UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Maurício Bianchini Moresco

Análise de Elementos Acumulados em Adolescentes e sua Associação com Inflamação Pulmonar.

Porto Alegre
2013

Maurício Bianchini Moresco

Análise de Elementos Acumulados em Adolescentes e sua Associação com Inflamação Pulmonar.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Claudia Ramos Rhoden
Co-orientador: Dr. Sérgio Luis Amantéa

Porto Alegre
2013

Catalogação na Publicação

Moresco, Maurício Bianchini
Análise de elementos acumulados em adolescentes e sua associação com inflamação pulmonar. / Maurício Bianchini Moresco. -- 2013.
79 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

Orientador(a): Profa. Dra. Claudia Ramos Rhoden ; coorientador(a): Prof. Dr. Sérgio Luis Amantéa.

1. Asma. 2. Óxido Nítrico Exalado. 3. Elementos Traço. 4. Inflamação das Vias Aéreas. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família pelo apoio e incentivo a conclusão dessa etapa tão importante. Adicionalmente, agradeço a todos os colegas de laboratório, de pós-graduação e aos amigos que me acompanharam durante essa jornada acadêmica, especialmente os amigos Fleck, Paim e Heinen. Agradeço aos professores Claudia Rhoden e Sérgio Amantea pela amizade, paciência e orientação, fundamentais para o meu aprendizado ao longo desses anos. Também agradeço à professora Jenifer Saffi pela orientação no programa de incentivo à docência REUNI. Finalmente, agradeço aos demais colegas, professores e técnicos que compõem a comunidade UFCSPA pela hospitalidade e carinho presentes todos os dias.

SUMÁRIO

1. Introdução 9

1.1 Doenças respiratórias 9

1.2 Asma 10

1.2.1 Prevalência 10

1.2.2 Custos econômicos relacionados à asma 12

1.2.3 Características da doença 12

1.2.4 Etiologia 13

1.2.5 Patogênese da asma 13

1.2.5.1 Epitélio respiratório 13

1.2.5.2 Células dendríticas 14

1.2.5.3 Linfócitos 15

1.2.5.4 Mastócitos 16

1.2.5.5 Eosinófilos 16

1.2.6 Marcadores inflamatórios 17

1.2.6.1. Biópsia tecidual 17

1.2.6.2 Escarro induzido 18

1.2.6.3 Marcadores sanguíneos 19

1.2.6.4. Metabólitos urinários 19

1.2.6.5. Fração exalada de óxido nítrico (Fe_{NO}) 20

1.3 Asma e poluição atmosférica 22

1.3.1 Epidemiologia 22

1.3.2 Mecanismo de toxicidade dos poluentes atmosféricos 25

1.4 Asma e micronutrientes 26

1.4.1 Vitamina D 27

1.4.2 Minerais 29

1.4.2.1 Zinco 30

1.4.2.2. Selênio 31

2. Justificativa 33

3. Objetivos 34

3.1 Objetivo geral 34

3.2 Objetivos específicos 34

4. Referências Bibliográficas 35

5. Artigo Científico 50

6. Conclusão 73

7. Anexos 74

7.1 Normas da revista Pediatric Pulmonology. 74

7.2 Carta de aprovação do CEP. 78

RESUMO

Introdução: Asma é uma doença respiratória caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas. A etiologia da asma é complexa, envolvendo aspectos genéticos, alérgicos, ambientais, infecciosos, emocional e nutricional. Entre os fatores nutricionais, a deficiência de minerais vem apresentando um papel importante na gênese da asma. Contudo, nenhum estudo avaliou a associação entre elementos acumulados e perfil inflamatório nas vias aéreas pulmonar de adolescentes. Desse modo, comparamos a concentração de elementos acumulados nas unhas de adolescentes em relação a um marcador de inflamação pulmonar. Matérias e Métodos: Asma ativa e asma grave foram avaliadas em adolescentes (n=106) através do questionário ISAAC. Os participantes foram divididos em dois grupos diferentes de acordo com o valor de Fe_{NO} medido. Além disso, amostras de unhas foram coletadas a fim de determinar a concentração de elementos acumulados (Cu, Zn, Mn, Se) por ICP-MS. Resultados: O NO exalado esteve aumentado em indivíduos do sexo masculino. Associação foi observada entre asma ativa e elevado NO exalado. Não houve diferença significativa nas concentrações (µg/g) de Cu (4,40 vs 4,52), Zn (84,66 vs 79,48), Mn (0,59 vs 0,76) e Se (0,18 vs 0,19) entre os diferentes grupos, bem como não foi encontrada correlação entre os níveis de Fe_{NO} e os elementos analisados. Conclusão: Ao analisarmos a concentração dos elementos Cu, Zn, Mn e Se nas unhas de adolescentes, não observamos diferença na concentração desses elementos entre os adolescentes com perfil inflamatório elevado em comparação ao outro grupo.

ABSTRACT

Asthma is a respiratory disease characterized by chronic inflammation of the airways. Asthma etiology is complex and involves genetic, allergic, environmental, infectious, nutritional and emotional factors. Among nutritional factors, mineral deficiency has shown an important role in the pathogenesis of asthma. However, no study has evaluated the association between accumulated elements and airway inflammatory status in adolescents. Thus, we compared the concentration of accumulated elements in adolescent nails in relation to a marker of pulmonary inflammation. Materials and Methods: Active and severe asthma were assessed in adolescents (n=106) through the ISAAC questionnaire. Subjects were allocated into two different groups according to the value of Fe_{NO} measured. Also, nail specimens were collected in order to determine the concentration of accumulated trace elements (Cu, Zn, Mn, Se) by ICP-MS. Results: Exhaled NO was increased in male subjects. We found association between active asthma and elevated exhaled NO. There was no significant difference in Cu (4.40 vs. 4.52), Zn (84.66 vs. 79.48), Mn (0.59 vs. 0.76) and Se (0.18 vs. 0.19) concentrations (μg/g) among distinct groups as well as no correlation was found between Fe_{NO} levels and any element analyzed. Conclusion: When analyzing the concentration of Cu, Zn, Mn and Se in adolescent nails, no difference was observed in the concentration of these elements among adolescents with increased inflammatory status compared to the other group

1. Introdução

1.1 Doenças respiratórias

A obstrução da passagem do ar através das vias respiratórias - cavidade nasal, traquéia, brônquios e pulmões - é característica das doenças respiratórias. O tipo de doença respiratória pode variar de aguda (como pneumonia e bronquite) à crônica, presente na asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

Doenças respiratórias crônicas atingem milhões de pessoas de todas as idades (desde neonatos a idosos) em todos os países do mundo. Dessas pessoas, mais de 50% vivem em países de baixa ou média renda ou pertencem a populações desfavorecidas (BOUSQUET & KHALTAEV, 2007).

Estima-se que no mundo 300 milhões de pessoas tenham asma, 210 milhões tenham DPOC e milhares tenham outros tipos de doenças crônicas. Conforme relatório

da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2005, 250 mil pessoas morreram de asma e 3 milhões de DPOC. Além disso, projeta-se que em 2030 a DPOC se torne a terceira maior causa de morte no mundo (OMS, 2008). No Brasil, as doenças respiratórias aparecem como a segunda principal causa de morbidade hospitalar. Atingindo principalmente, crianças, adolescentes e idosos (DATASUS, 2011).

1.2 Asma

1.2.1 Prevalência

Asma é considerada a doença crônica mais comum na infância e adolescência, com a maior prevalência na faixa entre 5 e 17 anos (CHOI & LEE, 2012), afetando principalmente crianças residentes em áreas urbanas (AMORIM & DANELUZZI, 2001). Estudos indicam que a prevalência de asma no mundo varia enormemente e o seu crescimento nas últimas décadas é um importante problema de saúde pública. (ISAAC STEERING COMMITTEE, 1998; COOPER *et al.*, 2009; NETO *et al.*, 2012).

A prevalência de asma mundial foi observada através do *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC). Na primeira fase desse projeto, foram estudados 463.801 adolescentes em 155 centros de 56 países e 304.796 crianças em 99 centros de 42 países. Os resultados demonstraram ampla variação nas prevalências dos sintomas de asma e alergias entre os diferentes países e entre regiões de um mesmo país. Considerando os dois grupos etários, a prevalência de sintomas de asma nos últimos doze meses (asma ativa) variou de 1,6% (Índia) a 36,8% (Reino Unido), e de rinite alérgica, de 1,4% (Índia) a 39,7% (Nigéria). O estudo mostrou que aproximadamente 80% dos pacientes asmáticos têm rinite alérgica (ISAAC STEERING COMMITTEE,

1998). A análise dos resultados obtidos ao final da fase 1, referentes à asma, mostrou ter havido ampla variação, nas duas faixas etárias, com relação à prevalência de sibilos nos últimos 12 meses, variando de 4,1 a 32,1% para as crianças e de 2,1 a 32,2% para os adolescentes. Os valores mais baixos foram documentados na República da Geórgia e Estônia, e os mais elevados, na Austrália (ISAAC STEERING COMMITTEE, 1998).

No Brasil, participaram oficialmente da primeira fase do ISAAC sete centros (Recife, Salvador, Uberlândia, Itabira, São Paulo, Curitiba e Porto Alegre) A prevalência de "sibilos nos últimos 12 meses" variou entre 16,1% (Itabira) e 27,2% entre as crianças com índices mais elevados em Recife e Porto Alegre. Entre os adolescentes ela variou de 9,6% (Itabira) a 27,1% (Salvador) sendo também elevada em Recife (24,7%). As formas mais graves de asma foram predominantes entre os adolescentes (SOLÉ *et al.*, 2001). No Brasil a prevalência de asma é elevada e atinge níveis de países desenvolvidos. Em comparação a todos os centros participantes da fase I, o Brasil ficou localizado no oitavo lugar entre os com maiores índices (ISAAC STEERING COMMITTEE, 1998).

Recentemente completa, a fase III do ISAAC incluiu um número maior de centros em diferentes regiões do mundo e jamais analisados em relação a essas condições. Aproximadamente, 1.200.00 de crianças e adolescentes foram amostrados. O estudo apontou que a prevalência mundial de asma entre adolescentes foi de 13,7%, oscilando entre 1,5% e 32,6% (LIMA *et al.*, 2012)

No Brasil, a prevalência de asma ativa em crianças, indicada pela resposta afirmativa para a questão de sibilos nos últimos 12 meses variou de 16,5% em Aracaju a 31,2% na zona oeste de São Paulo. Em adolescentes, a prevalência de asma ativa variou de 11,8% em Nova Iguaçu a 30,5% em Vitória da Conquista (SOLÉ *et al.*, 2006).

1.2.2 Custos econômicos relacionados à asma

Os gastos na saúde associados à asma são elevados e incluem despesas diretas e indiretas. Dentre as despesas diretas podemos ressaltar a medicação e o acompanhamento médico. As despesas indiretas referem–se às perdas no ganho monetário ocasionadas pela morbi-mortalidade decorrente da asma. Devido à sintomatologia ocasionada pela asma, muitos dos indivíduos asmáticos perdem um número significativo de dias de trabalho ou escola. Conforme revisão realizada por Bahadori *et al.* (2009) estima-se que os custos econômicos gerados pela asma estejam entre os maiores em relação às doenças crônicas, devido à utilização de cuidados de saúde significativos associados com esta condição. Também se observou que os custos da asma foram fortemente associados com a presença de comorbidades, idade dos indivíduos e severidade da doença.

1.2.3 Características da doença

Asma é uma condição inflamatória crônica das vias respiratórias que resulta em episódios de sibilância, tosse e dificuldade em respirar. A obstrução da via aérea segue um quadro variável, com períodos em que há ausência de sintomas e, inversamente, exacerbações geralmente causadas por infecções virais. Uma característica típica de pacientes asmáticos é o desenvolvimento de hiperresponsividade (hiperreatividade) brônquica – tendência da via aérea sofrer constrição em resposta a estímulos, como ar gelado e exercício.

Um grande número de asmáticos é atópico. A atopia pode ser conceituada como predisposição do indivíduo em desenvolver reações de sensibilidade alérgica e produzir imunoglobulina (Ig) E em resposta à exposição aos alérgenos. Contudo, alguns

asmáticos não apresentam sintomas associados à exposição aos alérgenos. Esse grupo é conhecido como asmáticos não-atópicos, apresentando doença de início tardio, muitas vezes associada à sinusite crônica e a pólipos nasais. Além disto, estes são resistentes ao tratamento com doses elevadas de corticosteróide inalado, porém responsivos aos corticosteróides sistêmicos e tratamento anti-interleucina (IL) 5 (MOORE *et al.*, 2010).

1.2.4 Etiologia

Nas últimas décadas, vem sendo observado o aumento na prevalência de doenças alérgicas e asma, particularmente em países de baixa e média renda. Além disso, a complexidade e a gravidade das doenças alérgicas, incluindo asma, continuam a aumentar, especialmente em crianças e adultos jovens (PAWANKAR *et al.*, 2012).

A causa da asma ainda não está completamente esclarecida, não havendo consenso sobre a sua etiologia. A asma é uma doença multifatorial relacionada com fatores genéticos, ambientais, emocionais e nutricionais. Embora a asma seja uma condição multifatorial, o fator de risco mais forte na etiologia da doença é a presença de atopia. Indivíduos atópicos possuem uma probabilidade maior de desenvolverem asma, assim como os que possuem histórico familiar de atopia. É consenso que resposta imunológica a vários estímulos alérgicos, incluindo pêlos de animais, ácaros, baratas, fungos e alimentos seja um fator importante no desencadeamento de sintomas asmáticos (MILLER, 2001).

1.2.5 Patogênese da asma

1.2.5.1 Epitélio respiratório

O epitélio respiratório é considerado um controlador fundamental da inflamação e das respostas imunes estimuladas por alérgenos, viroses e poluentes ambientais que contribuem para a patogênese da asma. Embora esse mecanismo de controle não seja completamente elucidado, a melhor compreensão da função do epitélio na manutenção da integridade das vias aéreas e sua disfunção na asma têm proporcionado uma visão importante de como a asma é iniciada e perpetuada.

As células epiteliais das vias respiratórias encontram-se na interface entre o organismo e o meio ambiente, representando a primeira linha de defesa contra microorganismos, poluentes e alérgenos (XIAO *et al.*, 2011). Pelo fato de estarem expostas ao meio externo, as células epiteliais expressam diversos receptores de reconhecimento padrão – receptor tipo Toll, receptor NOD, receptor lecitina-C e receptor ativado por protease – para rapidamente detectar e responder aos padrões moleculares associados aos patógenos, encontrados em microorganismos, ou aos padrões moleculares liberados no dano tecidual, estresse e morte celular. A ativação desses receptores resulta na liberação de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos que atraem e ativam células do sistema imune inato e adaptativo. Estudo recente demonstrou que a ativação de células epiteliais é evento chave desencadeante no reconhecimento de alérgenos inalados que ativam a rede de células dendríticas local, as quais coordenam a subseqüente resposta imune (LAMBRECHT & HAMMAD, 2009).

1.2.5.2 Células dendríticas

As células dendríticas são fundamentais no processo de iniciar e direcionar a resposta imune, servindo como sentinelas na superfície da mucosa, onde elas constantemente são expostas a antígenos e partículas que penetram nas vias aéreas

(MILL, 2012). Células dendríticas possuem a habilidade de captarem antígenos presentes nas vias aéreas. Processos dendríticos são projetados através do epitélio, entre as células epiteliais, mantendo a função de barreira pela formação de junções de oclusão (SUNG *et al.*, 2006). As células dendríticas expostas aos antígenos migram para o nódulo linfático local e apresentam os antígenos para linfócitos T imaturos e de memória (LAMBRECHT & HAMMAD, 2012). Atualmente, se tem o conhecimento que citocinas, principalmente IL-4, IL-12, IL-10, IL-6 e TGF-beta, estão envolvidas no processo de diferenciação de linfócitos T. Com exceção da IL-4, todas essas citocinas são produzidas por células dendríticas (BANCHEREAU *et al.*, 2000; LAMBRECHT & HAMMAD, 2010).

1.2.5.3 Linfócitos

Através de mecanismos ainda não completamente esclarecidos no pulmão *in vivo,* células dendríticas são responsáveis pela diferenciação de linfócitos T *helper* (Th) imaturos em Th tipo 2 (Th2), fundamentais na modulação da inflamação alérgica respiratória (MILL, 2012). Células Th2 são linfócitos T CD4+ produtores de várias citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Essas citocinas estimulam o crescimento, diferenciação e recrutamento de mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos B, todos envolvidos na imunidade humoral e resposta alérgica (MILLER, 2001).

Outro tipo de linfócito T CD4+, conhecido como Th17, foi recentemente descrito e vem demonstrando ser importante no processo inflamatório e em doenças autoimunes (STOCKINGER & VELDHOEN, 2007; WEAVER *et al.*, 2006). Pouco é conhecido sobre o papel de linfócitos Th17 na asma ou DPOC, porém, elevadas concentrações de IL-17 (produto predominante de linfócitos Th17) vêm sendo

encontradas em escarro de pacientes asmáticos (BULLENS *et al.*, 2006). Interessantemente, em pacientes asmáticos, eosinófilos estão acumulados nos pulmões, mas pacientes com um quadro de asma mais severa apresentam elevação no número de neutrófilos. Normalmente, os neutrófilos circundam o local de infecção ou dano, atraídos por IL-17, para proteger o organismo. Aparentemente, na asma, IL-17 está atraindo neutrófilos para os pulmões, mas eles não estão lá para protegê-los. Em vez disso, eles pioram o quadro asmático (CHAKIR *et al.*, 2003; BULLENS *et al.*, 2006; AL-RAMLI *et al.*, 2009; AGACHE *et al.,* 2010)

1.2.5.4 Mastócitos

Mastócitos são importantes na ativação da asma através da liberação de diversos broncoconstritores, principalmente histamina e mediadores lipídicos como leucotrienos C4, D4 e E4, além de prostaglandina D2. Mastócitos também liberam citocinas que estão relacionadas com inflamação alérgica, inclusive IL-4, IL-5 e IL-13 (GALLI *et al.*, 2005). A presença de mastócitos na musculatura lisa da via aérea vem tendo relação com hiperrresponsividade na asma (BRIGHTLING *et al.*, 2002).

1.2.5.5 Eosinófilos

A inflamação que ocorre na asma é geralmente descrita como eosinofílica. Células epiteliais da via aérea secretam fatores quimiotáticos que atraem eosinófilos na asma. O papel funcional dos eosinófilos na asma ainda não foi esclarecido e a evidência que relaciona a sua presença na hiperresponsividade vem sendo questionada por pesquisas recentes em que a administração de anticorpos bloqueadores de IL-5, que

reduzem consideravelmente o número de eosinófilos no sangue e escarro, não reduz a hiperrresponsividade ou os sintomas da asma (LECKIE *et al.*, 2000; FLOOD-PAGE *et al.*, 2007).

1.2.6 Marcadores inflamatórios

Asma é uma doença crônica com muitos fenótipos influenciados pelo grau de inflamação das vias aéreas. Essa inflamação pode variar em severidade, dependendo do grau de participação dos eosinófilos, mastócitos, linfócitos e neutrófilos (BUSSE & LEMANSKE, 2001; KAY, 2001). O conhecimento do perfil inflamatório de um indivíduo asmático é fundamental para o tratamento correto e eficiente. A inflamação mal controlada pode contribuir para o rápido declínio na função pulmonar e remodelamento das vias aéreas (HAMID, 2012).

Testes de função pulmonar, tais como os espirométricos, muitas vezes utilizados para acompanhamento clínico da asma possuem limitações importantes, uma vez que não permitem o detalhamento de mecanismos e de alterações celulares associadas à doença. Já, o uso de biomarcadores específicos pode permitir uma fenotipagem mais precisa da doença, indicando a patologia em um indivíduo e também pode auxiliar na escolha da terapêutica (WADSWORTH *et al.*, 2011).

A seguir temos uma descrição sumarizada de ensaios laboratoriais utilizados para diagnóstico e acompanhamento de indivíduos com doença pulmonar inflamatória.

1.2.6.1. Biópsia tecidual

O exame considerado “padrão-ouro” para o diagnóstico de inflamação pulmonar é a análise histológica de tecido pulmonar. Subtipos de células inflamatórias podem ser

identificas em camadas do tecido utilizando corantes específicos. Infelizmente, o processo de coleta da biópsia brônquica por bronquioscopia é um processo invasivo e necessita de um patologista experiente para a correta análise. Apesar de ser comum a diminuição da função pulmonar em pacientes que apresentam elevado número de células inflamatórias na biópsia brônquica, estudos clínicos demonstraram ausência de correlação entre o número de células inflamatórias contadas na biópsia de via aérea e a função pulmonar em asmáticos (SONT *et al.*, 1996).

1.2.6.2 Escarro induzido

A indução de escarro se faz um método alternativo para avaliar diretamente a inflamação das vias aéreas. O paciente inala uma solução salina hipertônica nebulizada para desencadear produção de escarro nas vias aéreas. Em alguns pacientes recomenda-se administrar 200 a 400 μg de salbutamol *spray* antes do início da indução. O uso de salbutamol é útil na prevenção de broncoconstricção naqueles pacientes com hiperresponsividade brônquica à solução salina hipertônica (DREWS *et al.*, 2006). O escarro, então, é expelido carreando as células inflamatórias presentes no lúmen da via aérea. A suposição principal é de que o infiltrado inflamatório no lúmen das vias aéreas reflete a inflamação tecidual. Lâminas contendo as amostras de expectoração são então coradas usando técnicas semelhantes as biópsias do tecido para examinar o tipo específico de infiltrado celular na expectoração.

Essa técnica vem sendo usada na pesquisa clínica para identificação de subpopulações de asmáticos que apresentam neutrofilia superior à eosinofilia, esses pacientes são comumente menos responsivos ao tratamento por esteróides (GREEN *et al.*, 2002). O sucesso do exame depende do treinamento da equipe e de adequada validação do método. A qualidade do escarro deve ser sempre avaliada com cuidado,

pois a contaminação por saliva - rica em células escamosas - é um problema comum. As células escamosas são células grandes que, em concentrações elevadas, dificultam a visualização de outras células (eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, etc.) (PIZZICHINI, 1996).

1.2.6.3 Marcadores sanguíneos

Na prática clínica a contagem dos eosinófilos sanguíneos é pouco utilizada como marcador de inflamação respiratória. O número de eosinófilos observado no soro apresenta fraca correlação com a eosinofilia obtida na biópsia brônquica (NIIMI *et al.*, 1998), tendo baixa especificidade para a doença. A avaliação de células inflamatórias como marcador sanguíneo pode auxiliar à terapêutica. Caso a concentração de eosinófilos encontrada no sangue tenha aumentado, em seguida, a dose de esteróides inalados deve ser aumentada, mas apenas após garantia de que o paciente aderiu ao tratamento. Em pacientes assintomáticos que apresentam ausência de eosinófilos, pode-se reduzir o tratamento com antiinflamatórios. No caso de porcentagem elevada de neutrófilos, o uso de esteróides pode não ser a opção de tratamento mais adequada e estratégias alternativas de manejo devem ser consideradas (ZACHARASIEWICZ, 2007).

1.2.6.4. Metabólitos urinários

Urina é possivelmente o fluido corpório menos invasivo para a avaliação de biomarcadores, portanto, é altamente adequada para o estudo e avaliação da asma em crianças jovens. Concentrações do metabólito histamínico, N-metil-histamina, apresentam-se elevadas na urina de pacientes asmáticos, após crise alérgica e

exacerbações, também se encontram reduzidos em crianças asmáticas na vigência de tratamento com medicamento antialérgico (STEPHAN *et al.*, 1990; TAKEI *et al.*, 1997).

Embora a sua efetividade clínica seja contestável, a dosagem de metabólitos urinários apresenta elevada sensibilidade e especificidade. Além disso, permite a análise de múltiplos marcadores e a padronização na coleta e processamento da amostra (WADSWORTH *et al.*, 2011).

1.2.6.5. Fração exalada de óxido nítrico (Fe_{NO})

Óxido nítrico (NO) é um mediador biológico e molécula citotóxica envolvido em vários processos patológicos e fisiológicos. NO é produzido nas vias aéreas pela conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina, a qual é catalisada por enzimas conhecidas como NO sintases (NOS) (NATHAN & XIE, 1994). Nos pulmões o NO atua como vasodilatador; broncodilatador; neurotransmissor não-colinérgico e não-adrenérgico (BELVISI *et al.*, 1993), além de ser um importante mediador de resposta inflamatória (BARNES & BELVISI, 1993; GUSTAFSSON, 1998). Quatro isoformas de NOS foram identificadas: NOS1, NOS2, NOS3 (NATHAN & XIE, 1994) e NOS4 - envolvida em patologias renais (FREEDMAN *et al.*, 2000) e nefropatia diabética (MOLLSTEN *et al.*, 2006).

NOS1 e NOS3 são dependentes de calcio-calmodulina e suas ativações parecem ser responsáveis pelos efeitos fisiológicos do NO, inclusive tônus vasodilatador (essencial para a regulação da pressão sanguínea); neurotransmissão; regulação do funcionamento da musculatura lisa no trato respiratório, gastrointestinal e genitourinário; contratibilidade cardíaca e agregação plaquetária. As enzimas NOS1 e NOS3 são expressas em células endoteliais, epiteliais, macrófagos, neutrófilos,

eosinófilos (BARNES & BELVISI, 1993) e musculatura lisa vascular (PALMER *et al.*, 1987). Agonistas como bradicinina, acetilcolina e histamina resultam na liberação de NO em baixa concentração (ρmol) durante poucos segundos.

Do contrário, NOS2 é cálcio-calmodulina independente e, uma vez induzida, a produção de NO aumenta para concentrações elevadas (nmol) e pode continuar durante dias. NOS2 é predominantemente expressa em linfócitos T, macrófagos e células epiteliais (DWEIK, 2005) e pode ser induzida por algumas citocinas: fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e IL-1b, assim como as endotoxinas. NOS2 é a isoforma predominante no epitélio respiratório (KOBZIK *et al.*, 1993) e a principal determinante dos níveis de NO exalado (LANE *et al.*, 2004). A ativação de NOS2 está relacionada à patogênese de diversas doenças, inclusive a asma. NOS2 foi encontrada no epitélio respiratório e em células inflamatórias de pacientes asmáticos, sendo raramente presente em pacientes não asmáticos (HAMID *et al.*, 1993). Adicionalmente, em asmáticos, existe correlação nos níveis de Fe_{NO} e expressão de NOS2 no epitélio respiratório, sugerindo que o aumento na atividade de NOS2 seja responsável pelo aumento de Fe_{NO} (LANE *et al.*, 2004). O aumento na atividade de NOS2 nas vias aéreas de asmáticos ocorre como resposta às citocinas inflamatórias liberadas por uma variedade de mecanismos (HAMID *et al.*, 1993 ; GUO *et al.*, 2000).

Em 2011, a American Thoracic Society (ATS) recomendou a medição de Fe_{NO} para auxílio no dagnóstico de inflamação eosinofílica das vias aéreas e determinar a probabilidade de resposta ao tratamento com corticosteróides (DWEIK *et al.*, 2011). As diretrizes sugerem a utilização de pontos de corte ao invés de valores de referência na interpretação dos níveis de Fe_{NO}, além do uso de diferentes limiares para crianças menores de 12 anos. A diretriz preconiza que o nível de Fe_{NO} <25 partes por bilhão (ppb) (20 ppb em crianças <12 anos) indica uma baixa probabilidade de inflamação

eosinofílica e, conseqüente, resposta ao tratamento com corticosteróides, enquanto que o Fe_{NO} >50 ppb (35 em crianças <12 anos) indica o contrário.

Atopia, ou seja, a predisposição genética de desenvolver doenças genéticas como eczema, rinite alérgica e asma, é um possível fator de confusão ao medir Fe_{NO} na asma. Atopia é comumente aceita como a principal desencadeadora de asma, principalmente em crianças, mas a sua associação com a doença pode estar superestimada. Na revisão de Pearce *et al.* (1999) que avaliou a relação entre atopia e asma, pode-se observar que a proporção de casos de asma atribuídos à atopia na população em geral é menor de 50% e muitos indivíduos atópicos não desenvolvem asma. Vários estudos demonstram que Fe_{NO} está elevado em indivíduos atópicos, independente de serem asmáticos, sugerindo que Fe_{NO} atua como biomarcador para atopia (HERVAS *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2009; BANOVCIN *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010). Contudo, outros estudos observaram que atopia, definida pelo teste cutâneo positivo, ou pela presença de várias doenças alérgicas, não está relacionada aos níveis de Fe_{NO}, propondo que o Fe_{NO} seja um marcador específico para doença asmática (ROUHOS *et al.*, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2011). Com opiniões tão polarizadas sobre a variável atopia ser um fator de confusão, é provavelmente sábio considerar a coexistência de atopia quando se está avaliando o estado de um paciente asmático em relação ao seu valor de Fe_{NO} (WADSWORTH *et al.*, 2011).

1.3 Asma e poluição atmosférica

1.3.1 Epidemiologia

Acredita-se que a poluição atmosférica possa ser um dos fatores responsáveis pelo aumento na prevalência de asma no mundo (GRUZIEVA *et al.*, 2013; MALLOL *et al.*, 2012). Por isso, muitos estudos têm sido realizados para investigação da relação entre asma e poluição do ar (KIM *et al.*, 2013; JEDRYCHOWSKI *et al.*, 2013; BAÏZ *et al.*, 2011). Os grupos em que é possível observar os efeitos da poluição na exacerbação da asma são crianças, idosos e, independentemente da idade, indivíduos com doenças pré-existentes crônicas que afetam principalmente o sistema respiratório (asma, COPD, fibrose), ou o sistema circulatório (arritmia, hipertensão e doenças isquêmicas do coração), bem como aqueles com doenças crônicas, como diabetes (BROOK *et al.*, 2010).

O papel de um poluente específico na morbidade respiratória pode ser difícil de determinar. A maioria dos estudos publicados são transversais e buscam determinar as relações entre poluentes do ar e os resultados de morbidade como hospitalização, visitas a serviços de emergência e deterioração da função pulmonar (KELLY & FUSSEL, 2011; SCHULTZ *et al.*, 2012; JASINSKI *et al.*, 2011). Em Atenas, na Grécia, pesquisadores investigaram os efeitos agudos da exposição ao material particulado menor que 10 μm de diâmetro (MP_{10}) na atmosfera e dióxido de enxofre (SO_2) sobre o número de visitas à emergência por crianças e adolescentes na faixa etária 0-14 anos, entre 2001 e 2004. Um aumento de 10 $\mu g/m^3$ nos níveis de MP_{10} e SO_2 foi associado com um aumento de 2,2% (95% IC: 0,1-5,1) e um aumento de 6,0% (95% IC: 0,9-11,3), respectivamente, do número de visitas hospitalares relacionadas à asma (SAMOLI *et al.*, 2011). Estudos demonstraram uma associação direta entre residir próximo a uma fonte de poluição, como por exemplo, grandes rodovias, e o aumento da incidência de sibilos, de asma, bem como exacerbação desta doença (LOYO-BERRÍOS *et al.*, 2007; MORGENSTERN *et al.*, 2007; MORGENSTERN *et al.*, 2008). Como parte de um

estudo longitudinal de coorte de nascimento, crianças que residiam dentro de 50m de uma estrada principal apresentaram maior chance de apresentarem sintomas alérgicos no primeiro ano de vida (MORGENSTERN *et al.*, 2007) e maior chance de sensibilização a alérgenos e asma em uma idade de 4-6 anos (MORGENSTERN *et al.*, 2008).

Muitos estudos recentes têm se concentrado em determinar os efeitos nocivos da poluição do ar na função respiratória em crianças. Em um estudo holandês, 632 crianças foram recrutadas e estratificadas de acordo com seus níveis de IgE. Nas crianças com hiperresponsividade brônquica e níveis elevados de IgE, o aumento dos níveis de poluentes atmosféricos foi associado com uma diminuição no pico de fluxo expiratório (BOEZEN *et al.*, 1999). Em outro estudo, a exposição a óxidos de nitrogênio (NO_x) relacionados com o tráfego veícular e partículas grossas durante o primeiro ano de vida foram associados com aumento da sensibilização a alérgenos, além de aumento do risco de sibilos e redução da função pulmonar em uma idade de 4 anos (NORDLING *et al.*, 2008). McConnell *et al.* (2002) seguiram 3.535 crianças de até 5 anos recrutadas do sul da Califórnia e que não apresentavam histórico de asma. Para as crianças provenientes de comunidades com níveis elevados de ozônio (O_3), o risco relativo de desenvolver asma para aqueles que jogam 3 ou mais esportes coletivos foi de 3,3 (IC 95%, 1,9 -5,8), em comparação com aqueles que não praticam esportes. Curiosamente, a prática de esportes não teve efeito em áreas de baixa concentração de ozônio. Além disso, a variável "tempo no ambiente externo" apenas foi associada com maior incidência de asma em áreas de alta concentração de O_3. Estes resultados sugerem que a prática de exercícios em comunidades com níveis elevados de O_3 no ambiente possam estar associadas com o desenvolvimento de asma em crianças.

1.3.2 Mecanismo de toxicidade dos poluentes atmosféricos

Os mecanismos envolvidos nos efeitos adversos ocasionados pela exposição a poluentes atmosféricos não estão ainda completamente esclarecidos. A explicação mais consistente e amplamente aceita é a de que, uma vez em contato com o epitélio respiratório, MP e gases (NO_x e O_3) são responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, induzindo estresse oxidativo nas vias aéreas. Esse desbalanço oxidativo inicia uma resposta inflamatória, com ativação de células inflamatórias e liberação de mediadores (citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão) que chegam à circulação sistêmica. Além dos efeitos negativos causados pela inflamação no sistema respiratório, efeitos sistêmicos podem ser observados (KÜNZLI *et al.*, 2010; WHO, 2005), tais como alterações cardiovasculares, cognitivo-comportamentais, dentre outras (ZANCHI *et al.*, 2010; HALMENSCHLAGER *et al.*, 2009; DAMIANI *et al.*, 2012).

A exposição ao MP associada à presença de alérgeno estimula a liberação de IL-4 mediada por IgE quando comparada com exposição à alérgeno apenas (DIAZ SANCHEZ, 1997; INOUE *et al.*, 2007; SAMUELSEN *et al.*, 2008). Estudos em camundongos e células humanas do epitélio respiratório demonstraram que, quando comparado com partículas de queima de madeira ou de exaustão de automóveis, partículas da exaustão de motor a diesel possuíram maior capacidade de induzir produção de citocinas da linhagem Th2, de aumentar a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade classe II e de incrementar a proliferação de células inflamatórias (SAMUELSEN *et al.*, 2008; PORTER *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que no ambiente, além dos poluentes dispersos na atmosfera, também encontramos microorganismos, os quais muitas vezes são carreados pelos próprios poluentes, como o MP. Bactérias e vírus são reconhecidos como potentes ativadores do sistema imune inato. Alguns estudos têm investigado o papel dos

componentes microbianos na indução da inflamação das vias aéreas mediadas por macrófagos alveolares (BECKER *et al.*, 2003; SOUKUP & BECKER, 2001; HUANG *et al.*, 2002). Em um modelo de contaminação de partículas de poluição contendo ambas as espécies Gram-positivas e Gram-negativas, Becker *et al.* (2002) verificaram que o componente bacteriano das partículas era um potente estimulador da produção de citocinas por macrófagos das vias aéreas humana.

Em um estudo transversal utilizando Fe_{NO} como marcador inflamatório, a proximidade com estradas foi associada ao aumento no Fe_{NO} em crianças de 9-11 anos, mas não com as alterações dos parâmetros de função pulmonar (DALES *et al.*, 2008), sugerindo que o Fe_{NO} possa ser um marcador mais sensível para avaliar respostas nas vias aéreas de crianças em relação à poluição. Outro estudo envolvendo crianças asmáticas e saudáveis observou que os níveis de Fe_{NO} aumentaram em resposta a elevadas concentrações nas residências de MP fino, NO_x e *black carbon* durante um período de 11 dias (MURATA *et al.*, 2007).

Estudos avaliando as interações gene-ambiente podem fornecer explicação para a variabilidade em fenótipos de asma associada com exposição à poluição do ar. Apesar de haver poucos estudos nesse segmento, alguns sugerem que polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de espécies oxidantes (SALAM *et al.*, 2007a; MELÉN *et al.*, 2008; ROMIEU *et al.*, 2006), inflamação das vias aéreas (SALAM *et al.*, 2007b), e imunidade inata (SVENDSEN *et al.*, 2007) modificam as respostas às exposições dos poluentes.

1.4 Asma e micronutrientes

A complexa etiologia da asma envolve aspectos genéticos, alérgicos, ambientais, infecciosos, emocional e nutricional (MADDOX & SCHWARTZ, 2002). Nas últimas duas décadas, diversos estudos demonstraram associação entre asma e doença atópica na infância com o *status* nutricional infantil e materno na gravidez. Entre os fatores nutricionais mais estudados, destacam-se a vitamina D e os elementos zinco (Zn) e selênio (Se) (NURMATOV *et al.*, 2011).

1.4.1 Vitamina D

A deficiência de vitamina D é uma das condições médicas mais comuns em todo o mundo, com aproximadamente 1 bilhão de crianças e adultos em risco (HOLICK, 2011). A deficiência de vitamina D está associada com várias condições não relacionadas ao tecido esquelético, como câncer, doenças auto-imunes, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e doenças do aparelho respiratório (HOLICK, 2007).

Tem sido proposto que a falta de vitamina D possa ser um dos fatores fundamentais para o aumento da prevalência da asma global nas últimas décadas (LITONJUA *et al.*, 2007). Estimativa de baixa ingestão materna de vitamina D durante a gravidez tem sido associada com o desenvolvimento de sibilos (DEVEREUX *et al.*, 2007; MIYAKE ET AL., 2010), asma (ERKKOLA *et al.*, 2009) ou alergia alimentar (NWARU *et al.*, 2010) em crianças.

A vitamina D tem propriedade imunomoduladora (BAEKE *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2009; BOONSTRA ET AL., 2001) capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzir a síntese de péptidos antimicrobianos (ADAMS & HEWISON; 2008). Durante uma infecção bacteriana, macrófagos transformam a vitamina D

circulante em seu metabólito (1,25-OH vitamina D), que é um indutor direto da expressão de genes que codificam para peptideos antimicrobianos (WHITE, 2010). Há também evidência de que a vitamina D reforça a barreira física epitelial através do aumento na expressão de genes de adesão e junção celular, auxiliando assim as defesas naturais (SCHWALFENBERG, 2011). Estudos *in vitro*, utilizando células humanas ou de camundongos demonstraram que a vitamina D é capaz de inibir a proliferação de células T e respostas Th1. Tang *et al.* (2009) observaram inibição na resposta a Th17 pela vitamina D, podendo ser importante no estudo de doenças refratárias ao tratamento com esteróides (MCKINLEY *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos sugerem que a deficiência de vitamina D está associada com um aumento da incidência de asma e de sintomas alérgicos (HYPPONEN *et al.*, 2004; LITONJUA, 2009; CAMARGO *et al.*, 2007; FREISHTAT *et al.*, 2010) Em um estudo envolvendo crianças na Costa Rica (BREHM *et al.*, 2009), baixos níveis de vitamina D foram associados com hiperresponsividade das vias aéreas e aumento na contagem de eosinófilos e níveis de IgE plasmático. Crianças com elevados níveis de vitamina D tiveram uma menor probabilidade de hospitalização por exacerbações de asma.

Alta prevalência de deficiência de vitamina D (54%) e insuficiência renal (86%) foi observada em um estudo recente com crianças saudáveis e asmáticas. Os níveis mais baixos de vitamina D foram observados em crianças asmáticas em comparação aos saudáveis (FREISHTAT *et al.*, 2010). Em uma coorte realizada na Nova Zelândia, baixo nível sérico de vitamina D no sangue do cordão umbilical foi associado com aumento no risco de sibilos na infância (CAMARGO *et al.*, 2008). Assim, é possível que a deficiência ou ausência de vitamina D em uma fase inicial do desenvolvimento predisponha ao desenvolvimento de sintomas asmáticos (CAMARGO *et al.*, 2008).

Em uma grande coorte realizada nos EUA, Brehmet *et al.* (2010) mediram os níveis séricos de vitamina D em 1024 crianças de 5-12 anos com leve a moderada asma desde a infância. Deficiência de vitamina D (≤75 nmol/l) foi associada a um aumento do risco de agravamento da asma grave ao longo de 4 anos. Searing *et al.* (2010) dosaram os níveis séricos de vitamina D em 100 crianças e adolescentes asmáticos com idade entre 0-18 anos, 17% eram deficientes e 47% tinham insuficiência de vitamina D. Baixos níveis séricos foram associados com o aumento no uso de esteróides e diminuição na função pulmonar.

Embora tenham muitas evidências sugerindo um papel para a vitamina D no controle da asma, outros estudos vão de encontro aos principais achados, sugerindo que a vitamina D possa exacerbar os sintomas de asma, ao invés de melhorar o fenótipo asmático (WJST, 2006; HYPPONEN *et al.*, 2004; GALE *et al.*, 2007). Embora os resultados sejam conflitantes, Nurmatov *et al.* (2011) em estudo de meta-análise, concluiu que há uma associação entre a ingestão materna de vitamina D e sibilos na infância (OR, 0.56, 95% CI, 0.42-0.73).

1.4.2 Minerais

Vem sendo proposto que os níveis de alguns minerais no organismo, absorvidos pela ingestão de alimentos, possuem papel fundamental no desenvolvimento de doenças respiratórias. É consenso que o estresse oxidativo contribui significativamente para a patogênese da asma e, como um potente antioxidante nutricional, elementos traço podem servir para reduzir as concentrações de radicais livres e, conseqüentemente, a asma. A fim de seqüestrar as espécies reativas formadas, o organismo possui sistemas que geralmente envolvem a presença de vitaminas e enzimas antioxidantes que

necessitam, obrigatoriamente de elementos traço no papel de cofatores, como Se, manganês (Mn), cobre (Cu), Zn e cobalto (Co). Estudos demonstram que a redução no consumo diário de antioxidantes é positivamente correlacionada com o aumento no risco de desenvolver asma (SEATON *et al.*, 1994; PATELAROU *et al.*, 2011). Zn e Se são os principais elementos antioxidantes em mamíferos e um grande número de publicações vem relacionando esses elementos com inflamação e asma.

1.4.2.1 Zinco

O Zn possui efeitos significativos no sistema imune (funções fagocitárias, imunidade celular, imunidade humoral e função para as células NK). Dano no epitélio celular e infecções no trato respiratório inferior ocorrem na deficiência de Zn pelo aumento no estresse oxidativo nos pulmões e nas vias aéreas (ZALEWSKI, 2006).

Estudo utilizando grupo de animais submetidos a modelo de inflamação alérgica das vias respiratórias e à depleção nutricional de Zn, demonstrou que os mesmos apresentaram eosinofilia nas vias aéreas e a apoptose do epitélio respiratório 1,6 e 3,2 vezes maior em relação aos animais submetidos ao modelo de inflamação alérgico mas com níveis normais de Zn na dieta (TRUONG-TRAN *et al.*, 2002). Estudos de caso controle na Escócia (SOUTAR *et al.*, 1997) e Espanha (DE LUIS *et al.*, 2003) demonstraram que o risco combinado de atopia, hiperresponsividade bronquica e sintomas alérgicos foram de 4 a 5 vezes maiores em indivíduos com baixa ingestão de Zn quando comparados com indivíduos de elevada dieta com Zn.

Estudos demonstram que ambos, asma (GEORAS *et al.*, 2005) e deficiência de Zn (PRASAD, 2000), favorecem o perfil de citocinas inflamatória do tipo Th2. Logo, indivíduos asmáticos com deficiência de Zn sistêmica podem ter um aumento acentuado de citocinas pró-inflamatórias Th2. Gomez *et al.* (2006) estudaram a interação entre NO

e Zn nos pulmões. Os autores observaram o aumento da expressão e atividade da enzima NOS2 nos pulmões de animais privados de Zn na dieta, esse achado foi acompanhado de aumento nos níveis de nitrito, nitrato e NO no soro e nos pulmões. Porém, ao terem Zn incluído na dieta, a expressão de NOS2 foi normalizada.

1.4.2.2. Selênio

O Se é um importante antioxidante, principalmente pela sua incorporação na enzima glutationa peroxidase, responsável pela proteção das células contra o estresse oxidativo (NORTON & HOFFMANN, 2012). Vários estudos (KOCYIGIT *et al.*, 2004; QUJEQ *et al.*, 2003; GARCIA-LARSEN *et al.*, 2007) fornecem evidências de que Se está relacionado com asma, associando *status* inferior de Se em pacientes asmáticos em comparação aos saudáveis. Em estudo desenvolvido por GUO *et al.* (2011), envolvendo 25 pacientes asmáticos adultos e 25 indivíduos saudáveis, foi observado no grupo asmático menores concentrações séricas de Se e indicadores mais elevados de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Carneiro *et al.*, (2011), investigaram asma em relação à concentração de Zn e Se nas unhas de 165 adolescentes. Adolescentes incluídos no quartil mais alto de Se e Zn apresentaram redução de 5 vezes na razão de prevalência de asma, enquanto os adolescentes na faixa de menor concentração de Se apresentaram um aumento de quase 2,5 vezes na razão de prevalência de asma.

Embora ensaios clínicos randomizados (HASSELMARK *et al.*, 1993) e estudos transversais (SHAHEEN *et al.*, 2001; RUBIN *et al.*, 2004) tenham demonstrado papel protetor do Se na asma, outros estudos não demonstraram essa relação (PICADO *et al.*, 2001; BURNEY *et al.*, 2008). Pesquisadores neo-zelandenses acompanharam neonatos

durante 1997-2001, não sendo observada forte associação entre os níveis de Se nas crianças e o aumento na incidência de asma (THOMSON *et al.*, 2012).

O conhecimento de que certas condições inflamatórias podem levar à diminuição nos níveis de Se pode ser um fator de confusão na causalidade relacionando asma e níveis de Se. Por isso, atualmente não é possível gerar conclusões definitivas através dos estudos epidemiológicos entre Se e asma, necessitando de mais estudos para esclarecer essa relação (NORTON & HOFFMANN, 2012).

2. Justificativa

A partir do aumento na prevalência de asma no mundo, diversos estudos buscaram relacionar fatores ambientais e genéticos com o desenvolvimento da doença (SCHULTZ *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013). A associação entre asma e micronutrientes é recente e, apesar de alguns estudos observarem essa associação (NURMATOV *et al.*, 2011), não é possível serem feitas conclusões definitivas. Desse modo, mais estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar o grau de associação entre asma e micronutrientes.

Apesar da asma ser uma doença com fenótipos variáveis, influenciados diretamente pelo grau de inflamação, poucos estudos levam em consideração o perfil da doença nos sujeitos de pesquisa durante a avaliação de associação entre asma e elementos essenciais. Desse modo, de nosso conhecimento, esse foi o primeiro estudo a avaliar a inflamação respiratória de adolescentes com os níveis de elementos acumulados em matriz biológica.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Comparar a concentração de elementos acumulados nas unhas de adolescentes em relação ao grau de inflamação nas vias aéreas.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar dados sociodemográficos e verificar a prevalência e severidade da asma através do questionário de sintomas respiratórios ISAAC em uma amostra de adolescentes do município de Capivari do Sul/RS;
- Medir instrumentalmente os níveis de Fe_{NO} em uma amostra de adolescentes do município de Capivari do Sul/RS;
- Coletar e analisar a concentração de elementos acumulados nas unhas de uma amostra de adolescentes do município de Capivari do Sul/RS.

4. Referências Bibliográficas

ADAMS, J.S. & HEWISON, M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab,** v. 4, p. 80–90, 2008.

AGACHE, I. et al. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. **Respir Med,** v. 104, p. 1131–7, 2010.

AL-RAMLI W. et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. **J Allergy Clin Immunol**,v.123, p.1185–7, 2009.

AMORIM, A.J. & DANELUZZI, J.C. Prevalence of asthma in schoolchildren. **J Pediatr**, v.77, p.197–202, 2001.

BAEKE, F. & KORF, H. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. **J Steroid Biochem Mol Biol,** v.121, p.221–7, 2010.

BAHADORI, K. & DOYLE-WATERS, M.M. Economic burden of asthma: a systematic review. **BMC Pulm Med**, v.19, p.24, 2009.

BAÏZ, N. et al. Maternal exposure to air pollution before and during pregnancy related to changes in newborn's cord blood lymphocyte subpopulations. The EDEN study cohort. **BMC Pregnancy Childbirth**, v.11, p.87, 2011.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol,** v.18, p.767-811, 2000.

BANOVCIN, P. et al. Factors attributable to the level of exhaled nitric oxide in asthmatic children. **Eur J Med Res,** v.14 (Suppl 4), p.9-13, 2009.

BARNES, P.J. & BELVISI, M.G. Nitric oxide and lung disease. **Thorax**, v.48, p. 1034-43, 1993.

BECKER, S. & FENTON, M.J. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 27, p. 611– 618, 2002.

BECKER, S. et al. Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. **Exp Lung Res**, v.29, p.29-44, 2003.

BELVISI, M.G. et al. Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea. **Eur. J. Pharmacol**. 1993; 231: 97–102.

BOEZEN, H.M. et al. Effects of ambient air pollution on upper and lower respiratory symptoms and peak expiratory flow in children. **Lancet**, v. 353, p. 353:874–878, 1999.

BOONSTRA, A. et al. 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. **J Immunol,** v. 167, p. 4974–80, 2001.

BOUSQUET, J. & KHALTAEV, N. Global surveillance, prevention and control of Chronic Respiratory Diseases. A comprehensive approach. www.who.int/gard/publications/GARD%20Book%202007.pdf. Acesso em Dez 2012.

BREHM, J.M. et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. **Am J Respir Crit Care Med,** v.179, p. 765– 771, 2009.

BREHM, J.M. et al. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, p. 52.e5–58.e5, 2010.

BRIGHTLING, C. E. et al. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. **N. Engl. J. Med**, v.346, p.1699–1705, 2002.

BROOK, R.D. et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. **Circulation,** v.121, n.21, p.2331-78, 2010.

BULLENS, D.M. et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? **Respir Res**, v.7, p. 135, 2006.

BURNEY, P. et al. A case-control study of the relation between plasma selenium and asthma in European populations: a GAL2EN project. **Allergy**, v.63, p. 865–71, 2008.

BUSSE, W.W & LEMANSKE, R.F. Jr. Asthma. **N. Engl. J.Med**, v.344, p.350–62,2001.

CAMARGO, C.A. et al. Cord blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of childhood wheeze in New Zealand. **Am J Respir Crit Care Méd**, v. 177(Suppl):A993, 2008.

CAMARGO, C.A. et al. Regional differences in EpiPen prescriptions in the United States: the potential role of vitamin D. **J Allergy Clin Immunol**, v.120, p.131-136, 2007.

CARNEIRO, M. F. H. et al. Low Concentrations of Selenium and Zinc in Nails are Associated with Childhood Asthma. **Biol Trace Elem Res**, v.144, p. 244–252, 2011.

CHAKIR, J. et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. **J Allergy Clin Immunol,** v.111, p.1293–8, 2003.

CHAN, E.Y. et al. Measuring FENO in asthma: coexisting allergic rhinitis and severity of atopy as confounding factors. **Am J Respir Crit Care Med**, v.180, n.3, p. 281, 2009.

CHOI, J. & LEE, G. L. Common pediatric respiratory emergencies. **Emerg Med Clin North Am**, v.30, n.2, p.529-63, 2012.

COOPER, P.J. et al. Asthma in Latin America: a public heath challenge and research opportunity. **Allergy**, v.64, p. 5–17, 2009.

CORDEIRO, D. et al. Utility of nitric oxide for the diagnosis of asthma in an allergy clinic population. **Allergy Asthma Proc**, v. 32, n.2, p. 119–126, 2011.

DALES, R,.et al. The influence of living near roadways on spirometry and exhaled nitric oxide in elementary schoolchildren. **Environ Health Perspect**, v.116, p.1423–1427, 2008.

DAMIANI RM. Et al. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? **Toxicol Mech Methods**, v.22, n.7, p. 533-9, 2012.

DATASUS, 2007. http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/livroidb/2ed/CapituloD.pdf. Acesso em dez/2012.

DE LUIS, D.A. et al. Antioxidant and fat intake in patients with polinic asthma. **Med Clin (Barc),** v. 121, p.653–654, 2003.

DEVEREUX, G. et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. **Am J Clin Nutr**, v.85, p. 853– 859, 2007.

DIAZ SANCHEZ, D. The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. **Allergy,** v. 52 (Suppl 38), p.52–56, 1997.

DREWS, A. C. et al. Uso do escarro induzido na avaliação da inflamação de vias aéreas em pacientes com asma. **Scientia Medica**, v. 16, n. 3, 2006.

DWEIK, R.A. et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. **Am J Respir Crit Care Med**, v.184, p. 602-615, 2011.

DWEIK, R.A. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! **Thorax,** v.60, p.265–7, 2005.

ERKKOLA, M. et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children. **Clin Exp Allergy,** v.39, p.875–882, 2009.

FLOOD-PAGE, P. et al. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v.176, p.1062–1071, 2007.

FREEDMAN, B.I. et al. Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant**, v.15, p.1794–800, 2000.

FREISHTAT, R.J. et al. High prevalence of vitamin D deficiency among inner-city African American youth with asthma in Washington, DC. **J Pediatr**, v.156, p. 948–52, 2010.

GALE, C.R. et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. **Eur J Clin Nutr**, v.62, p. 68–77, 2007.

GALLI, S. J. et al. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annu. Rev. Immunol**, v.23, p.749–786, 2005.

GARCIA-LARSEN V. et al. Atopy, wheeze and bronchial responsiveness in young Chilean adults Do dietary antioxidants matter?. **Allergy,** v.62, p.714–715, 2007.

GEORAS, S.N. et al. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. **Eur Respir J,** v. 26, p.1119–1137, 2005.

GOMEZ, N.N. Overexpression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in rat zinc-deficient lung: involvement of a NF-kappaB dependent pathway. **Nitric Oxide**, v.14, n.1, p.30-38, 2006

GREEN, R.H. et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. **Thorax,** v.57, n.10, p.875–879, 2010.

GRUZIEVA, O et al. Exposure to air pollution from traffic and childhood asthma until 12 years of age. **Epidemiology**, v.24, n.1, p.54-61, 2013.

GUO, C. et al. Role of certain trace minerals in oxidative stress, inflammation, CD4/CD8 lymphocyte ratios and lung function in asthmatic patients. **Ann Clin Biochem**, v.48, n.4, p.344-51, 2011

GUO, F.H. et al. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and posttranslational regulation of NO synthesis. **J Immunol,** v.164, p. 5970–5980, 2000.

GUSTAFSSON, L.E. Exhaled nitric oxide as a marker in asthma. **Eur. Respir. J. Suppl**, v.26, p.49S–52S, 1998.

HALMENSCHLAGER, G. et al. Evaluation of the effects of cigarette smoking on testosterone levels in adult men. **J Sex Med**, v.6, n.6, p.1763-72, 2009.

HAMID, Q. et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. **Lancet**, v.342, p.1510–1513, 1993.

HAMID, Q. Pathogenesis of small airways in asthma. **Respiration**, v.84, n.1, p.4-11, 2012.

HASSELMARK, L. et al. Selenium supplementation in intrinsic asthma. **Allergy,** v,48, p.30–6, 1993.

HERVAS, D. et al. Differences in exhaled nitric oxide in atopic children. **Allergol Immunopathol (Madr)**, v.36, n.6, p. 331–335, 2008.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency in 2010: health benefits of vitamin D and sunlight: a D-bate. **Nat Rev Endocrinol,** v.7, p. 73–5, 2011.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med,** v.357, p.266–281, 2007.

HUANG, S.L. et al. Contribution of endotoxin in macrophage cytokine response to ambient particles in vitro. **J Toxicol Environ Health**, v.65, p.1261–1272, 2002.

HYPPONEN, E. et al. Infant Vitamin D Supplementation and Allergic Conditions in Adulthood: Northern Finland Birth Cohort 1966. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1037, p. 84–95,2004.

INOUE, K. et al. Effects of components derived from diesel exhaust particles on lung physiology related to antigen. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.29, p.403–412, 2007.

ISAAC STEERING COMMITTEE. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. **Lancet**, v.351, p.1225–32, 1998.

JASINSKI, R. et al. Air pollution and pediatric hospital admissions due to respiratory diseases in Cubatão, São Paulo State, Brazil, from 1997 to 2004. **Cad Saude Publica**, v.27, n.11, p.2242-52, 2011.

JEDRYCHOWSKI, W.A. et al. Intrauterine exposure to fine particulate matter as a risk factor for increased susceptibility to acute broncho-pulmonary infections in early childhood. **Int J Hyg Environ Health**, 2013. doi: 10.1016/j.ijheh.2012.12.014.

KAY, A.B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **N. Engl. J.Med**, v.344, p.30–7, 2001.

KELLY, F.J. & FUSSELL, J.C. Air pollution and airway disease. **Clin Exp Allergy**, v.41, n.8, p.1059-71, 2011.

KIM, B.J. et al. Air pollution interacts with past episodes of bronchiolitis in the development of asthma. **Allergy,** 2013. doi: 10.1111/all.12104.

KOBZIK, L. et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, v.9, p.371–7,1993.

KOCYIGIT, A. et al. Alterations in plasma essential trace elements selenium, manganese, zinc, copper, and iron concentrations and the possible role of these elements on oxidative status in patients with childhood asthma. **Biol Trace Elem** Res, v.97, p.31–41, 2004.

KÜNZLI, N. et al. Air quality and health. **Lausanne: European Respiratory Society**, 2010.

LAMBRECHT, B.N. & HAMMAD, H. The role of dendritic and epithelial cells as máster regulators of allergic airway inflammation. **Lancet,** v.376, p.835-43, 2010.

LAMBRECHT, B.N. & HAMMAD, H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. **Immunity**, v. 31, p. 412–424, 2009.

LAMBRECHT, B.N. & HAMMAD, H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. **Annu. Rev. Immunol**, v.30, p. 243–270, 2012.

LANE, C. et al. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. **Thorax,** v.59, p.757–760, 2004.

LECKIE, M. J. et al. Effects of an interleukin□5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response. **Lancet**, v.356, p.2144–2148, 2000.

LIMA, W. L. et al. Asma e fatores associados em adolescentes de 13 e 14 anos em São Luís, Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.28, n.6, p.1046-1056, 2012.

LITONJUA, A.A. et al. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? J **Allergy Clin Immunol**, v.120, n.1031–1035, 2007.

LITONJUA, A.A. Childhood asthma may be a consequence of vitamin D deficiency. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v.9, p.202–207, 2009.

LOYO-BERRÍOS, N.I. et al. Air pollution sources and childhood asthma attacks in Catano, Puerto Rico. **Am J Epidemiol**, v.165, p.927–935, 2007.

MADDOX, L. & SCHWARTZ, D.A. The pathophysiology of asthma. **Annu. Rev. Med**, v.53, p. 477–498, 2002.

MALLOL, J. et al. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis. **Allergol Immunopathol (Madr)**, 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2012.03.001

MCCONNELL, R. et al. Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. **Lancet**. 2002;359:386 –391.

MCKINLEY, L. et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. **J Immunol**, v.181, p.4089–97, 2008.

MELÉN, E. et al. Interactions between glutathione S-transferase P1, tumor necrosis factor, and traffic-related air pollution for development of childhood allergic disease. **Environ Health Perspect, v.**116, p.1077–1084, 2008.

MILL, M. A. The role of dendritic cells in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v.129, n.4, p.889-901, 2012.

MILLER, A. L. The etiologies, pathophysiology, and alternative/complementary treatment of asthma. **Alternative Medicine Review : a Journal of Clinical Therapeutic**, v.6, n.1, p.20-47, 2001.

MIYAKE, Y. et al. Dairy food, calcium and vitamin D intake in pregnancy, and wheeze and eczema in infants. **Eur Respir J**, v. 35, p.1228– 1234, 2010.

MOLLSTEN, A. et al. Glu298Asp and NOS4ab polymorphisms in diabetic nephropathy. **Ann.Med**. v.38, p. 522–8, 2006.

MOORE, W.C. et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. **Am J Respir Crit Care Med,** v.181, p.315–23, 2010.

MORGENSTERN, V. et al. Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. **Am J Respir Crit Care Med**, v.177, p.1331–1337, 2008.

MORGENSTERN, V et al. Respiratory health and individual estimated exposure to traffic-related air pollutants in a cohort of young children. **Occup Environ Med**, v.64, p.8–16, 2007.

MURATA, A. et al. Environmental influence on the measurement of exhaled nitric oxide concentration in school children: special reference to methodology. J **Nippon Med Sch**, v.74, p.30– 36, 2007.

NATHAN, C. & XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell,** v. 78, p.915–8, 1994.

NETO, H. J. C. et al. Asthma and Rhinitis in South America: How Different They are From Other Parts of the World. **Allergy Asthma Immunol Res**, v.4, n.2, p.62-67, 2012.

NIIMI, A. et al. Serum eosinophil cationic protein as a marker of eosinophilic inflammation in asthma. **Clin Exp Allergy,** v.28, p.233, 1998.

NORDLING, E. et al. Traffic-related air pollution and childhood respiratory symptoms, function and allergies. **Epidemiology,** v.19, p.401–408, 2008.

NORTON, R.L. HOFFMANN, P.R. Selenium and asthma. **Mol Aspects Med**, v.33, p.98–106, 2012.

NURMATOV U., et al. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: Systematic review and meta-analysis. **J Allergy Clin Immunol**, v.127, n.3, p.724-33.e1-30, 2011.

NWARU, B.I. et al. Maternal diet during pregnancy and allergic sensitization in the offspring by 5 yrs of age: a prospective cohort study. **Pediatr Allergy Immunol,** v.21, p.29–37, 2010.

OMS, World Health Statistics. Geneva, World Health Organization, 2008. (http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/index.html)

PALMER, R.M. et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature,** v. 327, p.524–6, 1987.

PATELAROU, E. et al. Association between biomarkerquantified antioxidant status during pregnancy and infancy and allergic disease during early childhood: a systematic review. **Nutr Rev**, v.69, p.627–641, 2011

PAWANKAR R, et al. Allergic diseases and asthma: a major global health concern. **Curr Opin Allergy Clin Immunol,** v.12, n.1, p.39-41, 2012.

PEARCE, N. et al. How much asthma is really attributable to atopy? **Thorax**, v.54, n.3, p.268–272, 1999.

PICADO, C. et al. Dietary micronutrients/antioxidants and their relationship with bronchial asthma severity. **Allergy**, v.56, p.43–9, 2001.

PIZZICHINI, E. et al. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. **Eur Respir J**. v.9, p.1174-80, 1996.

PORTER, M. et al. Diesel-enriched particulate matter functionally activates human dendritic cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.37, p.706–719, 2007.

PRASAD, A.S. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. **J Infect Dis**, v. 82, p.S62–S68, 2000.

QUJEQ, D. et al. Glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in intrinsic asthmatic patients. **Clin Chem Lab Med**, v.41, p.200-202 2003.

ROMIEU, I. et al. GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone. **Eur Respir J**, v.28, p.953–959, 2006

ROUHOS, A. et al. Atopic sensitization to common allergens without symptoms or signs of airway disorders does not increase exhaled nitric oxide. **Clin Respir J,** v.2, n.3, p.141–148, 2008.

RUBIN R, et al. Relationship of serum antioxidants to asthma prevalence in youth. **Am J Respir Crit Care Med**, v.169, n.393–8, 2004.

SALAM, M.T. et al. Transforming growth factor-1 C-509T polymorphism, oxidant stress, and early-onset childhood asthma. **Am J Respir Crit Care Med,** v.176, p.1192–1199, 2007b.

SALAM, M.T. et al. Microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase P1, traffic and childhood asthma. **Thorax**, v.62, p.1050– 1057, 2007a.

SAMOLI, E. et al. Acute effects of air pollution on pediatric asthma exacerbation: evidence of association and effect modification. **Environ Res**, v.111, n.3, p.418-24, 2011.

SAMUELSEN, M. et al. Allergy adjuvant effect of particles from wood smoke and road traffic. **Toxicology,** v.246, p.124–131, 2008.

SCHULTZ, E.S. et al. Traffic-related Air Pollution and Lung Function in Children at 8 Years of Age: A Birth Cohort Study. **Am J Respir Crit Care Med**, v.186, n.12, p.1286-91, 2012.

SCHWALFENBERG, GK. A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. **Mol Nutr Food Res**, v.55, p.96–108, 2011.

SCOTT, M. et al. Influence of atopy and asthma on exhaled nitric oxide in an unselected birth cohort study. **Thorax,** v.65, n.3, p. 258–262, 2010.

SEARING, D.A. et al. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, p.995–1000, 2010.

SEATON, A. Godden DJ, Brown K. Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population? **Thorax** 1994, v.49, p.171–174, 1994.

SHAHEEN, S. et al. Dietary antioxidants and asthma in adults. Population-based case-control study. **Am J Respir Crit Care Med**, v.164, p.1823–8, 2001.

SOLÉ, D. et al - International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): Prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. **J Invest Allergol Clin Immunol** v.11, p.123-8, 2001.

SOLÉ, D. et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Phase 3. **J Pediatr**, v.82, p.341-6, 2006.

SONT, J.K. et al. Relationship between the inflammatory infiltrate in bronchial biopsy specimens and clinical severity of asthma in patients treated with inhaled steroids. **Thorax**. V.51, n.5, p. 496–502, 1996.

SOUKUP, J.M. & BECKER S. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.171, p.20 –26, 2001.

SOUTAR, A. et al. Bronchial reactivity and dietary antioxidants. **Thorax,** v.52, p.166–170, 1997.

STEPHAN, V. et al. Determination of N-methylhistamine in urine as an indicator of histamine release in immediate allergic reactions. **J Allergy Clin Immunol**, v.86, n.6 Pt1, p.862–868, 1990.

STOCKINGER, B. & VELDHOEN, M. Differentiation and function of Th17 T cells. Curr. **Opin. Immunol**, v.19, p.281–286, 2007.

SUNG, S.S. et al. A major lung CD103 (αE)-β7 integrin–positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. **J. Immunol**, v.176, p.2161–2172, 2006.

SVENDSEN, E.R. et al. Circulating neutrophil CD14 expression and the inverse association of ambient particulate matter on lung function in asthmatic children. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.99, p.244– 253, 2007.

TAKEI, S. et al.. Urinary N-methylhistamine in asthmatic children receiving azelastine hydrochloride. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.78, n.5, p.492–496, 1997.

TANG, J. et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. **J Immunol**, v.182, p.4624–32, 2009.

THOMSON C D, et al. Selenium status and allergic disease in a cohort of New Zealand children. **Clinical & Experimental Allergy**, v.42, p. 560–567, 2012.

TRUONG-TRAN, A.Q. et al. Altered zinc homeostasis and caspase-3 activity in murine allergic airway inflammation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.27, p.286-296, 2002.

WADSWORTH, S. J. et al. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. **Journal of Asthma and Allergy,** v. 4, p.77–86, 2011.

WEAVER, C. T. et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, v.24, p.677–688, 2006.

WHITE, J.H. Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.121, p.234–238, 2010.

WJST, M. The vitamin D slant on allergy. **Pediatric Allergy and Immunology,** v.17, p.477–83, 2006.

WHO. Air quality guidelines. Global update 2005. Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Copenhagen: World Health Organization; 2005

XIAO, C. et al. Defective epithelial barrier function in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol**, v.128, p.549–556.e1–12, 2011.

ZACHARASIEWICZ, A. Fractional exhaled nitric oxide and induced sputum. **Paediatric Respiratory Reviews**, v.8, p.94–96, 2007.

ZALEWSKI, P.D. Zinc metabolism in the airway: basic mechanisms and drug targets. **Curr Opin Pharmacol**, v.6, p.237–243, 2006.

ZANCHI, A.C. et al. Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. **Inhal Toxicol,** v.22, n.11, p.910-8, 2010.

5. Artigo Científico

Será submetido à revista PEDIATRIC PULMONOLOGY (Fator de Impacto: 2,533 – JCR -2011)

Trace elements concentration in nails and association with airway inflammation in adolescents.

MB MORESCO, MSc,[1*] AS FLECK, BSc,[1] MF CARNEIRO, MSc,[2] F BARBOSA JR, MSc, PhD,[2] SL AMANTEA, MD, PhD,[1] CR RHODEN, MSc, PhD[1]

[1]Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

[2]Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

*Correspondence to: MB MORESCO, MD. Address: Av. Sarmento Leite, 245, Centro, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +5551 3303-8800. E-mail: morescomb@gmail.com.br.

FINANTIAL SUPORT: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) and Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil).

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that they have no conflicting interests.

Trace elements and airway inflammation.

SUMMARY

Background: Asthma is a multifactorial disease and its severity varies with the inflammatory status of the patient. It has been hypothesized that deficiency of trace elements has an important role in the etiology of asthma. The aim of the study was to evaluate the concentration of trace elements in nails of adolescents with different degrees of airway inflammation. Methods: We assessed the prevalence of active and severe asthma in adolescents (n = 106) through the ISAAC questionnaire. Subjects were allocated into two different groups according to the value of fraction exhaled nitric oxide (Fe_{NO}) measured. Also, nail specimens were collected in order to determine the concentration of accumulated trace elements (Cu, Zn, Mn, Se) by ICP-MS. Results: Exhaled NO was increased in male subjects. We found association between active asthma and elevated exhaled NO. There was no significant difference in Cu (4.40 vs. 4.52), Zn (84.66 vs. 79.48), Mn (0.59 vs. 0.76) and Se (0.18 vs. 0.19) concentrations (μg/g) among distinct Fe_{NO} groups as well as was not observed correlation between exhaled NO levels and any element. Conclusion: Deficiency of trace elements in nails were not associated with increased Fe_{NO}.

Keywords: trace elements; exhaled nitric oxide; asthma; airway inflammation.

INTRODUCTION

Airway chronic inflammation is a hallmark of asthma whose severity ranges proportionately to inflammatory status which is triggered by oxidative stress.[1,2] It has been hypothesized that essential elements may play an important role in asthma genesis since they take part into oxidative stress reactions as cofactors of antioxidant enzymes.[3-5]

The measurement of inflammatory biomarkers is useful in clinical practice since it helps to phenotype asthmatic patients and consequently manages the therapeutic practice. According to the American Thoracic Society (ATS) guideline[6], fraction exhaled nitric oxide (Fe_{NO}) is a simple, noninvasive and promising biomarker for the diagnosis of eosinophilic airway inflammation, disease follow-up and as a guide to steroid therapy in adults and children with asthma. For example, positive correlation was found between Fe_{NO} levels and the percentage of eosinophilia, predicted of forced vital capacity and total serum IgE levels in asthmatic patients.[7,8] Although there are evidence on the association between asthma and Fe_{NO}[9] and asthma and trace minerals level,[10-12] the relationship between Fe_{NO} and the level of trace elements has not been investigated in patients with active airway inflammation. In addition, the use of biological matrices with noninvasive and easy collection such nails for the trace elements determination is an advantage when considering children.[13] The aim of the present study was to investigate whether the levels of Fe_{NO} are associated with concentrations of copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn) and selenium (Se) in nails of a young population.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

Capivari do Sul is a city of Rio Grande do Sul state, Brazil. The total population is about 3,890 inhabitants[14] distributed over an area of 412 km^2. Students from two public schools were invited to participate in this study. Inclusion criteria were age between 11-17 years and delivery of informed consent by both parents and adolescents. Exclusion criteria were composed by diseases such as heart disease, neuropathy, immunodeficiency or chronic lung disease; use of any anti-inflammatory drugs in the last two weeks and active smoking. The study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Methods

In November 2011, adolescents who agreed to participate were invited to answer the core questionnaire for wheezing and asthma International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) validated and translated into Portuguese.[15] Based on previous studies,[16,17] adolescents who experienced wheezing in the last 12 months were presumed to have current asthma. Those who had experienced presence of strong wheezing restricting speech at the same period were presumed to have severe asthma. Further, questions about socioedemographic characteristics and smoking habits (active and passive) were also applied.

Fe_{NO} measurement

Immediately after applying the questionnaire, Fe_{NO} was measured using a NIOX MINO® device (Aerocrine, Solna, Sweden). Fe_{NO} measures were performed according to ATS/European Respiratory Society recommendations by a trained group.[18] The measurements were performed at an expiratory flow rate of 50 mL/sec. Duration of exhalation was at least 6 sec to ensure a stable NO level and one recorded Fe_{NO} measurement was obtained for each subject.[19] The NO measure was done between 9 and 12 AM.

Adolescents were allocated into two different groups according to the value of Fe_{NO} measured. The cut-point was set at 25 ppb. Fe_{NO} beneath this cut-point implies absence or noneosinophilic airway inflammation according to ATS guideline.[6]

Trace Elements - Reagents and Instrumentation

All reagents were of analytical reagent grade except HNO_3, which was previously purified in a quartz sub-boiling still (Kürner). Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and L-cysteine were purchased from Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA), and multi-element stock solutions of each element were obtained from Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA). Laminar flow hood capable of producing class 100 were used for preparing solutions. High purity deionized water (resistivity 18.2 MΩ cm) obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout. Plastic bottles and

glassware were cleaned by soaking in 10% (v/v) HNO_3 for 24 h, rinsed five times with Milli-Q water and dried in a class 100 laminar flow hood before use.

All measurements were made with an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS; Elan DRC II PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) with high-purity argon (99.999%, White Martins, Brazil). A Meinhard concentric nebulizer (Spectron/Glass Expansion, Ventura, CA, USA) connected to a cyclonic spray chamber was used. A radiofrequency with 1,100 W power was selected in pulse mode with autolens one. Sample data were acquired by using 20 sweeps/reading, 1 reading/replicate, and a dwell time of 50 ms. The argon nebulizer gas flow rate was optimized daily from 0.5 to 0.9 $Lmin^{-1}$.

Trace Elements - Nail analyses

Students were requested previously to not cut their nails to obtain sufficient matrix. Right hand nails were clipped with a stainless steel cutting instrument and preserved in metal-free plastic tubes at room temperature.

Prior to analysis, samples were submitted to a washing procedure as described by Hunter et al.[20] Afterwards, nails were weighed (10–20 mg) and incubated into 15 mL conical tubes with 1 mL of 25% (w/v) TMAH at room temperature overnight. Following this, the volume was made up to 10 mL with a solution containing 1% v/v HNO_3. Trace element levels Trace element levels (Cu, Zn, Mn, Se) were determined by ICP-MS according to the validated method proposed by Batista et al.[21]

Trace Elements - Quality Control of the Results

Quality control of trace elements determination in nails was ensured by analyzing a hair reference material provided by the Institut National de Santé Publique du Québec, Canada (INSP-external quality assessment scheme - EQAS ICP03H-09). Obtained values were always in good agreement with the target values.

Statistical Analyses

Age and elements concentration were analyzed as continuous variables; gender, sociodemographic characteristics, smoking habit and presence of asthma as categorical variables. Student t test was performed to evaluate statistical differences between inflammatory groups considering normally distributed data. On the other hand, when data presented non-normal distribution, Mann-Whitney *U*-test was utilized. Spearman coefficients were calculated to investigate correlations between Fe_{NO} and mineral concentrations.

Moreover, Chi-Square test was employed to analyze the association between asthma, gender, smoking habit and sociodemographic characteristics with inflammatory degree. A minimum sample size of 103 adolescents was estimated with 95% confidence level. Results were defined as statistically significant for a value of $P \leq 0.050$. Analyses were performed using SPSS® 17 Statistics software (IBM; Armonk, NY, USA).

RESULTS

In total, 106 subjects were enrolled the study. The mean age was 14.52 ± 1.18 and 42.1% were male. ISAAC questionnaire analysis demonstrated that 20.6% and 3.7% of the adolescents had current and severe asthma, respectively. Low family income of up to two minimum wages was reported by 55.2%. Also 44.1% of the mothers had primary school, 32.4% had high school and 23.5% college. None of the students reported active smoking, although 38.1% were exposed to passive smoking.

Regarding the cut-point to set active inflammation of the airways, participants were dichotomized into two groups. Among adolescents, 20.6% (n=22) presented Fe_{NO} above the cut-point of 25 ppb. No significant association was observed for age, socioeconomical status, maternal education level, passive smoke and NO levels (table 1). Positive association was observed between male gender and Fe_{NO} (p=0.024). Association was also found between the Fe_{NO} and current asthma (p=0.043), although the same was not observed for severe asthma (p=0.831; table 1).

There was no significant difference in Cu (4.40 vs. 4.52), Zn (84.66 vs. 79.48), Mn (0.59 vs. 0.76) and Se (0.18 vs. 0.19) concentrations (µg/g) among distinct Fe_{NO} groups (table 2) as well as it was not observed correlation between Fe_{NO} levels and trace element concentrations (figure 1).

DISCUSSION

In our cross-sectional study, differences in the concentrations of trace elements based on the assessment of the inflammatory status of the airways were not observed. This corroborates the study of Bakkeheim et al.[22] that did not find differences in serum Se concentrations between asthmatic and healthy patients. Additionally, they considered a sub-analysis among asthmatic patients from the status of airway inflammation, the results remained unchanged even with a cut-point of Fe_{NO} lower than recommended by ATS and lower than we used. Besides, some cross-sectional studies found no association between the balance of trace elements and asthma incidence. In the prospective analysis of van Oeffelen et al.,[23] no associations between serum Se and Zn concentrations and childhood asthma were demonstrated. Similarly, New Zealand researchers[24] followed neonates during 1997-2001 and found no significant association between plasma Se levels in children and increased incidence of asthma evaluated by the ISAAC questionnaire.

Although we found no association between increased Fe_{NO} levels and trace elements concentration, other studies have shown relationship between asthma and trace elements imbalance. In the recent study of Razi et al.,[25] hair Zn and Se levels were lower in children with recurrent wheeze than health children and negatively correlated with wheezing episodes in the last 6 months. Carneiro et al.[12] investigated asthma in relation to the concentration of Zn and Se in nails of 165 adolescents. Adolescents included in the highest quartile of Se and Zn decreased by 5 times the asthma prevalence ratio, while

adolescents in the range of low Se concentration increased by almost 2.5 times the asthma prevalence ratio.

The variability observed between studies may be explained by some differences in the population in study and/or methodology of determination of the chemical elements. Moreover the sample number has to be considered. In addition, although the association between airway inflammation and asthma is well established, these variables should not be used as synonymous. We believe that for the aim proposed, the determination of exhaled NO provides more reliable and less subjective information than questionnaires.

When analyzing the probability of correlation between Fe_{NO} levels and elements concentration, interdependent behavior was not observed (figure 1). Apparently, airway inflammation does not seem to accompany accumulated elements levels in nails, although few studies have been performed.

We evaluated the prevalence of current and severe asthma through the ISAAC questionnaire. Current asthma was associated with increased Fe_{NO} (table 1). Therefore, 25 ppb cut-point was appropriated to identify asthmatics in this population.

Recent studies suggest that NO levels may be influenced by independent factors other than eosinophilic inflammation, e.g., age,[26] gender,[27] smoking habit[28] and air pollution.[29] In our study, only gender exhibited association with NO levels (table 1). Fe_{NO} levels in males was higher than in females (PR 2.4; 95% CI: 1.2-5.2, P=0.024), corroborating the findings of several studies.[27,30-32] This difference among genders was not able to be explained by genetic studies involving NO synthase gene polymorphisms.[33,34] Therefore, hormonal differences might be involved. For instance, it has been postulated that

testosterone is capable to augment NO synthesis[35-37] whereas estrogen inhibits its formation[38]. In addition, it has been hypothesized that anatomic differences such as those in airway surface area considering gender may contribute to variations in NO levels.[39]

In our study, the results of measuring elements in nail clippings were satisfactory. Element levels in nails were approximated to values measured in nails of Brazilian adolescents[13]. Nail clipping is a noninvasive matrix that has been used in epidemiological studies due to capacity to reflect longer exposure time windows.[12,40-42] Also, the analysis of nail specimens becomes advantageous in comparison to blood by simplicity related to sampling and storage.[42]

Although interesting, analysis of cause and effect was not possible to be performed between variables. Distinct from longitudinal studies, cross-sectional design is more appropriate for screening hypotheses.

In our knowledge, this is the first study to investigate the association between airways inflammatory status (Fe_{NO}) and trace elements in nails of adolescents. Levels of Cu, Zn, Mn and Se in nails were neither associated with increased Fe_{NO} nor with asthma whereas Fe_{NO} levels were significantly associated with asthma. More studies should be developed using blood or serum to better evaluate the role of trace elements in active asthma.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the contributions of the laboratory staff: Graziele Halmenschlager, Marlise Di Domenico, Karen Breitenbach, Maik Morais and Carlos Vicente da Silva. We thank Msc SK Kato for statistical consultation.

REFERENCES

1. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. Annu Rev Med 2002;53:477–498.
2. Riccioni G, D'Orazio N. The role of selenium, zinc and antioxidant vitamin supplementation in the treatment of bronchial asthma: adjuvant therapy or not? Expert Opin Investig Drugs 2005;14:1145-1155.
3. Kocyigit A, Armutcu F, Gurel A, Ermis B. Alterations in plasma essential trace elements selenium, manganese, zinc, copper, and iron concentrations and the possible role of these elements on oxidative status in patients with childhood asthma. Biol Trace Elem Res 2004;97:31-41.
4. 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;127:724-733.
5. Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. J Nutr 2003;133:1448S-1451S.
6. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, Olin AC, Plummer AL, Taylor DR. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. Am J Respir Crit Care Med 2011;184:602-615.
7. Banovcin P, Jesenak M, Michnova Z, Babusikova E, Nosal S, Mikler J, Fabry J, Barreto M. Factors attributable to the level of exhaled nitric oxide in asthmatic children. Eur J Med Res 2009;14:9–13.

8. Cordeiro D, Rudolphus A, Snoey E, Braunstahl GJ. Utility of nitric oxide for the diagnosis of asthma in an allergy clinic population. Allergy Asthma Proc 2011;32:119–126.
9. Rouhos A, Kainu A, Karjalainen J, Lindqvist A, Piirilä P, Sarna S, Haahtela T, Sovijärvi AR. Atopic sensitization to common allergens without symptoms or signs of airway disorders does not increase exhaled nitric oxide. Clin Respir J 2008;2:141–148.
10. Tahan F, Karakukcu C. Zinc status in infantile wheezing. Pediatr Pulmonol 2006;41:630-634.
11. Guo CH, Liu PJ, Hsia S, Chuang CJ, Chen PC. Role of certain trace minerals in oxidative stress, inflammation, CD4/CD8 lymphocyte ratios and lung function in asthmatic patients. Ann Clin Biochem 2011;48:344-351.
12. Carneiro MF, Rhoden CR, Amantéa SL, Barbosa F Jr. Low concentrations of selenium and zinc in nails are associated with childhood asthma. Biol Trace Elem Res 2011;144:244-252.
13. Carneiro MF, Grotto D, Batista BL, Rhoden CR, Barbosa F Jr. Background values for essential and toxic elements in children's nails and correlation with hair levels. Biol Trace Elem Res 2011;144:339-350.
14. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Available at:http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1.
15. Solé D, Vanna AT, Yamada E, Rizzo MCV, Naspitz CK. International Study on Asthma and Allergies in Children (ISAAC) written questionnaire: validation of the asthma component among Brazilian children. Invest Allergol Clin Immunol 1998;8:376-382.

16. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)—phase 3. J Pediatr 2006;82:341–346.
17. ISAAC Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. Lancet 1998;351:1225–1232.
18. American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:912-930.
19. Kapande KM, McConaghy LA, Douglas I, McKenna S, Hughes JL, McCance DR, Ennis M, Shields MD. Comparative repeatability of two handheld fractional exhaled nitric oxide monitors. Pediatr Pulmonol 2012;47:546-550.
20. Hunter DJ, Morris JS, Chute CG, Kushner E, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC. Predictors of selenium concentration in human toenails. Am J Epidemiol 1990;132:114–122.
21. Batista BL, Rodrigues JL, Nunes JA, Tormen L, Curtius AJ, Barbosa F. Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: comparison with ETAAS. Talanta 2008;76:575–579.

22. Bakkeheim E, Mowinckel P, Carlsen KH, Burney P, Carlsen KC. Altered oxidative state in schoolchildren with asthma and allergic rhinitis. Pediatr Allergy Immunol 2011;22:178-185.
23. van Oeffelen AA, Bekkers MB, Smit HA, Kerkhof M, Koppelman GH, Haveman-Nies A, van der A DL, Jansen EH, Wijga AH. Serum micronutrient concentrations and childhood asthma: the PIAMA birth cohort study. Pediatr Allergy Immunol. 2011 Dec;22(8):784-93.
24. Thomson CD, Wickens K, Miller J, Ingham T, Lampshire P, Epton MJ, Town GI, Pattemore P, Crane J. Selenium status and allergic disease in a cohort of New Zealand children. 2012. Clin Exp Allergy. 2012 Apr;42(4):560-7.
25. Razi CH, Akelma AZ, Akin O, Kocak M, Ozdemir O, Celik A, Kislal FM. Hair zinc and selenium levels in children with recurrent wheezing. Pediatr Pulmonol 2012;47:1185-1191.
26. Kovesi T, Kulka R, Dales R. Exhaled nitric oxide concentration is affected by age, height, and race in healthy 9-to 12-year-old children. Chest 2008;133:169-175.
27. Janahi I, Saadoon A, Tuffaha A, Panneerselvam B. Effects of age, gender, and environmental exposures on exhaled nitric oxide level in healthy 12 to 18 years Qatari children. Ann Thorac Med 2012;7:98-103.
28. Nadif R, Matran R, Maccario J, Bechet M, Le Moual N, Scheinmann P, Bousquet J, Kauffmann F, Pin I. Passive and active smoking and exhaled nitric oxide levels according to asthma and atopy in adults. Ann Allergy Asthma Immunol 2010;104:385-393.

29. Antó JM. Recent advances in the epidemiologic investigation of risk factors for asthma: a review of the 2011 literature. Curr Allergy Asthma Rep 2012;12:192-200.
30. Linn WS, Rappaport EB, Berhane KT, Bastain TM, Avol EL, Gilliland FD. Exhaled nitric oxide in a population based study of southern California schoolchildren. Respir Res 2009; 10:28.
31. Wong GW, Liu EK, Leung TF, Yung E, Ko FW, Hui DS, Fok TF, Lai CK. High levels and gender difference of exhaled nitric oxide in Chinese schoolchildren. Clin Exp Allergy 2005;35:889-893.
32. Kim SH, Kim TH, Sohn JW, Yoon HJ, Shin DH, Park SS. Reference values and determinants of exhaled nitric oxide in healthy Korean adults. J Asthma 2010;47:563-567.
33. Grasemann H, Storm van's Gravesande K, Buscher R, Drazen JM, Ratjen F. Effects of sex and of gene variants in constitutive nitric oxide synthases on exhaled nitric oxide. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:1113-1116.
34. Leung TF, Liu EK, Li CY, Chan IH, Yung E, Lam CW, Wong GW. Lack of association between NOS2 pentanucleotide repeat polymorphism and asthma phenotypes or exhaled nitric oxide concentration. Pediatr Pulmonol 2006;41:649-655.
35. Thomas LN, Morehouse TJ, Too CK. Testosterone and prolactin increase carboxypeptidase-D and nitric oxide levels to promote survival of prostate cancer cells. Prostate 2011;72:452-455.

36. Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS. Testosterone induced modulation of nitric oxide cGMP signaling pathway and androgenesis in the rat Leydig cells. Biol Reprod 2010;83:434-442.
37. Goglia L, Tosi V, Sanchez AM, Flamini MI, Fu XD, Zullino S, Genazzani AR, Simoncini T. Endothelial regulation of eNOS, PAI-1 and t-PA by testosterone and dihydrotestosterone in vitro and in vivo. Mol Hum Reprod 2010;16:761-769.
38. Palmieri D, Perego P, Palombo D. Estrogen Receptor Activation Protects Against TNF-α-Induced Endothelial Dysfunction. Angiology 2013. [Epub ahead of print] doi: 10.1177/0003319713477909.
39. Olivieri M, Talamini G, Corradi M, Perbellini L, Mutti A, Tantucci C, Malerba M. Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. Respir Res 2006;7:94.
40. Slotnick MJ, Nriagu JO. Validity of human nails as a biomarker of arsenic and selenium exposure: A review. Environ Res 2006;102:125-139.
41. He K. Trace elements in nails as biomarkers in clinical research. Eur J Clin Invest 2011;41:98-102.
42. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Physiol Rev 1993;73:79–118.

TABLES

Table 1. Sociodemographic characteristics and asthma prevalence of subjects allocated into different groups of inflammatory status.

Variables	Fe_{NO} <25ppb (n=84)	Fe_{NO} >25ppb (n=22)	P-value
Mean age ± SD (years)[a]	14.54 ± 1.18	14.45 ± 1.22	0.760
Gender (%)[b]			**0.024**
Male	36.5	63.6	
Female	63.5	36.4	
Maternal education level (%)[b]			0.162
Primary School (or less)	46.3	35.0	
Secondary education	34.1	25.0	
College	19.5	40.0	
Socioeconomic status (%)[b]			0.279
Up to 2 minimum wages	58.6	41.2	
More than 2 minimum wages	41.4	58.8	
Passive smoke (%)[b]	27.3	41.0	0.240
Current asthma (%)[b]	16.5	36.4	**0.043**
Severe asthma (%)[b]	3.5	4.5	0.831

[a] Student t-test.

[b] Chi-square test.

P-value significance <0.05.

Table 2. Trace elements concentration (μg/g) in nails of different groups of inflammatory status.

Elements	Fe_{NO} <25ppb (n=84)	Fe_{NO} >25ppb (n=22)	P-value
Cu	4.52 (1.96–9.31)	4.40 (1.04–6.12)	0.529
Zn	79.48 (38.82–113.07)	84.66 (56.97–122.35)	0.603
Mn	0.76 (0.09–1.43)	0.59 (0.169–1.31)	0.603
Se	0.19 (0.11–0.31)	0.18 (0.12–0.28)	0.744

Median comparison not statistically significant between different groups.

Mann-Whitney *U* test, P-value significance <0.05.

Data are expressed as median (percentile 25 – percentile 75).

FIGURE

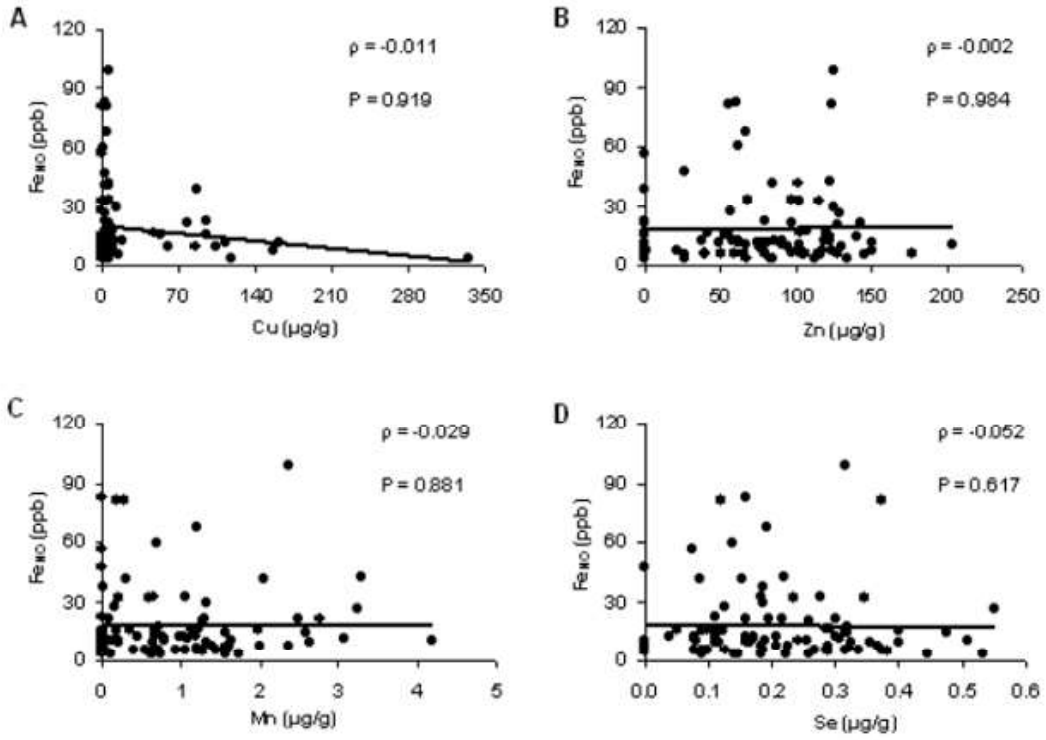
A
ρ = -0.011
P = 0.919
Feno (ppb)
Cu (µg/g)
B
ρ = -0.002
P = 0.984
Feno (ppb)
Zn (µg/g)
C
ρ = -0.029
P = 0.881
Feno (ppb)
Mn (µg/g)
D
ρ = -0.052
P = 0.617
Feno (ppb)
Se (µg/g)

FIGURE LEGEND

Figure 1. Correlation between Fe_{NO} and trace elements: (A) Cu, (B) Zn, (C) Mn and (D) Se. ρ = Spearman correlation. P-value significance <0.05.

6. Conclusão

A inflamação crônica é característica de muitas doenças respiratórias, principalmente asma. O processo inflamatório gerado é responsável pela formação de radicais livres, os quais são causadores do desequilíbrio oxidativo encontrado em pacientes asmáticos.

A deficiência de elementos essenciais parece ter um papel importante no surgimento e manutenção da inflamação. Ao analisarmos a concentração dos elementos Cu, Zn, Se, Mn nas unhas de adolescentes, não observamos diferença na concentração desses elementos entre os adolescentes com perfil inflamatório elevado em relação aos demais. Desse modo, sugerimos que mais estudos devam ser conduzidos a fim de esclarecer a relação entre a disponibilidade de elementos essenciais no organismo e a condição inflamatória das vias aéreas na população.

7. Anexos

7.1 Normas da revista Pediatric Pulmonology.

Preparation of Manuscripts.

Standard, double-spaced manuscript format is requested.

Title page. The title should be brief(no more than 100 characters in length including spaces) and useful for indexing. All authors' names with highest academic degree, affiliation of each, but no position or rank, should be listed. For cooperative studies, the institution where research was primarily done should be indicated. In a separate paragraph, specify grants, other financial support received, and the granting institutions. If support from manufacturers of products used is listed, assurances about the absence of bias by the sponsor and principal author must be given. Identify meeting, if any, at which the paper was presented. The name, complete mailing address,Telephone number, Fax number, and E- mail address of the person to whom correspondence and requests for reprints are to be sent must be included.

Abbreviated title. For usage as a running head, provide the essence of the title (maximum 50 characters) on the bottom of the Title page.

Summary. In accordance with the structure of the article, with or without separate headings, outline the objectives, working hypothesis, study design, patient-subject selection, methodology, results (including numerical findings) and conclusions. The Summary should not exceed one double-spaced page. If abbreviations are used several

times, spell out the words followed by the abbreviations in parentheses. Other than English, language summaries are not required.

Keywords. Supply a minimum of 3 to 5 keywords, exclusive of words in the title of the manuscript. A guide to medical subject heading terms used by PubMed is available at http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html

Abbreviations. Define abbreviations when they first occur in the manuscript and from there on use only the abbreviation. Whenever standardized abbreviations are available use those. Use standard symbols with subscripts and superscripts in their proper place.

Drug names. Use generic names. If identification of a brand name is required, insert it in parentheses together with the manufacturer's name and address after the first mention of the generic name.

Text. Start text on a new page and number all pages (including Tables and Legends) consecutively. Divide article into: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion, starting each part on a new page. All methodology and description of experimental subjects should be under Materials and Methods; results should not be included in the Introduction.

Acknowledgments. Technical assistance, advice, referral of patients, etc. may be briefly acknowledged at the end of the text.

References.

References should be prepared according to CBE style. Refer to the CBE Style Manual, 6th edition (Cambridge University Press). Start the listing on a new page, double-spaced throughout. Number the references in the sequence in which they first appear in the text, listing each only once even though it may be cited repeatedly. Journals' names should be shown by their abbreviated title in Index Medicus .

Manuscripts in preparation or submitted for publication are not acceptable references. If a manuscript "in press" is used as a reference, a copy of it must be provided at the time of submission of the manuscript.

Sample references:

Standard journal article

Landau IL, Morgan W, McCoy KS, Taussig LM. Gender related differences in airway tone in children. Pediatr Pulmonol 1993;16:31-35. (Include names of all authors, and first and last page numbers with all digits.)

Book with authors

Voet D, Voet JG. 1990. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons. 1223 p.

Book with editors

Coutinho A, Kazatch Kine MD, editors. Autoimmunity physiology and disease. New York. Wiley-Liss; 1994. 459 p.

Chapter in a Book

Hausdorf G. Late effects of anthracycline therapy in childhood: evaluation and current therapy. In: Bricker JT, Green DM, D'Angio GJ, editors. Cardiac toxicology after treatment for childhood cancer. New York: Wiley-Liss; 1993. p 73-86.

For a book reference include the page numbers that have direct bearing on the work described.

Tables. Number tables with Arabic numbers consecutively and in order of appearance. Type each table double-spaced on a separate page, captions typed above the tabular material. Symbols for units should be used only in column headings. Do not use internal horizontal or vertical lines; place horizontal lines between table caption and column heading, under column headings, and at the bottom of the table (above the footnotes if any). Use footnote letters (a, b, c, etc.) in consistent order in each table. All tables should be referred to in the text. Do not submit tables as photographs and do not separate legends from tables.

Illustrations. Illustration files must be in TIFF or EPS (with preview) formats . Number illustrations with Arabic numbers and refer to each figure in the text. The preferred form is 5 X 7 inches (12.5 X 17.5 cm). Print reproduction requires files for full color images to be in a CMYK color space. See author charges below.

Journal quality reproduction will require grey scale and color files at resolutions yielding approximately 300 ppi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions yielding 600-1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Lettering on illustrations should be of a size and weight appropriate to the content and the clarity of printing must allow for legibility after reduction to final size. Labeling and arrows on illustrations must be done professionally. Spelling, abbreviations, and symbols should precisely correspond to those used in the text. Indicate the stain and magnification of each photomicrograph. Photographs of recognizable subjects must be

accompanied by signed consent of the subject of publication. Illustrations previously published must be accompanied by the author's and publisher's permission.

Figure Legends for the illustrations should be brief, and included on a separate page under the heading: "Figure Legends." When borrowed material is used, the source of the illustration should be shown in parentheses after its legend, either by a reference number or in full if not listed under References.

Informed consent statements, if applicable, should be included in the Methods section.

7.2 Carta de aprovação do CEP.

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Monitoramento de poluentes atmosféricos de ambiente rural: potencial área de risco

Pesquisador Responsável Claudia Ramos Rhoden **Parecer** 1408/11

Data da Versão 14/03/2011 | Cadastro 751/11 | Data do Parecer 21/07/2011

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto
Avaliar a qualidade do ar e identificar as fontes poluidoras na cidade de Capivari do Sul, correlacionando com a resposta inflamatória pulmonar de indivíduos residentes.

Sumário do Projeto
Os fatores relacionados à inesperada prevalência de asma em jovens no município de Capivari do Sul são desconhecidos. Será realizada a medição de poluentes e o monitoramento da poluição ambiental através de bioensaios na localidade, bem como será medida a concentração de óxido nítrico exalada pelos jovens da área rural do município.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Comentário

Comentários sobre os itens de Identificação

Os alunos de Escolas do município de Capivari do Sul, previamente identificados em estudo anterior, serão novamente convidados a participar do estudo. Foi apresentada autorização da direção das escolas para acesso as suas dependências e contato com os mesmos.

Introdução	Adequada

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Ausente
Tamanho de amostra	Total 82 Local 82
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Menores de 18 anos
Seleção eqüitativa dos indivíduos participantes	Ausente
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/05/2011

Página 1-2

Data de término prevista	31/12/2012
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto está adequado nos seus aspectos metodológicos e éticos.