercer função sobre a responsividade das vias aéreas, função pulmonar, controle da asma, e talvez, se relacione com a resistência aos corticosteroides³.

Revisões sistemáticas e meta-análises mostram potencial benefício do uso de VD na asma^{3,10,11}. Contudo, atualmente, não se dispõe de evidência nível "A" sobre a função da VD sobre as doenças alérgicas¹².

Tabela 2 - Artigos originais utilizados nesta revisão

Ano	1º autor	População	Método	Resultados
2006	Kull	4.089 RN	IgE específica, follow up, questionário	Suplementação com VD e A hidrossolúveis aumenta em duas vezes o risco de asma e sensibilização alérgica, à idade de 4 anos comparada com a suplementação de óleo de amendoim
2007	Camargo	1.1511.534 prescrições de EpiPen® nos EUA	Prescrição e venda	Existe um gradiente norte-sul para a prescrição por estado americano. Sugere que a menor exposição solar pode estar relacionada com maior incidência de anafilaxia
2009	Bäck	123 crianças	Inquérito alimentar e follow-up	Maior consumo de Vitamina D3 na infância está associado a maior risco de DA aos 6 anos
2009	Hyppönen	9.377 adultos	25(OH)D3 + questionário	Comparado com indivíduos com níveis normais (100-125 nmol/l), aqueles com VD < 25 nmol/L tem níveis de IgE 29% superior e os com níveis > 135 nmol/L, 56% superior
2009	Majak	54 crianças asmáticas alérgicas a ácaros	Randomizado duplo cego, Placebo 3 grupos: IT + Placebo IT + CTCVO IT + CTCVO + VD	A IT com CTCVO parece prejudicar a indução de linfócitos T reguladores, prejudicando a imunoterapia. Este efeito não se observa no grupo CTC+VD. A VD parece anular esta influência negativa do CTC sobre a IT

VD= vitamina D, UV= ultravioleta, RN= recém-nascido, NK= natural killer, DA= dermatite atópica, SCORAD= escore de dermatite atópica, ATAQ= questionário de avaliação de tratamento da asma, BP= broncoprovocação, dexa= dexametasona, CTC= corticoide, CTCVO= corticoide via oral, CTCI= corticoide inalatório, IT= imunoterapia.

Tabela 2 - Artigos originais utilizados nesta revisão (continuação)

Ano	1º autor	População	Método	Resultados
2009	Brehm	616 crianças	IgE sérica, função pulmonar, crises de asma, 5(OH)D	Baixos níveis de VD estão associados a mais hospitalizações, maior resposta ao broncodilatador e maiores níveis de IgE
2010	Gorman	Ratos	Lavado bronco alveolar	1,25(OH)2D3 aumenta a capacidade do linfócito T CD4+, CD25+ em suprimir a resposta TH2
2010	Camargo	922 RN	Sangue do cordão, questionário, <i>follow up</i>	Níveis de 25(OH)D no cordão tiveram relação inversa com risco de infecção respiratória e sibilância na infância
2010	Sutherland	54 adultos asmáticos	25(OH)D, função pulmonar, BP, resposta à dexta (MKP-1)	Em asmáticos, maiores concentrações de VD estão associados com melhora da função pulmonar, menor hiperresponsividade e melhor resposta aos CTC
2010	Vassalo	1.002 crianças	Revisão de prontuários de indivíduos com reação alérgica alimentar	Alergia alimentar é mais comum em crianças de Boston nascidas no outono e inverno
2010	Nwaru	931 crianças	Coorte, <i>follow up</i>	Consumo de frutas cítricas na gestação pode aumentar risco de sensibilização da prole, enquanto a suplementação com VD pode ter efeito benéfico
2010	Brehm	1.024 crianças asmáticas	25(OH)D3 sérica, e clínica	Insuficiência de VD é comum em asmáticos americanos e prediz o aumento do número de exacerbações de asma no período de 4 anos. Suficiência de VD confere proteção contra exacerbações graves
2010	Urashima	234 crianças	Randomizado duplo-cego, com placebo	Suplementação de VD durante o inverno pode reduzir a incidência de Influenza A
2011	Hughes	353 adultos	Enquete e laboratório	A relação inversa entre diagnóstico de asma e latitude não é decorrente da exposição à radiação UV mas pode ser explicado por outros fatores como a temperatura. Óleo de fígado de bacalhau antes dos 15 anos está associado com maior frequência de asma e rinite
2011	Ehlayel	976 crianças	Caso-controle, clínica e laboratório	Asmáticos têm menores níveis de VD. Deficiência de VD é maior entre indivíduos com asma, DA, rinite, urticária e alergia alimentar
2011	Sharief	6.590 adultos e crianças	Enquete e laboratório	Deficiência (< 15 ng/mL) 25(OH)D está associada à maior sensibilização IgE mediada em crianças e adolescentes

VD= vitamina D, UV= ultravioleta, RN= recém-nascido, NK= natural killer, DA= dermatite atópica, SCORAD= escore de dermatite atópica, ATAQ= questionário de avaliação de tratamento da asma, BP= broncoprovocação, dexta= dexametasona, CTC= corticoide, CTCVO= corticoide via oral, CTCI= corticoide inalatório, IT= imunoterapia.

Tabela 2 - Artigos originais utilizados nesta revisão (continuação)

Ano	1º autor	População	Método	Resultados
2011	Majak	48 crianças	Prospectivo, ATAQ, VEF ₁ , 25(OH)D sérica	Asmáticos recebendo CTCI tiveram queda dos níveis de VD em 6 meses Asmáticos recebendo CTCI + VD tiveram menos exacerbações e discreto aumento dos níveis de VD
2011	El-shazly	16 adultos	Cultura de células NK	NK produz menos IL8 na presença de vitamina D3
2011	Peroni	37 crianças	SCORAD	Altos níveis de VD estão associados à menor SCORAD na DA
2011	Hartmann	Ratos	Cultura de linfócitos B	Calcitriol e outro agonista do VDR diminuí intensamente a produção de IgE por Linfócitos B periféricos

VD= vitamina D, UV= ultravioleta, RN= recém-nascido, NK= natural killer, DA= dermatite atópica, SCORAD= escore de dermatite atópica, ATAQ= questionário de avaliação de tratamento da asma, BP= broncoprovocação, dexam= dexametasona, CTC= corticoide, CTCVO= corticoide via oral, CTCI= corticoide inalatório, IT= imunoterapia.

Avaliação realizada com mais de 14.000 indivíduos, por determinação de níveis séricos de VD e função pulmonar, demonstrou que maiores concentrações da vitamina estão relacionadas a maior volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada. Neste grupo, se encontrou menores níveis séricos de VD em negros não hispânicos, México-americanos e fumantes¹³.

O segmento de uma coorte pediátrica, de casos e controles, com quase mil asmáticos, mostrou que estes têm níveis inferiores de VD¹⁴.

Alguns mecanismos de ação da VD sobre as doenças alérgicas têm sido propostos. Em experimento com cobaias *knock out* para o gene do VDR se observou o desenvolvimento acelerado de mastócitos e que a interação VD-VDR exerce função importante na diferenciação, maturação e função deste tipo celular¹⁵.

A VD estimula as células T regulatórias a produzir mais IL-10 inibindo o perfil Th2 e parece reverter o defeito de produção de IL-10 em asmáticos resistentes ao tratamento com corticoides (CTC).

É proposto que em indivíduos que tem baixa exposição solar, dieta inadequada, ou pertencem a população de risco para deficiência de VD, exista um meio com menor concentração de IL-10, o que leva a maior inflamação da via aérea, e, além disto, resistência aos CTC³. Níveis baixos de VD estimulam a proliferação do músculo liso bronquial e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, levando a obstrução e hiperresponsividade brônquica³ (Figura 1).

O momento em que ocorre a exposição VD (ou falta dela) parece ter importantes implicações sobre a forma como células do sistema imunológico respondem. Linfócitos T *naive* do cordão umbilical, podem se comportar de maneira diferente das células T adultas do sangue periférico a esta exposição.

Uma coorte composta por 1.194 duplas de mães com seus filhos avaliou a ingestão materna de VD durante a gravidez, a partir de questionário validado de frequência e hábito alimentar. O resultado observado foi maior incidência de sibilância recorrente aos três anos nos filhos de mulheres que referiram dieta mais pobre nesta vitamina¹⁶.

Na avaliação de 616 crianças asmáticas da Costa Rica, comparou-se níveis séricos de VD, marcadores de alergia e gravidade da asma. Níveis elevados de VD, se associam a menor eosinofilia periférica, menor IgE total, menor pápula no *prick test* e menor índice de internamentos e uso de CTC nas crises¹⁷. Entre os indivíduos estudados, 28% tinham níveis subótimos de VD. Contudo, ainda que a exposição seja supostamente intensa na Costa Rica, devido a sua localização geográfica, a pele bronzeada, do indivíduo que tem exposição solar constante, pode dificultar a produção cutânea da vitamina.

Seguindo a tendência, uma coorte da Nova Zelândia, acompanhada desde 1997, avaliou amostras de sangue do cordão umbilical, armazenadas no momento do parto, também demonstrou efeito benéfico da VD sobre a asma em crianças. Neste grupo existe associação entre maiores níveis

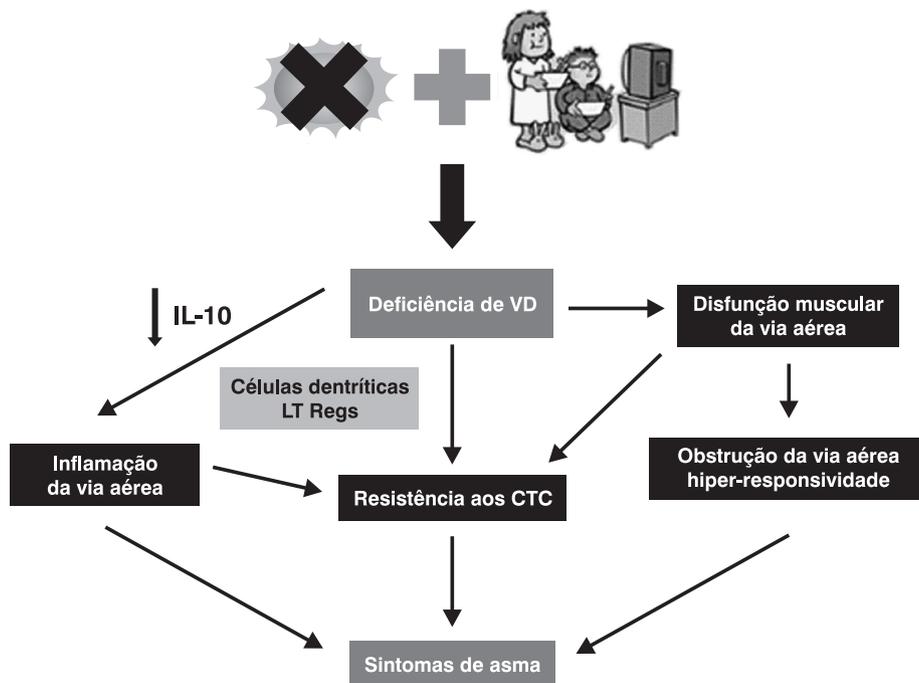


Figura 1 - Hipótese demonstrando os vários possíveis efeitos da deficiência de VD na patogênese da asma (Adaptado de Sandhu et al., 2010³)

de VD no cordão com menor risco de infecções respiratórias aos três meses de idade, e menor risco de sibilância aos 15 meses, 3 e 5 anos¹⁸.

Por outro lado, avaliação similar em adolescentes, concluiu que a suplementação com óleo de fígado de bacalhau (fonte de VD) antes dos 15 anos, está associada com maior frequência de asma e rinite¹⁹.

Ainda que níveis de VD no cordão possam explicar o risco de sibilância alguns anos mais tarde, os níveis maternos de VD durante a gestação podem alterar o desenvolvimento do sistema imunológico intraútero ou ainda, nos primeiros meses de vida³.

Existe um crescente interesse nas ações da VD sobre o sistema imunológico e as doenças alérgicas. Em uma rápida pesquisa no banco de dados MEDLINE®, com os termos *vitamin D + asthma*, foram encontrados 225 artigos publicados no dia da pesquisa (15/11/2011) e houve um aumento nos últimos anos, e pode ser observado na Figura 2.

Dermatite atópica

A dieta materna pobre em VD, está associada com maior prevalência de eczema em sua prole²³. Já a maior ingestão de vitamina D3 no primeiro ano de vida da crian-

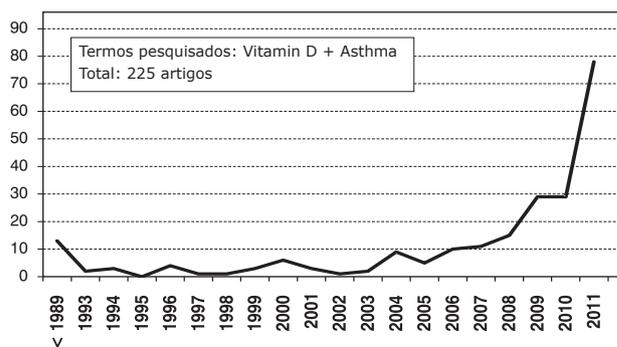


Figura 2 - Artigos publicados, por ano, disponíveis no banco de dados Medline®, até o dia 1/12/2011

ça foi associada com maior frequência do diagnóstico de atopia aos 6 anos de vida²⁴.

Na avaliação dos níveis séricos de VD em indivíduos com dermatite atópica (DA), encontrou-se que, maiores índices no SCORAD, ou seja, maior intensidade de sintomas, estão associados a menores concentrações de dita vitamina (Figura 3)²⁵.

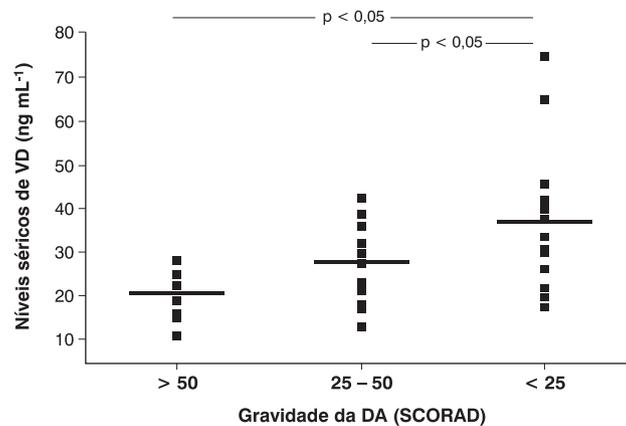


Figura 3 - Níveis séricos de vitamina D (VD) em relação aos níveis do SCORAD. As linhas horizontais indicam os valores médios de cada grupo (Adaptado de Peroni et al, 2011²²)

Um dos mecanismos de atuação da VD na DA está relacionado com a produção e funcionamento das catelecidinas. Estas pertencem à família de peptídeos antimicrobianos²³ e estão envolvidas na resposta imunológica aos vírus, bactérias e fungos^{24,25}. Também agem sinergicamente com mediadores inflamatórios endógenos para incrementar a indução de efetores inflamatórios específicos de várias outras vias²⁶. Como resultado, as catelecidinas podem aumentar a migração celular e secreção de quimocinas e outras moléculas sinalizadoras das células ativadas^{23,27}. Na pele saudável e íntegra, a produção de catelecidina acontece em pequenas quantidades. A lesão ou infecção tissular estimulam a atividade da 1-alfa-hidroxilase (CYP27B1) de monócitos e queratinócitos a ativar mais VD localmente, o que estimula a expressão e atividade das catelecidinas (Figura 4)^{28,29}. Vários grupos de pesquisa tem comprovando esta influência da vitamina D3 sobre a produção de catelecidinas pelos queratinócitos^{30,31}.

Devido aos potenciais efeitos da VD em suprimir a resposta inflamatória e aumentar a atividade dos peptídeos antimicrobianos, sua suplementação pode ser uma intervenção útil no tratamento da dermatite atópica³².

Alergia alimentar e anafilaxia

Na alergia alimentar, a hipótese de maiores níveis de VD estarem associados a menores índices de alergias, não encontra respaldo. À exemplo, existem relatos que, em comunidades agrícolas alemãs com menor suplementação alimentar de VD, existe menor prevalência de doenças alérgicas. Tal argumento

foi reforçado com a observação do aumento da frequência de diagnóstico de alergias na Baviera após 1960. À época, implantou-se um programa de suplementação alimentar de VD no país, visando combater o raquitismo³³.

Em coorte de recém nascidos, que receberam suplementação de VD nos primeiros meses de vida, observou-se risco aumentado de desenvolver alergia alimentar³⁴.

Porém, alguns autores afirmam que é possível que a correção da deficiência de VD possa estimular a imunidade da mucosa intestinal, promover uma ecologia microbiana mais saudável e também a aumentar a tolerância aos alérgenos em indivíduos com alergia alimentar³⁵.

Quanto a anafilaxia, numa tentativa de explicar sua associação com os níveis séricos de VD, um grupo avaliou as taxas regionais de prescrições de um auto injetor de adrenalina (EpiPen) no ano de 2004 em todos estados dos EUA. Com o número médio de prescrições por habitante notou-se que em estados da região nordeste (Connecticut, Rhode Island, Massachusetts, Vermont, New Hampshire,) ocorrem as maiores frequências, com 8-12 prescrições para cada 1.000 habitantes. Enquanto isto, nos estados do sul e na Califórnia e Mississippi, se prescreveram 3 receitas para cada grupo de 1.000 habitantes.

Este estudo demonstrou um gradiente norte-sul para a prescrição destes dispositivos nos Estados Unidos e serviu de base para formular-se a hipótese de que onde mais se prescreveu EpiPen, ocorre menor exposição solar, e que tal fato poderia estar relacionado com maior incidência de anafilaxia³⁶.

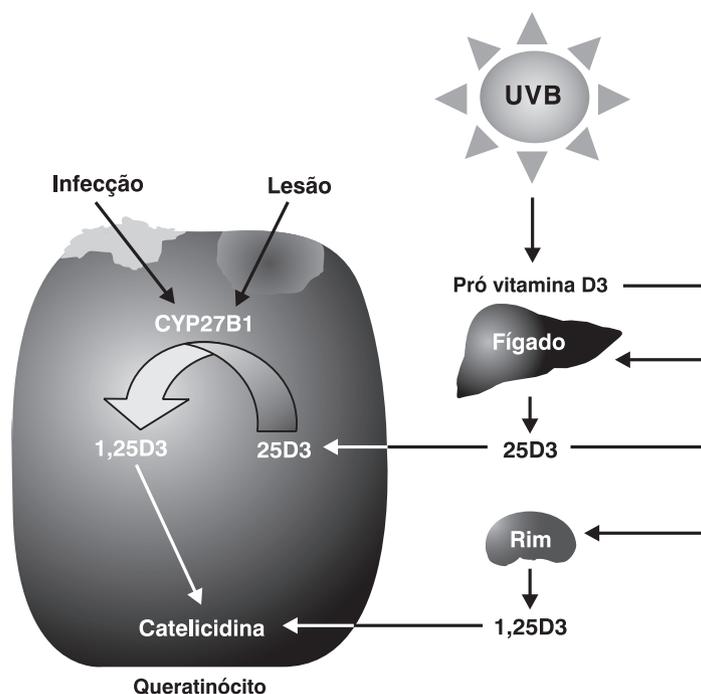


Figura 4 - Mecanismos de ativação da vitamina D3 (VD3) e resposta da catelicidina*

* O metabolismo extra-renal da VD3 pelos queratinócitos fornece um sistema para o rápido controle da expressão da catelicidina. A ativação da 25D3 em 1,25D3 requer dois passos de hidroxilação que ocorrem sequencialmente no fígado e no rim. Entretanto, queratinócitos também expressam uma 1-alfa-hidroxilase (CYP27B1) que ativa a 1,25D3. A expressão desta hidroxilase nos queratinócitos é estimulada pela lesão e infecção tecidual. Adaptado de Schaubert et al., 2007²⁸.

Imunoterapia

Poucos estudos relacionam VD com imunoterapia. Um deles avaliou a influência dos CTC orais e da VD sobre os primeiros efeitos clínicos e imunológicos da imunoterapia (IT). Asmáticos sensíveis a ácaros foram divididos em grupos e recebiam os medicamentos 3 a 4 horas antes da dose de IT, na fase de indução. Após 12 meses de IT subcutânea, a média diária da dose CTC inalado, foi reduzida em 25% no grupo de que recebia apenas CTC ao contrário do grupo controle em que houve 50% redução da dose de CTC.

A intervenção com CTC pode dificultar a indução de linfócitos T reguladores. Tal efeito não observado em no grupo que recebeu CTC associado à VD. Assim, postula-se que a VD anula a influência negativa do CTC sobre a IT, aumentando a expressão de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF-beta³⁷.

VD e o sistema imunológico

A VD pode exercer sua função em vários sistemas, visto que seu receptor foi localizado em vários tecidos do organis-

mo, incluindo as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) células dendríticas e linfócitos T^{38,39}.

A forma hormonal da vitamina D3, a 1,25 (OH) 2D3, inibe a linfocina promotora de crescimento (IL-2), que é produzida pelos linfócitos T humanos ativadas *in vitro* pelo mitógeno fitohemaglutinina⁴⁰. Tem sido observado que esta vitamina diminui a proliferação de linfócitos Th1 e Th2, reduz a produção de interferon gama, IL-5 e aumenta a produção de IL-4⁴¹.

A VD tem feitos inibitórios sobre os LT *naive* na produção de IFN-gama induzido por IL-12, assim como a produção de IL-4 e IL-13 induzida por IL-4⁴². Com isto, em indivíduos com deficiência de VD, existe favorecimento à predominância da resposta Th1 e que em indivíduos com altos níveis de vitamina D, além de ocorrer a supressão dos efeitos Th1, também pode ocorrer o incremento das respostas Th2⁴³.

Em modelos murinos de inflamação eosinofílica pulmonar, quando os animais são tratados precocemente com VD, ocorre a proliferação de células T induzida por alérgenos e no lavado broncoalveolar, observa-se recrutamento deficiente de eosinófilos, diminuindo a resposta inflamatória alérgica⁴⁴.

No entanto, estes resultados variáveis podem estar relacionados com a dose de VD, com os níveis séricos desta vitamina, com o momento em que ocorre a exposição (*LT naive*, *LT maduros*).

Conclusão

A associação entre níveis de vitamina D e doenças alérgicas parece promissora e requer mais pesquisas. Já estão estabelecidos, níveis adequados de ingestão suplementar de VD para todos os grupos da população, a fim de evitar a deficiência e insuficiência vitamínica. Existe efeito benéfico da suplementação de VD em gestantes, com relação a presença de sintomas respiratórios em seus filhos. Porém, ainda é controverso o uso de VD suplementar para o tratamento das alergias.

Níveis baixos de VD estão frequentemente associados a hábitos de vida ocidentais, que por sua vez, se relacionam epidemiologicamente com a asma e outras alergias, podendo assim, gerar um viés na interpretação dos dados.

Estudos sobre a suplementação de VD, tanto para a prevenção primária de alergias, quanto para a modificação da doença existente, principalmente enfocando seu mecanismo de ação no sistema imunológico estão em andamento e ajudarão a compreender melhor as doenças alérgicas. Além disto, a possibilidade de alterações ou mutações nos receptores de VD que prejudiquem a interação das células com a vitamina, pode ter implicações tanto na instalação de doença alérgica, quanto no seu tratamento.

Referências

- Lamberg-Allardt C. Vitamin D in foods and as supplements. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;92:33-8.
- Blanco A. Vitaminas. Em: Blanco A. *Química biológica 6ª edição*. Buenos Aires: El Ateneo; 1998. P 475-81.
- Sandhu MS, Casale TB. The role of vitamin D in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;105:191-9.
- Holick MF. Let the sunshine in, in Holick, MF, *the vitamin D solution*, 1a edição, New York; 2010, capítulo 8.
- Garland CF, Garland FC, Gorham ED. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 2006;96:252-61.
- Holick, MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266-81.
- Kumar J, Muntner P, Kaskel FJ, Hailpern SM, Melamed ML. Prevalence and associations of 25-hydroxyvitamin D deficiency in US children: NHANES 2001-2004. *Pediatrics* 2009;124:362-70.
- Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, et al International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol* 2006;58(4):742-59.
- Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, et al. The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 1991;11(1):168-73.
- Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:724-33.
- Ginde AA, Sutherland ER. Vitamin D in asthma: panacea or true promise? *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:59-60.
- Allan K, Devereux G. Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment. *J Am Diet Assoc* 2011;111:258-68.
- Black PN, Scragg R. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin d and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. *Chest* 2005;128(6):3792-8.
- Ehlayel MS, Bener A, Sabbah A. Is high prevalence of vitamin D deficiency evidence for asthma and allergy risks? *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2011;43:81-8.
- Baroni E, Biffi M, Benigni F. VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 2007;81:250-62.
- Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007;85:788-95.
- Brehm JM, Celedón JC, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:765-71.
- Camargo CA Jr, Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, et al. New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study Group. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics* 2011;127:e180-7.
- Hughes AM, Lucas RM, Ponsonby A-L, Chapman C, Coulthard A, et al. The role of latitude, ultraviolet radiation exposure and vitamin D in childhood asthma and hayfever: an Australian multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:327-33.
- Willers SM, Devereux G, Craig LC. Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax* 2007;62:773-9.
- Bäck O, Blomquist HK, Hernell O, Stenberg B. Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? *Acta Derm Venereol* 2009;89:28-32.
- Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *Br J Dermatol* 2011;164:1078-82.
- Schauber J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:261-6.
- Braff MH, Gallo RL. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;306:91-110.
- Lopez-Garcia B, Lee PH, Yamasaki K, Gallo RL. Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *J Invest Dermatol* 2005;125:108-15.
- Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DM, Pistollic J, Li Y, et al. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol* 2007;179:7684-91.
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007;127:594-604.
- Schauber J, Dorschner RA, Coda AB, Buchau AS, Liu PT, Kiken D, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007;117:803-11.
- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311:1770-3.
- Wang T-T, Nestel F, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909-12.
- Weber G, Heilborn JD, Chamorro Jimenez CI, Hammarsjo A, Torma H, Stahle M. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *J Invest Dermatol* 2005;124:1080-2.

32. Hata TR, Kotol P, Jackson M, Nguyen M, Paik A, Udall D, et al. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:829-31.
33. Wijst M. Another explanation for the low allergy rate in the rural Alpine foothills. *Clin Mol Allergy* 2005;3:7.
34. Milner JD, Stein DM, McCarter R, Moon RY. Early infant multivitamin supplementation is associated with increased risk for food allergy and asthma. *Pediatrics* 2004;114:27-32.
35. Vassallo MF, Camargo CA Jr. Potential mechanisms for the hypothesized link between sunshine, vitamin D, and food allergy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:217-22.
36. Camargo CA Jr, Clark S, Kaplan MS, Lieberman P, Wood RA. Regional differences in EpiPen prescriptions in the United States: the potential role of vitamin D. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:131-6.
37. Majak P, Rychlik B, Stelmach I. The effect of oral steroids with and without vitamin D3 on early efficacy of immunotherapy in asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1830-41.
38. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:1308-10.
39. Brennan A, Katz DR, Nunn JD. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 1987;61:457-61.
40. Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984;224:1438-40.
41. Mahon BD, Wittke A, Weaver V. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003;89:922-32.
42. Pichler J, Gerstmayr M, Szepfalusi Z. 1 alpha, 25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatr Res* 2002;52:12-8.
43. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C. 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(1) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001;167:4974-80.
44. Matheu V, Back O, Mondoc E. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:585-92.

Correspondência:

Hevertton Luiz Bozzo Silva dos Santos
Rua Antonina, 2464 - ap. 1202
CEP 85812-040 – Cascavel, PR
E-mail: drhevertton@hotmail.com

Título: Associação entre níveis séricos de Vitamina D e asma em crianças

Título abreviado: Associação entre níveis séricos de Vitamina D e asma

Title: Association between serum vitamin D levels and asthma in children

Autores: Hevertton L. B. S. Santos – Pesquisador principal.

Especialista em Alergia e Imunologia Clínica

drhevertton@hotmail.com

<http://lattes.cnpq.br/1196544722206331>

Nelson A. Rosário Filho - Orientador

Professor Titular de Pediatria, Universidade Federal do Paraná

nelson.rosario@ufpr.br

<http://lattes.cnpq.br/9586520484706376>

(Trabalho à ser apresentado no XXXIX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia à ser realizado entre 10 e 13 de novembro. Inscrito no premio Oswaldo Seabra)

Declaração de conflito de interesses: NADA À DECLARAR

Instituição: Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná

Autor responsável pela publicação: Dr Hevertton L.B.S. Santos

Endereço: Hospital de Clínicas , UFPR. Rua General Carneiro 181, 14° andar

CEP: 80060-900 Curitiba,PR.

E-mail: drhevertton@hotmail.com

Fonte financiadora ou fornecedora de equipamento e materiais: HC-UFPR, UNIBRASIL, Laboratório PR-ANÁLISE.

Contagem total das palavras do texto: 1808 palavras.

Contagem total das palavras do resumo: 240 palavras.

Número de tabelas e figuras. 4 tabelas.

RESUMO

Introdução: para explicar o padrão de prevalência de asma e alergias, formulou-se a hipótese de que baixos níveis séricos de Vitamina D (VD) estariam relacionados à maior incidência destas doenças. Este estudo verifica a relação entre níveis séricos de VD e asma, necessidade de corticoterapia inalatória (CTCI), função pulmonar, testes alérgicos cutâneos e IgE. **Métodos:** estudo transversal com crianças entre 7 e 14 anos, divididas em 2 grupos: Asmáticos, usando CTCI; asmáticos sem CTCI. Dados clínicos, espirométricos e testes alérgicos foram registrados. Foram determinados os níveis séricos de VD, IgE total e específica à alérgenos comuns, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e paratormônio e cortisol. **Resultados:** 60 crianças foram avaliadas. A média de idade foi 10,8 ($\pm 2,1$ anos), 65% do gênero masculino, todos provenientes de Curitiba. 38 no grupo de asmáticos com CTCI, 22 sem CTCI. 8 asmáticos atingiram critérios de obesidade. Deficiência ou insuficiência de VD foi diagnosticada em 98%, com níveis de VD de $17,9 \pm 5,6$ e $16,6 \pm 4,8$ ng/mL em pacientes com e sem uso de corticoide, respectivamente ($p = 1,0$). Não houve correlação entre os níveis de VD com função pulmonar, testes alérgicos, IgE. **Conclusão:** baixos níveis de vitamina D ocorreram em quase todos os asmáticos avaliados. Não houve relação entre níveis de VD com a necessidade do uso de corticoterapia inalatória para o controle da asma, com função pulmonar, com resultados dos testes alérgicos nem com valores de IgE total ou específicas.

Palavras-chave: Asma; Vitamina D; Alergia, IgE, espirometria.

ABSTRACT

Background: as an attempt to explain the prevalence pattern of asthma and allergies, it was hypothesized that low serum vitamin D levels (VD) were related to higher incidence of these diseases. This study assesses the relationship between serum VD levels with asthma, need of inhaled corticosteroids (ICS), pulmonary function tests, skin prick tests and IgE. **Methods:** cross-sectional study with children between 7 and 14 years, divided into two groups: Asthmatics using ICS; asthmatic without ICS. Clinical data, pulmonary function and prick test results were recorded. VD, total and specific IgE to common allergens, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, PTH and cortisol levels were determined. **Results:** 60 children were evaluated. The mean age was 10.8 (± 2.1 years), 65% male, all from Curitiba. 38 in the group of asthmatics with ICT and 22 without ICT. 8 asthmatics reached obesity criteria. VD deficiency or insufficiency was diagnosed in 98%, with VD levels of 17.9 ± 5.6 and 16.6 ± 4.8 ng/mL in patients with and without use of ICS, respectively ($p = 1.0$). There was no correlation between VD levels and pulmonary function, skin prick test and IgE. **Conclusion:** low serum vitamin D levels occurred in almost all evaluated asthmatics. There was no relation between VD levels with the need to use inhaled corticosteroids for asthma control, pulmonary function, with results of skin prick tests or with values of total and specific IgE.

Keywords: Asthma; Vitamin D; allergy, spirometry, IgE

Introdução: Na tentativa de explicar o padrão de prevalência da asma e de outras doenças alérgicas, a hipótese da higiene sugere que estas ocorrem devido à menor exposição às infecções nos primeiros anos de vida, em famílias pequenas de países ocidentais. Este padrão de exposição levaria à falha no desenvolvimento da resposta TH1 e, desta forma, ao predomínio da resposta imunológica TH2.

Entretanto, estudos mostram que a hipótese da higiene não explica todos os aspectos epidemiológicos da asma, como a relação da asma com obesidade, a grande prevalência de asma em centros urbanos pobres e ao incremento na frequência de doenças autoimunes mediadas pela resposta TH1¹.

Na tentativa de explicar estes fatos, formulou-se a hipótese de que tais doenças estariam ligadas aos níveis séricos de Vitamina D (VD). Em populações mais prósperas e ocidentalizadas, é maior a permanência em ambientes fechados, com menor exposição à luz solar, e assim, é maior a frequência de hipovitaminose D. Esta deficiência pode estar relacionada à maior incidência de asma e outras doenças alérgicas^{2,3}.

A VD, um hormônio obtido em grande parte da síntese cutânea dependente da interação com a radiação UV, exerce funções em uma grande variedade de tecidos, uma vez que seus receptores foram encontrados em diversos sistemas do organismo⁴. Alterações dos níveis séricos de VD tem sido associados ao diagnóstico de asma, exacerbações de asma e gravidade das crises², gravidade da dermatite atópica⁵ e à frequência de anafilaxia⁶. Algumas explicações para tais efeitos foram estudadas, entretanto, a exata relação da vitamina D com as doenças alérgicas permanece desconhecida⁷.

Os objetivos deste estudo são identificar os níveis séricos de VD crianças entre 7 e 14 anos, com diagnóstico de asma, acompanhadas em ambulatório

especializado, e também, verificar a correlação destes níveis com a necessidade de corticoterapia para o controle da doença, com os resultados de função pulmonar, de testes alérgicos e de níveis séricos de IgE total e específicas.

Métodos: Estudo observacional analítico transversal, com coleta de dados prospectiva, realizado pela análise dos dados clínicos de pacientes de 7 à 14 anos, em acompanhamento por asma em ambulatório especializado assim como da análise bioquímica dos casos, realizado de Abril à Novembro de 2011 .

A amostra foi dividida em 2 grupos: 1) pacientes com diagnóstico de asma persistente, em uso de corticóide inalatório, em dose diária ≥ 400 ug de beclometasona ou o equivalente em outras formulações, por período superior a 1 ano; 2) pacientes' com diagnóstico de asma intermitente, sem necessidade de corticóide inalatório para controle.

Crítérios de inclusão: crianças com idade de 7 à 14 anos, selecionadas por conveniência, em acompanhamento por asma no ambulatório do Serviço de Alergia do HC-UFPR, cujos pais concordaram com sua participação no estudo. A vontade da criança foi respeitada e o termo de assentimento foi obtido quando necessário.

Crítérios de exclusão: Foram excluídos indivíduos com diagnósticos de doenças crônicas associadas como nefropatia e doenças reumáticas e aqueles que solicitaram retirada do termo de consentimento.

Procedimentos: após o preenchimento do termo de consentimento, e de assentimento quando aplicável, foi realizada a coleta de dados clínicos(incluindo resultados de testes alérgicos e de provas de função pulmonar) e a coleta de amostra de sangue. Os dados foram coletados dos prontuários padronizados do serviço de Alergia Pediátrica, que minimiza a discrepância dos dados avaliados durante a consulta.

Dados pessoais como data de nascimento, gênero e procedência, história familiar de doenças alérgicas, peso, estatura, índice de massa corporal (IMC),

diagnósticos e medicamentos em uso foram registrados. Também foram analisados os resultados dos testes alérgicos e espirometrias.

Foram considerados obesos aqueles com IMC superior ao escore Z +2, de acordo com a idade e gênero, conforme a classificação da OMS de 2007.

Os diagnósticos de asma foram realizados utilizando-se os critérios propostos pelo GINA, assim como os tratamentos instituídos. Diagnósticos de urticária, dermatite atópica, rinoconjuntivite e outras alergias foram estabelecidos de acordo com os protocolos disponíveis atualmente.

A história familiar foi considerada positiva na presença de relato consistente de dermatite atópica, urticária, asma ou rinite.

O teste alérgico é realizado rotineiramente nos pacientes e consta das seguintes substâncias: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Lolium perenne*, epitélio de cão, epitélio de gato, *Blattella germanica*, além de controles positivo (histamina) e negativo (solução salina). Os resultados são medidos em milímetros, considerando-se os 2 maiores eixos das pápulas. Consideram-se positivos aqueles em que o valor médio dos eixos medidos superarem em 3 ou mais milímetros o resultado obtido para este cálculo obtido no local do controle negativo.

Os dados de função pulmonar, realizadas rotineiramente, foram obtidos dos prontuários. As espirometrias são realizadas pelo Serviço de Pneumologia do HC-UFPR. Considerou-se normal o VEF1% e CVF acima de 80% com relação ao predito para cada sujeito do exame. A prova broncodilatadora é considerada positiva em indivíduos com espirometria normal quando ocorre variação no VEF1% superior a 10% com relação ao valor obtido antes do uso do salbutamol. Para aqueles com diagnóstico de distúrbio ventilatório obstrutivo, considera-se positiva quando a variação é de 7% e de 200 mL.

Avaliação bioquímica: foram coletados 10 mL de amostra sanguínea de cada indivíduo. Após retração do coágulo e centrifugação, o soro foi dividido em alíquotas, armazenadas a -70°C , até o momento das análises laboratoriais.

Análises bioquímicas, obedeceram os métodos padronizados: cálcio e fósforo: colorimétrico/automatizado; fosfatase alcalina, enzimático; PTH, eletroquimioluminescência; cortisol basal e 25(OH)Vitamina D, quimioluminescência; IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis* e *Lolium perenne*, ImmunoCAP e IgE total, imunológico não competitivo.

Análise Estatística: os dados obtidos foram armazenados em planilha eletrônica Microsoft Excel® e posteriormente processados estatisticamente com o software Action®.

Os testes estatísticos foram escolhidos de acordo com o tipo de distribuição das variáveis contínuas estudadas, simétricas ou assimétricas, número de grupos e seu caráter de independência. Assim, o teste paramétrico empregado foi o Teste t de Student e não paramétrico foi o teste de Mann–Whitney–Wilcoxon.

Os valores de p maiores que 0,05 obtidos pelos testes utilizados foram considerados não significativos, e, portanto, de aceitação da hipótese zero ou nula de cada teste, determinando igualdade entre os grupos ou medidas avaliadas.

Relações univariadas entre níveis séricos de 25-hidroxivitamina D e características demográficas dos pacientes foram determinadas usando o coeficiente de correlação de Spearman, uma vez que este não é exigente quanto à normalidade de distribuição dos dados.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para cada uma das variáveis contínuas a fim de estabelecer a normalidade da distribuição da amostra.

Ética em Pesquisa: o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR. Os termos de consentimento e assentimento livre e esclarecido foram avaliados e aprovados pelo comitê antes de sua utilização.

Resultados: foram envolvidos 91 pacientes no estudo. Após as exclusões ocorridas por inadequação da amostra para avaliação laboratorial ou retirada do TCLE, restaram 60 indivíduos, divididos em 2 grupos.

Características da amostra: entre os 60 participantes avaliados, 39 (65%) eram do gênero masculino e 21 (35%) do gênero feminino. A idade dos participantes variou de 7,0 aos 14,7 anos com média de 10,8 ($\pm 2,1$ anos).

Quando avaliados individualmente, os grupos de asmáticos em uso de corticóide inalatório, asmáticos sem uso de corticóide inalatório apresentaram similaridades. Todos os participantes foram provenientes do município de Curitiba e região metropolitana. Geograficamente, Curitiba localiza-se à -25° de latitude e -49° de longitude.

Características clínicas dos asmáticos: entre os 60 indivíduos incluídos neste grupo, 22 (36,6%) não utilizavam corticóide inalatório para o controle da asma e 38 (63,4%) faziam uso da medicação. Mais de 90% dos indivíduos do grupo de asmáticos tinham diagnóstico de rinite alérgica (97% entre os que fazem uso de CTCI). A frequência do diagnóstico de conjuntivite alérgica, dermatite atópica e outras alergias como urticária e alergia alimentar podem ser observadas na Tabela 1. Quase três quartos dos asmáticos apresentavam história familiar consistente para rinite, asma ou dermatite atópica. Notou-se a presença de fumantes nos lares daqueles pacientes que utilizavam medicamento para controle da asma (28,9%) assim como nos lares dos que não o faziam (40,9%).

A frequência de internações dos asmáticos em uso de CTCI foi significativamente superior à do grupo sem tratamento. Os testes de função pulmonar foram realizados em 50 asmáticos.

O índice de massa corporal (IMC) médio entre meninos foi $18,2 \pm 3,0$ Kg/m² e entre meninas foi $18,6 \pm 3,5$ Kg/m². Oito crianças atingiram critério de obesidade (OMS, 2007), com IMC acima do segundo desvio padrão para o escore Z.

Resultados dos exames bioquímicos: os níveis de vitamina D utilizados como referência vigentes à época da realização do estudo foram os seguintes: Níveis inferiores a 30 ng/mL: insuficiência; inferiores a 15 ng/mL, deficiência; acima de 30 ng/mL, normalidade. Quase 98% dos indivíduos testados estavam com níveis inadequados de VD. Entretanto, não houve associação entre níveis de VD e o uso de CTCl ($p=1,0$) e não houve diferença nos níveis séricos de VD entre os grupos. Os resultados dos testes laboratoriais realizados para todos os asmáticos avaliados estão dispostos na Tabela 2.

Considerou-se normal o nível de cortisol entre 5,5 e 30 ug/dL, conforme o método utilizado (Quimioluminescência). Baixos níveis de cortisol foram observados em 17 asmáticos (28,3%), destes 8 sem uso de CTCl e 9 utilizando o tratamento. Não foi observada associação entre os níveis de cortisol e o uso de CTCl ($p=0,37$) e os níveis séricos foram similares ($p=0,37$).

Os níveis de PTH são considerados normais entre 15,0 a 65,0 pg/mL de acordo com o método empregado (Eletroquimioluminescência). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p=0,65$).

Os níveis normais de cálcio e fósforo considerados foram de 8,5 a 10,5 mg/dL e 4,0 a 7,0 mg/dL respectivamente, pelo método colorimétrico automatizado. Assim como os anteriores, não houve diferença estatística entre os resultados observados ($p=0,11$ e $0,20$, respectivamente).

Níveis entre 110 e 340 U/L foram considerados normais para fosfatase alcalina. Não houve diferença entre as médias encontradas nos grupos ($p=0,85$).

Os resultados da IgE total e das específicas para *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis* e *Lolium perenne* realizadas podem ser observados na Tabela 3. Por fins estatísticos os valores de IgE total superiores a 5000 UI/mL foram arredondados para 5001 UI/mL e sequência unitária superior. Os valores de IgE específica acima de 100 KU/L, pela mesma razão, foram arredondados para 101 KU/L e sequência. Observou-se diferença significativa apenas para os níveis de IgE total ($p=0,01$).

Associação entre os níveis de vitamina D com os demais exames laboratoriais, VEF1% e testes alérgicos: quando foi avaliada a correlação dos níveis séricos de vitamina D com ao outros exames laboratoriais realizados nos 60 asmáticos, e também com os valores de VEF1% e número de alérgenos positivos obtidos pelo TCA (realizados respectivamente em 47 e 60 dos asmáticos), não se encontrou coeficiente de correlação significativo pelo teste de Spearman. Os resultados estão dispostos na Tabela 4. O teste de correlação de Pearson foi aplicado às variáveis com distribuição normal e não mostrou associação significativa em nenhum caso.

Discussão: Deficiência ou insuficiência de VD foi verificada em quase 98% dos indivíduos avaliados. Não houve relação entre os níveis de VD com o uso de corticosteróide inalatório. Não há correlação entre os valores de VD com as variáveis laboratoriais, testes alérgicos. Existem relatos na literatura de associação inversa entre níveis de VD e valores de VEF1% ⁸, entretanto, neste grupo, esta associação não foi observada.

Níveis séricos mais baixos de VD, foram relacionados com maior frequência de doença alérgica ou asma. Ainda que se utilizem como artifício neste grupo, valores de referência menos rigorosos, que consideram suficientes valores superiores a 20 ng/dL ⁹, mais de três quartos dos sujeitos avaliados não atingem valores adequados da vitamina.

A ocorrência de hipovitaminose D é relatada amplamente mesmo entre indivíduos saudáveis ¹⁰⁻¹³. Uma explicação possível para os baixos níveis séricos de VD encontrados nos estudos pode ser a inadequação dos valores de referência utilizados ¹⁴. Inicialmente, a determinação dos valores de referência foi baseada em indivíduos considerados saudáveis que tinham pouca exposição solar¹⁵. É evidente que este método é pouco acurado, visto que hoje, sabe-se que os níveis da VD estão relacionados com exposição solar, dieta, latitude de residência, cor da pele estilo de vida e idade ¹⁶. Estes fatos determinaram a necessidade de estabelecerem-se novos valores de referência. Assim, o nível sérico de VD que se associa à incidência de doenças, foi fixado em 30ng/dL ^{14,17}.

A VD é um hormônio e sua ação está relacionada com diversos sistemas, é possível que variações das concentrações sanguíneas desta vitamina influenciem os níveis de outros hormônios.

O achado de níveis séricos baixos de cortisol ocorreu em 17 (20%) dos asmáticos, entretanto, a frequência foi similar entre os que faziam uso e os não usuários de CTCl. Assim, não é possível afirmar que tais níveis se devem ao medicamento.

Talvez, a utilização de corticosteróide tópico nasal para o controle da rinite (presente em aproximadamente 90% deste grupo) esteja relacionado com tal resultado. Outra hipótese é a prescrição de corticóide para tratamento de doenças agudas ou crises, que pode ter ocorrido em outros centros, e desta forma, não estão registrados no prontuário, e podem ter sido omitidos ou esquecidos ou ainda, ou ainda, ser desconhecido pelos entrevistados.

Testes da função do eixo hipotálamo-hipofisário, que avaliam a produção basal de cortisol, indicam que a absorção dos corticóides intranasais pode ocorrer, e, em variados graus, suprimir a produção endógena de cortisol ¹⁸. Ainda que esta supressão seja considerada um marcador biológico da atividade sistêmica dos corticóides, não indica disfunção adrenal clínica. Com isto, tem-se sugerido que doses pequenas ou moderadas de corticóide tópico nasal, tenham efeitos sobre o eixo hipotálamo hipofisário, sem repercutir clinicamente ¹⁹.

Alterações dos níveis de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e PTH foram pouco frequentes e ocorreram em numero semelhante de asmáticos com e sem tratamento com CTCl.

Níveis elevados de IgE total, IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* foram encontrados. Tal achado está de acordo com os resultados relatados por outros autores ²⁰.

Níveis séricos de IgE estão inversamente associados aos níveis séricos de VD ²¹⁻²³.

Assim como acontece na vigência de baixos níveis de VD ^{21,24}, a sensibilização aos alérgenos domiciliares como os ácaros da poeira é frequente em crianças asmáticas ²⁵. A exposição natural aos alérgenos leva ao incremento da reação inflamatória e aumento da responsividade brônquica ²⁶, bem como o aumento da contagem de eosinófilos no lavado bronco-alveolar ²⁷, da mesma forma que a hipovitaminose D ^{8,28}.

Embora a VD se relacione com a asma de forma similar à IgE, faltam estudos experimentais que demonstrem como ocorre realmente esta interação.

Algumas limitações a serem consideradas incluem, o possível uso não reportado de corticosteróide no grupo de asmáticos sem prescrição de corticosteróide inalatório para controle da doença.

Um estudo de intervenção com o grupo de asmáticos, pode demonstrar se existe diminuição da necessidade de corticóide para o controle da doença após suplementação de VD. Atualmente, alguns estudos estão em andamento e devem responder à questões sobre doses adequadas de VD para o tratamento de doenças alérgicas, efeitos na prole de mães que receberam suplementação da vitamina durante a gestação, efeitos dos polimorfismos no desenvolvimento de doenças alérgicas, entre outros. Estes estudos podem ser consultados no endereço eletrônico <http://www.clinicaltrials.gov>.

Uma vez que a hipovitaminose D vem sendo relacionada à maior frequência de asma e outras doenças alérgicas, pode haver envolvimento do receptor desta vitamina no mecanismo da doença. É possível que polimorfismos ou mutações do gene do receptor de VD, capazes de modificar a interação celular com a vitamina, estejam associados com a prevalência de asma, e, talvez, com a dificuldade de controle da doença.

Concluindo, baixos níveis de vitamina D ocorreram em quase todos os asmáticos avaliados. Não se observou correlação significativa entre os níveis de VD com a necessidade do uso de corticoterapia inalatória para o controle da asma, com resultados de função pulmonar, com resultados dos testes alérgicos nem com valores de IgE total ou específicas.

Agradecimentos

Ao Dr. Marco Antônio Largura, que viabilizou a execução das análises bioquímicas no laboratório PR-ANÁLISE– Análises e Pesquisas Clínicas de Curitiba.

Ao Dr. Álvaro Largura , por suas sugestões e por suas ideias, fundamentais para minha compreensão e interpretação deste estudo.

Ao Técnico do laboratório, Sr. Alisson Aparecido Pereira Trespach, por sua inestimável dedicação no processamento das análises bioquímicas.

Ao Dr. Deivis Junior Paludo, por sua contribuição na realização os testes bioquímicos.

À Prof. Dra. Suzana Nesi-França, por seu auxílio na interpretação endocrinológica dos resultados bioquímicos.

REFERÊNCIAS

1. GINA - Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention – Updated 2008. Available at www.ginasthma.org.
2. Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr*, 2007;85:788-95.
3. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, Mcneill G, Martindale S, *et al.* Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr*; 2007 85:853-9.
4. Lamberg-Allardt C. Vitamin D in foods and as supplements. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006, 92:33–8.
5. Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL., Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *Br J Dermatol*, 2011, 164:1078-82.
6. Camargo CA JR, Clark S, Kaplan MS, Lieberman P, Wood RA. Regional differences in EpiPen prescriptions in the United States: the potential role of vitamin D. *J Allergy Clin Immunol*, 2007,120:131-6.
7. Santos HLBS, Rosário NA. Relação entre vitamina D e doenças alérgicas. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.* 2012;35:15-24.
8. Alyasin S, Momen T, Kashef S, Alipour A, Amin R. The relationship between serum 25 hydroxy vitamin d levels and asthma in children. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011; 3(4):251-5.
9. Ahmed Sf, Franey C, Mcdevitt H, Somerville L, Butler S, Galloway P, *et al.*, Recent trends and clinical features of childhood vitamin D deficiency presenting to a children’s hospital in Glasgow. *Arch Dis Child* 2011; 96: 694–6.
10. Greene-Finestone LS, Berger C, De Groh M, Hanley DA, Hidioglou N, Sarafin K, *et al.* 25-Hydroxyvitamin D in Canadian adults: biological, environmental, and behavioral correlates. *Osteoporos Int* 2011; 22:1389–99.
11. Marwaha RK, Tandon N, Reddy DR, Aggarwal R, Singh R, Sawhney RC, *et al.* Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:477–482.

12. Thacher TD, Fischer PR, Strand MA, Pettifor JM. Nutritional rickets around the world: causes and future directions. *Ann Trop Paediatr* 2006; 26:1-16.
13. Gordon CM, Depeter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158:531-7.
14. Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, Plebani M, Shoenfeld Y, Largura A, *et al.* Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev* 2010; 9(11):709-15.
15. Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33:922-5.
16. Hollis BW. Circulating 25-hydroxy vitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J. Nutr* 2005; 135:317-22.
17. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, *et al.*, Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1911-30.
18. Wihl JA, Andersson KE, Johansson SA. Systemic effects of two nasally administered glucocorticosteroids. *Allergy* 1997; 52:620-6.
19. Allen D. Systemic effects of intranasal steroids: an endocrinologist's perspective. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:S179-90.
20. Rosario NA, Vilela MM. Quantitative skin prick tests and serum IgE antibodies in atopic asthmatics. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997; 7:40-5.
21. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, *et al.* Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:765-71.
22. Hyppönen E, Berry DJ, Wjst M, Power C. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - a significant but nonlinear relationship. *Allergy*. 2009 Apr;64:613-20.
23. Sharief S, Jariwala S, Kumar J, Muntner P, Melamed ML. Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 May;127:1195-202.

24. Ehlajel MS, Bener A, Sabbah A., Is high prevalence of vitamin D deficiency evidence for asthma and allergy risks? *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2001; 43:81-8.
25. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990; 323:502–7.
26. Piacentini GL, Martinati L, Fornari A, Comis A, Carcereri L, Boccagni P. Antigen avoidance in a mountain environment: influence on basophil releasability in children with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1993; 92:644–50.
27. Rak S, Bjornson A, Hakanson L, Sorenson S, Venge P. The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of eosinophil chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:878–88.
28. Gorman S, Judge MA, Burchell JT, Turner DJ, Hart PH. 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the ability of transferred CD4+ CD25+ cells to modulate T helper type 2-driven asthmatic responses. *Immunology*. 2010 130:181-92.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GRUPO DE ASMÁTICOS

VARIÁVEL	SEM CORTICÓIDE (22)		COM CORTICÓIDE (38)		
	N	%	n	%	<i>p</i> *
Rinite	20	90,9	37	97,4	0,54
Conjuntivite	15	68,2	22		0,58
DA	3	13,6	5	57,9	1,00
Outras alergias	2	9,1	2	13,2	0,61
Hx Familiar	16	72,7	27	5,3	1,00
Hx Tabagismo	9	40,9	11	71,1	0,40
Internações	4	18,2	17	28,9	0,05
TCA	22	100	36	44,7	0,52
DVO	3\19	15,8	7\31	22,6	0,72
PBD	4\19	21,1	11\31	35,5	0,35
VEF1% (Mediana)	102		98		
Tempo de doença (Média)	9,10		8,71		
Desvio padrão	2,23		2,47		

NOTA: * Teste exato de Fisher; DA, dermatite atópica; Hx, história; TCA, teste cutâneo alérgico;
DVO, distúrbio ventilatório obstrutivo; PBD, proba broncodilatadora

FONTE: O autor (2012)

TABELA 2 – RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS POR GRUPOS

EXAME	NÍVEIS	ASMA				p
		Sem Corticóide (22)		Com Corticóide (38)		
		n	%	n	%	
25(OH)VD (ng/mL)	<10 (d)	1	4,5	3	7,9	1,00+
	10-30 (i)	21	95,5	34	89,5	
	>30 (n)	0	0	1	2,6	
	Média	16,6 ± 4,8		17,9 ± 5,6		
Cortisol Matinal (ug/dL)	<5,5	8	36,4	9	23,7	0,37+
	5,5-30 (n)	14	63,6	29	76,3	
	>30	0	0	0	0	
	Mediana	6,3		6,8		
PTH (pg/mL)	<15	1	4,5	0	0	0,45+
	15-65 (n)	20	90,9	37	97,4	
	>65	1	4,5	1	2,6	
	Média	34,0 ± 12,4		32,6 ± 11,2		
Cálcio (mg/dL)	<8,5	5	22,7	4	10,5	0,26+
	8,5-10,5 (n)	17	77,3	34	89,5	
	>10,5	0	0	0	0	
	Mediana	9,1		9,3		
Fósforo (mg/dL)	<4	3	13,6	6	15,8	1,00+
	4-7 (n)	19	86,4	32	84,2	
	>7	0	0	0	0	
	Média	4,4 ± 0,4		4,6 ± 0,6		
FAL (U/L)	<110	0	0	4	1	0,28+
	110-340	22	100	33	86,8	
	>340	0	0	1	0,2	
	Média	198,5 ± 45,6		195,6 ± 67,7		

NOTA: DP, desvio padrão; n, normalidade; i, insuficiência; d, deficiência. *, teste t de Student; ** Mann–Whitney–Wilcoxon; +, teste de Fisher.

FONTE: O autor (2012)

TABELA 3 – VALORES DA MEDIANA DA IGE EM KUI/L POR GRUPO

IgE	SEM CORTICÓIDE (n=22)	COM CORTICÓIDE (n=38)	p*
	n (amplitude)	n (amplitude)	
IgE DP	97,0 (100,9)	101,0 (100,8)	0,47
IgE BT	15,9 (101,0)	21,6 (100,5)	0,36
IgE Lol	0,1 (9,8)	0,3 (58,8)	0,25
IgE Total	628,5 (3664,8)	1104,0 (4839,0)	0,01

NOTA: IgE total em UI/mL. IgEs específicas em KU/L. DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*; BT: *Blomia tropicalis*; Lol: *Lolium perenne*; *: Mann-Whitney-Wilcoxon

FONTE: O autor (2012)

TABELA 4 – CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE VD (EM ng/mL) E VARIÁVEIS LABORATORIAIS, VEF1% OU NÚMERO DE TCA POSITIVOS

VARIÁVEL	ρ (RHO DE SPEARMAN)	p
Cálcio (mg/dL)	-0,04	0,71
Fósforo (mg/dL)	0,02	0,85
Cortisol (ug/dL)	0,17	0,17
PTH (pg/mL)	-0,21	0,09
FAL (U/L)	-0,15	0,22
IgE DP (KU/L)	0,12	0,32
IgE BT (KU/L)	-0,19	0,14
IgE Lol (KU/L)	-0,08	0,49
IgE Tot (UI/mL)	0,00	0,98
VEF1% (n=47)	0,13	0,39
nTCA+ (n=60)	-0,14	0,27

NOTA: DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*; BT: *Blomia tropicalis*; Lol: *Lolium perenne*.

FONTE: O autor (2012)