

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE  
VITÓRIA - EMESCAM

ESDRAS ANDRADE SANTANA

MARCELO PANDOLFI CALIMAN

MILTON AGRIZZI DAVID

**POLIMORFISMO 45T>G NO GENE DA ADIPONECTINA: ASSOCIAÇÃO CLÍNICA  
EM MULHERES COM ASMA**

VITÓRIA  
2013

ESDRAS ANDRADE SANTANA  
MARCELO PANDOLFI CALIMAN  
MILTON AGRIZZI DAVID

**POLIMORFISMO 45T>G NO GENE DA ADIPONECTINA: ASSOCIAÇÃO CLÍNICA  
EM MULHERES COM ASMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM, como requisito parcial para obtenção do grau de médico e farmacêutico.

Orientadora: Flávia Imbroisi Valle Errera

VITÓRIA  
2013

ESDRAS ANDRADE SANTANA  
MARCELO PANDOLFI CALIMAN  
MILTON AGRIZZI DAVID

**POLIMORFISMO 45T>G NO GENE DA ADIPONECTINA: ASSOCIAÇÃO CLÍNICA  
EM MULHERES COM ASMA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina apresentado a Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM, como requisito parcial para obtenção do grau de médico e farmacêutico.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Flávia Imbroisi Valle Errera  
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de  
Vitória – EMESCAM  
Orientadora

---

Dr.<sup>a</sup>. Faradiba Sarquis Serpa  
Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória – HSCMV

---

Dr.<sup>a</sup>. Flávia de Paula  
Universidade Federal do Estado do Espírito Santo - UFES

---

Dr.<sup>o</sup>. Firmino Braga Neto  
Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória – HSCMV

VITÓRIA  
2013

Dedicamos este trabalho aos familiares e amigos, por nos apoiarem incondicionalmente e pela compreensão nos momentos de nossa ausência justificada pela dedicação à carreira acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos aos pacientes, funcionários e a Rafaela que nos ajudaram com o estudo. À Beatriz, Débora, Ícaro, Simone e Luana que contribuíram para realização desse projeto. À Dra. Flávia, Dra. Faradiba, Dra. Fernanda e Dr. Firmino que nos instruem com a ciência mais eminente e humana. Sobretudo, agradecemos a Deus, mentor das nossas vidas e direcionador de toda ciência.

“Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo”.

*Confúcio*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>07</b>
<b>2 ARTIGO ORIGINAL .....</b>	<b>08</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica de etiologia multifatorial, resultante de uma interação entre fatores genéticos, exposição ambiental a aeroalérgenos e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e à manutenção dos sintomas. É uma doença caracterizada por hiperresponsividade (HR) das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo. (Busse & Lemanske, 2001; Lemanske & Busse, 2010). Esse processo é complexo e parece ser regulado por ação do tecido adiposo e pela resposta imune através de moléculas denominadas adipocitocinas (leptina, resistina, fator de necrose tumoral, adipisina e adiponectina) (Saltiel et al., 2001).

A adiponectina é a única adipocitocina com efeito anti-inflamatório e o tecido adiposo visceral é sua fonte mais importante (Steffes, 2004), sendo que a concentração sérica de adiponectina tende a diminuir em obesos (Arita, 1999). Isso pode ser explicado pela ação de macrófagos do tecido adiposo que produzem TNF-alfa e IL-6, os quais por ação parácrina podem inibir de forma direta a produção local de adiponectina (Brunn, 2003).

Visto que receptores de adiponectina estão expressos em células da via aérea humana, foi proposto que o declínio da concentração sérica da adiponectina em obesos pode contribuir com o aumento da massa muscular da via aérea observada em asmáticos (Shore, 2006). Polimorfismos genéticos também podem estar relacionados à diminuição destes níveis de adiponectina (Ornelas et al., 2012).

Diante desta importante associação da adiponectina com a asma, o objetivo deste trabalho é verificar se há associação entre genótipos para o polimorfismo 45T>G no gene da adiponectina e presença e gravidade da asma, bem como à função pulmonar em mulheres obesas e não obesas.

## 2 ARTIGO ORIGINAL

### Models, Genetics and Molecular Biology

#### POLYMORPHISM 45T>G OF THE ADIPONECTIN GENE: CLINIC ASSOCIATION IN WOMEN WITH ASTHMA

POLIMORFISMO 45T>G NO GENE DA ADIPONECTINA: ASSOCIAÇÃO CLÍNICA EM MULHERES COM ASMA

Esdras Andrade Santana<sup>I</sup>, Marcelo Pandolfi Caliman<sup>II</sup>, Milton Agrizzi David<sup>II</sup>, Faradiba Sarquis Serpa<sup>III</sup>, Flávia Imbroisi Valle Errera<sup>III</sup>.

<sup>I</sup> Academic pharmacy - EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. *Responsible for manuscript preparation, acquisition and interpretation of data. The article is part of graduation thesis level.*

<sup>II</sup> Academic medicine - EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. *Responsible for manuscript preparation, acquisition and interpretation of data. The article is part of graduation thesis level.*

<sup>III</sup> Associate Professor, College of Health Sciences, EMESCAM, Vitoria-ES Brazil. *Intellectual and scientific content of the study, Responsible for manuscript preparation, critical revision.*

---

#### ABSTRACT

**Introduction:** Asthma affects about 10% of the population of developed countries. In Brazil, 12.9% of adult women have asthma. It is a chronic inflammation of the lower airways and its etiology is multifactorial. The genetic susceptibility is an important factor for the development and possible worsening of asthma. Adiponectin has recently been implicated in the pathophysiology of asthma. Because current evidence suggests that sexual dimorphism in the expression of adiponectin polymorphism 45T> G was analyzed in women with and without asthma. **Objectives:** To determine if the polymorphism is associated with the risk or severity of asthma, as well as clinical variables. **Methods:** Pulmonary function was assessed by spirometry, and atopy by skin test. DNA was extracted and polymorphisms was investigated using PCR followed by digestion with *BspHI*. **Results:** The TT genotype was associated to a higher risk of asthma ( $p < 0.0001$ ), but not its severity. This genotype is also associated with family history of 1st degree of asthma ( $p = 0.03$ ) and, in atopic patients, it was associated with reduced percentage of peak flow ratio ( $p = 0.0092$ ). The G allele was associated with the skin test positive ( $p = 0.035$ ). **Conclusion:** Our results showed that the TT genotype is a genetic risk factor for asthma.

**Keywords:** Asthma; polymorphism; adiponectin.

---

## RESUMO

**Introdução:** A asma afeta cerca de 10% da população dos países desenvolvidos. No Brasil, 12,9% das mulheres adultas tem asma. É uma inflamação crônica das vias aéreas inferiores e sua etiologia é multifatorial. A suscetibilidade genética é fator importante para o desenvolvimento e possível agravamento da asma. A adiponectina foi recentemente implicada na fisiopatologia da asma. Devido evidências atuais que sugerem dimorfismo sexual na expressão da adiponectina, o polimorfismo 45T>G foi analisado em mulheres com e sem asma. **Objetivos:** Verificar se o polimorfismo está associado ao risco ou gravidade da asma, bem como as variáveis clínicas. **Métodos:** A função pulmonar foi avaliada pela espirometria e presença de atopia por meio de teste alérgico cutâneo. O DNA foi extraído e o polimorfismo foi investigado utilizando técnica de PCR com primers específicos. Seguido por digestão com enzima de restrição BspHI. **Resultados:** O genótipo TT foi associado ao maior risco de asma ( $p<0,0001$ ), mas não com a sua gravidade. Esse genótipo também está relacionado à história familiar de 1° grau de asma ( $p=0,03$ ) e nas atópicas relacionado com percentuais reduzidos de peak flow relativo ( $p=0,0092$ ). O alelo G nas com asma foi associado a teste alérgico cutâneo positivo ( $p=0,035$ ). **Conclusão:** Nossos resultados mostraram que o genótipo TT foi associado à maior frequência de história familiar de asma e é um fator de risco genético para a asma.

**Palavras-chave:** Asma; polimorfismo; adiponectina.

---

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica que afeta 300 milhões de pessoas no mundo com prevalência média na população geral de 0,7 a 18,4%, estando o Brasil em 8° lugar com prevalência estimada de 10% (GINA 2011), sendo de 12,9% entre mulheres adultas (Macedo et al. 2007). Constitui a quarta causa de hospitalização pelo SUS e a terceira causa de internação entre crianças e adultos jovens (DATASUS, 2009).

Estudos sugerem que sua base etiológica seja multifatorial, resultante de uma interação entre fatores genéticos, exposição ambiental a aeroalérgenos e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e à manutenção dos sintomas. É uma doença caracterizada por hiperresponsividade (HR) das vias aérea inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo. Manifesta-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispneia, aperto no peito e tosse. (Busse & Lemanske, 2001; Lemanske & Busse, 2010).

Um dos processos patológicos mais relevantes na asma é a inflamação desencadeada por repetidas reações de hipersensibilidade imediata que leva à obstrução intermitente e reversível das vias aéreas, inflamação brônquica crônica com eosinófilos e hipertrofia das células musculares lisas (Cohn et al, 2004). Esse processo é complexo e parece ser regulado por ação do tecido adiposo e pela resposta imune através de moléculas denominadas adipocitocinas (leptina, resistina, fator de necrose tumoral, adipisina e adiponectina) (Saltiel et al., 2001), as quais são relacionadas ao desenvolvimento de inúmeras condições inflamatórias, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e asma.

A adiponectina é a única adipocitocina com efeito anti-inflamatório e o tecido adiposo visceral é sua fonte mais importante (Steffes, 2004), sendo que a concentração sérica de adiponectina tende a diminuir em obesos (Arita, 1999). Isso pode ser explicado pela ação de macrófagos do tecido adiposo que produzem TNF-alfa e IL-6, os quais por ação parácrina podem inibir de forma direta a produção local de adiponectina (Brunn, 2003).

As propriedades anti-inflamatórias da adiponectina incluem a inibição de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, IL-6 (Masaki, 2004), ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina (Wolf, 2004), bem como indução de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e antagonista do receptor de IL-1 (Kumada 2004 & Wolf, 2004, Wulster-Radcliffe, 2004). Além disso, a adiponectina modula a ativação, proliferação, citotoxicidade e produção de citocinas pelas células inflamatórias, bem como afeta a interação entre linfócitos T e B. Sabe-se que a ICAM-1 é o receptor para a maioria dos rinovírus - causa infecciosa mais importante de exacerbação da asma (Stanciu, 1998) - e a P-selectina é um mediador da adesão dos leucócitos ao endotélio vascular, assim esses podem ser os gatilhos para iniciar uma resposta inflamatória. Essa capacidade de inibir as moléculas de adesão endotelial está diminuída na deficiência de adiponectina, o que pode estar relacionado com a causa da asma (Sood et al 2008).

Visto que receptores de adiponectina estão expressos em células da via aérea de humanos, foi proposto que o declínio da concentração sérica da adiponectina em obesos pode contribuir com o aumento da massa muscular da via aérea observada

em asmáticos crônicos (Shore, 2006). Sood et al. (2008) verificaram que mulheres com asma recente apresentam menores níveis plasmáticos de adiponectina que mulheres sem asma, mas a mesma associação não foi encontrada em homens. Lessard et al. (2011) encontraram baixos níveis de adiponectina em obesos asmáticos e Holguin et al. (2011) também verificaram baixos níveis em material coletado de lavagem broncoalveolar. Lugogo et al. (2010), relataram que estudos em ratos, ao analisar a obesidade e asma, sugerem que as adipocitocinas, leptina e adiponectina, podem modular a inflamação da via aérea e a hiperreatividade brônquica.

Polimorfismos genéticos também podem estar relacionado à diminuição destes níveis de adiponectina, como relatado por Ornelas et al. (2012) que verificaram que baixos níveis de adiponectina foram associados significativamente ao genótipo TT do polimorfismo 45T/G do gene da adiponectina (*APM1*). Yang et al. (2003) encontraram a mesma associação em ao analisar RNAm.

O gene *APM1* (ou *ACDC*) se localiza no cromossomo 3q27, na mesma região onde foram previamente mapeados a síndrome metabólica (Kissebah et al., 2000). Este gene contém três exons e a tradução é iniciada no exon 2 e termina em parte do exon 3. Polimorfismos já foram descritos ao longo desse gene em várias populações em estudos de diabetes e obesidade. O SNP45T>G (Gli15Gli) foi estudado, pois pode afetar a transcrição do gene *APM1*, possivelmente por alterar splicing do pré RNAm (Yang et al. 2003).

Como a obesidade é um importante fator de risco para asma, aumentando a prevalência, incidência e possivelmente a gravidade da doença (Ford, 2005 e Taylor et al. 2008), a hipótese desse trabalho é que mulheres com polimorfismo do gene da adiponectina sejam mais suscetíveis à asma, principalmente se estiverem acima do peso. Diante desta importante associação da adiponectina com a asma, o objetivo deste trabalho é verificar se há associação entre genótipos para o polimorfismo 45T>G no gene da adiponectina e presença e gravidade da asma, bem como à função pulmonar em mulheres obesas e não obesas.

## SUJEITOS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado no CEP/Emescam (045-2010) e todos os pacientes que participaram da pesquisa receberam esclarecimentos sobre os objetivos do trabalho. A coleta do sangue para extração do DNA foi realizada somente após a assinatura do termo de consentimento esclarecido (TCLE) pelo paciente ou de um responsável.

### Sujeitos

Os pacientes asmáticos deste estudo são adultos do gênero feminino atendidos no ambulatório do Centro de Referência em Asma de Vitória (CREAS) (n=179) do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV). Uma população de mulheres sem asma, utilizada para comparação da frequência do genótipo de acordo com as classes de IMC, foi obtida pela análise de duas amostras populacionais da região metropolitana de Vitória-ES: indivíduos da população geral, doadores de sangue no Hemocentro “Marcos Daniel Santos de Deus” (HEMOES) (n=11) e indivíduos atendidos no ambulatório de referência de obesidade do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) (n=96). As coletas de dados foram realizadas de acordo com a ordem de atendimento nos três serviços.

Para as pacientes com asma foi preenchido um questionário, de forma arguitiva, no qual se perguntou sobre a história familiar de asma, presença de comorbidades como hipertensão e diabetes mellitus, bem como com presença de rinite alérgica, remissão, exacerbação, tabagismo, ingestão alcoólica e uso de medicação. Também foi aferida as medidas de altura, peso e circunferência abdominal (mensurada na distância média entre o último arco costal e crista ilíaca, passando pela cicatriz umbilical), de acordo com questionário presente no ANEXO II. Sendo que as comorbidades foram consideradas presentes de acordo com o relato das pacientes. O cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC) foi obtido pelo peso dividido pela altura elevada ao quadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), sendo classificado como eutrófica a paciente com IMC maior do que 19,5 e menor do que 25, sobrepeso com IMC maior ou igual à 25 e menor que 30 e obesas as com IMC maior ou igual à 30. As pacientes com

asma foram classificadas quanto a gravidade de acordo com a IV Diretriz Brasileira de Manejo da Asma.

### **Avaliação da função pulmonar**

A função pulmonar foi avaliada pela espirometria realizada com aparelho digital KoKo® PFT Spirometer, por meio de medidas do volume expiratório forçado no 1 segundo (VEF1), capacidade vital forçada (CVF) e da relação VEF1/CVF. Da mesma forma que Thyagarajan et al. (2010) os valores de VEF1 e CVF foram agrupados em quartiles e correlacionados com polimorfismo do gene da adiponectina. A aferição do Pico de Fluxo foi aferido no dia da entrevista.

### **Teste alérgico cutâneo**

Para avaliação da atopia foi utilizado o teste cutâneo (Prick Test, FDA imunotest), para o qual, após limpeza com álcool 70% foram aplicados os extratos de alérgenos a uma distância de aproximadamente 2cm, em sequência pré-determinada na superfície medial do antebraço. O excesso de extrato foi retirado e a leitura foi realizada entre 15 a 20 minutos após a punção. A presença de pápulas com diâmetro maior ou igual a 3 mm para pelo menos um dos extratos alérgicos indica positividade e, portanto, atopia. Foram utilizados os seguintes extratos alergênicos: *Blomia Tropicallis*, *Dermatophagoides pteronyssimus*, *Dermatophagoides farinae*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, epitélios de *Canis familiares* (cão), *Felis domesticus* (gato), *Blatella germanica* e *Periplaneta americana* (baratas).

### **Coleta de Sangue Periférico**

A coleta de sangue da população asmática foi realizada no laboratório de análises clínicas do HSCMV, na qual uma amostra foi para o laboratório de análises clínicas do HSCMV para realização de hemograma e dosagem de IgE total e uma segunda amostra foi para o laboratório do Centro de Pesquisa na Emescam para extração do DNA. As amostras da população não asmática foram coletadas durante doação de

sangue no HEMOES e durante o atendimento do HUCAM. Cerca de 5 ml de sangue foram coletados com seringa estéril e descartável, sendo armazenados em tubo contendo EDTA 5%.

### **Dosagem de IgE total**

A dosagem do IgE total foi realizada em amostra de sangue periférico dos asmáticos. A IgE total foi extraído do soro e utilizado método de imunoenensaio enzimático automatizado pelo Sistema XT 1800 i, sendo o valor normal de referência do kit  $\leq 160\text{UI/dL}$ .

### **Extração do DNA dos pacientes**

O DNA foi extraído de acordo com o método QIAMP DNA Blood mini kit (Qiagen, Brasil), seguindo recomendações do fabricante e quantificado no aparelho Nanodrop (NanoDropND-1000® - Thermo Fisher Scientific Inc).

### **Análise do polimorfismo 45T>G no gene da adiponectina**

O polimorfismo 45T>G (G15G) foi analisado utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida por digestão com enzima de restrição PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição) de acordo com pequena modificação do protocolo de NAKATANI e cols. (2004). A região genômica contendo os polimorfismos foi amplificada com os seguintes primers: F 5'-TCCTTTGTAGGTCCCAACT-3' e R 5'-GCAGCAAAGCCAAAGTCTTG-3' e na seguinte condição: 5min a 95°, 35 ciclos a 95° 40seg, 57° 40seg e 72° 60seg e uma extensão final de 10 min a 72°. Para a identificação dos genótipos, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima BspHI (New England Biolabs, Beverly, MA). Fragmentos com 375 e 128pb foram obtidos para indivíduos homozigotos para o alelo T, com 503, 375 e 128 pb por indivíduos heterozigotos TG e com 503 pb por indivíduos homozigotos para o alelo G (GG). Esses fragmentos foram separados por

eletroforese em gel de acrilamida corado com nitrato de prata ou gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 1).

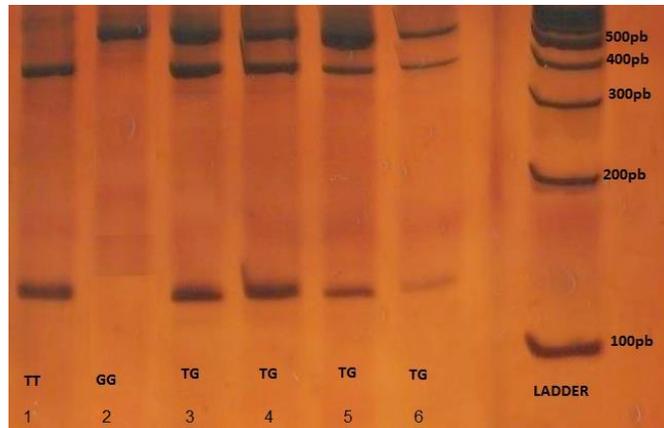


Figura 1 - Gel de Poliacrilamida 8% referência do laboratório, coluna com os respectivos genótipos 1(TT), 2 (GG), 3, 4, 5, 6 (TG) e última coluna com DNA marcador de 100bp.

### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5. As variáveis quantitativas foram analisadas em relação à normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste t student foi utilizado para comparar duas variáveis com distribuição normal e o de Mann-Whitney para as que não estavam com distribuição normal. O teste ANOVA foi realizado em comparações de variáveis quantitativas entre os três genótipos. Variáveis categóricas foram analisadas pelo teste exato de Fisher ou  $X^2$ . Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## RESULTADOS

### Características Clínicas

A amostra do estudo foi composta por 286 pacientes, sendo 179 com asma e 107 sem asma.

O perfil clínico das pacientes com asma está descrito nas tabelas 1 e 2. Nessas pacientes, o IMC médio foi 29,58 kg/m<sup>2</sup>, e 74,86% (134/179) estavam com excesso de peso, sendo 25,15% (45/179) eutróficas, 30,72% (55/179) com sobrepeso e 44,13% (79/179) obesas.

Tabela 1: Características clínicas descritivas das pacientes com asma

Variáveis	Média	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	50,53 (±14,1)	18	82
Peso (Kg)	70,78 (±16,3)	37,7	138
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,58 (±6,27)	17,45	47,47
Cintura (cm)	94,57 (±14,57)	69	127
Idade da 1° crise (anos)	18,55 (±19,73)	1	71
Eosinófilos (%)	5,01 (±4,55)	0	26
Eosinófilos (n)	325,49 (±325,13)	96,1	1801,2
IgE Total (UI/dL)	426,17 (±618,37)	4,47	3000
<i>Peak Flow</i> (%)	64 (±19)	18	111
CVF	78,57 (±15,66)	42	112
VEF1	66 (±18,13)	24	106
VEF1/CVF	67 (±9,81)	34	93

IMC: índice de massa corpórea; CVF: capacidade vital forçada; VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo; VEF1/CVF: relação entre VEF1 e CVF

A história familiar de asma em parentes de 1° grau foi relatada por 74,16% (132/178) das mulheres com asma. Quanto à positividade no teste alérgico, 55,55% (65/117) foram positivos para pelo menos um antígeno cutâneo (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição das variáveis clínicas de acordo com presença ou ausência de obesidade

Variáveis	Eutróficas		Obesas		p
	Sim	Não	Sim	Não	
Teste Alérgico (n=82)	13	15	32	22	0,3502
Remissão (n=123)	15	30	30	48	0,6979
Asma na infância (n=123)	22	23	45	33	0,3552
Rinite Alérgica (n=122)	38	6	59	19	0,2423
História Familiar 1º Grau (n=123)	31	14	58	20	0,5357
Tabagismo (n=110)	10	33	23	44	0,287
Média do período de fumo em anos	11,7 (±12,79)		21,3(±14,85)		
Cigarros/dias	6,9 (±5,95)		15,08(±17,97)		
Menopausa (n=104)	16	23	38	27	0,1061
Idade Média	61,12 (±11,46)		60,42(±8,47)		
HAS (n=122)	14	31	48	29	0,0013
DM (n=122)	5	39	20	58	0,0664

HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus

O perfil clínico das mulheres sem asma encontra-se na tabela 3. Nesta população o IMC médio foi de 41,81 kg/m<sup>2</sup>, sendo 81,3% (87/107) de obesas, 12,15% (13/107) de sobrepeso e 6,55% (7/107) de eutróficas.

Tabela 3: Variáveis quantitativas da população com asma e sem asma

Variáveis	Mulheres com asma		Mulheres sem asma		p
	Média	Intervalo	Média	Intervalo	
Idade (anos)	50,53 (±14,1)	18 a 82	41,81 (±13,1)	14 a 72	<0,0001
Peso (Kg)	70,78 (±16,3)	37,7 a 138	110,62 (±25,8)	53 a 167	<0,0001
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,58 (±6,27)	17,45 a 47,47	42,87 (±8,59)	30,04 a 70,68	<0,0001
Eutróficas	22,52 (±1,72)	19,06 a 24,82	23,06 (±9,41)	19,66 a 24,84	0,9539
Sobrepeso	27,37 (±1,42)	25,03 a 29,99	27,65 (±1,29)	25,15 a 29,61	0,8916
Obesas	35,21 (±4,64)	30,07 a 47,47	42,87 (±8,59)	30,04 a 70,68	<0,0001

IMC: índice de massa corpórea

Comparando amostra de mulheres com e sem asma observa-se alta prevalência de obesidade em ambas, sendo maior em pacientes sem asma (44,13% versus 81,43%). Na literatura, a obesidade está associada à maior gravidade da asma (Taylor et al., 2007; Novosad et al., 2013). Em nosso trabalho apesar da obesidade

ter sido associada negativamente aos parâmetros de função pulmonar (dados não mostrados), as classes de IMC não foram associadas com gravidade da asma ( $p=0.7370$ ).

### Frequência dos genótipos do polimorfismo 45T>G

Os genótipos para o polimorfismo 45T>G foram analisados em pacientes com asma e sem asma, cujas frequências podem ser observadas no gráfico 1.

A frequência do genótipo TT em mulheres com asma foi 74,3% (133/179) e na população sem asma foi de 23,86% (21/88). O genótipo TG foi mais prevalente em mulheres sem asma (64,48%).

Devido à diferença entre obesas com asma e sem asma os genótipos foram comparados entre os grupos apenas em mulheres eutróficas e com sobrepeso.

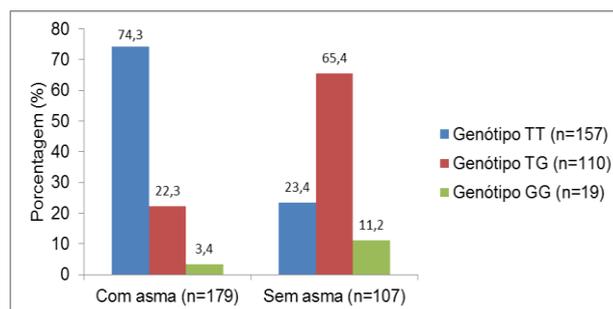


Gráfico 1: Frequência de genótipos em mulheres com asma e sem asma

### Análises dos genótipos e variáveis clínicas

A análise descritiva das variáveis clínicas da população com asma em relação aos diferentes genótipos do polimorfismo 45T>G da adiponectina encontra-se na tabela 4 e 5.

Tabela 4 – Variáveis clínicas em relação ao genótipo.

Variáveis	TT	TG	GG	P
Idade (anos)	50,56 ( $\pm 13,77$ )	51,20 ( $\pm 14,92$ )	45,50 ( $\pm 17,38$ )	0,6464
Peso (Kg)*	69,60	65,85	70,50	0,2847
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,99 ( $\pm 6,48$ )	28,08 ( $\pm 5,26$ )	30,69 ( $\pm 7,26$ )	0,2769

Cintura (cm)	94,93(±15,26)	89,39(±13,73)	92,33(±21,36)	0,3826
Peak Flow	62,25(±19,39)	67,30(±19,38)	74,40(±15,98)	0,1663
Eosinófilos (n/mL)*	254,6	228,98	328,2	0,8386
Eosinófilos (%)*	4,000	3,000	4,000	0,8664
IgE Total (UI/dL)*	203,2	215,0	168,8	0,9572
VEF1	66,24(±18,5)	64,26(±17,15)	59,00(±18,38)	0,7678
CVF	79,01(±15,88)	77,44(±14,45)	71,50(±28,99)	0,7334
VEF1/CVF	67,53(±10,08)	66,70(±9,23)	69,00(±5,65)	0,9026

\*Mediana

Tabela 5: Distribuição do genótipo em relação à presença ou não de fatores de risco ou comorbidades na amostra geral.

Variáveis	SIM			NÃO			p
	TT	TG	GG	TT	TG	GG	
Atopia (n=117)	41	19	5	42	10	0	0,04
Remissão (n=177)	51	17	2	80	23	4	0,8765
Asma na infância (n=178)	72	24	4	60	16	2	0,7231
Rinite Alérgica (n=177)	102	36	3	29	4	3	0,046
História Familiar 1º Grau (n=177)	103	25	4	28	15	2	0,1104
Tabagismo (n=161)	35	7	3	85	28	3	0,2678
Média do período de fumo em anos	18,83 (±14,12)	22,57 (±14,20)	17 (±15,72)				
Cigarros/dias	12,31 (±15,20)	12,57 (±13,66)	10,67 (±9,02)				
Menopausa (n=151)	63	22	2	47	13	4	0,397
Idade Média	46,36 (±7,24)	47,68 (± 7,09)	47 (± 11,31)				
HAS (n=177)	67	13	2	64	27	4	0,0951
DM (n=177)	24	7	0	107	33	6	0,5135

Não foram observados aumento da história de asma na infância ( $p=0,3988$ ) e da história de remissão da asma em algum momento da vida ( $p=0,8765$ ) com os genótipos. No entanto, mulheres com asma e genótipo TT apresentam maior frequência de história familiar de 1º grau de asma do que as que apresentam outros genótipos ( $p=0,03$ ).

Na amostra total de pacientes com asma não foi encontrada associação entre as variáveis quantitativas de função pulmonar com os genótipos. No entanto, menores valores relativos de *peak flow* foram associados ao genótipo TT em mulheres com asma atópica ( $p=0,0092$ ) (média do genótipo TT =  $58,33 \pm 2,95$  e média do genótipo TG+GG=  $70,70 \pm 3,24$ ) e no subgrupo de asmáticas obesas ( $p=0,0032$ ).

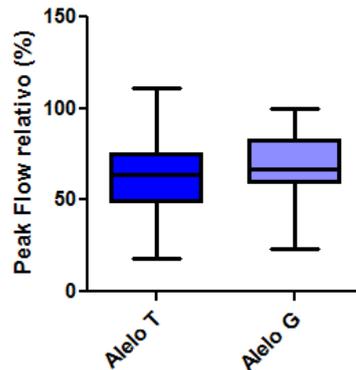


Gráfico 2: Relação em genótipos e valores de *Peak flow*

As classes de IMC não foram associadas aos diferentes genótipos em mulheres com asma ( $p=0,6883$ ). A distribuição dos genótipos em pacientes obesas atópicas e não atópicas ( $p=0,2455$ ), bem como entre pacientes eutróficas atópicas e não atópicas ( $p=0,5498$ ) não diferiu entre os grupos. Não houve diferença na distribuição do genótipo em relação ao estado de menopausa tanto para obesas ( $p=0,4987$ ) quanto para não obesas ( $p=0,1435$ ).

Em nosso estudo as populações com asma ( $n=179$ ) e sem asma ( $n = 107$ ) foram comparadas em relação à frequência dos genótipos TT, TG e GG (Tabela 6). Foi encontrada relação estatisticamente significativa do genótipo TT em asmático (74,30% versus 23,15%,  $p<0,0001$ ). Essa associação foi verificada por classes de IMC, sendo que a classe de obesidade não foi analisada devido a grande diferença nas médias de IMC entre as populações com e sem asma neste subgrupo. Foi observado que o genótipo TT se manteve associado à asma na categoria de sobrepeso (OR=14,67, IC 95%: 2,90-74,09;  $p=0,0002$ ). Em eutróficas esse genótipo foi mais prevalente na população com asma (71,11%) do que na sem asma (28,57%), mas sem associação estatística ( $p=0,0846$ ).

Em mulheres com asma, a presença do alelo G foi associada a teste alérgico cutâneo positivo (OR=2,55; p=0,035).

Tabela 6: Polimorfismo e classes de IMC em mulheres com asma e sem asma.

	Asmáticas (n=179)			Não asmática (n=107)			p
	TT	TG	GG	TT	TG	GG	
	(n=133)	(n=40)	(n=6)	(n=25)	(n=69)	(n=13)	
Eutróficas (n=52)	32	11	2	2	4	1	0,0846
Sobrepeso (n=68)	40	14	1	2	10	1	0,0006
Obesa (n=167)	61	15	3	21	55	11	<0,0001

## DISCUSSÃO

Nosso estudo investigou a distribuição do polimorfismo 45T>G do gene da adiponectina em mulheres com asma e sem asma, bem como sua relação com variáveis clínicas.

Recentemente a adiponectina vem recebendo atenção devido a sua possível implicação na etiologia da asma principalmente por sua influência na resposta inflamatória. Ela é produzida pelo tecido adiposo branco, e encontrada com abundância na circulação sanguínea (Vasseur et al., 2003). Em contraste com outras adipocitocinas, a adiponectina plasmática e a expressão de adiponectina pelo tecido adiposo declinam na obesidade e aumenta de acordo com a perda de peso (Shore et al., 2010).

Sood et al. (2008) demonstraram que os níveis séricos de adiponectina estão diminuídos em mulheres asmáticas quando comparado a mulheres não asmáticas, mas essa relação não foi encontrada quando se analisou em conjunto homens e mulheres. Por esta razão, foi sugerido que está é uma associação observada apenas em mulheres, fato também encontrado por Scott et al. (2011). Devido à existência de evidências no dimorfismo sexual nas concentrações séricas de adiponectina nosso estudo analisou apenas mulheres.

Ding et al. (2012), estudaram os polimorfismos 276G>T e 45T>G em 240 homens e mulheres sendo 120 com asma, porém estudaram apenas a associação da doença com remissão e exacerbação. Os autores observaram associação do genótipo TT do SNP 276G>T em chineses com asma, porém não foi encontrada a mesma relação para o polimorfismo 45T>G. Este fato pode ser apoiado pelos resultados de Berthier et al. (2005) que mostra que a frequência do polimorfismo 276G>T é maior na população japonesa, enquanto que na população caucasiana a frequência dos genótipos para os polimorfismos 45T>G e 276G>T é semelhante. Em nosso estudo foi encontrado que o genótipo TT (45T>G) está associado ao maior risco de asma ( $p < 0,0001$ ). Essa associação se manteve na classe de sobrepeso ( $p = 0,0002$ ), mas não foi significativa em mulheres eutróficas.

Níveis plasmáticos reduzidos de adiponectina foram encontrados com maior frequência em indivíduos TT do que nos com algum alelo G do polimorfismo 45T>G (Berthier et al. 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Yang et al. (2003) e Ornelas et al. (2012). Dessa forma, é possível que as mulheres com genótipo TT investigadas em nosso estudo possuam menores níveis plasmáticos de adiponectina e isso confira menor potencial anti-inflamatório e maior risco de asma. Com base nesses dados, o nosso trabalho obteve resultados semelhantes ao estudo de Sood et al. (2008) em que níveis séricos maiores de adiponectina estão associados a menor risco de asma atual em mulheres, associação que se manteve após análise por classes de IMC e outras variáveis, sugerindo que a adiposidade em mulheres com asma não afeta a associação entre asma e adiponectina.

A relação entre expressão da adiponectina e gênero é desconhecido. Uma das hipóteses é que existe interação entre estrogênio e funcionamento do tecido adiposo nas mulheres. Porém, Sood et al. (2008) ao avaliarem a influência do estado de menopausa não encontrou relação entre este período e os níveis séricos de adiponectina em mulheres com asma. Da mesma forma, na amostra estudada não houve diferença na distribuição dos genótipos em mulheres com asma menopausa e fora desse período, tanto em obesas quanto para não obesas, assim como em atópicas e não atópicas.

Summer et al. (2008) em estudo realizado com animais de peso normal e deficiência de adiponectina geneticamente induzida, sugere que a adiponectina, independentemente da obesidade, possa exercer efeito protetor pulmonar através da inibição da inflamação alveolar. Thyagarajan et al. (2010), com base nos dados do estudo CARDIA, encontraram pela primeira vez em 423 homens e mulheres, que níveis séricos reduzidos de adiponectina estão associados à redução dos valores de CVF e VEF1, e esta relação não foi influenciada pelo IMC. Em nosso estudo, o genótipo TT foi relacionado com valores reduzidos de *peak flow* em pacientes asmáticas com atopia e também com obesidade. De acordo com Rodrigues et al. (2005), os valores de *peak flow* apresentam boa correlação com VEF1, mas se sabe que VEF1 é um parâmetro mais sensível. Valores de *peak flow* já foram associados ao polimorfismo Val105Val do gene da Glutathione S-transferase em asmáticos expostos ao cigarro ( $p=0,021$ , IC 95%: 1,11-3,37) (Palmer et al. 2006).

No presente trabalho, o genótipo TT foi mais frequente em parentes com asma e história familiar de 1º grau do que os outros genótipos ( $p=0,03$ ). Não foram encontrados estudos que associam a presença de história familiar com polimorfismo da adiponectina. No entanto, há relatos de associação positiva com outros genes. Patel et al. (2004) observaram que a história familiar positiva de asma foi associada aos genótipos do gene TGF- $\beta$  e Witte et al. (2002) verificaram que duas cópias do alelo \*2 do gene TNF- $\alpha$  308 é fator de risco para o desenvolvimento de asma e essa associação é aumentada em pacientes com história familiar positiva.

Tsaroucha et al. (2013) encontraram associação entre baixos níveis de adiponectina plasmática com asma grave. Em nossa análise não foi observada associação entre os diferentes genótipos com a gravidade da asma. Esse resultado pode ter sido influenciado pelo dinamismo da classificação da asma.

Foi verificado que o teste alérgico cutâneo positivo foi associado à presença do alelo G em mulheres com asma (OR=2,55;  $p=0,035$ ). Este resultado pode ser reforçado por estudos funcionais em roedores que mostraram que a deficiência de adiponectina agrava a eosinofilia e o recrutamento de macrófagos nas vias aéreas durante provocação alérgica crônica (Medolf, 2009). Além disso, a infusão de adiponectina suprime a hiperresponsividade aguda induzida por alérgenos,

inflamação e produção de citocinas Th2 (Shore, 2006). De forma semelhante, Ionescu, et al. (2012) relataram redução da inflamação em animais submetidos a provocação alérgica e tratados com adiponectina recombinante intra-nasal. Corroborando os achados anteriores, mais recentemente, Verbout et al. (2013) observaram que, mesmo sem melhoria da metaplasia das células mucosas, os roedores com alta expressão de adiponectina apresentaram melhora da doença alérgica. Embora os resultados obtidos no presente trabalho devam ser replicados por outros grupos e em amostras maiores, de forma inédita, eles sugerem que polimorfismo no gene da adiponectina pode predispor à atopia e são reforçados por abordagens funcionais em animais.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o genótipo TT é fator de risco de asma. Esse genótipo também está relacionado à história familiar de 1º grau de asma e em pacientes atópicas a valores percentuais reduzidos de *peak flow*. Por outro lado, a presença de pelo menos um alelo G é fator de risco para a atopia em mulheres com asma. O polimorfismo 45T>G não foi associado as classes de IMC e gravidade da asma.

## REFERÊNCIAS

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T and Miyaoka K (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1):79–83.

Berthier MT, Houde A, Côté M, Paradis AM, Mauriège P, Bergeron J, Gaudet D, Després JP and Vohl MC (2005) Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. *J Lipid Res* 46(2):237-44.

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A and Richelsen B (2003) Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527–33.

Busse WW and Lemanske RF Jr (2001) Asthma. *N Engl J Med* 344(5):350-62.

Cartegni L, Chew SL and Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285–98.

Cohn L, Elias JA and Chupp GL (2004) Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual Review of Immunology* 22: 789-815.

Ding Y, Lin D, Yao H, He H, Shi H, Lin L and Chen S (2012) Investigation of association of the plasma adiponectin concentrations and adiponectin gene polymorphisms with bronchial asthma in Li nationality of Hainan. *Biological and Biomedical Reports* 2(1), 19-24.

Ford ES (2005) The epidemiology of obesity and asthma,” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 115, no. 5, pp. 897–910.

Holguin F, Rojas M, Brown LA and Fitzpatrick AM (2011) Airway and plasma leptin and adiponectin in lean and obese asthmatics and controls. *J Asthma* 48(3):217–223.

Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, Marks JA, Krakower GR, Jacob HJ, Weber J, et al. (2000) Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14478–14483

Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, et al. (2004) Adiponectin specifically increased

tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 109(17):2046–2049.

Lemanske RF Jr and Busse WW (2010) Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S95-102.

Lessard A, ST-Laurent J, Turcotte H and Boulet LP (2011) Leptin and adiponectin in obese and non-obese subjects with asthma. *Biomarkers* 16(3):271-3.

Lugogo NL, Kraft M and Dixon AE (2010) Does obesity produce a distinct asthma phenotype? *J Appl Physiol* 108: 729–734.

Macedo SEC, Menezes AMB, Knorst M, da Costa JSD, Gigante DP, Olinto MTA and Fiss E (2007) Fatores de risco para a asma em adultos, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 23(4): 863-874.

Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M and Yoshimatsu H (2004) Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- $\alpha$  in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 40(1):177–184

Novosad S, Khan S, Wolfe B and Khan A (2013) Role of Obesity in Asthma Control, the Obesity-Asthma Phenotype. *J Allergy (Cairo)*.

Ornelas MOG, Avila EC, Valle JFM, Ramos LEA, Albarran JC, Aldrete MEA, Romero EO, Del Mercado MV and Hernandez REN (2012) Association of *ADIPOQ* +45T>G polymorphism with body fat mass and blood levels of soluble adiponectin and inflammation markers in a Mexican-Mestizo population. *Diabetes Metab Syndr Obes* 5: 369–378.

Palmer CN, Doney AS, Lee SP, Murrie I, Ismail T, Macgregor DF and Mukhopadhyay S (2006) Glutathione S-transferase M1 and P1 genotype, passive smoking, and peak expiratory flow in asthma. *Pediatrics* 118(2):710-6.

Paro MLZ and Rodrigues JC (2005) Fatores preditivos da asma aguda em crianças. *J Bras Pneumol* 31(5):378-81.

Patel A, Gentile D, Trecki J, Howe-Adams J, Zeevi A, Doyle W and Skoner D. (2004) Association between TNF and TGF gene polymorphisms in infants and family history of allergic rhinitis and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 113(2):174.

Saltiel AR (2001) You are what you secrete. *Nat Med* 7(8):887–888.

Scott HA, Gibson PG, Garg ML and Wood LG (2011) Airway Inflammation is Augmented by Obesity and Fatty Acids in Asthma. *Eur Respir J* (38):594-602.

Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A and Hug C (2006) Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 118(2):389–395.

Sood A, Cui X, Qualls C, Beckett WS, Gross MD, Steffes MW, Smith LJ and Jacobs DRJr (2008) Association between asthma and serum adiponectin concentration in women. *Thorax* 63(10):877–882.

Stanciu LA and Djukanovic R (1998) The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *European Respiratory Journal* 11: 949–957.

Steffes MW, Gross MD, Schreiner PJ, Yu X, Hilner JE, Gingerich R and Jacobs DR Jr (2004) Serum adiponectin in young adults—interactions with central adiposity, circulating levels of glucose, and insulin resistance: the CARDIA study. *Ann Epidemiol* 14(7):492–498.

Summer R, Little FF, Ouchi N, Takemura Y, Aprahamian T, Dwyer D, Fitzsimmons K, Suki B, Parameswaran H, Fine A, et al. (2008) Alveolar macrophage activation and an emphysema-like phenotype in adiponectin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(6):L1035–L1042.

Sun H, Huang Y, Yu X, Li Y, Yang J, Li R, Deng Y and Zhao G (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, rosiglitazone, suppresses CD40 expression and attenuates inflammatory responses after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Int J Dev Neurosci* 26:505–515.

Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, et al. (2000) Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:861–868

Taylor B, Mannino D, Brown C, Crocker D, Twum-Baah N and Holguin F (2008) Body mass index and asthma severity in the National Asthma Survey. *Thorax* 63, 14–20.

Thyagarajan B, Jacobs DR Jr, Smith LJ, Kalhan R, Gross MD and Sood A (2010) Serum adiponectin is positively associated with lung function in young adults, independent of obesity: The CARDIA study. *Respir Res* 11:176.

Tsaroucha A, Daniil Z, Malli F, Georgoulas P, Minas M, Kostikas K, Bargiota A, Zintzaras E and Gourgoulis KI (2013) “Leptin, Adiponectin, and Ghrelin Levels in Female Patients with Asthma during Stable and Exacerbation Periods,” *Journal of Asthma* 50(2):188–197.

Vasseur F, Lepretre F, Lacquemant C and Froguel P (2003) The genetics of adiponectin. *Curr Diab Rep* 3:151–8.

Verbout NG, Benedito L, Williams AS, Kasahara DI, Wurmbrand AP, Si H, Halayko AJ, Hug C and Shore SA (2013) Impact of Adiponectin Overexpression on Allergic Airways Responses in Mice,” *Journal of Allergy*, vol. 2013, Article ID 349520, 13 pages.

Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ and Hall JM (2002) Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha-308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 10:82–85.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B and Tilg H (2004) Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 323(2):630–635.

Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA and Spurlock ME (2004) Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 316(3):924–929.

Yang WS, Tsou PL, Lee WJ, Tseng DL, Chen CL, Peng CC, Lee KC, Chen MJ, HuangCJ, Tai TY, et al. (2003) Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. *J Mol Med* 81(7):428-434.

## **RECURSOS DE INTERNET**

DATASUS, Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), 2008-2009. Acesso em: 11/12/12.

Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org). Date last updated: December 2011. Date last accessed December 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

## **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Embora esses resultados devam ser reproduzidos em estudos com amostras maiores, nosso trabalho encontrou associação entre o polimorfismo 45T>G do gene da adiponectina com a presença de asma, atopia e história familiar de 1° grau de asma.

## REFERÊNCIAS

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T and Miyaoka K (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1):79–83.

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A and Richelsen B (2003) Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527–33.

Busse WW and Lemanske RF Jr (2001) Asthma. *N Engl J Med* 344(5):350-62.

Lemanske RF Jr and Busse WW (2010) Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S95-102.

Ornelas MOG, Avila EC, Valle JFM, Ramos LEA, Albarran JC, Aldrete MEA, Romero EO, Del Mercado MV and Hernandez REN (2012) Association of *ADIPOQ* +45T>G polymorphism with body fat mass and blood levels of soluble adiponectin and inflammation markers in a Mexican-Mestizo population. *Diabetes Metab Syndr Obes* 5: 369–378.

Saltiel AR (2001) You are what you secrete. *Nat Med* 7(8):887–888.

Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A and Hug C (2006) Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 118(2):389–395.

Steffes MW, Gross MD, Schreiner PJ, Yu X, Hilner JE, Gingerich R and Jacobs DR Jr (2004) Serum adiponectin in young adults—interactions with central adiposity, circulating levels of glucose, and insulin resistance: the CARDIA study. *Ann Epidemiol* 14(7):492–498.

**ANEXO A**

Formatação do artigo de acordo com as normas de submissão da Revista Genetics and Molecular Biology (<http://www.gmb.org.br>).

**ANEXO B****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro que concordo em participar do projeto “Estudo genético e molecular da asma”. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que tem como objetivo buscar uma melhor compreensão dos fatores genéticos relacionados com a asma. Fui informado que a asma é uma doença inflamatória das vias respiratórias e está relacionada a fatores do ambiente e genéticos. Existem vários genes relacionados a asma e nos últimos anos, diversas pesquisas vem sendo realizadas para identificá-los e relacioná-los com as diversas formas e gravidade da doença. Fui informado ainda que esse estudo é independente do meu tratamento no hospital, que devo manter todas as recomendações médicas e que será realizada uma coleta de 5ml de sangue, como ocorre em qualquer exame laboratorial de rotina, e que a mesma será realizada com material estéril e descartável. O sangue coletado será utilizado para dosagens laboratoriais e estudo do meu material genético-DNA. Autorizo a utilização do meu DNA, bem como as informações obtidas na entrevista e nos exames laboratoriais, para os objetivos desse projeto e de outros relacionados à asma e comorbidades associadas, que possam vir a se realizar no futuro. Tenho a liberdade de cancelar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao meu atendimento e tratamento. Recebi a garantia de não ser identificado (a) e que todos os dados referentes a mim serão confidenciais, podendo ser acessados por mim e pelos pesquisadores envolvidos a qualquer tempo.

**Por este documento, tomo parte voluntariamente do presente estudo.**

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**RG/Assinatura do paciente**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do entrevistador**

\_\_\_\_\_  
**RG/ Assinatura do pesquisador**

Caso você tenha alguma dúvida ou problema relacionado ao estudo, poderá entrar em contato com a Pesquisadora Responsável, Dra. Flávia Imbroisi (tel. 3334-3547) ou Dra. Faradiba Sarquis Serpa (tel. 3322-0074). Ainda poderá recorrer ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da EMESCAM (tel. 33243586), email: comite.ética@emescam.br. Av. Nossa Senhora da Penha, 2190 - Prédio central da EMESCAM, 1º andar.

## ANEXO C

PROTOCOLO ASMA E GENES			
DATA: ___/___/___		PRONTUÁRIO:	
Nome:		Telefone:	Município: Estado:
Nascimento: ___/___/___	Idade: ___	Genero: M F	Cor: Paciente: Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Amarelo ( ) Índio ( ) Entrevistador: Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Amarelo ( ) Índio ( )
Peso (kg)	Estatura (m)	IMC:	Cintura (cm): Peak Flow (L/min) absoluto e %
IDADE DA 1ª CRISE _____ ANOS		REMISSÃO: ( ) Não ( ) Sim DE _____ A _____ ANOS	
Doenças Pré existentes e co-morbidades:		TABAGISMO: Início com _____ Parou com _____ Tipo _____ Consumo/dia _____	
( ) Hipertensão – Antes ou depois da asma ?		ALCOOLISMO: Início com _____ Parou com _____ Tipo _____ Consumo/dia _____ Dias por semana _____	
( ) Diabetes Mellitus. Tipo ___ Antes ou depois da asma?		MEDICAMENTOS EM USO _____	
( ) Doença do Refluxo		_____	
( ) Asma na Infância		MEDICAMENTOS DURANTE CRISE _____	
( ) Rinite alérgica		_____	
( ) Problemas da Tireóide. Qual? _____		MENOPAUSA Sim ( ) Idade _____ Não ( )	
( ) Neoplasia		REPOSIÇÃO HORMONAL Sim ( ) Não ( )	
( ) Reação a Medicamentos. Qual? <u>ASPIRINA / DIPIRONA</u>		_____	
História Familiar:			
Mãe	Asma _____ Rinite Alérgica _____	Dermatite Atópica _____	Outras alergias _____ DRGE _____
Obesidade	NEO _____ Diabetes _____	Hipertensão _____	Outras doenças _____
Pai	Asma _____ Rinite Alérgica _____	Dermatite Atópica _____	Outras alergias _____ DRGE _____
Obesidade	NEO _____ Diabetes _____	Hipertensão _____	Outras doenças _____
Irmãos	Asma _____ Rinite Alérgica _____	Dermatite Atópica _____	Outras alergias _____ DRGE _____
Obesidade	NEO _____ Diabetes _____	Hipertensão _____	Outras doenças _____
Filhos	Asma _____ Rinite Alérgica _____	Dermatite Atópica _____	Outras alergias _____ DRGE _____
Obesidade	NEO _____ Diabetes _____	Hipertensão _____	Outras doenças _____
Netos	Asma _____ Rinite Alérgica _____	Dermatite Atópica _____	Outras alergias _____ DRGE _____
Obesidade	NEO _____ Diabetes _____	Hipertensão _____	Outras doenças _____
EXAMES COMPLEMENTARES: DOSAGEM DE IgE TOTAL ___/___/___ _____ UI/ml normal:			
Hemograma ___/___/___ Hm Hg Htc Leuc. Seg Bt Eos. Linf.			
TESTES C/ AEROALERGENOS ___/___/___ POSITIVOS ( ) NEGATIVOS ( )			
Sol. Salina		<i>D. farinae</i>	Baratas
Histamina		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cão
<i>Blomia tropicalis</i>		<i>Alternaria alternata</i>	Gato
<i>D. pteronyssinus</i>		<i>Cladosporium herbarum</i>	
ESPIROMETRIA 1: ___/___/___ PRÉ	CVF _____ ( )	VEF1 _____ ( )	VEF1/CVF _____ ( ) FEF 25/75 _____ ( )
(primeira) PÓS	CVF _____ ( )	VEF1 _____ ( )	VEF1/CVF _____ ( ) FEF 25/75 _____ ( )
ESPIROMETRIA 2: ___/___/___ PRÉ	CVF _____ ( )	VEF1 _____ ( )	VEF1/CVF _____ ( ) FEF 25/75 _____ ( )
(antepenúltima) PÓS	CVF _____ ( )	VEF1 _____ ( )	VEF1/CVF _____ ( ) FEF 25/75 _____ ( )
ESPIROMETRIA 5: MÉDIA PRÉ	CVF _____ ( )	VEF1 _____ ( )	VEF1/CVF _____ ( ) FEF 25/75 _____ ( )
(3 últimas) PÓS	CVF _____ ( )	VEF1 _____ ( )	VEF1/CVF _____ ( ) FEF 25/75 _____ ( )
DIAGNÓSTICOS – CLASSIFICAÇÃO DA ASMA DE ACORDO COM AS IV DIRETRIZES PARA O MANEJO DA ASMA:			
Asma intermitente( )	Asma persistente leve( )	Asma persistente moderada( )	Asma persistente grave( )