



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**  
**CURSO BIOMEDICINA**

**DANIELLE NASCIMENTO RIBEIRO DE JESUS**

**PAPEL DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NA ASMA EM**  
**CRIANÇAS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**SALVADOR – BA**

**2022**

**DANIELLE NASCIMENTO RIBEIRO DE JESUS**

**PAPEL DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NA ASMA EM  
CRIANÇAS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Escola Bahiana de  
Medicina e Saúde Pública, como parte  
dos requisitos para obtenção do título  
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Thessika  
Hiaila Almeida Araújo

**SALVADOR – BA**

**2022**

**DANIELLE NASCIMENTO RIBEIRO DE JESUS**

**PAPEL DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NA ASMA EM CRIANÇAS – UMA  
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 01 de junho de 2022.



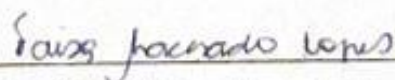
---

Prof. Dra. Thessika Hiralla Almeida Araújo  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



---

Prof. Dra. Cinthia Vila Nova Santana  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



---

Prof. Dra. Taisa Manuela Bonfim Machado Lopes  
Universidade Federal da Bahia

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. ARTIGO: PAPEL DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NA ASMA EM CRIANÇAS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA .....</b> | <b>8</b>  |
| <b>2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO .....</b>  | <b>26</b> |

## RESUMO

A asma é uma doença heterogênea inflamatória crônica de grande predominância na infância, a qual baseia-se apenas no tratamento para controle dos sintomas. Nesse sentido, o desenvolvimento de biomarcadores característicos, a partir da compreensão da influência das modulações epigenéticas nessa patologia, vem sendo cada vez mais estudados como sendo uma possibilidade de auxílio no desenvolvimento de uma ação mais específica do tratamento. A metilação do DNA é o processo mais bem caracterizado dentre os três mecanismos epigenéticos envolvidos nas pesquisas relacionadas a asma. Diante desse cenário, esta revisão busca compreender o perfil de metilação do DNA envolvido no desenvolvimento de asma em crianças e avaliar a utilização dos fatores epigenéticos como biomarcadores. Para isso, foram realizadas buscas na base de dados *PubMed* utilizando os descritores: *epigenetics, asthma, DNA methylation, histone, microRNA, biomarkers e child\**, nos idiomas inglês e português, afim de realizar uma revisão sistemática da literatura seguindo o diagrama PRISMA (*Preferred Report Items for Systematics Reviews and Meta-Analyses*), durante o período de agosto de 2021 a junho de 2022. Dessa maneira, foram incluídos 18 artigos neste estudo, os quais trouxeram informações importantes sobre os principais tipos de métodos, amostras e genes disponíveis para compreensão do perfil de metilação do DNA e utilização dos fatores epigenéticos como biomarcadores. Tendo em vista os resultados obtidos, as modulações epigenéticas apresentaram-se com um grande potencial para serem utilizadas como biomarcadores da asma infantil, porém mais estudos são necessários para melhor definir quais fatores poderão ser de fato utilizados como biomarcadores.

**Palavras-chave:** Asma, Crianças, Biomarcadores, Epigenética, Metilação do DNA.

## ABSTRACT

Asthma is a heterogeneous chronic inflammatory disease of great predominance in childhood, which is based only on treatment to control symptoms. In this sense, the development of characteristic biomarkers, based on the understanding of the influence of modulations in this pathology, has been increasingly studied as a possibility of aid in the development of a specific treatment action. DNA methylation is the best-characterized process among the three mechanisms involved in research to be researched as FBased on this scenario, this review seeks to understand the DNA methylation involved in the development of asthma in children and to evaluate the use of epigenetic factors as biomarkers. For this, searches were carried out in the PubMed database using the descriptors: epigenetics, asthma, DNA methylation, histone, microRNA, biomarkers and child\*, in English and Portuguese, in order to carry out a systematic review of the literature following the PRISMA diagram. (Preferred Report Items for Systematics Reviews and Meta-Analyses), during the period from August 2021 to June 2022. In this way, 18 articles were included in this study, which brought information about the main types of methods, samples and genes available for understanding the DNA methylation profile and use of epigenetic factors as biomarkers. In view of the results obtained, epigenetic modulations have a great potential to be used as biomarkers of childhood asthma, but more studies are needed to better define which factors can actually be used as biomarkers.

**Keywords:** Asthma, Children, Biomarkers, Epigenetics, DNA Methylation.

## 1. Artigo Científico

### **PAPEL DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NA ASMA EM CRIANÇAS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Danielle Nascimento Ribeiro de Jesus<sup>1</sup>, Thessika Hialla Almeida Araújo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil.

**\*Autor correspondente:** Thessika Hialla Almeida Araújo, biomédica, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Rua Silveira Martins, 100, Cabula, Salvador, Bahia, Brasil. Telefone para contato: 71 3257-8200. Email para contato: [thessikaaraujo@bahiana.edu.br](mailto:thessikaaraujo@bahiana.edu.br)

## INTRODUÇÃO

De acordo com Global Initiative for Asthma<sup>1</sup> “asma é uma doença heterogênea inflamatória crônica, caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento (...)”. É uma doença de grande predominância na infância, onde estima-se que no Brasil 20% das crianças sofrem com essa enfermidade<sup>2,3</sup>. Além disso, não possui cura e baseia-se apenas no tratamento para seu alívio e controle dos sintomas. Por esses motivos, torna-se árdua e diária a conduta dos médicos envolvidos nesse processo, bem como, compromete o bem-estar das crianças acometidas e dos seus familiares, além de gerar gastos financeiros consideráveis, o que também afeta a vida dos mesmos<sup>2,4</sup>.

Atualmente o estudo de novas técnicas, as quais visam proporcionar uma ação mais específica do tratamento, tem sido de grande importância para o alcance de uma estabilidade nos sintomas, como por exemplo, o desenvolvimento de biomarcadores característicos e novas terapias biológicas<sup>5</sup>. Dentre essas novas buscas, cada vez mais pesquisas indicam uma relação entre o desenvolvimento da asma e a influência das modulações epigenéticas, visto que, acredita-se que essa enfermidade ocorra em decorrência da junção de fatores genéticos e ambientais<sup>6,7</sup>.

Entende-se que esse processo está relacionado com a ativação ou desativação de diferentes genes, os quais são capazes de tornar os indivíduos propensos ao desencadeamento de determinadas doenças<sup>8</sup>. Dessa maneira, existem três principais mecanismos epigenéticos que estão envolvidos nas pesquisas para determinação das causas e origens da asma, são eles: a modificação de histonas, metilação do DNA e os RNAs não codificantes<sup>9</sup>. No entanto, o mecanismo da metilação do DNA (DNAm) é o mais bem caracterizado por ser o primeiro apontado e vastamente estudado no que diz respeito a doenças alérgicas, podendo assim ser um marcador epigenético importante no auxílio do tratamento<sup>10</sup>.



Sendo assim, a compreensão desses fatores pode proporcionar o entendimento dos impactos causados pelas modulações epigenéticas nessa patologia, como uma possibilidade de tornar mais fácil o processo de aprimoramento das terapias e formas diagnósticas, no intuito de amenizar as complicações que cercam essa doença e, conseqüentemente, gerar uma melhor qualidade de vida para essas crianças. Diante desse cenário, esta revisão busca compreender o perfil de metilação do DNA envolvido no desenvolvimento de asma em crianças e avaliar a utilização dos fatores epigenéticos como biomarcadores.

## MÉTODOS

Trata-se de a uma revisão sistemática da literatura elaborada seguindo o diagrama PRISMA (*Preferred Report Items for Systematics Reviews and Meta-Analyses*), durante o período de agosto de 2021 a junho de 2022.

Para o desenvolvimento do levantamento bibliográfico foram feitas buscas na base de dados eletrônica PubMed, tendo como referência a pergunta investigativa: “O desenvolvimento de asma em crianças sofre influência da regulação epigenética?”, a qual foi formulada a partir da estratégia PICO.

Dessa maneira, foram utilizados os operadores booleanos ‘AND’, ‘OR’ e ‘NOT’ associado aos descritores, os quais foram previamente pesquisados na plataforma eletrônica Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), sendo eles: *epigenetics*, *asthma*, *DNA methylation*, *histone*, *microRNA*, *biomarkers* e *child\**, nos idiomas inglês e português. Essa associação resultou na estratégia de busca “asthma” AND “child\*” AND “DNA methylation” OR “histone” OR “microRNA” AND “biomarkers” NOT *review*. Além disso, foram aplicados critérios de inclusão e exclusão para obtenção de uma melhor seleção dos artigos científicos utilizados.

Assim, os critérios de inclusão foram: artigos originais publicados nos últimos 10 anos (2012 a 2022); pesquisas realizadas em humanos; artigos nos idiomas inglês e português;

artigos que abordem o papel da epigenética na asma em crianças, nos idiomas citados. Enquanto os critérios de exclusão foram: artigos que não possuam dados relacionando epigenética ao desenvolvimento de asma; artigos que não apresentem a faixa etária infantil ou subgrupos que englobem essa faixa etária; artigos de revisão sistemática.

Tendo em vista isso, primeiramente foram selecionados artigos encontrados por meio da busca dos descritores definidos e após a leitura do resumo foram excluídos aqueles que não abordassem o tema central do estudo ou que se encaixassem em artigos do tipo revisão sistemática. Posteriormente, aqueles que eram escolhidos foram lidos na íntegra e analisados seguindo os critérios de inclusão e foram excluídos aqueles que não auxiliariam na resolução da pergunta investigativa. Ademais, para a obtenção de mais base também foram feitas buscas nas referências dos estudos encontrados e aqueles que se encaixaram nos critérios propostos foram incluídos no trabalho. Sendo assim, os artigos selecionados serviram como fonte de dados para coleta de informações como objetivos, metodologias, tipos de amostras, características populacionais e conclusões.

A análise metodológica dos estudos foi avaliada utilizando o método do Instituto Joanna Briggs, onde um questionário é disponibilizado para avaliação da qualidade dessa metodologia de acordo com cada tipo de estudo. Desse modo, os artigos foram classificados de acordo com as chances de apresentarem viés, sendo considerados de alto risco de viés quando obtivessem menos de 50% de respostas positivas, moderado risco de viés quando entre 70% e 50% e baixo risco de viés tendo acima de 70% de respostas positivas. Os trabalhos que apresentaram resultado de alto risco foram excluídos, visando manter um bom padrão de qualidade para esta revisão.

## **RESULTADOS**

Durante o processo de busca foram inicialmente encontrados 389 artigos na base de dados *PubMed*. As bases de dados *SciELO* e *LILACS* também foram utilizadas, porém não

foram identificados artigos significativos para esse estudo. Seguindo uma análise dos artigos encontrados, a partir do título e resumo foram selecionados 45 estudos para ser realizada uma leitura na íntegra. Destes, 23 artigos foram excluídos com justificativas baseadas nos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, restando 22 estudos a serem utilizados nesta revisão. Porém, para uma melhor seleção, foi avaliada também a qualidade dos artigos selecionados aplicando o questionário disponível pelo Instituto *Joanna Briggs*. Com isso, 4 artigos foram considerados com alto risco de viés, sendo excluídos, 4 foram classificados como médio risco e 14 como baixo risco de viés, chegando a 18 artigos elegíveis. Os resultados desta busca estão descritos resumidamente na Figura 1.

**Figura 1.** Fluxograma PRISMA

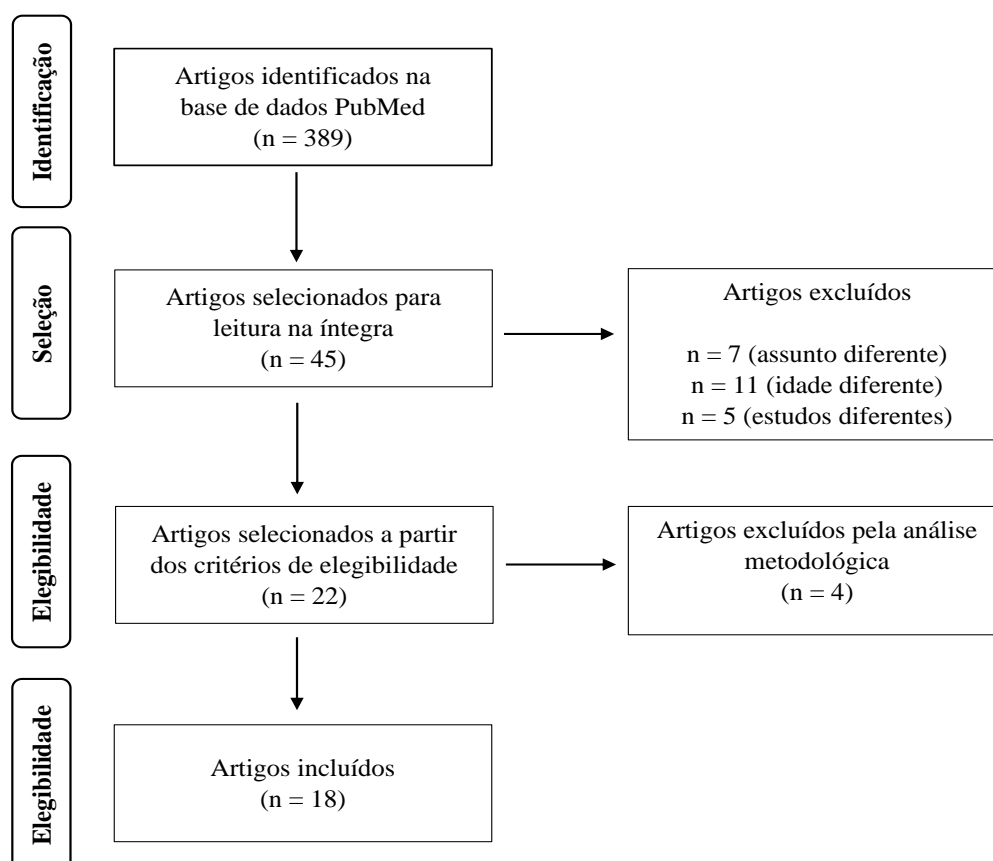


Diagrama de fluxo da revisão sistemática, PRISMA. Adaptado de Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009).

Dos 18 artigos analisados 61,11% (11/18) tinham como objetivo caracterizar a metilação do DNA (Tabela 1) e 27,77% (5/18) identificar os miRNAs críticos para serem possíveis biomarcadores no desenvolvimento de asma em crianças (Tabela 2). Ademais, o artigo de Harb *et al.*<sup>27</sup> focou na identificação da acetilação de histonas, enquanto o artigo de Zhang *et al.*<sup>28</sup> abordou sobre os genes diferencialmente expressos associados à asma infantil. Desses, 50% (9/18) eram estudos de caso controle<sup>14,16,19,22-25,27,28</sup>, seguindo de 7 coortes (38,88%)<sup>11,13,17,18,20,21,26</sup> e tendo apenas 2 estudos do tipo ensaio clínico (11,11%)<sup>12,15</sup>.

Com relação aos tipos de amostras analisadas temos que 50% (9/18) dos artigos utilizaram as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) para estudo, 38,88% (7/18) utilizaram as células do epitélio nasal. O artigo de Dorota *et al.*<sup>17</sup> faz exatamente uma comparação entre esses dois principais tipos de amostras estudadas. Por sua vez, o artigo de Gaffin *et al.*<sup>21</sup> utilizou tanto amostras de PBMCs, quanto amostras de células bucais encontradas na saliva dos participantes. Além disso, o trabalho de Mendes *et al.*<sup>24</sup> deu destaque ao condensado do ar exalado (EBC) como uma alternativa pouco invasiva e potencialmente interessante para a avaliação de inflamação das vias aéreas em doenças como a asma.

Para a medição dos ensaios de metilação do DNA 81,81% (9/11) dos artigos utilizaram o sistema *Illumina*, sendo 6 (54,54%) o *Illumina Human Methylation 450k BeadChip*, 2 (18,18%) o *Illumina GoldenGate Cancer Panel I* e 1 (9,09%) o *Infinium MethylationEPIC BeadChip*. Também foi utilizado o *Illumina Human Methylation 450k BeadChip* para a identificação de miRNAs críticos envolvidos na patologia da asma infantil (2/5, 40%), bem como para a detecção dos genes diferencialmente expressos (1/1, 100%). Além disso, o estudo de Chan *et al.*<sup>16</sup> utilizou o *kit 5-mC DNA ELISA* e Gaffin *et al.*<sup>21</sup> utilizou o pirosequenciamento, ambos para a detecção de DNAm. Já para medição dos miRNAs foi utilizado *All-in One Purification Kit* (1/5, 20%), *Tri Reagent LS* (1/5, 20%) e *miRNeasy kit* soro/plasma (1/5, 20%).

Dentre os estudos, 44,44% (8/18) demonstraram uma correlação entre as alterações epigenéticas e a incidência nos fenótipos da asma, sendo eles asma alérgica<sup>11,18,20,28</sup> ou asma atópica<sup>14,17,18,22,24</sup>. Foi também realizada uma correlação com a gravidade dos sintomas por 5 dos 18 artigos (27,77%), neles genes como o *ADRB2*, *TET1*, *ALOX12*, *IL15RA* e o miR-582-5p foram associados as chances de exacerbações graves no quadro clínico das crianças<sup>13,15,20,21,26</sup>. Dentro das análises realizadas apenas o artigo de Chan *et al.*<sup>16</sup> fez uma correlação com a raça, estudando crianças afro-americana. Outras variáveis como idade e sexo não foram significativamente examinadas. Além disso, 50% dos artigos (9/18) encontraram uma associação entre as modulações epigenéticas e as vias de resposta imune, principalmente relacionadas a expressão de células do tipo T2<sup>11,14,18,19,21,23,25,27,28</sup>.

Com relação à metilação, foi observado que em 6 dos artigos (33,33%) a maior parte dos genes se encontram hipometilados<sup>13-15,18,19,28</sup>, tendo apenas 2 artigos (11,11%) onde os principais genes citados estavam hipermetilados<sup>21,23</sup>. Já em relação aos genes, a alta na expressão de Interleucina 13 (*IL-13*) foi avaliada em 27,77% dos artigos (5/18)<sup>11,19,24,25,27</sup>, assim como o *RUNX3* que teve uma frequência de avaliação de 16,66% (3/18)<sup>17,19,24</sup>. Os genes *LOX* se apresentaram hipometilados em asmáticos tanto como *ALOX15* (2/18, 11,11%)<sup>18,28</sup> como *ALOX12* (1/18, 5,55%)<sup>4</sup>. Ademais, foram encontrados genes da família do *NTRK*, sendo *NTKR1* e *NTKR2* (1/18, 5,55%) diferencialmente expressos, bem como o *CDH26* (2/18, 11,11%)<sup>14,18</sup>. O gene *CHI3LI* também teve uma associação significativa com a asma infantil (2/18, 11,11%)<sup>11</sup>, porém quando avaliado em relação a influência nos níveis da sua proteína codificada, conhecida por *YKL-40*, esse gene não apresentou significância nessa patologia<sup>12</sup>.

Por fim, dos microRNAs críticos observados o miR155 apresentou uma elevada expressão quando examinado em PBMCs (1/5, 20%)<sup>25</sup>, porém nas amostras de EBC como miR-115-5p apresentou diminuição da expressão em asma sintomática (1/5, 20%)<sup>24</sup>. Além disso, o

miR-148b foi significativamente associado a regulação do processo de resposta imune na asma (1/5, 20%)<sup>23</sup>.

## **DISCUSSÃO**

As informações coletadas nesta revisão revelam que as modulações epigenéticas possuem um grande potencial para serem utilizadas como biomarcadores, visto a capacidade de diferenciar pacientes asmáticos e saudáveis, bem como identificar os fenótipos relacionados a essa patologia e a sua gravidade. Esses achados vão de acordo com outros estudos encontrados sobre o tema, confirmando a relevância dos dados para possível utilização como fonte de auxílio prognóstico na asma infantil<sup>27</sup>.

Quando visto os artigos pode-se observar que destas modulações a modificação de histonas apresenta uma baixa quantidade de estudos quanto a sua possibilidade de ser utilizada como biomarcador, ao contrário da metilação do DNA que ganha destaque nesta doença. Os microRNAs também vem ganhando força e trazendo resultados significativos neste ponto. Esse fator é explicado pelos pesquisadores, uma vez que as pesquisas/métodos que avaliam a metilação do DNA são mais acessíveis, já que as amostras se mantêm em bom estado por grandes períodos, além de que, com pouca quantidade dessas amostras já é possível a realização de estudos amplos na população<sup>28</sup>.

No que diz respeito ao perfil de metilação do DNA, os artigos apontam para hipometilação, levando à uma maior expressão de determinados genes, os quais interferem principalmente na resposta imune das crianças<sup>13-15,18,19,28</sup>. Já outros estudos apontam que essa associação entre a metilação do DNA e o estado de expressão do gene é algo que não segue um padrão estabelecido, podendo nem sempre haver, por exemplo, a hipermetilação e diminuição da expressão ou hipometilação e elevação da expressão gênica<sup>27</sup>. Há também um questionamento sobre se essa alteração no DNA metilado seria uma causa ou consequência das diferenças observadas na expressão desses genes<sup>27</sup>.

Dos resultados aqui observados, a associação significativa entre o gene beta-2 adrenérgico (*ADRB2*) e a gravidade dos sintomas da asma infantil foi também observada por Consentino *et al.*<sup>29</sup>, onde foi relatada a relação entre o polimorfismo desse gene e uma maior sensibilidade nas vias aéreas, causando uma diminuição da função pulmonar e conseqüentemente gerando agravamento dos sintomas. Além disso, o gene *TET1*, o qual também foi associado como provável influenciador para gravidade da doença, já vem sendo considerado por estudos anteriores como possível biomarcador geral para asma infantil, pois foi encontrado diferencialmente metilado tanto em células nasais, como bucais e no sangue dos pacientes<sup>30</sup>.

O receptor A da interleucina 17 (*IL17RA*) é mais um desses genes que foi positivamente associado a exarcebações graves, visto a sua característica pró-inflamatória, ou seja, há um aumento dos efeitos inflamatórios nas vias aéreas o que potencializa os sintomas dessa patologia<sup>31</sup>. Ademais, apesar de ser considerado um biomarcador potencial para outras doenças, o miR-582-5p não teve correlação apresentada por outros estudos quanto a sua relação com a asma grave, apenas o estudo de Trifunovic *et al.*<sup>26</sup> trouxe esse dado como um ponto relevante, sendo necessários mais estudos para confirmação desta relação significativa.

Dentre os genes diferencialmente expressos, a interleucina 13 (*IL-13*) foi a mais analisada entre os artigos avaliados nesta revisão e essa relação frequente também é observada em outros estudos<sup>32,33</sup>. A alta dessa expressão pode ser explicada pelo fato da *IL-13* ser uma citocina produzida principalmente pelas células TH2 levando a indução de determinados genes, os quais estão intimamente ligados às vias inflamatórias e que conseqüentemente atuam na asma<sup>33</sup>. Além disso, sendo as modificações epigenéticas um mecanismo complexo dessa patologia, essas mudanças geram alterações consideráveis nessas vias tornando essa alta expressão um padrão e enfatizando os efeitos patogênicos dessa interleucina<sup>32</sup>. Outro gene diferencialmente expresso que apresentou grande correlação com a asma foi o *RUNX3* o qual

está relacionado também ao equilíbrio das células TH2 e, sendo assim, a sua expressão gera igualmente uma influência na resposta imune<sup>34</sup>.

Seguindo este mesmo princípio, a hipometilação do DNA levando a um aumento da expressão dos genes *ALOX*, tanto *ALOX15*, como *ALOX12*, foi bem estabelecida em estudos anteriores como uma resposta mediada pelas células TH2, ou seja, esses genes também resultam em um maior efeito das vias pró-inflamatórias<sup>35,36</sup>. Assim como, é vista uma forte interação entre *IL-13* e *NKTR1*, sugerindo que a expressão desses fatores coopera para o desenvolvimento de uma doença inflamatória como a asma<sup>37</sup>.

As modificações epigenéticas na asma infantil se mostram um ponto crucial na disfunção da barreira epitelial das vias aéreas, onde essas mudanças geram maior sensibilidade e chances de desenvolvimento da doença<sup>38</sup>. Genes como o *NKTR2* e o *CDH26* apresentam relação com mecanismos da barreira epitelial e nessa patologia se apresentaram diferencialmente expressos, mostrando-se relevantes na identificação dos eventos críticos associados a essa disfunção e a asma<sup>38,39</sup>.

Ao contrário dos outros genes já mencionados, o *CHI3L1* e a sua relação de influência nos níveis da sua proteína codificada *YLK-40* apresentou nesta revisão um resultado divergente quando comparado à estudos anteriores, por exemplo, no estudo de Gomes *et al.*<sup>40</sup> além desse gene estar associado à asma infantil os dados sugerem que há uma influência nos níveis de *YLK-40* e que o mesmo também tem relação, não só com a asma, mas com a gravidade dessa doença<sup>40</sup>.

Com relação aos microRNAs o estudo de Rafael *et al.*<sup>41</sup> mostrou que o *miR-155* apresenta níveis de expressão diferenciada, quando estudado em diferentes tecidos. Esse fato pode ser explicado porque em cada tecido, um conjunto de vias podem ser ativados ou desativados, levando a uma modulação diferencial desse microRNA<sup>41</sup>. Já o *miR-148b* em diversos estudos está relacionado ao polimorfismo de genes que tem relação com a indução da



inflamação nas vias aéreas, por essa razão nesse estudo foi significativamente associado a regulação dos processos de resposta imune na asma infantil<sup>42</sup>.

A heterogeneidade das fontes de coleta do DNA para análise é outro ponto que vem sendo bastante discutido em estudos sobre esse tema, uma vez que as assinaturas epigenéticas são específicas para os determinados tipos de células e essa variação pode tornar superficial a descoberta dos alvos moleculares associados a asma em crianças<sup>27</sup>.

Nesta revisão apesar da maioria dos estudos se concentrar nas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), quando comparada as células das vias aéreas (AECs) foi observada maior metilação nas AECs<sup>17</sup>. Esse fator não é surpreendente, visto que as células das vias aéreas são consideradas a interface primária em relação as exposições ambientais e por isso, sofrem maior influência, sendo de extrema importância então na identificação das doenças respiratórias<sup>18</sup>. Entretanto, a utilização das PBMCs ainda se dá por conta da facilidade de acesso a essas células em crianças, pois são menos invasivas<sup>19</sup>.

Pode-se considerar que esse trabalho apresenta algumas limitações. Uma delas seria a pouca disponibilidade de estudos que façam uma análise onde seja investigada o mesmo conjunto de genes nos mesmos tecidos ou até mesmo em tecidos diferentes, pois isso gera um amplo conhecimento sobre esses genes diversos relacionados a asma infantil, mas apenas um vago entendimento sobre a real possibilidade de utilização deles como biomarcadores. Também não há muitos estudos onde sejam feitas comparações dos resultados obtidos entre as variáveis, como por exemplo, o sexo e a raça, trazendo uma dificuldade na obtenção de informações significativas para esse tipo de revisão, visto que essas variáveis podem estar diretamente associadas a diferentes respostas do organismo.

Portanto, mais estudos são necessários para que esses pontos sejam elucidados, levando em consideração as outras variáveis, os conjuntos específicos de genes, bem como estudos que

caminhem em direção a respostas sobre a metilação do DNA e sua relação com a expressão desses genes, pois seria um grande passo na compreensão do desenvolvimento da asma infantil.

## CONCLUSÃO

As modulações epigenéticas apresentam um grande potencial para serem utilizadas como biomarcadores da asma infantil, pois a interação dos fatores ambientais e genéticos geram nesta patologia uma expressão diferencial dos genes que afetam principalmente o sistema imune das crianças acometidas, podendo assim, ser um ponto de partida crucial para o desenvolvimento de fármacos específicos, auxiliando no controle da doença e garantindo bem-estar para essas crianças. Porém, mais estudos são necessários para que haja uma melhor definição de quais fatores poderão ser de fato utilizados como biomarcadores.

## REFERÊNCIAS

1. Global Initiative for Asthma. The global strategy for asthma management and prevention. GINA; 2022. Disponível em: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2022/05/GINA-Main-Report-2022-FINAL-22-05-03-WMS.pdf>
2. Licari A, Ciprandi G, Marseglia GL, Silvestri M, Tosca MA, Anastasio E, et al. Asma em crianças e adolescentes: o projeto ControL'Asma. *Acta Biomed* [Internet]. 15 de setembro de 2020 [citado em 05 de outubro de 2021];91(11-S):e2020002. Disponível em: <https://www.mattioli1885journals.com/index.php/actabiomedica/article/view/10295>.
3. ASBAI. Asma: Doença atinge cerca de 20% das crianças no Brasil [site na Internet]. Disponível em: <https://asbai.org.br/asma-doenca-atinge-cerca-de-20-das-criancas-no-brasil/#:~:text=Segundo%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Mundial%20de,tratamento%20ou%20com%20pouca%20resposta.>
4. Moral L, Asensi Monzó M, Juliá Benito JC, Ortega Casanueva C, Paniagua Calzón NM, Pérez García MI, et al. Pediatric asthma: The REGAP consensus. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2021 Aug;95(2):125.e1-125.e11. doi: 10.1016/j.anpede.2021.02.007. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34353777.
5. Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *Lancet*. 2018 Feb 24;391(10122):783-800. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33311-1. Epub 2017 Dec 19. PMID: 29273246.
6. Tost J. Epigenetic plasticity of eosinophils and other immune cell subsets in childhood asthma. *Lancet Respir Med*. 2018 May;6(5):322-324. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30051-1. Epub 2018 Feb 26. PMID: 29496483.
7. Trinca MA, Bicudo IMP, Pelicioni, MCF. A interferência da asma no cotidiano das crianças. *Rev. bras. crescimento desenvolv. hum.* 2011; 21(1), 70-84. Disponível em: [http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-12822011000100008&lng=pt&tlng=pt](http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12822011000100008&lng=pt&tlng=pt).
8. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*.

- 2020;1253:3-55. doi: 10.1007/978-981-15-3449-2\_1. PMID: 32445090.
9. Salam, MT. Epigenética da Asma. In: Brasier, A. (eds) Heterogeneidade na asma. *Avanços em Medicina Experimental e Biologia*. Humana Press, Boston, MA; 2014. p. 183-199. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8603-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8603-9_11)
  10. Lin PI, Shu H, Mersha TB. Comparing DNA methylation profiles across different tissues associated with the diagnosis of pediatric asthma. *Sci Rep*. 2020 Jan 13;10(1):151. doi: 10.1038/s41598-019-56310-4. PMID: 31932625; PMCID: PMC6957523.
  11. Cardenas A, Sordillo JE, Rifas-Shiman SL, Chung W, Liang L, Coull BA, et al. The nasal methylome as a biomarker of asthma and airway inflammation in children. *Nat Commun*. 2019 Jul 12;10(1):3095. doi: 10.1038/s41467-019-11058-3. PMID: 31300640; PMCID: PMC6625976.
  12. Guerra S, Melén E, Sunyer J, Xu CJ, Lavi I, Benet M, Bustamante M, et al. Genetic and epigenetic regulation of YKL-40 in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Mar;141(3):1105-1114. doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.030. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28739286.
  13. Morales E, Bustamante M, Vilahur N, Escaramis G, Montfort M, de Cid R, Garcia-Esteban R, et al. DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 May 1;185(9):937-43. doi: 10.1164/rccm.201105-0870OC. Epub 2012 Feb 9. PMID: 22323304.
  14. Forno E, Wang T, Qi C, Yan Q, Xu CJ, Boutaoui N, Han YY, et al. DNA methylation in nasal epithelium, atopy, and atopic asthma in children: a genome-wide study. *Lancet Respir Med*. 2019 Apr;7(4):336-346. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30466-1. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30584054; PMCID: PMC6441380.
  15. Zhu T, Zhang X, Chen X, Brown AP, Weirauch MT, Guilbert TW, et al. Nasal DNA methylation differentiates severe from non-severe asthma in African-American children. *Allergy*. 2021 Jun;76(6):1836-1845. doi: 10.1111/all.14655. Epub 2020 Nov 25. PMID: 33175399; PMCID: PMC8110596.
  16. Chan MA, Ciaccio CE, Gigliotti NM, Rezaiekhalthigh M, Siedlik JA, Kennedy K, Barnes CS. DNA methylation levels associated with race and childhood asthma severity. *J Asthma*. 2017 Oct;54(8):825-832. doi: 10.1080/02770903.2016.1265126. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27929694.
  17. Stefanowicz D, Hackett TL, Garmaroudi FS, Günther OP, Neumann S, Sutanto EN, et al. DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One*. 2012;7(9):e44213. doi: 10.1371/journal.pone.0044213. Epub 2012 Sep 6. PMID: 22970180; PMCID: PMC3435400.
  18. Yang IV, Pedersen BS, Liu AH, O'Connor GT, Pillai D, Kattan M, et al. The nasal methylome and childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 May;139(5):1478-1488. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.036. Epub 2016 Oct 13. PMID: 27745942; PMCID: PMC5391298.
  19. Yang IV, Pedersen BS, Liu A, O'Connor GT, Teach SJ, Kattan M, et al. DNA methylation and childhood asthma in the inner city. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Jul;136(1):69-80. doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.025. Epub 2015 Mar 11. PMID: 25769910; PMCID: PMC4494877.
  20. Zhang X, Biagini Myers JM, Burleson JD, Ulm A, Bryan KS, Chen X, et al. Nasal DNA methylation is associated with childhood asthma. *Epigenomics*. 2018 May;10(5):629-641. doi: 10.2217/epi-2017-0127. Epub 2018 Apr 25. PMID: 29692198; PMCID: PMC5992571.
  21. Gaffin JM, Raby BA, Petty CR, Hoffman EB, Baccarelli AA, Gold DR, Phipatanakul W.  $\beta$ -2 adrenergic receptor gene methylation is associated with decreased asthma severity in inner-city schoolchildren: asthma and rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(5):681-9. doi:

- 10.1111/cea.12219. PMID: 24131275; PMCID: PMC3989375.
22. Chen R, Piao LZ, Liu L, Zhang XF. DNA methylation and gene expression profiles to identify childhood atopic asthma associated genes. *BMC Pulm Med*. 2021 Sep 15;21(1):292. doi: 10.1186/s12890-021-01655-8. PMID: 34525985; PMCID: PMC8444351.
  23. Shi K, Ge MN, Chen XQ. Coordinated DNA Methylation and Gene Expression Data for Identification of the Critical Genes Associated with Childhood Atopic Asthma. *J Comput Biol*. 2020 Jan;27(1):109-120. doi: 10.1089/cmb.2019.0194. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31460781.
  24. Mendes FC, Paciência I, Ferreira AC, Martins C, Rufo JC, Silva D, et al. Development and validation of exhaled breath condensate microRNAs to identify and endotype asthma in children. *PLoS One*. 2019 Nov 8;14(11):e0224983. doi: 10.1371/journal.pone.0224983. PMID: 31703106; PMCID: PMC6839869.
  25. Karam RA, Abd Elrahman DM. Differential expression of miR-155 and Let-7a in the plasma of childhood asthma: Potential biomarkers for diagnosis and severity. *Clin Biochem*. 2019 Jun;68:30-36. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2019.04.007. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30981701.
  26. Trifunovic A, Dombkowski A, Cukovic D, Mahajan P. The potential of microRNAs as noninvasive biomarkers in acute pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jun;145(6):1706-1708.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2020.01.032. Epub 2020 Feb 1. PMID: 32018032.
  27. Qi C, Xu CJ, Koppelman GH. The role of epigenetics in the development of childhood asthma. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019 Dec;15(12):1287-1302. doi: 10.1080/1744666X.2020.1686977. Epub 2019 Nov 10. PMID: 31674254.
  28. Reis AP. Epigenética da asma: revisão. *Braz J Allergy Immunol*. 2015;3(1):13-18.
  29. Consentino CL, Furtado-Alle L, da Silva LR, Lopes WA, Tureck LV, Milano GE, et al. Influência dos polimorfismos no receptor beta 2 adrenérgico na presença de broncoespasmo induzido pelo exercício em adolescentes polimorfismos do receptor beta-2 adrenérgico na presença de broncoespasmo induzido por exercício em adolescentes. *Rev Paul Pediatr*. 2016 Jan-Mar;34(1):24-9. doi: 10.1016/j.rpped.2015.06.002. Epub 2015 9 de outubro. PMID: 26684442; PMCID: PMC4795718.
  30. Sominen HK, Zhang X, Biagini Myers JM, Kovacic MB, Ulm A, Jurcak N, Ryan PH, Khurana Hershey GK, Ji H. Ten-eleven translocation 1 (TET1) methylation is associated with childhood asthma and traffic-related air pollution. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Mar;137(3):797-805.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.021. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26684294; PMCID: PMC4783231.
  31. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C, Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1185-7. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.024. Epub 2009 Apr 10. PMID: 19361847.
  32. Nicodemus-Johnson J, Naughton KA, Sudi J, Hogarth K, Naurekas ET, Nicolae DL, et al. Genome-Wide Methylation Study Identifies an IL-13-induced Epigenetic Signature in Asthmatic Airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 15;193(4):376-85. doi: 10.1164/rccm.201506-1243OC. PMID: 26474238; PMCID: PMC4803084.
  33. Reis AP, Machado JAN. Biomarcadores e imunobiológicos na asma. *Arq Asma Alerg Imunol*. 2018;2(4):405-415
  34. Yu Y, Wang L, Gu G. The correlation between Runx3 and bronchial asthma. *Clin Chim Acta*. 2018 Dec;487:75-79. doi: 10.1016/j.cca.2018.09.023. Epub 2018 Sep 12. PMID: 30218658.
  35. Mashima R, Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and

- future perspectives. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:297-310. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.006. Epub 2015 Aug 7. PMID: 26298204; PMCID: PMC4556770.
36. Xu X, Li J, Zhang Y, Zhang L. Ácido Araquidônico 15-Lipoxigenase: Efeitos de sua expressão, metabólitos e variações genéticas e epigenéticas na inflamação das vias aéreas. *Alergia Asma Immunol Res.* 2021 set;13(5):684-696. doi: 10.4168/air.2021.13.5.684. PMID: 34486255; PMCID: PMC8419644.
37. Rochman M, Kartashov AV, Caldwell JM, Collins MH, Stucke EM, Kc K, et al. O receptor neurotrófico de tirosina quinase 1 é um alvo transcricional e epigenético direto de IL-13 envolvido na inflamação alérgica. *Mucosal Immunol.* Julho de 2015;8(4):785-98. doi: 10.1038/mi.2014.109. Epub 2014 12 de novembro. PMID: 25389033; PMCID: PMC4429043.
38. Heijink IH, Kuchibhotla VNS, Roffel MP, Maes T, Knight DA, Sayers I, Nawijn MC. Disfunção das células epiteliais, um dos principais impulsionadores do desenvolvimento da asma. *Alergia.* 2020 agosto;75(8):1902-1917. doi: 10.1111/todos.14421. Epub 2020 16 de junho. PMID: 32460363; PMCID: PMC7496351.
39. Forno E, Zhang R, Jiang Y, Kim S, Yan Q, Ren Z, et al. Análise da rede de expressão diferencial e ampla do transcriptoma da asma infantil no epitélio nasal. *J Allergy Clin Immunol.* Setembro de 2020;146(3):671-675. doi: 10.1016/j.jaci.2020.02.005. Epub 2020 20 de fevereiro. PMID: 32088307; PMCID: PMC7438239.
40. Gomez JL, Crisafi GM, Holm CT, Meyers DA, Hawkins GA, Bleecker ER, et al. Genetic variation in chitinase 3-like 1 (CHI3L1) contributes to asthma severity and airway expression of YKL-40. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Jul;136(1):51-58.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.027. Epub 2015 Jan 13. PMID: 25592985; PMCID: PMC4494869.
41. DOVEINIS RB, MELLO VS. Elucidando o papel dos micrnas nas doenças atópicas: revisão sistemática [trabalho de conclusão de curso]. Maringá (PR): Universidade Cesumar; 2020.
42. Alves CC. Sítios polimórficos do gene HLA-G na asma brônquica [dissertação de pós-graduação]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2016.

**Tabela 1.** Características dos artigos com objetivo de avaliação da metilação do DNA.

| Referência / Ano                      | Objetivo  | População  | Métodos   | Tipo de Amostra                                   |
|---------------------------------------|---|--|---|---|
| Andrés Cárdenas <i>et al.</i><br>2019 | Metilação do DNA como biomarcador de doenças das vias aéreas  | 547 participantes<br>Idade média = 12,9 anos                           | Infinium MethylationEPIC BeadChip               | Células do epitélio nasal das narinas anteriores  |
| Stefano Guerra <i>et al.</i><br>2017  | Metilação do CHI3L1 que regulam os níveis de YKL-40 associados à asma na primeira infância                    | 443 participantes<br>Idade = 4 a 8 anos                                | Illumina Infinium Human Methylation450 BeadChip | Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) |
| Eva Morales <i>et al.</i><br>2012     | Metilação do DNA de fenótipos relacionados à asma na infância   | 358 participantes<br>Idade = 4 a 6 anos                                | Illumina GoldenGate Cancer Panel I              | Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) |
| Eric Forno <i>et al.</i><br>2018      | Metilação do DNA que classifiquem com precisão asma atópica em crianças                                       | 483 participantes<br>Idade = 9 a 20 anos                               | Illumina Human Methylation450 BeadChip          | Células do epitélio nasal                         |
| Tao Zhu <i>et al.</i><br>2020         | Diferenças na metilação do DNA no epitélio nasal entre crianças afro-americanas asmáticas graves e não graves | 33 asmáticos não graves e 22 asmáticos graves<br>Idade média = 12 anos | Illumina Human Methylation450 BeadChip          | Células do epitélio nasal                         |
| Márcia A Chan <i>et al.</i><br>2016   | Medir os níveis de metilação do DNA usando células retiradas do sangue periférico de crianças com asma        | 99 participantes<br>Idade = 2 a 17 anos                                | kit 5-mC DNA ELISA                              | Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) |

|                                  |   |  |  |   |
|----------------------------------|---|--|--|---|
| Dorota Stefanowicz <i>et al.</i> | Identificação de diferenças epigenéticas dentro de AECs e PBMCs de crianças asmáticas e atópicas              | 25 crianças com cirurgia por condições não respiratórias e 44 crianças controles<br>Idade = 7 a 8 anos | Illumina GoldenGate Cancer Panel I     | Células mononucleares de sangue periférico (PBMC)<br>Células das vias áreas (AEC)                           |
| 2012                             |   |  |  |   |
| Ivana V Yang <i>et al.</i>       | Metilação do DNA e as alterações na expressão gênica associadas à asma alérgica persistente na infância.      | 36 crianças com asmáticas atópicas e 36 controles<br>Idade = 10 a 12 anos                              | Illumina Human Methylation450 BeadChip | Células do epitélio nasal   |
| 2016                             |   |  |  |   |
| Ivana V. Yang <i>et al.</i>      | Alterações epigenéticas nas PBMCs circulantes associadas à asma alérgica.                                     | 97 crianças com atopia e asma persistente e 97 controles<br>Idade = 6 a 12 anos                        | Illumina Human Methylation450 BeadChip | Células mononucleares de sangue periférico (PBMC)   |
| 2015                             |   |  |  |   |
| Xue Zhang <i>et al.</i>          | Identificação de marcadores de DNAm que são diferencialmente metilados entre irmãos AA discordantes para asma | 29 pares de irmãos para estudo e 54 pares de irmãos controles<br>Idade = 5 a 18 anos                   | Illumina Human Methylation450 BeadChip | Células do epitélio nasal   |
| 2018                             |   |  |  |   |
| JM Gaffin <i>et al.</i>          | Metilação no ADRB2 região promotora para sintomas de asma, morbidade e função pulmonar                        | 177 participantes<br>Idade média = 7,9 anos  | Pirosequenciamento                     | 41 amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)<br>136 amostras de células bucais (saliva) |
| 2014                             |   |  |  |   |

**Tabela 2.** Características dos artigos com objetivo de avaliação dos MicroRNAs.

| Referência / Ano                              | Objetivo  | População  | Métodos                                | Tipo de Amostra                                   |
|---|---|--|--|---|
| Rui Chen <i>et al.</i><br>2021                | Identificação de genes e miRNAs críticos na progressão da asma atópica infantil   | 97 crianças com asma atópica e 97 crianças controles                           | Illumina Human Methylation450 BeadChip | Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) |
| Ke Shi <i>et al.</i><br>2019                  | Identificação de genes e miRNAs críticos na progressão da asma atópica infantil   | 72 pacientes asmáticos<br>Idade média = 11,06 anos                             | Illumina Human Methylation450 BeadChip | Células do epitélio nasal                         |
| Francisca Castro Mendes <i>et al.</i><br>2019 | Avaliação de miRNA no condensado do ar exalado como potenciais biomarcadores para diagnosticar e endotipar a asma de crianças | 71 crianças com asma e 115 crianças controles<br>Idade = 7 a 12 anos           | Tri Reagent LS                         | Condensado do ar exalado (EBC)                    |
| Rehab A Karam <i>et al.</i><br>2019           | Uso da expressão de miR-155 e Let7a como biomarcadores e sua relação com o nível de IL-13 e gravidade da asma                 | 100 crianças com asma alérgica e 100 crianças controles<br>Idade = 6 a 10 anos | miRNeasy kit soro/plasma               | Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) |
| Aleksandra Trifunovic <i>et al.</i><br>2020   | Padrões de expressão de microRNA em pacientes pediátricos   | 50 participantes<br>Idade = menores de 18 anos                                 | All-in One Purification Kit            | Células do epitélio nasal                         |

Fonte: Produzido pelo autor.



## 2. Proposta de submissão

### **Revista:**

Arquivos De Asma, Alergia E Imunologia (AAAI)

### **Regras para Submissão:**

São aceitos artigos nos idiomas português, espanhol ou inglês e o envio dos manuscritos deverá ser feito através do sistema de submissão on-line. Os artigos de revisão são limitados a 6.000 palavras, excluindo referências e tabelas. As referências bibliográficas deverão ser atuais e em número mínimo de 30.

**Extensão e apresentação:** O artigo completo (original e de revisão) não deve exceder 25 laudas de papel tamanho A4 (21 cm x 29,7 cm), escritas em letra Times New Roman de tamanho 12, espaço duplo entre linhas. As figuras serão submetidas separadamente (cada figura completa, com título e notas de rodapé).

**Resumo e palavras-chave (descritores):** Resumos em artigos de revisão não são estruturados em seções. O resumo deve ter no máximo 250 palavras, e o texto do mesmo deve incluir aspectos como: fazer uma apreciação geral do tema; informar por que a revisão da literatura foi feita, indicando se ela enfatiza algum aspecto em especial, como causa, prevenção, diagnóstico, tratamento ou prognóstico; descrever as fontes da pesquisa, definindo as bases de dados e os anos pesquisados; informar sucintamente os critérios de seleção de artigos e os métodos de extração e avaliação da qualidade das informações; informar os principais resultados da revisão da literatura; apresentar as conclusões e suas aplicações clínicas.

**Texto de artigos de revisão:** O texto de artigos de revisão não obedece a um esquema rígido de seções. Sugere-se uma introdução breve, em que os autores explicam qual a importância da revisão para a prática clínica, à luz da literatura médica. Podem ser descritos os métodos de seleção e extração dos dados, passando em seguida para a sua síntese, com apresentação de todas as informações pertinentes em detalhe. As conclusões devem

correlacionar as ideias principais da revisão com as possíveis aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão.

**Referências bibliográficas:** As referências bibliográficas devem ser numeradas e ordenadas segundo a ordem de aparecimento no texto, no qual devem ser identificadas pelos algarismos arábicos respectivos entre parênteses. Devem ser formatadas no estilo Vancouver revisado.

**Tabelas:** As Tabelas devem ser apresentadas em formato .doc (Microsoft Word®) ou .xls (Microsoft Excel®). Digite cada tabela com espaçamento duplo em página separada, e não submeta tabelas como fotografias. Numere as tabelas consecutivamente na ordem da sua citação no texto. Cada tabela deve ter um título breve, mas completo, de maneira que o leitor possa determinar, sem dificuldade, o que se tabulou. O título deve estar acima da tabela. Coloque as explicações necessárias em notas de rodapé, com chamadas de notas usando letras colocadas como sobrescrito, em ordem alfabética: a, b, c, etc. Explique em notas de rodapé todas as abreviaturas sem padrão que forem utilizadas. Não use linhas horizontais e verticais internas.

**Figuras (fotografias, desenhos, gráficos):** Todas as figuras devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto. Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas. Figuras reproduzidas de outras fontes já publicadas devem indicar esta condição na legenda, assim como devem ser acompanhadas por carta de permissão do detentor dos direitos. Fotos não devem permitir a identificação do paciente. Figuras devem ser anexadas sob a forma de arquivos nos formatos .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida. Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões, em qualquer circunstância. Desenhos, fotografias ou quaisquer ilustrações que tenham sido digitalizadas por escaneamento devem ser convertidas a resolução gráfica superior a 300 dpi.

**Legendas das figuras:** Devem ser apresentadas em página separada. Quando usados símbolos, setas, números, ou outros elementos em partes das ilustrações, identificar e explicar

cada um claramente na legenda.

**Regras disponíveis em:** <http://aaai-asbai.org.br/conteudo.asp?cont=1>