
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA
E SAÚDE DA CRIANÇA

HELEN ZATTI

**IMPACTO DA PREMATURIDADE NO COMPRIMENTO
DOS TELÔMEROS EM CRIANÇAS**

Porto Alegre, 2015

HELEN ZATTI

**IMPACTO DA PREMATURIDADE NO COMPRIMENTO DOS
TELÔMEROS EM CRIANÇAS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de doutor em pediatria e saúde da criança pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Herbert Jones

Porto Alegre

2015

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Z38i Zatti, Helen

Impacto da prematuridade no comprimento dos telômeros em crianças.
/ Helen Zatti. Porto Alegre: PUCRS, 2015.

107 f.: il. tab. Inclui dois artigos científicos.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Herbert Jones.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Pediatria e Saúde da Criança.

1. NASCIMENTO PREMATURO. 2. RECÉM-NASCIDO DE MUITO BAIXO PESO. 3. TELÔMERO. 4. ENCURTAMENTO DO TELÔMERO. 5. CRIANÇA. 6. ESTUDO TRANSVERSAL CONTROLADO. I Jones, Marcus Herbert. II. Título.

CDD 618.920.11

CDU 616-053.2(043.2)

NLM WS 410

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201



1

2

ATA DE DEFESA DE TESE N° 048-P

3

4 Ao quinto dia do mês de março do ano de dois mil e quinze, no Programa de Pós-graduação em
5 Medicina/Pediatria e Saúde da Criança (Doutorado) da Pontifícia Universidade Católica do Rio
6 Grande do Sul o doutorando **Helen Zatti** apresentou a Tese de Doutorado intitulada
7 **“IMPACTO DA PREMATURIDADE NO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS EM**
8 **CRIANÇAS”**, sob a orientação do Professor Doutor Marcus Herbert Jones, em sessão pública, na
9 Sala de Aula do IPB, 2º andar do Hospital São Lucas da PUCRS. A Comissão Examinadora foi
10 presidida pelo Professor Doutor Marcus Herbert Jones e constituída pelos Professores: Drª Andréa
11 Lúcia Corso, Dr. Manuel Antonio Rutt kay Pereira e Dr. Leonardo Araújo Pinto. A sessão foi
12 aberta pelo Professor Doutor Renato Tetelbom Stein, Coordenador do Programa de Pós-
13 Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, que saudou aos presentes e, inicialmente,
14 deu ao doutorando as orientações sobre o processo de defesa de tese concedendo-lhe cinquenta
15 minutos para expor o trabalho. Após a exposição, a doutoranda foi arguida pelos componentes da
16 Comissão Examinadora, respondendo a cada examinador. Encerrada a arguição os examinadores
17 consideraram candidata **APROVADA COM VOTOS DE LOUVOR**. O presidente da banca
18 comunicou a aprovação do doutorando, encerrando a sessão pública de apresentação para constar,
19 lavrou-se esta ata que será assinada pelos integrantes da Comissão Examinadora, pelo professor
20 orientador, pelo Coordenador do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da
21 Criança, pela doutoranda e por mim, Carla Carmo de Melo Rothmann, secretária que a redigi.
22 Porto Alegre, 05 de março de 2015.

23

24

25

26

Profª. Drª. Andréa Lúcia Corso

27

28

29

Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

30

31

32

33

Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein
Coordenador

34

35

36

37

38

Srª. Carla Carmo de Melo Rothmann
Secretária

Prof. Dr. Manuel Antonio Rutt kay Pereira

Prof. Dr. Marcus Herbert Jones
Orientador

Helen Zatti
Doutoranda

AGRADECIMENTOS

Às crianças que participaram deste estudo e seus pais, todo o meu respeito e gratidão.

Ao Mauricio, meu esposo, amigo e companheiro, pelo apoio e paciência, e principalmente por me instigar a buscar sempre algo novo e melhor, muitas vezes acreditando em mim mais do que eu mesma.

À minha família, pelo apoio e participação efetiva na execução deste, e de todos os meus projetos. Em especial ao meu pai, pelo exemplo, carinho e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Herbert Jones, agradeço pela confiança que depositou em mim, pelo exemplo de competência como pesquisador e professor, e por sempre me mostrar caminhos novos.

À equipe do projeto PREMMIES, do qual este estudo faz parte. Às colegas Deise Schumann, Aline Dill Wink e Lissia Ana Basso. Aos bolsistas: Luíse Pezzin, Raisia Spanhol, Gabriela Chulla, Lucas Grun, Carol Torres e Amanda Quinteiro. Aos professores: Dr. Renato Tetelbom Stein e Dra. Adriane Xavier Arteche. Um agradecimento especial à professora Dra. Florencia María Barbé-Tuana, cuja disponibilidade e competência na análise dos telômeros possibilitaram a realização deste projeto.

À professora Dra. Rita Mattiello, que foi muito além de participar do projeto PREMMIES, me auxiliando em todas as etapas deste projeto, sempre com disponibilidade e competência, pela oportunidade de convívio e aprendizado.

À Carla Rothmann, sempre atenciosa e competente.

À Giovana dos Santos, pela amizade e alegria que fazem tudo mais leve, sempre disposta a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização de bolsa de pós-graduação.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, através do Programa de Apoio à Integração entre Áreas – PRAIAS, que disponibilizou recursos financeiros para a realização do projeto PREMMIES.

Aos colegas do Serviço de Perinatologia do Hospital Geral de Caxias do Sul, em especial o Dr. Breno Fauth de Araújo, por tudo o que aprendi no período em que lá trabalhei, e pela busca incessante por melhorar a qualidade de atendimento aos pacientes, que inspirou este projeto.

À Prefeitura Municipal de Caxias do Sul, em especial a colega Claudia Panno de Oliveira, por acreditar no projeto PREMMIES e na necessidade de seguimento diferenciado para os recém-nascidos prematuros.

Aos colegas plantonistas da UTI neonatal do Hospital Regional de São José e Hospital Universitário/UFSC, pelo carinho com que me receberam e pelo apoio, fundamental nos momentos que precisei priorizar este projeto.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o impacto da prematuridade no comprimento dos telômeros, um marcador de envelhecimento celular, em crianças nascidas com muito baixo peso.

Métodos: Realizou-se um estudo transversal controlado, avaliando 91 crianças entre 7 e 12 anos, sendo 46 ex-prematuros de muito baixo peso e 45 controles. A quantificação relativa do tamanho dos telômeros (T/S) foi realizada por reação de polimerase de cadeia (PCR) em leucócitos do sangue periférico. Foram obtidas informações sobre variáveis perinatais, condição socioeconômica e eventos de vida estressores. Na análise estatística, utilizou-se o modelo de regressão linear, tanto no modelo de análise univariada quanto multivariável.

Resultados: Não houve diferença significativa na razão T/S dos leucócitos entre as crianças prematuras e controles ($p=0,841$), mesmo após ajuste para possíveis variáveis preditoras. A análise univariada não mostrou associação estatisticamente significativa entre a razão T/S e sexo, idade, idade parental, tabagismo na gestação, escolaridade do cuidador e do chefe da família e eventos estressores ocorridos no último ano. Entre os prematuros, não houve relação entre a razão T/S e peso de nascimento abaixo de 1.000 g ($\beta=0,133$, $IC_{95\%}= -0,141$ a $0,406$; $p=0,341$), idade gestacional abaixo de 30 semanas ($\beta=0,030$, $IC_{95\%}= -0,209$ a $0,270$; $p=0,34$) ou displasia broncopulmonar ($\beta=0,213$, $IC_{95\%}= -0,166$ a $0,591$; $p=0,15$).

Conclusões: Os resultados indicam que não há relação entre nascimento prematuro ou muito baixo peso ao nascer e comprimento dos telômeros nos leucócitos na idade escolar. Entretanto, os achados precisam ser replicados, preferentemente em estudos longitudinais.

Palavras-chave: Nascimento prematuro. Recém-nascido de muito baixo peso. Telômero. Encurtamento do telômero. Criança.

ABSTRACT

Objective: Assess the impact of prematurity on telomere length, a cell aging marker, in children born with very low birth weight.

Methods: We conducted a controlled cross-sectional study evaluating 91 children between 7 and 12 years, been 46 former very low birth weight premature and 45 controls. The relative quantification of the size of telomeres (T/S) was performed by polymerase chain reaction (PCR) in peripheral blood leukocytes. Information on perinatal variables, socioeconomic status and stressful life events were obtained. The linear regression model was used for statistical analysis, both in univariate and multivariate analysis.

Results: There was no significant difference in the leukocyte T/S ratio among premature infants and controls ($p = 0.841$), even after adjustment for possible predictor variables. Univariate analysis showed no statistically significant association between T/S ratio and sex, age, parental age, smoking during pregnancy, education of the caregiver and the head of the family and stressful events that occurred last year. Among preterm infants, there was no relationship between the T/S ratio and birth weight below 1,000 g ($\beta=0.133$, 95% CI= -0.141 to 0.406; $p=0.341$), gestational age below 30 weeks ($\beta=0.030$, 95% CI= -0.209 to 0.270; $p=0.34$) or bronchopulmonary dysplasia ($\beta = 0.213$, 95% CI = -0.166 to 0.591; $p=0.15$).

Conclusions: The results indicate that there is no relationship between preterm birth or very low birth weight and the leukocyte telomere length at school age. However, the findings need to be replicated, preferably in longitudinal studies.

Keywords: Premature birth. Infant, very low birth weight. Telomere. Telomere shortening. Child.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

Figura 2.1 Flow Diagram of study selection.....38

CAPÍTULO III

Figura 3.1 Descrição da formação da amostra.....69

Figura 3.2 *Boxplot* mostrando a média da razão T/S dos leucócitos no grupo de crianças prematuras e no grupo controle.....72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 2.1 Characteristics of studies assessing the effect of psychosocial stress situations on telomere length	39
Table 2.2 Characteristics of studies evaluating the interference of health conditions on telomere length	41
eTable 2.1 Criteria used for quality assessment	47

CAPÍTULO III

Tabela 3.1 Comparação entre as crianças elegíveis e aquelas com avaliação do comprimento dos telômeros nos leucócitos	70
Tabela 3.2 Características da população estudada	71
Tabela 3.3 Relação entre as variáveis e a razão T/S nos leucócitos	73
Tabela 3.4 Relação das variáveis perinatais com a razão T/S nos leucócitos nos ex-prematuros	73

LISTA DE SIGLAS

ABEP	Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa
ART	<i>Antiretroviral therapy</i>
AZT	Zidovudine
Bp	<i>Base pairs</i>
BPD	<i>Bronchopulmonary dysplasia</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
DBP	Displasia broncopulmonar
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IQ	Intervalo interquartil
IUGR	<i>Intrauterine growth restriction</i>
Kb	Kilobases
LBW	<i>Low birth weight</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase de cadeia)
PIG	Pequeno para a idade gestacional
PROM	<i>Prelabor rupture of membranes</i>
Q-FISH	<i>Quantitative fluorescent in situ hybridization</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase de cadeia quantitativa)
RNMBP	Recém-nascidos de muito baixo peso
RPM	Ruptura prolongada de membranas
SD	<i>Standard deviation</i>
SE	<i>Standard error</i>

SGA	<i>Small-for-gestational-age</i>
SLES	<i>Stressful Life Events Schedule</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T/S	<i>Telomere signal/single copy signal</i>
TRF	<i>Terminal restriction fragments</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

Z38i Zatti, Helen	iii
109 f.: il. tab. Inclui dois artigos científicos.	iii
Orientador: Prof. Dr. Marcus Herbert Jones.	iii
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I.....	1
1. Apresentação	2
2 Justificativa.....	6
3 Objetivos	8
3.1 Objetivo principal	8
3.2 Objetivo secundário	8
4. Referências	9
CAPÍTULO II.....	13
ARTIGO DE REVISÃO.....	14
Abstract.....	15
Introduction	17
Methods	18
Results	20
Discussion.....	25
Conclusions.....	30
References.....	30
CAPÍTULO III.....	48

ARTIGO ORIGINAL	49
Resumo.....	50
Summary.....	51
Introdução	52
Métodos	54
Informações sobre o período neonatal:.....	55
Histórico de saúde e condições socioeconômicas:	56
Eventos de vida estressores	56
Medida do comprimento dos telômeros	56
Análise estatística.....	57
Resultados:	58
Discussão	59
Referências:	64
CAPÍTULO IV	74
CONCLUSÕES	75
APÊNDICES	76
Apêndice A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	77
Apêndice B – Termo de consentimento livre e esclarecido	80
Apêndice C – Termo de assentimento.....	86
Apêndice D – Informações do período neonatal.....	87
Apêndice E – Condições de Saúde e Socioeconômicas	89
Apêndice F - Escala de Eventos Estressores de Vida	104

CAPÍTULO I

Apresentação

1. Apresentação

Os telômeros são complexos DNA-proteína, encontrados nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, que regulam a capacidade replicativa das células, previnem a perda de material genético durante a replicação celular e evitam a fusão entre os cromossomos. Nos humanos são constituídos por uma sequência de 6 nucleotídeos (TTAGGG) repetida várias vezes. [1] Possuem proteínas específicas associadas, de forma a proteger e caracterizar as extremidades cromossômicas, diferenciando-os das quebras cromossômicas, para que não sejam reconhecidos pelo sistema de reparo do DNA, evitando a recombinação ou fusão com extremidades de outros cromossomos. [2] Os telômeros encurtam progressivamente com a divisão celular, pois a DNA polimerase não pode replicar os cromossomos completamente, e uma pequena porção do telômero deixa de ser replicada a cada divisão. Neste caso, o telômero é um mecanismo que impede a replicação incompleta do genoma. Se os telômeros ficam criticamente curtos, passam a ser ineficientes na proteção dos cromossomos, podendo resultar em fusão dos cromossomos e morte celular por apoptose. [3]

Existem mecanismos para compensar o encurtamento dos telômeros, principalmente a enzima telomerase, que em alguns contextos pode repor os pares de bases que são perdidos na replicação do DNA. [4] Em geral, a telomerase tem atividade diminuída ou mesmo ausente na maioria das células adultas, mantendo atividade significativa apenas nas células germinativas e nas células tronco. Possíveis razões para esta baixa atividade da telomerase incluem a possibilidade de que o encurtamento dos telômeros seja um mecanismo protetor contra o surgimento dos tumores, ao limitar o potencial replicativo das células. Outra explicação é que os telômeros funcionariam como um “relógio biológico”, limitando o tempo de vida dos organismos. [1] Entretanto, alguns estudos de intervenção, de tamanho limitado, indicam a

Apresentação

possibilidade de aumento significativo da atividade da telomerase após introdução de mudanças positivas no estilo de vida, [5] melhora do sofrimento psíquico e da saúde alimentar, [6] e prática de meditação. [7]

O acúmulo de telômeros curtos, com o avanço da idade e exposição a fatores que causam erosão, pode contribuir para o processo de envelhecimento e o surgimento de doenças. Estudos indicam associação entre menor comprimento dos telômeros dos leucócitos e doença cardiovascular, [8, 9] doença pulmonar obstrutiva crônica, [10] demência, [11] diversos tipos de câncer [12] e doenças autoimunes,[13] entre outras. Além disso, há evidências de que mutações nos genes de manutenção dos telômeros, e consequente disfunção desses, estejam associadas a envelhecimento prematuro em doenças genéticas degenerativas raras, que passaram a ser chamadas de “Síndromes dos telômeros”. [1] Conquanto os achados ainda necessitem confirmação, há estudos relacionando maior comprimento dos telômeros à longevidade [14, 15] e ao número de anos de vida saudável. [16, 17]

O comprimento dos telômeros depende do comprimento no nascimento, com influência genética, e da magnitude da erosão dos telômeros desde então. Por sua vez, a erosão dos telômeros depende da taxa de replicação celular, da exposição cumulativa a agentes que danificam o DNA (como inflamação e estresse oxidativo) e da atividade da telomerase. [18] É crescente e significativo o número de estudos relacionando doenças ou situações de vida adversas com erosão dos telômeros. Entre essas, encontram-se: tabagismo, [19] obesidade, [20] exposição à poluição ambiental [21, 22] e situações de estresse psicológico. [23-25] Na infância, demonstrou-se relação com: baixo nível socioeconômico, [26] exposição a estresse psicológico [27] e à violência, [28] entre outros. Também há estudos demonstrando a relação com eventos adversos durante a gestação. [29-31] Estas evidências geraram a hipótese de que eventos no início da vida podem causar alteração persistente no comprimento dos telômeros, aumentando o risco de doenças na vida adulta. [28] Por outro lado, redução do estresse, exercício, nutrição e sono adequados

Apresentação

estão relacionados com telômeros mais longos, sugerindo a possibilidade de intervenções. [32]

Embora a manifestação de doenças relacionadas com a idade ocorra principalmente na velhice, o processo de envelhecimento, a nível celular, ocorre ao longo da vida, desde o nascimento. [33] O conhecimento das situações relacionadas à erosão mais rápida dos telômeros em crianças pode contribuir para que se desenvolvam de estratégias de prevenção e intervenção precoce, que poderiam amenizar a aceleração no processo de envelhecimento. Nesse contexto, o capítulo II desta tese apresenta um artigo de revisão sistemática da literatura, sobre os fatores relacionados à erosão telômeros em crianças. O capítulo II será apresentado em inglês.

Teoricamente, qualquer situação que gere inflamação crônica e/ou estresse oxidativo pode gerar erosão dos telômeros. [34] A prematuridade pode ser consequência de situações de estresse fetal, e complicações no período neonatal associadas à infecção e à inflamação são frequentes. [35] Além disso, a prematuridade está associada a aumento da produção de radicais livres e a menor disponibilidade de antioxidantes, tanto que o estresse oxidativo está implicado na fisiopatologia de diversas doenças no recém-nascido prematuro, como displasia broncopulmonar, leucomalácia periventricular e retinopatia da prematuridade. [36, 37]

Diversas evidências sugerem que um estímulo ambiental aplicado durante o período crítico de desenvolvimento, pode ter efeito subsequente sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos, influenciando a saúde e susceptibilidade a doenças, fenômeno este conhecido como programação. [38] Foi proposto, por Entringer e colaboradores, que a biologia dos telômeros (incluindo os telômeros e a atividade da telomerase) possa representar um dos mecanismos conectando a programação fetal e os resultados de saúde subsequentes. [39] Embora os autores discutam a influência do estresse psicológico, o estresse relacionado à prematuridade poderia desempenhar papel semelhante, uma vez que, quando adultos, ex-prematuros tem maior

Apresentação

risco de doenças relacionadas ao envelhecimento, como hipertensão, alterações de lipídios no sangue, intolerância à glicose e doença cardiovascular. [40-44]

Considerando que tanto fatores de risco para erosão dos telômeros quanto complicações que podem estar associadas ao acúmulo de telômeros curtos estão presentes nos prematuros, formulou-se a hipótese de que a prematuridade esteja associada a encurtamento dos telômeros. Se confirmada a hipótese, o comprimento dos telômeros poderia ser um biomarcador objetivo do dano causado pelo nascimento prematuro, identificando os ex-prematuros de maior risco e, se as alterações forem persistentes, um marcador prognóstico associado a risco na idade adulta.

Tendo em vista o exposto acima, foi proposto um estudo original avaliando o impacto da prematuridade em crianças em idade escolar, que será apresentado no capítulo III desta tese. As conclusões desse estudo serão ressaltadas no capítulo IV.

2 Justificativa

O aumento do número de nascimentos prematuros, bem como da sua sobrevivência, [45, 46] gera uma população crescente de adultos que nasceram prematuramente. Embora as taxas de sobrevivência tenham melhorado nas últimas décadas, permanece o risco de desenvolvimento de uma grande variedade de complicações, principalmente em recém-nascidos de muito baixo peso e de extremo baixo peso. Na infância, há associação com alteração do desenvolvimento neurológico e problemas de saúde recorrentes, incluindo maior morbidade respiratória e problemas de comportamento. [46] Quando adultos, ex-prematuros tem maior risco de doenças relacionadas ao envelhecimento, como hipertensão, alterações de lipídios no sangue, intolerância à glicose e doença cardiovascular. [40-44] A identificação de morbidades em ex-prematuros muitas vezes é tardia, e depende de um seguimento cuidadoso e oneroso. Embora fatores perinatais possam indicar risco, não se identificou, até o momento, um marcador objetivo que indique o risco de complicações.

Um número crescente de pesquisas destaca o papel que a erosão dos telômeros das células imunológicas desempenha na patogênese de doenças relacionadas ao envelhecimento. [47] Os telômeros ficam mais curtos com o avançar da idade, e este encurtamento pode ser acelerado em situações que gerem estresse oxidativo e inflamação, [48, 49] fatores esses frequentemente presentes nos prematuros. Não existem estudos publicados avaliando a relação entre o comprimento dos telômeros e prematuridade em crianças. O tema foi avaliado em dois estudos piloto, não publicados, com resultados conflitantes. [50, 51] Um estudo em adultos avaliou a relação entre comprimento dos telômeros e fatores perinatais, não encontrando associação com peso de nascimento ou idade gestacional. [52]

Justificativa

Caso seja comprovada a associação entre prematuridade e erosão dos telômeros, os telômeros podem ser marcador do dano biológico em prematuros, com potencial de permitir o acompanhamento do resultado de intervenções.

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Avaliar o impacto da prematuridade no comprimento dos telômeros, na idade escolar, em prematuros de muito baixo peso.

3.2 Objetivo secundário

Avaliar a associação entre o comprimento dos telômeros, na idade escolar, e variáveis perinatais em recém-nascidos de muito baixo peso.

Referências

4. Referências

1. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 2012;13(10):693-704.
 2. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol* 2012;41(5):1561-9.
 3. Zakian VA. Telomeres: the beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Exp Cell Res* 2012;318(12):1456-60.
 4. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 2006;12(10):1133-8.
 5. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* 2008;9(11):1048-57.
 6. Daubenmier J, Lin J, Blackburn E, Hecht FM, Kristeller J, Maninger N, et al. Changes in stress, eating, and metabolic factors are related to changes in telomerase activity in a randomized mindfulness intervention pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 2011;37(7):917-28.
 7. Lavretsky H, Epel ES, Siddarth P, Nazarian N, Cyr NS, Khalsa DS, et al. A pilot study of yogic meditation for family dementia caregivers with depressive symptoms: effects on mental health, cognition, and telomerase activity. *Int J Geriatr Psychiatry* 2012;28(1):57-65.
 8. Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(5):842-6.
 9. Saliques S, Zeller M, Lorin J, Lorgis L, Teyssier JR, Cottin Y, et al. Telomere length and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis* 2010;103(8-9):454-9.
 10. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179(7):566-71.
 11. Honig LS, Kang MS, Schupf N, Lee JH, Mayeux R. Association of shorter leukocyte telomere repeat length with dementia and mortality. *Arch Neurol* 2012;69(10):1332-9.
 12. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, Dunning AM, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2011;6(6):e20466.
-

Referências

13. Hohensinner PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. *Aging Dis* 2011;2(6):524-37.
 14. Bakaysa SL, Mucci LA, Slagboom PE, Boomsma DI, McClearn GE, Johansson B, et al. Telomere length predicts survival independent of genetic influences. *Aging Cell* 2007;6(6):769-74.
 15. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003;361(9355):393-5.
 16. Njajou OT, Hsueh WC, Blackburn EH, Newman AB, Wu SH, Li R, et al. Association between telomere length, specific causes of death, and years of healthy life in health, aging, and body composition, a population-based cohort study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64(8):860-4.
 17. Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, et al. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107 Suppl 1:1710-7.
 18. Shalev I, Entringer S, Wadhwa PD, Wolkowitz OM, Puterman E, Lin J, et al. Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology* 2013;38(9):1835-42.
 19. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005;366(9486):662-4.
 20. Zannolli R, Mohn A, Buoni S, Pietrobelli A, Messina M, Chiarelli F, et al. Telomere length and obesity. *Acta Paediatr* 2008;97(7):952-4.
 21. Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, et al. Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environ Health* 2009;8:41.
 22. McCracken J, Baccarelli A, Hoxha M, Dioni L, Melly S, Coull B, et al. Annual ambient black carbon associated with shorter telomeres in elderly men: Veterans Affairs Normative Aging Study. *Environ Health Perspect* 2010;118(11):1564-70.
 23. O'Donovan A, Epel E, Lin J, Wolkowitz O, Cohen B, Maguen S, et al. Childhood trauma associated with short leukocyte telomere length in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2011;70(5):465-71.
 24. O'Donovan A, Tomiyama AJ, Lin J, Puterman E, Adler NE, Kemeny M, et al. Stress appraisals and cellular aging: a key role for anticipatory threat in the relationship between psychological stress and telomere length. *Brain Behav Immun* 2012;26(4):573-9.
-

Referências

25. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(49):17312-5.
 26. Needham BL, Fernandez JR, Lin J, Epel ES, Blackburn EH. Socioeconomic status and cell aging in children. *Soc Sci Med* 2012;74(12):1948-51.
 27. Drury SS, Theall K, Gleason MM, Smyke AT, De Vivo I, Wong JYY, et al. Telomere length and early severe social deprivation: linking early adversity and cellular aging. *Mol Psychiatry* 2012;17(7):719-27.
 28. Shalev I, Moffitt TE, Sugden K, Williams B, Houts RM, Danese A, et al. Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. *Mol Psychiatry* 2013;18(5):576-81.
 29. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS One* 2012;7(2):e31136.
 30. Entringer S, Epel ES, Lin J, Buss C, Shahbaba B, Blackburn EH, et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208(2):134 e1-7.
 31. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(33):E513-8.
 32. Epel E. How "reversible" is telomeric aging? *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5(10):1163-8.
 33. Shalev I. Early life stress and telomere length: investigating the connection and possible mechanisms: a critical survey of the evidence base, research methodology and basic biology. *Bioessays* 2012;34(11):943-52.
 34. Aviv A. Telomeres and human aging: facts and fibs. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004;2004(51):pe43.
 35. Procianoy RS, Silveira RC. Association between high cytokine levels with white matter injury in preterm infants with sepsis. *Pediatr Crit Care Med*;13(2):183-7.
 36. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15(4):191-5.
 37. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res* 2009;66(2):121-7.
 38. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 2001;4(2B):611-24.
 39. Entringer S, Buss C, Wadhwa PD. Prenatal stress, telomere biology, and fetal programming of health and disease risk. *Sci Signal* 2012;5(248):pt12.
-

Referências

40. de Jong F, Monuteaux MC, van Elburg RM, Gillman MW, Belfort MB. Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension* 2012;59(2):226-34.
 41. Parkinson JR, Hyde MJ, Gale C, Santhakumaran S, Modi N. Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* 2013;131(4):e1240-63.
 42. Tinnion R, Gillone J, Cheetham T, Embleton N. Preterm birth and subsequent insulin sensitivity: a systematic review. *Arch Dis Child* 2014;99(4):362-8.
 43. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2(8663):577-80.
 44. Kerkhof GF, Breukhoven PE, Leunissen RW, Willemsen RH, Hokken-Koelega AC. Does preterm birth influence cardiovascular risk in early adulthood? *J Pediatr* 2012;161(3):390-6 e1.
 45. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371(9606):75-84.
 46. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet* 2008;371(9608):261-9.
 47. Puterman E, Epel E. An intricate dance: Life experience, multisystem resiliency, and rate of telomere decline throughout the lifespan. *Soc Personal Psychol Compass* 2012;6(11):807-25.
 48. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008;44(3):235-46.
 49. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 2010;464(7288):520-8.
 50. Henckel E, Svenson U, Osterman P, Roos G, Bohlin K. Telomere length in preterm babies and infants with bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatrica* 2009;98:276-7.
 51. Henckel E, Brostrom EB, Hedlin G, Roos G, Bohlin K. Prematurity and lung function in relation to telomere length and inflammation in 10-year old children. *Pediatr Res* 2011;70:136-.
 52. Kajantie E, Pietilainen KH, Wehkalampi K, Kananen L, Raikonen K, Rissanen A, et al. No association between body size at birth and leucocyte telomere length in adult life--evidence from three cohort studies. *Int J Epidemiol* 2012;41(5):1400-8.
-

CAPÍTULO II

ARTIGO DE REVISÃO

***Factors associated with telomere shortening in
children: a systematic review.***

O artigo será submetido para publicação no periódico JAMA Pediatrics.

Abstract

Importance: Telomere length declines with cell replication, as a natural part of aging. This shortening can be accelerated by conditions as oxidative stress and inflammation and is associated with the onset of diseases, like cancer, cardiovascular and auto-immune diseases.

Objective: To synthesize and critically assess the publications about the factors related to telomere shortening in children.

Evidence Review: We searched the following databases: MEDLINE, EMBASE, Web of Science, SciELO, PsycINFO and CINAHL, until January 2014. We also searched reference lists of the included articles and review articles, congress abstracts were also included. We included original articles dealing with factors associated with telomere shortening in children. We defined the following as exclusion criteria: (A) experimental models, case reports, cases series, reviews, responses and editorials; (B) studies assessing consequences of telomere shortening or chromosome anomalies directly related to telomere length; (C) duplicated publications or additional studies of already included studies. Two reviewers, working independently, screened all titles and abstracts, studies were selected for full text reading according to inclusion criteria previously established. For quality assessment, the following factors were verified: Participants representative of the population; clear and appropriate inclusion and exclusion criteria; sample size; appropriate measuring method of the variables; appropriate statistical analysis; adjustment for the main confusion factors; design.

Findings: From a total of 4,433 articles identified, 37 were included in this review. The literature shows that there is an association between telomere erosion and psychosocial stress. The assessed studies indicate that there is no association between telomere length and intrauterine growth restriction and exposure to HIV and antiretroviral therapy. Evidence is inconclusive regarding obesity, premature delivery and exposure to tobacco.

Artigo de Revisão

Conclusions and Relevance: More studies are necessary in order to better understand the factors associated with telomere shortening in children and its relation to different conditions. There is a need of evidences based on longitudinal studies, larger samples and, in some situations, interventions assessment.

Introduction

Telomeres are structures located at the ends of the chromosomes which consist of a sequence of DNA (TTAGGG) repeated several times, and a set of associated proteins. Telomeres are necessary for the adequate replication of DNA and the maintenance of chromosome stability. Telomere length progressively diminishes during successive cycles of cellular division, reaching a size that makes them inefficient at protecting chromosome ends, resulting in fusion of chromosomes and apoptotic cellular death. These events are part of a phenomenon of cellular senescence, one that is associated with the emergence of several pathologies. [1] Studies demonstrate an association among leukocyte telomere shortening and cardiovascular disease,[2, 3] chronic obstructive pulmonary disease, [4] susceptibility to pulmonary emphysema in smokers,[5] several types of cancer [6] and auto-immune diseases.[7] Hence, telomere length might be a better representative of the functional state than chronological age.

One of the main mechanisms involved in telomere shortening is oxidative stress,[8] which may induce premature telomere shortening. Among the situations related to premature telomere shortening are: smoking,[9] obesity[10] and exposure to environmental pollution.[11, 12] Moreover, association with situations of psychological stress have been described,[13, 14] suggesting that telomere shortening is a potential mechanism to explain the relation between psychosocial stress and the emergence of diseases.[15, 16] On the other hand, telomeres may be lengthened by enzymes denominated telomerases. Telomerase activity, however, is diminished or even absent in most adult cells. Nevertheless, Ornish et al. assessed adults before and 3 months after the introduction of positive changes in their life style, demonstrating a significant increase in telomerase activity.[17]

Studies in children have also demonstrated an association between telomere shortening and exposure to adverse situations such as obesity,[18]

Artigo de Revisão

low socioeconomic level[19] as well as exposure to psychological stress.[20] Shalev et al. assessed children at the ages of 5 and of 10 exposed to violence, finding persistence on the alteration in the telomere length,[21] suggesting that events in early life could cause persistent alteration, thus increasing the risk of diseases in adulthood. Moreover, it has been demonstrated that adverse events in gestation, leading to intra-uterus stress, might be associated to the erosion of telomeres in the fetus as well as in the newborn,[22, 23] which might persist until adult life.[24]

The number of studies trying to assess whether there is a relation between different situations and/or pathologies and the telomere shortening is growing and significant. Although most of the studies are in adults, several authors evaluated the possibility that adverse situations occurring during pregnancy or in the first years of life can cause telomere shortening detectable in childhood. In general, these studies have assessed a small number of children, which makes the assessment of combined results important.

Early telomere shortening might be an objective measure of the impact of adversity in the children's health, as it is considered a biomarker of cellular aging, and it might be associated to the early emergence of diseases. Therefore, the aim of this systematic review is to critically assess and summarize publications about the factors related to telomere shortening in children.

Methods

The protocol of this review was registered on PROSPERO database (record number CRD42014010643) and, to report our results, we followed the PRISMA Statement 2009.[25]

Artigo de Revisão

Search strategy and selection criteria

A search was carried out in the following databases from inception to January 2014: MEDLINE, EMBASE, Web of Science, SciELO, PsycINFO and CINAHL. We have also searched the grey literature, discussed the subject with leading experts in the field, and searched reference lists of other recent systematic reviews.

The search was performed using the following combination of terms: telomer* AND (infant [Mesh] OR infants OR “child, preschool” [Mesh] OR “preschool child” OR “children, preschool” OR “preschool children” OR “infant, newborn” [Mesh] OR “infants, newborn” OR “newborn infant” OR “newborn infants” OR newborns OR newborn OR neonate OR neonates).

Two reviewers, working independently, screened all titles and abstracts to identify studies that could meet inclusion criteria, or that could not be safely excluded without assessing its full text. Initially, titles and abstracts were analyzed in an independent way and, subsequently, studies were selected for full text reading according to inclusion criteria previously established. Divergences were solved by consensus and when still discordant, a third reviewer served as a judge.

Eligibility criteria

We included observational studies as well as interventions (randomized or not randomized clinical trials), which assess the correlation among determining, correlated and/or risk factors, and early telomere shortening in children, with ages ranging from 0 to 18. We defined the following as exclusion criteria: (A) experimental models, case reports, cases series, reviews, responses and editorials; (B) studies assessing consequences of telomere shortening or chromosome anomalies directly related to telomere length; (C) duplicated publications or additional studies of already included studies.

Artigo de Revisão

Data extraction

From each of the selected studies, the following variable data was extracted: characteristics of the study (country, period, design, sample size, age of the participants), assessed factors (variables of the exposure and outcomes), statistical analysis, results, and controlled confusion factors.

Analysis of risk of bias

To test for possible bias in each of the selected studies, the following factors were verified: a) Participants representative of the population; b) Clear and appropriate inclusion and exclusion criteria; c) Sample size; d) Appropriate measuring method of the variables; e) Appropriate statistical analysis; f) Adjustment for the main confusion factors; g) Design. For each factor, the following grades were attributed: 0 if not reached, 0,5 if partly reached and 1 if totally reached, in a way that the total score may vary from 0 to 7. The criteria utilized to assess each item are available on eTable 2.1 of the online supplement.

Results

Figure 2.1 displays the flow diagram of our search strategy and study selection used on our systematic review. From a total of 4,433 articles identified, 37 were included in this review. Two main groups of studies were identified: 7 studies assessing the interference of psychosocial stress situations on telomere length (Table 2.1), and 30 studies assessing the relation with health conditions (Table 2.2). The results of the selected articles are presented henceforth in more detail and they are grouped according to topics.

Psychosocial Stress

The studies which assess the influence of stress generated by environmental factors on telomere length in children were included. Most of the

Artigo de Revisão

studies were conducted in the United States, and assessed adverse situations in the first years of life. All the identified studies used quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to assess telomere length. Most of the studies assessed telomeres in buccal cells,[20, 21, 27, 28] one in the saliva,[26] and two in the blood (in leukocytes[19] and mononuclear cells[23]).

In the only longitudinal study assessing environmental conditions and its relation with the T/S ratio, the exposure to violence in childhood was assessed at 5 and at 10 years of age.[21] Three types of violence were analyzed: domestic violence between the mother and her partner, frequent bullying and physical maltreatment by an adult. A significant decline was observed in T/S ratio between the ages of 5 and 10, as expected. Children exposed to two or more types of violence presented significantly greater erosion of telomeres between the two verifications, when compared to those who were not exposed or were exposed to one type of violence ($p=0.015$).

Asok et al. assessed the role of parental responsiveness, characterized by synchronous interactions with the child, in buffering the damage to telomeres caused by early-life stress in children.[28] The authors evaluated 38 children at low risk and 51 children at risk, who were living with their parents and were being watched due to a suspicion of maltreatment, including negligence, domestic violence, parents' drug addiction, among others. Telomere length was shorter in the group of high risk children ($p<0.05$). There was a positive association between responsiveness from the parents and telomere length in children of high risk ($p<0.05$), but not among the ones in low risk, suggesting that parental responsiveness may neutralize the environmental stress suffered.

Pre-natal tobacco exposure:

In two of the three studies which assessed prenatal exposure to tobacco, a reduction in telomere length was found. Theall et al.[29] assessed 104 children, considering that 19 were exposed to tobacco in the pre-natal period, and found a reduction in telomere length in the saliva of the exposed children. Rodriguez et al. found a similar result assessing telomere length in leukocytes.[31] On the

Artigo de Revisão

other hand, Almanzar et al. assessed 169 newborns and found telomeres of lymphocytes longer among the 58 newborns of mothers who smoked during gestation.[30] This study was designed to assess subpopulations of lymphocytes in newborns of smoking mothers, and other expected results, such as the increase of cytokines and alterations in the proportions of subpopulations of lymphocytes, were not found either.

Maternal smoking in gestation was assessed as a secondary outcome by some authors. There was no correlation in newborns in a study which assessed the impact of the intrauterine growth restriction,[40] and in adolescents of 17 years of age.[54] Nevertheless, Imam et al., in a study about HIV and antiretroviral therapy, reported an association between telomere shortening and maternal smoking and the use of illicit drugs.[33]

Human immunodeficiency virus (HIV) and antiretroviral therapy:

Three publications assessed the relation between infection and exposure to HIV in gestation, as well as exposure to antiretroviral therapy (ART), and telomere length in children. In none of the studies, a significant difference was found in the telomere length in the groups with infection or exposure to HIV or in those that received ART.[32-34] Poirier et al. assessed the size of telomeres at birth and again at age one, also without any difference among the groups.[34] In the analysis of the secondary factors, one of the studies found shorter telomeres in HIV positive children with detectable viral load, suggesting that not controlled viremia could be associated to telomere shortening.[32]

Obesity

Among the studies assessing the relation of telomere length and obesity in children, the results were inconsistent. In France, Buxton et al. found telomeres significantly shorter in a group of 471 obese children of 2 to 17 years of age, when compared to 322 non obese controls.[18] Another study, assessing a smaller sample, found a relation only in children of the male sex.[36] On the other hand, in other three studies there was not any relation with obesity[10, 35]

Artigo de Revisão

or adiposity[37] in children, although the first one has demonstrated an inverse correlation in adults. In the study of Masi et al [35], there was no relation among the size of telomeres and dyslipidemia, resistance to insulin and hypertension in adolescents, but there was an inverse relation with the levels of inflammatory biomarkers (reactive protein C and fibrinogen).

Intrauterine growth restriction

With the goal of assessing the impact of intrauterine growth restriction (IUGR) in telomere shortening, three studies compared newborns with low weight for gestational age with a group of adequate weight. The studies differed in relation to the cut-off point to consider the newborns small for the gestational age, having included the newborns below percentile 3 in a study,[40] below percentile 5 in another,[38] and below percentile 10 in the curve of weight for gestational age in the third.[39] Moreover, one of the studies included only cases of IUGR of idiopathic origin.[38] Even though the samples have been small, the results were similar; there was not a significant difference in telomere length in the blood from the umbilical cord between newborns of low and adequate weight for the gestational age. A similar result was reported by Okuda et al., who analyzed the matter with a secondary outcome.[50]

Another study assessed full-term newborns and compared those of low weight (weight lower than 2500 g at birth) with a group of adequate birth weight.[41] At the age of 5, children born with low weight presented shorter telomeres. It should be noted, however, that assessed children was from a rural area of Bangladesh, where maternal malnutrition is the main cause of low weight at birth.

Prematurity

Holmes et al. followed fetuses (n=8) for 8 to 12 weeks, during the gestational period of 23 to 36 weeks, and premature newborns (n=5), with equivalent gestational ages.[43] During the follow-up, the fetuses presented an increase or no alteration in telomere length. Among the premature newborns,

Artigo de Revisão

however, there was a decrease with an average loss of 231 bp/week. This value is similar to the one reported by Friedrich et al., who reported an average loss of 238 bp/week in newborns, in a transversal study, and did not find a significant difference in telomere length between premature and full-term infants.[42] On the other hand, Menon et al. found bigger telomeres in leukocytes from the umbilical cord in premature compared to full-term newborns.[22] The relation with the gestational age was reported as a secondary outcome by some of the authors, who did not find an association with telomere length in newborn infants; nevertheless, these studies were not designed to assess this outcome.[50, 51]

Two pilot studies, published as abstracts in proceedings of congresses, assessed the possibility of telomere erosion associated to prematurity and bronchopulmonary dysplasia (BPD), but they were never published in peer-reviewed journals. At the first one, including a total of 22 infants, there was not any difference in telomere length among ex-preterm infants with BPD at term age, and full-term newborns.[44] Nevertheless, the same group assessed 23 children born prematurely with a history of BPD at 10 years of age, and found smaller telomeres in relation to a group of 19 asthmatic children who were full-term born.[45]

Parental influence

Two studies assessed the correlation between the telomere length of children and their progenitors,[46, 47] and demonstrated a positive correlation with the size of the paternal telomere. The maternal telomere length presented a weaker correlation in a study[47] and a correlation solely with the descendants of the feminine sex in another.[46] This relation was assessed as a secondary outcome in some studies. Okuda et al. found a weak positive correlation, nevertheless statistically significant ($r = 0.18$, $p = 0.02$), between telomere length in the newborn and maternal age.[50] Other authors did not find an association with the parental age in new-born infants [51] and those of 17 years of age.[54]

Artigo de Revisão

Age

Zeichner et al. accompanied 9 children, offspring of HIV positive mothers who were not infected, and assessed the telomere length in multiple blood samples over the three first years of life.[48] The average rate of telomere shortening was of 270 bp/year, higher than the one verified in two adults accompanied by the authors (49 bp/year) and also than described in literature for adults (32 to 45 bp/year in longitudinal studies).[56] A rate of telomere shortening even faster, above 1,000 bp/year, was described by Frenk Jr. et al., who assessed ten children of 5 and 48 months.[49] In this case, however, the data was obtained from the comparison among the cases, with only one sample from each child. Based on these data, and also on the assessment of 75 people from 12 families and of different ages, the authors concluded that rate of telomere shortening varies according to age. They suggest that there is a phase of rapid decline from birth to 4 years of age, followed by a phase of probable stability until the early adulthood, and by a final phase of gradual decline of telomere length associated with advancement of age.[49]

Sex

The influence of sex on telomere length was assessed by a North-American group, who did not find an association in newborns.[50] As a secondary outcome, sex was assessed by several authors, most of them did not find an association in newborns[40] and in children with ages between 2 and 17 years old.[18, 20, 36, 54] On the other hand, some studies report shorter telomeres in the male sex in adolescents [35, 37] and in children from 0 to 19 years of age.[32]

Discussion

Studies indicate that telomere length may be a strong determinant of early onset of diseases related to aging, and that it is related to experiences in early life.[57] As far as we know, this is the first systematic review of literature which assessed studies on factors related telomere erosion in children. Considering

Artigo de Revisão

the possibility that the intervention on factors which lead to telomere erosion may increase healthy years of life of the individual, we endeavored to carry out a broad assessment of all studies available until the moment, providing pediatricians with an overview of the factors that can cause telomere shortening in children. We consider the review of several sources of data and the inclusion of studies published in Proceeding of Congresses as positive aspects. Nevertheless, it was not possible to make contact with the authors, thus limiting the available information about the studies which had only the abstract published. It was not possible to do a meta-analysis of the results, as there were few studies about each factor, and there was not uniformity in relation to the technique utilized to assess the telomeres and cell analyzed, besides the differences in the studied populations (age, cut-off point, definition of study group).

The method utilized to assess telomere length varied among the studies analyzed. The most used methods were Southern Blot, and qPCR. Southern Blot measures TRF (terminal restriction fragments), and is considered the gold standard. Nevertheless, the existence of many variations in the method, and the fact the subtelomeric region (of variable length) is measured as well, must be considered. Requirement of large amounts of genetic material may be a major drawback in studies in children. qPCR has little accuracy for comparisons and small variations, but it is useful in the comparison of tendencies among groups. This technique is faster and cheaper than Southern Blot and requires small amount of DNA, but can show substantial variability across laboratories. Q-FISH and STELA techniques are useful to detect variations of telomere length in a short period and to assess telomere length in a specific chromosome, but applicable only in the analysis of a small number of samples.[58, 59]

Among the studies included in this review, some analyze telomeres in the blood (total blood, leukocytes, lymphocytes), while others use saliva or buccal cells. A study in adults with Alzheimer did not find a correlation between telomere length in buccal cells and leukocytes,[60] whereas a positive

Artigo de Revisão

correlation was reported in patients with inherited bone marrow failure syndromes.[61] The measure of telomeres in buccal cells is being utilized in studies with children, as it is a less invasive method, and the results demonstrate an association between erosion of telomeres and psychosocial stress.[20, 21, 27, 28] Nevertheless, there is not data from large studies confirming the correlation among the measure in different cellular types and mostly studies in adults, indicating negative outcomes associated with telomere shortening, evaluated leukocytes or peripheral blood. [62]

Psychosocial stress: Studies in adults demonstrate a negative impact of psychosocial stress on telomeres, in mothers caring for a chronically ill child,[15] in caregivers of Alzheimer's disease patients[16] and in women who take care of their partners with dementia.[63] Erosion of telomeres in women victims of violence by their partner[64] and chronic pain associated to stress were also reported,[65] among others. Moreover, there are studies linking to early stress with telomere shortening in adults, who suffered maltreatment in childhood,[66] and who reported a greater number of adverse events in childhood,[67-69] even though some studies have not demonstrated an association.[70]

Recent studies assessed whether the impact of stress on telomeres can be detected in childhood, most of them with positive results, as it can be seen at Table 2.1. Although with a smaller sample than in the studies in adults, there was an association with institutionalization time, and exposure to 2 or more kinds of violence, suggesting a dose-dependent effect.[20, 21, 23] In addition, the stress suffered in fetal life was also assessed, detecting erosion of telomeres in children[23] and in adults as well.[24] An important consideration about the studies in children is that was only one prospective longitudinal study, with a test at 5 and again at 10 years of age.[21] Further studies with longitudinal follow up will improve the understanding of telomere behavior in children and its response to different situations.

Artigo de Revisão

The only study on the influence of parents' behavior concluded that parental responsiveness might be damage protective among high-risk children.[28] This result needs to be replicated, but it would indicate an intervention possibility.

Pre-natal tobacco exposure: Studies in adults demonstrate an inverse and dose-dependent relation between the size of telomeres and smoking.[9, 71] In children, the studies have conflicting results. They assessed different cellular populations (saliva, lymphocytes, leukocytes) and age ranges (newborn, infants and children between 4 and 14 years of age) and a small number of children exposed to tobacco. The available evidence does not allow conclude whether prenatal tobacco exposure affects telomere length in children.

HIV and antiretroviral therapy: Studies in HIV-infected adults showed early telomere shortening, probably secondary to inflammation and chronic activation of the immune system.[72, 73] Moreover, telomerase is a reverse transcriptase, with similarities with HIV reverse transcriptase, and ART can cause inhibition of telomerase in vitro.[74] There are reports of telomere shortening in mice with transplacental exposure to Zidovudine (AZT)[75] and in monkeys exposed to AZT associated to Lamivudina (3TC).[76] The studies carried out in newborns and children, however, do not demonstrate an alteration on telomere length in children of HIV positive mothers or after exposure to ART.[32-34] In the only study which included a group of HIV infected children,[32] an inverted relation with viral load was observed, nevertheless the result needs to be confirmed with the assessment of a larger sample size.

Obesity: Studies in adults suggest that there is an association between obesity and telomere shortening, although large longitudinal studies are necessary so as to better assess possible confusion factors.[77] Studies in children have conflicting results. Analyzing the two studies involving a larger number of children, one found telomere shortening in obese children[18] while the other did not find any relation.[35] A study in adult women suggests that obesity duration would be an important factor.[78] Thus, the presence of obesity

Artigo de Revisão

since childhood would have an important impact in the long term, even though more evidences are necessary to demonstrate whether there is a detectable impact in this age range.

Intrauterine growth restriction: IUGR is associated to complications in adulthood, including metabolic syndrome, obesity and cardiovascular disease.[79] It was proposed that telomere shortening, due to fetal stress, could be the mediator of these complications. Nonetheless, the evidences do not show erosion of telomeres associated to IUGR so far. One possibility is that there is a small effect, and that the carried out studies do not have power so as to detect it individually. Methodological differences, especially the low weight for gestational age definition utilized, impede the realization of a metanalysis. Another possibility, suggested by Akkad et al, is that there is a higher risk of telomere shortening in this population after delivery, in the catch-up phase of growth.[40] Studies with larger samples and longitudinal follow-up are necessary to investigate these possibilities.

Prematurity: There is still few studies assessing the dynamics of telomeres in preterm, and the studies available assess a very small number of children (there is only one with more than 40 cases). In adults, a study assessed telomere length and perinatal factors in participants of 3 cohorts, including a group born preterm.[80] The authors assessed 164 ex-preterm of very low birth weight and 170 controls born full-term, ranging between 18 and 27 years of age. There was not an association among telomere length and weight at birth, gestational age or having been born with a weight below 1500 g. In this study, however, there was a great variability in the results (21% in cohort of premature infants).

Obstructive sleep apnea: Kim et al. assessed children with obstructive sleep apnea, and found an increase in leukocytes telomere length, contradicting the initial hypothesis.[52] However, there are studies demonstrating leukocyte telomere shortening in adults with sleep apnea.[81, 82]

Conclusions

A large number of studies was identified, but many with small samples and a few with longitudinal follow-up, not drawing conclusions about the greatest part of the assessed factors. The evidences are more consistent regarding association between telomere erosion and psychosocial stressors, especially situations which generate persistent stress.

The assessed studies indicate no relationship between telomere length and intrauterine growth restriction and exposure to HIV and antiretroviral therapy. More studies are necessary to assess the relation with obesity, premature delivery and exposure to tobacco. There is a need of evidences based on longitudinal studies, larger samples and, in situations such as obesity, interventions assessment.

More studies are necessary which confirm that saliva and buccal cells, or other less invasive methods, can be used instead of blood samples. Moreover, longitudinal studies monitoring the dynamics of telomere length as well as studies endeavoring to replicate the available evidences are important.

References

1. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 2012;13(10):693-704.
 2. Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(5):842-6.
 3. Saliques S, Zeller M, Lorin J, Lorgis L, Teyssier JR, Cottin Y, et al. Telomere length and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis* 2010;103(8-9):454-9.
 4. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179(7):566-71.
-

Artigo de Revisão

5. Alder JK, Guo N, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, Gorgy AI, et al. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(8):904-12.
 6. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, Dunning AM, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2011;6(6):e20466.
 7. Hohensinner PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. *Aging Dis* 2011;2(6):524-37.
 8. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008;44(3):235-46.
 9. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005;366(9486):662-4.
 10. Zannolli R, Mohn A, Buoni S, Pietrobelli A, Messina M, Chiarelli F, et al. Telomere length and obesity. *Acta Paediatr* 2008;97(7):952-4.
 11. Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, et al. Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environ Health* 2009;8:41.
 12. McCracken J, Baccarelli A, Hoxha M, Dioni L, Melly S, Coull B, et al. Annual ambient black carbon associated with shorter telomeres in elderly men: Veterans Affairs Normative Aging Study. *Environ Health Perspect* 2010;118(11):1564-70.
 13. O'Donovan A, Epel E, Lin J, Wolkowitz O, Cohen B, Maguen S, et al. Childhood trauma associated with short leukocyte telomere length in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2011;70(5):465-71.
 14. O'Donovan A, Tomiyama AJ, Lin J, Puterman E, Adler NE, Kemeny M, et al. Stress appraisals and cellular aging: a key role for anticipatory threat in the relationship between psychological stress and telomere length. *Brain Behav Immun* 2012;26(4):573-9.
 15. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(49):17312-5.
 16. Damjanovic AK, Yang Y, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Nguyen H, Laskowski B, et al. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer's disease patients. *J Immunol* 2007;179(6):4249-54.
 17. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* 2008;9(11):1048-57.
-

Artigo de Revisão

18. Buxton JL, Walters RG, Visvikis-Siest S, Meyre D, Froguel P, Blakemore AI. Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(5):1500-5.
 19. Needham BL, Fernandez JR, Lin J, Epel ES, Blackburn EH. Socioeconomic status and cell aging in children. *Soc Sci Med* 2012;74(12):1948-51.
 20. Drury SS, Theall K, Gleason MM, Smyke AT, De Vivo I, Wong JYY, et al. Telomere length and early severe social deprivation: linking early adversity and cellular aging. *Mol Psychiatry* 2012;17(7):719-27.
 21. Shalev I, Moffitt TE, Sugden K, Williams B, Houts RM, Danese A, et al. Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. *Mol Psychiatry* 2013;18(5):576-81.
 22. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS One* 2012;7(2):e31136.
 23. Entringer S, Epel ES, Lin J, Buss C, Shahbaba B, Blackburn EH, et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208(2):134 e1-7.
 24. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(33):E513-8.
 25. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009;6(7):e1000097.
 26. Theall KP, Brett ZH, Shirtcliff EA, Dunn EC, Drury SS. Neighborhood disorder and telomeres: connecting children's exposure to community level stress and cellular response. *Soc Sci Med* 2013;85:50-8.
 27. Kroenke CH, Epel E, Adler N, Bush NR, Obradovic J, Lin J, et al. Autonomic and adrenocortical reactivity and buccal cell telomere length in kindergarten children. *Psychosom Med* 2011;73(7):533-40.
 28. Asok A, Bernard K, Roth TL, Rosen JB, Dozier M. Parental responsiveness moderates the association between early-life stress and reduced telomere length. *Development and Psychopathology* 2013;25(03):577-85.
 29. Theall KP, McKasson S, Mabile E, Dunaway LF, Drury SS. Early hits and long-term consequences: tracking the lasting impact of prenatal smoke exposure on telomere length in children. *Am J Public Health* 2013;103 Suppl 1:S133-5.
 30. Almanzar G, Eberle G, Lassacher A, Specht C, Koppelstaetter C, Heinz-Erian P, et al. Maternal cigarette smoking and its effect on neonatal lymphocyte subpopulations and replication. *BMC Pediatr* 2013;13:57.
-

Artigo de Revisão

31. Rodriguez J, McQueen E, Downes K, Plosker S, Keefe D, Silva C. Maternal smoking hastens telomere shortening in neonatal umbilical cord blood leukocytes. *Fertility and Sterility* 2011;96(3):S62.
 32. Cote HC, Soudeyns H, Thorne A, Alimenti A, Lamarre V, Maan EJ, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children: shorter telomeres with uncontrolled HIV viremia. *PLoS One* 2012;7(7):e39266.
 33. Imam T, Jitratkosol MH, Soudeyns H, Saththa B, Gadawski I, Maan E, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral drugs during pregnancy and their uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012;60(5):495-502.
 34. Poirier MC, Divi RL, Al-Harhi L, Olivero OA, Nguyen V, Walker B, et al. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33(2):175-83.
 35. Masi S, Nightingale CM, Day IN, Guthrie P, Rumley A, Lowe GD, et al. Inflammation and not cardiovascular risk factors is associated with short leukocyte telomere length in 13- to 16-year-old adolescents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(8):2029-34.
 36. Al-Attas OS, Al-Daghri N, Bamakhramah A, Shaun Sabico S, McTernan P, Huang TT. Telomere length in relation to insulin resistance, inflammation and obesity among Arab youth. *Acta Paediatr* 2010;99(6):896-9.
 37. Zhu H, Wang X, Gutin B, Davis CL, Keeton D, Thomas J, et al. Leukocyte telomere length in healthy Caucasian and African-American adolescents: relationships with race, sex, adiposity, adipokines, and physical activity. *J Pediatr* 2011;158(2):215-20.
 38. Davy P, Nagata M, Bullard P, Fogelson NS, Allsopp R. Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. *Placenta* 2009;30(6):539-42.
 39. Heo HJ, Atzmon G, Budagov T, Lo LW, Muzundar RH, Barzilai N, et al. Telomere Length in Hematopoietic Stem Cells and Differentiated Lymphocytes of Infants with Intrauterine Growth Restriction. *Reproductive Sciences* 2009;16(3):327A-A.
 40. Akkad A, Hastings R, Konje JC, Bell SC, Thurston H, Williams B. Telomere length in small-for-gestational-age babies. *Bjog* 2006;113(3):318-23.
 41. Raqib R, Alam DS, Sarker P, Ahmad SM, Ara G, Yunus M, et al. Low birth weight is associated with altered immune function in rural Bangladeshi children: a birth cohort study. *Am J Clin Nutr* 2007;85(3):845-52.
 42. Friedrich U, Schwab M, Griese E-U, Fritz P, Klotz U. Telomeres in Neonates: New Insights in Fetal Hematopoiesis. *Pediatr Res* 2001;49(2):252-6.
-

Artigo de Revisão

43. Holmes DK, Bellantuono I, Walkinshaw SA, Alfirevic Z, Johnston TA, Subhedar NV, et al. Telomere length dynamics differ in foetal and early post-natal human leukocytes in a longitudinal study. *Biogerontology* 2009;10(3):279-84.
 44. Henckel E, Svenson U, Osterman P, Roos G, Bohlin K. Telomere length in preterm babies and infants with bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatrica* 2009;98:276-7.
 45. Henckel E, Brostrom EB, Hedlin G, Roos G, Bohlin K. Prematurity and lung function in relation to telomere length and inflammation in 10-year old children. *Pediatr Res* 2011;70:136-.
 46. Nordfjall K, Svenson U, Norrback KF, Adolfsson R, Roos G. Large-scale parent-child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length. *Eur J Hum Genet* 2010;18(3):385-9.
 47. Al-Attas OS, Al-Daghri NM, Alokail MS, Alkharfy KM, Alfadda AA, McTernan P, et al. Circulating leukocyte telomere length is highly heritable among families of Arab descent. *BMC Med Genet* 2012;13:38.
 48. Zeichner SL, Palumbo P, Feng Y, Xiao X, Gee D, Sleasman J, et al. Rapid telomere shortening in children. *Blood* 1999;93(9):2824-30.
 49. Freck RW, Jr., Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(10):5607-10.
 50. Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, et al. Telomere length in the newborn. *Pediatr Res* 2002;52(3):377-81.
 51. Cross JA, Temple RC, Hughes JC, Dozio NC, Brennan C, Stanley K, et al. Cord blood telomere length, telomerase activity and inflammatory markers in pregnancies in women with diabetes or gestational diabetes. *Diabet Med* 2010;27(11):1264-70.
 52. Kim J, Lee S, Bhattacharjee R, Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Leukocyte telomere length and plasma catestatin and myeloid-related protein 8/14 concentrations in children with obstructive sleep apnea. *Chest* 2010;138(1):91-9.
 53. Nakamura K, Ishikawa N, Izumiyama N, Aida J, Kuroiwa M, Hiraishi N, et al. Telomere lengths at birth in trisomies 18 and 21 measured by Q-FISH. *Gene* 2014;533(1):199-207.
 54. Maganga R, Marsh. J A, Lye. S J, Pennell. C E. Telomere length in an adolescent population: association with the duration of breast-feeding. *Reproductive Sciences* 2012;19(3 (Supplement)):264A.
 55. Mulhern MS, Broberg K, McAfee A, Laird E, Li H, Wallace JMW, et al. Vitamin D status is a predictor of telomere length during pregnancy. *Proceedings of the nutrition society* 2012;71(2):E124.
-

Artigo de Revisão

56. Muezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev* 2013;12(2):509-19.
57. Lin J, Epel E, Blackburn E. Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutat Res* 2012;730(1-2):85-9.
58. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res* 2012;730(1-2):59-67.
59. Turner KJ, Vasu V, Greenall J, Griffin DK. Telomere length analysis and preterm infant health: the importance of assay design in the search for novel biomarkers. *Biomark Med* 2014;8(4):485-98.
60. Thomas P, NJ OC, Fenech M. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 2008;129(4):183-90.
61. Gadalla SM, Cawthon R, Giri N, Alter BP, Savage SA. Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Aging (Albany NY)* 2010;2(11):867-74.
62. Starkweather AR, Alhaeeri AA, Montpetit A, Brumelle J, Filler K, Montpetit M, et al. An integrative review of factors associated with telomere length and implications for biobehavioral research. *Nurs Res* 2014;63(1):36-50.
63. Tomiyama AJ, O'Donovan A, Lin J, Puterman E, Lazaro A, Chan J, et al. Does cellular aging relate to patterns of allostasis? An examination of basal and stress reactive HPA axis activity and telomere length. *Physiol Behav* 2012;106(1):40-5.
64. Humphreys J, Epel ES, Cooper BA, Lin J, Blackburn EH, Lee KA. Telomere shortening in formerly abused and never abused women. *Biol Res Nurs* 2011;14(2):115-23.
65. Sibille KT, Langae T, Burkley B, Gong Y, Glover TL, King C, et al. Chronic pain, perceived stress, and cellular aging: an exploratory study. *Mol Pain* 2012;8:12.
66. Tyrka AR, Price LH, Kao HT, Porton B, Marsella SA, Carpenter LL. Childhood maltreatment and telomere shortening: preliminary support for an effect of early stress on cellular aging. *Biol Psychiatry* 2010;67(6):531-4.
67. Kananen L, Surakka I, Pirkola S, Suvisaari J, Lonnqvist J, Peltonen L, et al. Childhood adversities are associated with shorter telomere length at adult age both in individuals with an anxiety disorder and controls. *PLoS One* 2010;5(5):e10826.
68. Surtees PG, Wainwright NW, Pooley KA, Luben RN, Khaw KT, Easton DF, et al. Life stress, emotional health, and mean telomere length in the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk population study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011;66(11):1152-62.
-

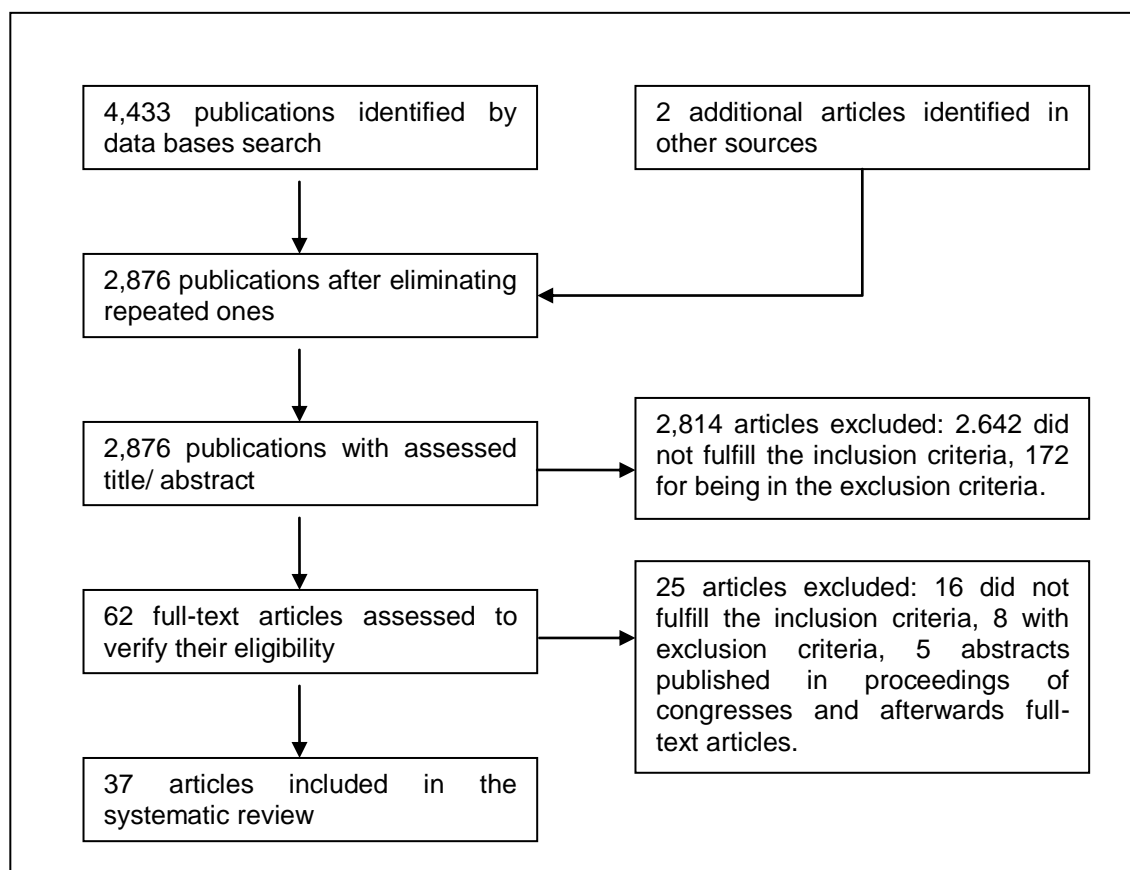
Artigo de Revisão

69. Kiecolt-Glaser JK, Gouin JP, Weng NP, Malarkey WB, Beversdorf DQ, Glaser R. Childhood adversity heightens the impact of later-life caregiving stress on telomere length and inflammation. *Psychosom Med* 2012;73(1):16-22.
70. Glass D, Parts L, Knowles D, Aviv A, Spector TD. No correlation between childhood maltreatment and telomere length. *Biol Psychiatry* 2010;68(6):e21-2; author reply e3-4.
71. Morla M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W, Agusti AG. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006;27(3):525-8.
72. Bestilny LJ, Gill MJ, Mody CH, Riabowol KT. Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection. *Aids* 2000;14(7):771-80.
73. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* 2011;62:141-55.
74. Gomez DE, Armando RG, Alonso DF. AZT as a telomerase inhibitor. *Front Oncol* 2012;2:113.
75. Olivero OA, Anderson LM, Diwan BA, Haines DC, Harbaugh SW, Moskal TJ, et al. Transplacental effects of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(21):1602-8.
76. Olivero OA, Fernandez JJ, Antiochos BB, Wagner JL, St Claire ME, Poirier MC. Transplacental genotoxicity of combined antiretroviral nucleoside analogue therapy in *Erythrocebus patas* monkeys. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29(4):323-9.
77. Muezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H. Body mass index and leukocyte telomere length in adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2014;15(3):192-201.
78. Kim S, Parks CG, DeRoo LA, Chen H, Taylor JA, Cawthon RM, et al. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(3):816-20.
79. Salam RA, Das JK, Bhutta ZA. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014;17(3):249-54.
80. Kajantie E, Pietilainen KH, Wehkalampi K, Kananen L, Raikkonen K, Rissanen A, et al. No association between body size at birth and leucocyte telomere length in adult life--evidence from three cohort studies. *Int J Epidemiol* 2012;41(5):1400-8.
81. Barcelo A, Pierola J, Lopez-Escribano H, de la Pena M, Soriano JB, Alonso-Fernandez A, et al. Telomere shortening in sleep apnea syndrome. *Respir Med* 2010;104(8):1225-9.
-

Artigo de Revisão

82. Savolainen K, Eriksson JG, Kajantie E, Lahti M, Raikkonen K. The history of sleep apnea is associated with shorter leukocyte telomere length: the Helsinki Birth Cohort Study. *Sleep Med* 2014;15(2):209-12.

Figura 2.1 Flow Diagram of study selection



Artigo de Revisão

Table 2.1 Characteristics of studies assessing the effect of psychosocial stress situations on telomere length

Type of stress	Author, year	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Social environmental risk	Theall KP, 2013 [26]	4 -14 years n=99	qPCR, saliva	5	Inverted association between neighborhood-level disorder and T/S ratio ($\beta = -1.280$, $SD = 0.492$; $p < 0.05$). Children living in neighborhoods characterized by high disorder were more likely to have low relative telomere length ($OR = 3.43$, 95% $CI = 1.22$ to 9.62).
Maternal psychosocial stress during pregnancy	Entringer S, 2013 [23]	newborn n=27	qPCR, umbilical cord blood	5	Inverted association between pregnancy-specific stress and newborn T/S ratio, adjusted for gestational age at birth, weight, sex and exposure to antepartum obstetric complications ($\beta = -0.099$; $p = 0.04$). Pregnancy-specific stress accounted for 25% of the variance in adjusted telomere length ($r^2 = 0.25$).
Exposure to violence (maternal domestic violence, frequent bullying victimization, physical maltreatment)	Shalev I, 2013 [21]	5 and 10 years n=236	qPCR, buccal cells	6	The children who experienced two or more kinds of violence exposure showed significantly greater reduction in T/S ratio from age 5 to age 10 years ($\beta = -0.052$, $SD = 0.021$; $p = 0.015$).
Socioeconomic status	Needham BL, 2012 [19]	7 - 13 years n=70	qPCR, leukocyte	5.5	Positive association between parental education and T/S ratio ($p < 0.01$). Shorter telomeres in children whose parents never attended college ($\beta = -0.49$, 95% $CI = -0.88$ to -0.09 ; $p = 0.02$). No significant association with family income ($p = 0.09$).
Exposure to institutional care	Drury SS, 2011 [20]	6 - 10 years n=136	qPCR, buccal cells	6	Inverted association between T/S ratio and percent time spent in the institution at baseline ($\beta = -0.07$, $SD = 0.03$) and 54 months ($\beta = -0.05$, $SD = 0.03$).

Artigo de Revisão

Type of stress	Author, year	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Internalizing and externalizing behavior, autonomic and adrenocortical reactivity in response to laboratory stress	Kroenke CH, 2011 [27]	5 - 6 years n=78	qPCR, buccal cells	5.5	Internalizing behaviors were inversely related to T/S ratio ($\beta = -0.33$; $p < 0.01$). Children with high sympathetic activation, high parasympathetic withdrawal and high cortisol had significantly shorter T/S ratio (0.80 vs. 1.00, $\chi^2 = 7.6$; $p < 0.01$).
Early-life stress and parental responsiveness	AsoK A, 2013 [28]	4 - 6.5 years n=89	qPCR, buccal cells	4.5	Telomere length was shorter in children living in high-risk situation ($F(1.83) = 4.37$; $p < 0.05$). Positive association between parental responsiveness and T/S ratio among high-risk children ($r = 0.35$; $p < 0.05$), but not among low-risk to maltreatment children.

qPCR= quantitative polymerase chain reaction; T/S ratio= telomere signal/single copy signal; SD=standard deviation; OR=odds ratio; CI= confidence interval.

* Telomere length expressed as T/S ratio.

Artigo de Revisão

Table 2.2 Characteristics of studies evaluating the interference of health conditions on telomere length

Author, year (reference)	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Pre-natal tobacco exposure				
Theall KP, 2013 [29]	4 -14 years n=92 (19 exposed to tobacco smoke)	qPCR, saliva	5	Mean T/S ratio was lower among children who were exposed to smoke during pregnancy (6.4±1.5 vs. 7.5±2.3; $p<0.05$) Children exposed to smoke were more likely to have short T/S ratio than those not exposed (OR= 2.47, 95% CI= 0.81 to 7.51; $p<0.05$).
Almanzar G, 2013 [30]	Newborn n=169 (58 exposed to tobacco smoke)	qPCR, umbilical cord lymphocytes	5	T/S ratio was significantly greater in newborns of smoking mothers ($p<0.01$).
Rodrigues J, 2011 [31]	Newborn n= no description	qPCR, leukocyte of umbilical cord blood	3.5 §	Mean T/S ratio was lower among newborns who were exposed to smoke during pregnancy ($p<0.05$).
HIV and antiretroviral therapy				
Côté HC, 2012 [32]	0 - 19 years n=375 (94 HIV+, 177 exposed to ART, 104 controls)	qPCR, blood	4	No association between T/S ratio and HIV infection or ART exposure. In HIV infected children, a detectable plasma viral load was associated with shorter T/S ratio ($\beta= -0.51$; $p<0.01$).
Imam T, 2012 [33]	0 - 2 months n=223 (140 HIV+/ART+, 39 HIV+/ART- , 44 controls)	qPCR, leukocyte (umbilical cord or peripheral blood)	5	No difference in T/S ratio between groups. Shorter T/S ratio in cord blood in ART-exposed newborns ($p<0.05$), but no statistically significant difference after controlling for potential confounders. Inverted association between infants T/S ratio and maternal smoking (Pearson: $r= -0.197$; $p<0.05$) and use of drugs of addiction in pregnancy (Pearson: $r= -0.20$; $p<0.05$).
Poirier MC, 2003 [34]	Newborn and 1 year n=30 (10 HIV+/ART+, 10 HIV+/ART-, 10 HIV-)	Southern blot, leukocyte (umbilical cord and peripheral blood)	3.5	No association between maternal HIV infection or in utero exposure to ART and infants TRF length at birth and 1 year of age.

Artigo de Revisão

Author, year (reference)	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Obesity				
Masi S, 2012 [35]	13 - 16 years n=1080	qPCR, leukocyte	5.5	No association between T/S ratio and cardiovascular risk factors (dyslipidemia, obesity, hypertension, insulin resistance, smoking). Inverted association between T/S ratio and levels of inflammatory markers, C-reactive protein ($\beta = -0.026$, 95% CI= -0.041 to -0.011; $p < 0.01$) and fibrinogen ($\beta = -0.025$, 95% CI= -0.041 to -0.010; $p < 0.01$).
Buxton JL, 2011 [18]	2 - 17 years n=793 (471 obese, 322 controls)	qPCR, leukocyte	4.5	The mean log T/S ratio in the obese children (0.072, SE= 0.006) was significantly shorter than that in nonobese children (0.191, SE=0.008; $p < 0.01$). Obese children had a mean T/S ratio 23.9% shorter than that of nonobese children ($p < 0.01$).
Al-Attas OS, 2010 [36]	5 - 12 years n=148	qPCR, leukocyte	5	The mean T/S ratio was significantly shorter in the obese boys (6.0, SD= 7.1) than that in nonobese boys (8.2, SD=1.9; $p < 0.05$), but not in obese girls (6.7 SD=1.6 vs. 7.1 SD=2.0; $p = 0.51$). No association between T/S ratio and insulin resistance, adipocytokines or inflammatory markers.
Zannolli R, 2008 [10]	2 - 15 years n=53 (12 obese, 41 controls)	Southern blot, blood	4	No association between the TRF lengths of obese and nonobese children. Obese adults had shorter TRF lengths than nonobese.
Zhu H, 2011 [37]	14 - 18 years n=667	qPCR, leukocyte	5	No association between T/S ratio and adiposity or adipokine measures. Positive association between vigorous physical activity and T/S ratio only in girls ($R^2 = 0.019$; $p < 0.01$).

Artigo de Revisão

Author, year (reference)	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Intrauterine growth restriction				
Davy P, 2009 [38]	Newborn n = 68 (32 IUGR, 36 controls)	Southern blot, umbilical cord blood	4	Significantly shorter TRF lengths in IUGR placenta samples ($p < 0.01$), but not in cord blood samples.
Heo HJ, 2009 [39]	Newborn n = 13 (7 IUGR, 6 controls)	qPCR, hematopoietic stem cells and lymphocytes	3 §	T/S ratio was similar between IUGR and appropriated grown neonates in both hematopoietic stem cells (0.57 ± 0.2 bp vs 1.09 ± 0.16 bp; $p = 0.1$) and lymphocytes (2.01 ± 0.28 bp vs 1.95 ± 0.28 bp; $p = 0.9$).
Akkad A, 2006 [40]	Newborn n = 72 (34 SGA, 38 controls)	Southern blot, blood	5.5	No difference in mean TRF length between SGA (10.33 ± 1.3 Kb) and control groups (10.36 ± 1.5 Kb; $p = 0.93$). No correlation between TRF length and maternal smoking, parity or fetal gender.
Raqib R, 2007 [41]	4 - 5 years n = 68 (34 LBW, 34 controls)	Southern blot, blood	4.5	Shorter TRF length in LBW group ($p = 0.02$). No association between current nutritional status and TRF length.
Prematurity				
Friedrich, 2001 [42]	Newborn n = 26 (15 preterm, 11 controls)	Southern blot, leukocyte (umbilical cord blood)	2.5	No difference in mean TRF length between preterm (8512 ± 523 bp) and full-term neonates (8323 ± 503 bp). Longer TRF in very low birth weight when compared to low birth weight preterm neonates ($p < 0.01$). Significant decline in mean TRF between 27 and 32 weeks of gestation ($r = 0.79$, $p < 0.05$).
Menon R, 2012 [22]	Newborn n = 133 (28 preterm PROM, 69 preterm, 35 controls)	qPCR, leukocyte (umbilical cord blood)	5.5	No difference in telomere length between preterm with PROM (9962 ± 3126 bp) and full-term neonates (9011 ± 2497 bp; $p = 0.31$). Preterm with intact membranes had longer telomeres (11546 ± 4348 bp) than preterm with PROM ($p = 0.05$) and full-term neonates ($p < 0.01$).

Artigo de Revisão

Author, year (reference)	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Holmes, 2009 [43]	23 - 36 weeks of gestation n=13 (8 fetuses, 5 preterm newborns)	Southern blot, blood	3.5	Decline in mean TRF length in neonates followed for 8-12 weeks (average loss of 231 bp/week), but not in fetuses.
Henckel S, 2009 [44]	Newborn n = 22 (preterm newborn < 30 weeks, ex-preterm infants with BPD at term age, full-term newborn)	qPCR, blood	2.5 §	Preterm infant tended to have longer T/S ratio than full-term and BPD infants, but difference was not statistically significant ($p=0.096$). No difference in T/S ratio between infants with BPD at term age and full-term newborn.
Henckel S, 2011 [45]	10 years n = 32 (23 born preterm with BPD and 19born at term with asthma)	qPCR, cell not described	2.5 §	Children with BPD had shorter T/S ratio than children with asthma (1.43 vs. 1.61; $p<0.05$), reduced lung function (Forced Expiratory Fraction 25-75%) and lower levels of exhaled nitric oxide. Lung function was not correlated with T/S ratio.
Parental influence				
Nordfjäll K, 2010 [46]	Age not described. n = 962 (children, parents and grandparents)	qPCR, blood	4.5	Correlation between fathers' and offspring's T/S ratio ($r=0.484$; $p<0.01$), independent of the sex of the offspring. Mothers' T/S ratio was correlated to the daughter's T/S ratio ($r=0.297$; $p=0.013$), but not to the son's ($r=0.080$; $p=0.561$). Significant correlation of grandchildren and grandparents T/S ratio ($r=0.272$; $p=0.013$).
Al-Attas OS, 2012 [47]	n = 254 (131 children, 123 adults)	qPCR, leukocyte	5	Telomere length was heritable as assessed by a parent-offspring regression ($h^2=0.64$, $p<0.01$), and the effect was stronger for paternal ($h^2 = 0.59$; $p<0.01$) than for maternal transmission ($h^2 = 0.16$; $p=0.03$).

Artigo de Revisão

Author, year (reference)	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Age				
Zeichner BSL, 1999 [48]	Multiple times during first 3 years of life. n = 9	Southern blot, peripheral blood mononuclear cells	3.5	The average rate of TRF length shortening during the first 3 years of life was 270 bp/year (in 2 adults followed for 8 and 10 years the shortening rate average was 49 bp/year).
Frenck RW, 1998 [49]	n = 85 (12 newborn, 10 children between 5 and 48 months, 63 adults)	Southern blot, leukocyte	3.5	Mean TRF length declined from a mean \pm 1 SD of 16.4 \pm 1.2 kb in the newborns, to 11.6 \pm 1.2 kb in their parents ($p < 0.001$) to 9.6 \pm 0.8 kb in the grandparents ($p < 0.01$ for parents vs. grandparents). There was a rapid decline in TRF length over time in 10 children \leq 48 months old (at a rate of > 1 kb/year).
Sex				
Okuda K, 2002 [50]	Newborn n = 168	Southern blot, leukocyte and umbilical artery cells	5	No sex related differences in TRF length in white blood cells ($p = 0.3$) and in umbilical artery cells ($p = 0.8$). No differences in TRF length related to hypertension during pregnancy or preeclampsia. Maternal age was positively correlated with TRF length in white blood cells ($r = 0.18$, $p < 0.05$).
Maternal diabetes				
Cross JA, 2010 [51]	Newborn n = 244 (117 cases, 127 controls)	flow FISH, umbilical cord blood	5.5	No significant differences in telomere length between any group (Type 1, Type 2 and gestational diabetes) and control subjects. Higher telomerase activity in cord blood mononuclear cells in the offspring of mothers with Type 1 and gestational diabetes.
Obstructive sleep apnea				
Kim J, 2010 [52]	5 - 10 years n = 213 (111 cases, 02 controls)	qPCR, leukocyte	5	T/S ratio significantly increased and severity dependently increased in children with obstructive sleep apnea ($p = 0.012$).

Artigo de Revisão

Author, year (reference)	Age, sample	Telomere measurement method	Quality assessment	Main results*
Trisomies 18 and 21				
Nakamura K, 2014 [53]	Newborn n = 31 (trisomy 18= 10, trisomy 21= 11, controls= 10)	Q-FISH, lymphocytes	4.5	No significant difference in mean telomere length among the three groups (trisomy 18, trisomy 21 and controls). Telomeres of trisomic chromosomes were not shorter than the mean telomere length of chromosomes as a whole among subjects with trisomy 18 and trisomy 21.
Duration of breast-feeding				
Maganga, 2012 [54]	17 years n= 1266	qPCR, blood	4 §	Positive correlation between T/S ratio and duration of breast-feeding ($p < 0.01$).
Maternal vitamin D status				
Mulhern, 2012 [55]	5 years n= 117	qPCR, blood	3 §	Mothers vitamin D status was correlated with maternal T/S ratio, but not with child T/S ratio ($r = -0.066$; $p = 0.479$).

qPCR= quantitative polymerase chain reaction; T/S ratio= telomere signal/single copy signal; OR=odds ratio; CI= confidence interval; HIV=human immunodeficiency virus; ART=antiretroviral therapy; TRF= terminal restriction fragment; SE=standard error; SD=standard deviation; IUGR= Intrauterine growth restriction; bp=base pairs, SGA= small-for-gestational-age; Kb=Kilobases; LBW= low birth weight; PROM= prelabor rupture of membranes; BPD= bronchopulmonary dysplasia; FISH= fluorescent in situ hybridization; Q-FISH= quantitative fluorescent in situ hybridization.

* Telomere length expressed as T/S ratio or TRF length, according to measuring method (qPCR or Southern blot, respectively).

§ Only Abstract published.

eTable2.1: Criteria used for quality assessment

Domain	Criteria	Rating
Participants selection	Participants representative to the target population	0= not likely: self referred, selection not described; 0.5= somewhat likely: convenience sample, losses not described; 1= very likely: random selection, well described.
	Appropriate inclusion and exclusion criteria	0= inclusion / exclusion criteria not described or inappropriate; 0.5: inclusion / exclusion criteria partly appropriate; 1: inclusion / exclusion criteria appropriate.
	Sample size	0= calculation of sample size not described, few cases; 0.5= calculation of sample size not described, sample seems appropriated; 1: presents the calculation of sample size, sample appropriated.
Measuring exposure and outcome variables	Accurate and appropriate variable measures / blinding	0= method of variables measure inappropriate; 0.5= appropriate variable measures, objective variables, no blinding or not described; 1= appropriate variable measures, objective variables, blind.
Appropriate methods to control confounding	Statistical tests appropriate / multivariate analysis	0= statistical test not described or inappropriate; 0.5= partly appropriate, univariate analysis; 1= appropriate, multivariate analysis.
	Control for major confounders (in study design or statistical analysis)	0= no control or less than 60% of confounders controlled; 0.5: partial control (60 to 79%); 1= Control for major confounders (80 to 100%).
Design	Design	0= weak design: case series; 0.5: case control study, transversal; 1= longitudinal, prospective.

CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL

***Impacto da prematuridade no comprimento dos
telômeros em crianças***

Impact of prematurity on telomere length in children

Resumo

Objetivo: Avaliar o impacto da prematuridade no comprimento dos telômeros, um marcador de envelhecimento celular, em crianças nascidas com muito baixo peso.

Métodos: Realizou-se um estudo transversal controlado, avaliando 91 crianças entre 7 e 12 anos, sendo 46 ex-prematuros de muito baixo peso e 45 controles. A quantificação relativa do tamanho dos telômeros (T/S) foi realizada por reação de polimerase de cadeia (PCR) em leucócitos do sangue periférico. Foram obtidas informações sobre variáveis perinatais, condição socioeconômica e eventos de vida estressores. Na análise estatística, utilizou-se o modelo de regressão linear, tanto no modelo de análise univariada quanto multivariável.

Resultados: Não houve diferença significativa na razão T/S dos leucócitos entre as crianças prematuras e controles ($p=0,841$), mesmo após ajuste para possíveis variáveis preditoras. A análise univariada não mostrou associação estatisticamente significativa entre a razão T/S e sexo, idade, idade parental, tabagismo na gestação, escolaridade do cuidador e do chefe da família e eventos estressores ocorridos no último ano. Entre os prematuros, não houve relação entre a razão T/S e peso de nascimento abaixo de 1.000 g ($\beta=0,133$, $IC_{95\%} = -0,141$ a $0,406$; $p=0,341$), idade gestacional abaixo de 30 semanas ($\beta=0,030$, $IC_{95\%} = -0,209$ a $0,270$; $p=0,34$) ou displasia broncopulmonar ($\beta=0,213$, $IC_{95\%} = -0,166$ a $0,591$; $p=0,15$).

Conclusões: Os resultados indicam que não há relação entre nascimento prematuro ou muito baixo peso ao nascer e comprimento dos telômeros nos leucócitos na idade escolar. Entretanto, os achados precisam ser replicados, preferentemente em estudos longitudinais.

Palavras-chave: Nascimento prematuro. Recém-nascido de muito baixo peso. Telômero. Encurtamento do telômero. Criança.

Summary

Objective: Assess the impact of prematurity on telomere length, a cell aging marker, in children born with very low birth weight.

Methods: We conducted a controlled cross-sectional study evaluating 91 children between 7 and 12 years, been 46 former very low birth weight premature and 45 controls. The relative quantification of the size of telomeres (T/S) was performed by polymerase chain reaction (PCR) in peripheral blood leukocytes. Information on perinatal variables, socioeconomic status and stressful life events were obtained. The linear regression model was used for statistical analysis, both in univariate and multivariate analysis.

Results: There was no significant difference in the leukocyte T/S ratio among premature infants and controls ($p = 0.841$), even after adjustment for possible predictor variables. Univariate analysis showed no statistically significant association between T/S ratio and sex, age, parental age, smoking during pregnancy, education of the caregiver and the head of the family and stressful events that occurred last year. Among preterm infants, there was no relationship between the T/S ratio and birth weight below 1,000 g ($\beta=0.133$, 95% CI= -0.141 to 0.406; $p=0.341$), gestational age below 30 weeks ($\beta=0.030$, 95% CI= -0.209 to 0.270; $p=0.34$) or bronchopulmonary dysplasia ($\beta = 0.213$, 95% CI = -0.166 to 0.591; $p=0.15$).

Conclusions: The results indicate that there is no relationship between preterm birth or very low birth weight and the leukocyte telomere length at school age. However, the findings need to be replicated, preferably in longitudinal studies.

Keywords: Premature birth. Infant, very low birth weight. Telomere. Telomere shortening. Child.

Introdução

Os telômeros são estruturas localizadas nas pontas dos cromossomos que regulam a capacidade replicativa das células, previnem a perda de material genético durante a replicação celular e evitam a fusão entre os cromossomos. [1] São constituídos pela repetição de uma sequência de DNA (TTAGGG), e um conjunto de proteínas associadas. O comprimento dos telômeros diminui durante sucessivos ciclos de divisão celular, até um comprimento crítico, que os torna ineficientes para a proteção das extremidades cromossômicas, resultando na fusão dos cromossomos e morte celular apoptótica. Esses eventos são parte do fenômeno de senescência celular, e o acúmulo de telômeros curtos com o avanço da idade pode contribuir para o surgimento de doenças relacionadas ao envelhecimento. Foi demonstrada associação entre menor comprimento dos telômeros dos leucócitos e doença cardiovascular, [2, 3] doença pulmonar obstrutiva crônica, [4] diversos tipos de câncer [5] e doenças autoimunes. [6] Além disso, há evidências de que o comprimento dos telômeros pode estar relacionado à longevidade [7, 8] e ao número de anos de vida saudável. [9, 10]

O encurtamento dos telômeros pode ser acelerado em situações que gerem estresse oxidativo e inflamação. [11, 12] Entre essas situações encontram-se: tabagismo, [13] obesidade [14] e exposição a poluição ambiental. [15, 16] Além disso, está descrita associação com situações de estresse psicológico, [17, 18] sugerindo que a erosão dos telômeros seja um potencial mecanismo para explicar a relação entre estresse psicossocial e surgimento de doenças. [19, 20] Por outro lado, existem mecanismos compensatórios. O principal é a telomerase, uma enzima que pode repor os pares de bases que são perdidos na replicação do DNA, [1] mas tem atividade diminuída ou mesmo ausente na maioria das células adultas. Entretanto, foi demonstrado aumento significativo na atividade da telomerase em adultos três meses após a introdução de mudanças positivas no estilo de vida. [21]

Artigo Original

O reflexo da exposição a situações adversas sobre os telômeros pode ser detectado ainda na infância. Estudos em crianças demonstraram associação entre encurtamento dos telômeros e obesidade, [22] baixo nível socioeconômico [23] e exposição a estresse psicológico, entre outros. [24] Em um estudo longitudinal, que acompanhou durante 5 anos crianças expostas à violência, houve persistência do encurtamento dos telômeros, sugerindo que eventos no início da vida podem causar alteração persistente, aumentando o risco de doenças na idade adulta. [25] Além disso, há evidências de que eventos adversos ainda durante a gestação podem estar associados a telômeros mais curtos no recém-nascido (RN), [26, 27] e em adultos jovens. [28]

Dois estudos piloto avaliaram a possibilidade de erosão dos telômeros associada à prematuridade e displasia broncopulmonar (DBP). O primeiro avaliou 22 RN, e não encontrou diferença no comprimento dos telômeros entre prematuros com DBP, ao atingir idade gestacional corrigida de termo, e RN a termo. [29] Entretanto, o mesmo grupo avaliou, aos 10 anos de idade, 23 crianças com história de prematuridade e DBP, e encontrou telômeros menores em relação a um grupo de 19 crianças asmáticas nascidas a termo. [30] Esses dois estudos foram publicados apenas como resumos em anais de congressos, não estando disponíveis na íntegra, ou publicados em periódicos revisados por pares. Em adultos, um estudo avaliou comprimento dos telômeros e fatores perinatais em participantes de 3 coortes. Uma coorte englobou 164 ex-prematuros de muito baixo peso e 170 controles nascidos a termo, avaliados entre 18 e 27 anos de idade. Não houve associação entre comprimento dos telômeros e peso de nascimento, idade gestacional ou ter nascido com peso abaixo de 1.500 g. [31] A variabilidade nos resultados de medida dos telômeros na coorte de prematuros, entretanto, foi de 21%.

A prematuridade com frequência está associada a situações de estresse fetal e neonatal, inflamação e estresse oxidativo, podendo-se supor que exista risco de erosão dos telômeros. [32, 33] Além disso, ex-prematuros tem maior

Artigo Original

risco de doenças relacionadas ao envelhecimento, como hipertensão, alterações de lipídios no sangue, intolerância a glicose e doença cardiovascular. [34-37] Desta forma, formulou-se a hipótese de que crianças que nasceram prematuramente, com muito baixo peso, possam apresentar encurtamento dos telômeros, que persista até a idade escolar. Considera-se que o comprimento dos telômeros possa ser uma medida objetiva do impacto causado pelo nascimento prematuro e, possivelmente, um marcador prognóstico, associado a risco na vida adulta. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o impacto da prematuridade no comprimento dos telômeros, na idade escolar, em ex-prematuros de muito baixo peso. Pretende-se também avaliar a correlação do comprimento dos telômeros na idade escolar com variáveis perinatais.

Métodos

Conduziu-se um estudo transversal controlado, incluindo crianças nascidas com peso < 1.500 g, atendidas na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal do Hospital Geral de Caxias do Sul, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2005. Por questões de logística, foram incluídas apenas crianças residentes em Caxias do Sul e municípios próximos. As crianças foram localizadas através de dados obtidos no cadastro do hospital ou através de informações fornecidas pelas secretarias municipais da saúde e/ou educação. Os ex-prematuros foram comparados com um grupo controle, formado por crianças nascidas a termo, de mesma idade e sexo, que estudassem na mesma escola do caso, ou em duas escolas municipais de Caxias do Sul. Foram selecionadas escolas que atendem crianças de nível socioeconômico semelhante ao dos casos. Foram considerados critérios de exclusão óbito e residir atualmente em municípios que não façam parte de área de abrangência do estudo.

O presente estudo é parte do Projeto PREMMIES, que avaliou as condições de saúde de escolares nascidos prematuramente. Além dos dados

Artigo Original

aqui descritos, o projeto avaliou também: qualidade de vida relacionada à saúde, função pulmonar, atividade física e desenvolvimento cognitivo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital (Apêndice A). Nenhum procedimento foi realizado antes da concordância da criança e dos responsáveis com a participação no estudo e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B) e do termo de assentimento (Apêndice C). Os responsáveis e a criança foram informados do direito de desistir de participar do estudo a qualquer momento ou de recusar a participação em algum dos procedimentos.

As crianças foram avaliadas no período de 13 de julho a 7 de dezembro de 2013, no Campus da Universidade de Caxias do Sul ou em salas apropriadas nas escolas onde estudavam. Os procedimentos foram realizados por pesquisadores treinados, sendo cada pesquisador responsável por um dos procedimentos. As variáveis avaliadas estão descritas a seguir.

Informações sobre o período neonatal:

As informações perinatais sobre os prematuros foram obtidas no banco de dados da UTI neonatal do Hospital Geral de Caxias do Sul (formulário de coleta de dados disponível no Apêndice D), e incluem: idade materna, tabagismo na gestação, uso de corticoide antenatal, ruptura prolongada de membranas (considerada como tempo de ruptura de membranas ≥ 24 horas), tipo de parto, idade gestacional (definida por: 1º) ecografia obstétrica até 20 semanas de gestação; 2º) data da última menstruação; 3º) idade gestacional estimada pelo método New Ballard, sendo este método preferido, em relação ao cálculo pela data da última menstruação, quando a diferença entre os dois métodos fosse maior do que duas semanas), peso no nascimento, sexo, escore de Apgar, necessidade e tempo de uso de oxigênio, displasia broncopulmonar (caracterizada por dependência de oxigênio às 36 semanas de idade corrigida), hemorragia peri-intraventricular e tempo de internação. Foram considerados

Artigo Original

pequenos para a idade gestacional os RN abaixo do percentil 10 na curva de Alexander et al. [38]

Histórico de saúde e condições socioeconômicas:

Informações perinatais das crianças do grupo controle, informações sobre as condições de saúde da criança desde o nascimento até o momento da avaliação, e sobre condições socioeconômicas, foram obtidas através de entrevista com os responsáveis, com o auxílio de formulário padronizado (Apêndice E. A avaliação das condições socioeconômicas baseou-se no Critério de Classificação Econômica Brasil 2012 da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP). [39]

Eventos de vida estressores

Considerando que situações de estresse podem causar encurtamento dos telômeros, verificou-se a exposição da criança a situações de estresse. Foi aplicado o *Stressful Life Events Schedule* (SLES), [40] um instrumento que visa investigar a presença e o impacto de eventos de vida estressantes ocorridos nos últimos 12 meses, já adaptado e validado para uso no nosso meio nesta faixa etária (Apêndice F). [41]

O SLES é um inventário composto por uma escala contendo uma lista de eventos estressores e uma escala *likert* de quatro pontos (nem um pouco, um pouco, bastante e muito) para verificar a intensidade do impacto de cada um dos eventos para o sujeito. Optou-se pela versão para aplicação com os pais e/ou responsáveis, objetivando uma coleta de dados mais completa e precisa. Avaliou-se o total de eventos estressores nos últimos 12 meses, e também o número de eventos estressores graves (que afetaram o sujeito bastante ou muito) no mesmo período.

Medida do comprimento dos telômeros

O comprimento dos telômeros foi avaliado em leucócitos extraídos do sangue periférico. Foram coletados por punção venosa 2 mL de sangue venoso

Artigo Original

periférico em tubos contendo heparina (Vacuplast®). As amostras foram coletadas em Caxias do Sul e transportadas no mesmo dia para Porto Alegre, pelos pesquisadores, acondicionadas em caixa térmica, resfriadas com gelo. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por pesquisadores treinados. Todas as amostras foram processadas de forma cega. A técnica está brevemente descrita a seguir.

O DNA genômico das amostras foi extraído a partir do kit The PureLink® Genomic DNA Mini Kit, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). A quantificação relativa do tamanho dos telômeros (T/S) foi realizada por reação de polimerase de cadeia quantitativa (qPCR) em tempo real de acordo com R.M. Cawthon (2002), utilizando o gDNA como molde. [42] Basicamente, são realizadas duas reações, em triplicata, para cada indivíduo do estudo. A primeira reação de qPCR consiste na amplificação da sequência telomérica (T). Juntamente com a amplificação dos telômeros, é realizada a amplificação de um gene de cópia única (*single copy gene*, S), 36B4. Esse gene normalizador é o controle de amplificação e serve para determinar o número de cópias de genoma por amostra. Foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores já publicados para mamíferos. [42] Finalmente, a quantificação do tamanho relativo dos telômeros (T/S) é expressa como a razão entre o gene de interesse (T) e o gene constitutivo de cópia única 36B4 (S). As reações foram realizadas em triplicata, com um coeficiente de variabilidade médio de 1%. Em todas as 12 placas utilizadas foi avaliada uma amostra normalizadora, obtendo-se média \pm desvio padrão de $0,945 \pm 0,16$, com uma variabilidade de 17% nos resultados entre placas.

Análise estatística

Cálculo do tamanho da amostra

Uma amostra de cinco pacientes para cada grupo seria suficiente para detectar uma diferença de 247 pares de bases nos telômeros, assumindo um

Artigo Original

desvio padrão de 94,94 no grupo controle e 107,80 no grupo de crianças prematuras, com um poder de 90% e um nível de significância de 5% (Cálculo baseado na diferença encontrada entre os grupos em um estudo realizado por O'Donovan e colaboradores.). [17] Esse número foi acrescido para 55 em cada grupo (total de 110 pacientes), considerando as possíveis variáveis associadas ao desfecho (idade, sexo, idade parental e estresse).

Testes estatísticos

Utilizou-se o Programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 14.0 para realizar a análise estatística dos dados. Os dados categóricos serão apresentados por frequência absoluta e relativa. As variáveis contínuas, mediante médias e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil, conforme a assimetria das variáveis. Para avaliação da associação entre a variável de desfecho e as variáveis preditoras, tanto no modelo de análise univariada quanto multivariável, utilizou-se o modelo de regressão linear. Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Resultados:

Entre os prematuros, 219 crianças foram rastreadas para verificar a elegibilidade, sendo o comprimento dos telômeros nos leucócitos avaliado em 46 delas. A Figura 3.1 mostra o processo de formação da amostra. Não houve diferença significativa em relação às variáveis perinatais entre as crianças elegíveis e as avaliadas (Tabela 3.1). Da mesma forma, não houve diferença entre as crianças inicialmente selecionadas, ou aquelas avaliadas no projeto PREMMIES, e as crianças participantes deste estudo (dados não mostrados).

Foram avaliadas 91 crianças, sendo 46 casos e 45 do grupo controle, com idade de 7 a 12 anos. Tabela 3.2 mostra os dados referentes à caracterização da amostra. No grupo dos prematuros os pais eram mais jovens e houve maior

Artigo Original

prevalência de eventos estressores no ano anterior à avaliação. A idade gestacional dos prematuros variou de 26 a 36 semanas e o peso de nascimento de 808 g a 1.470 g. A patologia materna mais frequente foi a pré-eclâmpsia, que ocorreu em 9 casos (19,6%). Entre os 46 prematuros avaliados, 3 (6,5%) apresentavam déficit cognitivo importante e 2 (4,3%) surdez severa, sendo que uma análise realizada com exclusão destes casos não modificou os resultados que serão apresentados.

Não houve diferença significativa na razão T/S dos leucócitos entre as crianças prematuras e controles ($p=0,841$). A figura 3.2 mostra a comparação da razão T/S nos dois grupos. O ajuste para possíveis variáveis preditoras, ou seja, sexo, idade, idade do pai e ocorrência de eventos estressores graves no último ano, não modificou o resultado.

A relação entre a razão T/S dos leucócitos e as variáveis estudadas está descrita na Tabela 3.3. Na análise univariada, não houve relação estatisticamente significativa com nenhuma das variáveis estudadas. O nível socioeconômico está representado pela escolaridade do chefe da família, pois as demais informações foram pouco sensíveis para detectar diferenças na amostra.

Entre os ex-prematuros, não houve relação entre a razão T/S dos leucócitos e as variáveis perinatais estudadas, conforme demonstrado na Tabela 3.4. Não houve relação entre a razão T/S dos leucócitos e peso de nascimento ($p=0,861$) ou idade gestacional ($p=0,349$), após correção para sexo, idade e ocorrência de algum estressor grave no último ano. Hemorragia intracraniana graus 3 ou 4 ocorreu em 2 prematuros (13%), não sendo possível avaliar a relação com telômeros em virtude do número reduzido de casos.

Discussão

O comprimento dos telômeros é determinado pela interação entre fatores genéticos, ambientais, experiências e estivo de vida, e pode sofrer influência de

Artigo Original

experiências no início da vida. [43] Evidências indicam que situações de estresse podem gerar erosão dos telômeros, sendo apontados como mediadores o estresse oxidativo e a inflamação. [11, 19, 44] Estes fatos tornam plausível a hipótese de que a prematuridade esteja associada a encurtamento precoce dos telômeros. Nesse caso, o comprimento dos telômeros seria um marcador objetivo dos ex-prematuros de maior risco para o surgimento precoce de doenças relacionadas ao envelhecimento.

Neste estudo, não houve associação entre prematuridade e comprimento dos telômeros nos leucócitos em crianças de 7 a 12 anos de idade. Henckel e colaboradores encontraram telômeros menores em ex-prematuros com DBP aos 10 anos de idade, quando comparados a crianças asmáticas. [30] O estudo, entretanto, teve apenas o resumo publicado, o que impede uma análise crítica dos resultados e das possíveis diferenças em relação ao presente estudo. Por outro lado, Kajantie e colaboradores, avaliando ex-prematuros e controles entre 18 e 27 anos de idade, não encontraram associação entre comprimento dos telômeros e peso de nascimento, idade gestacional ou ter nascido com peso abaixo de 1.500 g, o que está de acordo com os nossos resultados. [31] Corroborando esses achados, recentemente foi publicado estudo demonstrando senescência das células endoteliais formadoras de colônias em RN prematuros, que estaria relacionada com menor capacidade de reparo endotelial e poderia contribuir para as complicações cardiovasculares na idade adulta. Nesse estudo a senescência celular foi mediada por outros fatores, não havendo encurtamento dos telômeros. [45]

Uma possível razão para o resultado negativo encontrado é que o efeito da prematuridade seja pequeno, só podendo ser detectado com uma amostra maior. Neste caso, entretanto, a influência da prematuridade provavelmente não seria relevante. Outra possibilidade é que o dano aos telômeros ocorra em situações de estresse crônico e, embora estes prematuros tenham sofrido estresse no período neonatal, esta situação não tenha se mantido. Em uma revisão publicada em 2012, Shalev e colaboradores sugerem que a exposição

Artigo Original

repetida ao estresse, resultando em ativação crônica dos sistemas endócrino e imunológico, levaria a um dano mais significativo nos telômeros. [46] Outra hipótese é que os prematuros apresentem encurtamento dos telômeros no período neonatal, mas nesta faixa etária exista plasticidade suficiente para que haja recuperação até a idade escolar. Um maior cuidado com a saúde e a alimentação destas crianças poderia influenciar na recuperação, considerando que um estilo de vida e ambiente saudáveis podem amenizar os efeitos deletérios do estresse sobre os telômeros. [46]

Não foi detectada correlação entre comprimento dos telômeros e idade na amostra estudada. Da mesma forma, outros estudos não encontraram correlação em crianças entre 4 e 14 anos [47] e entre 5 e 12 anos de idade. [48] Uma possível explicação é que a variação nesta faixa etária seja pequena. Frenck e colaboradores sugerem que há uma fase de encurtamento rápido do nascimento aos 4 anos de idade, seguida por uma fase de provável estabilidade até o início da vida adulta. [49] Entretanto, um estudo demonstrou correlação inversa entre idade e comprimento dos telômeros em crianças de 7 a 13 anos [23] e o único estudo longitudinal conduzido nesta faixa etária mostrou redução dos telômeros entre 5 e 10 anos de idade. [25]

Embora existam evidências de telômeros mais longos em adultos do sexo feminino, [50] estudos em recém-nascidos não mostraram diferença em relação ao sexo. [51]. Assim como no presente estudo, outros autores também não encontraram relação entre o sexo e o comprimento dos telômeros em crianças. [22, 24, 48] A diferença parece estar presente na adolescência, logo após a puberdade. [52, 53]

Entre os ex-prematuros, não houve associação do comprimento dos telômeros com pré-eclâmpsia materna, resultado semelhante ao descrito por outros autores. [51, 54] Em pelo menos um estudo houve relação com diabetes gestacional, [54] mas esta complicação não ocorreu em nenhum caso no presente estudo. Não encontramos diferença no comprimento dos telômeros

Artigo Original

entre as crianças que nasceram com baixo peso e com peso adequado para a idade gestacional, assim como relatado em outros estudos. [31, 51, 55, 56]

Embora este estudo traga uma importante contribuição, por ser o primeiro que avalia prematuros em comparação com crianças saudáveis, há várias limitações: 1) avaliação transversal, não permitindo avaliar a possibilidade de que tenha havido encurtamento dos telômeros com posterior recuperação; 2) impossibilidade de avaliar a influência genética no comprimento dos telômeros em função de não terem sido coletadas amostras dos pais; 3) tamanho da amostra, embora suficiente de acordo com cálculo baseado na diferença encontrada em estudos que avaliaram outros fatores, pode ter sido insuficiente para detectar uma diferença pequena. Além disso, não permitiu a avaliação adequada de subgrupos, como os extremos prematuros; 4) limitações relacionadas à técnica de avaliação dos telômeros. Embora o *Southern blot* seja considerado o “padrão ouro”, a qPCR tem sido a técnica de escolha em estudos em crianças, em função da necessidade de menor quantidade de DNA, reduzindo o volume de coleta, além de ter menor custo. A principal limitação da técnica é a variabilidade interensaio. O coeficiente de variabilidade de 17% entre as placas, na avaliação da razão T/S neste estudo, pode ser considerado alto. Para minimizar este fato, as triplicatas de cada caso e seu respectivo controle foram sempre analisadas em uma mesma placa.

A sobrevida de 64,8%, encontrada na amostra, é compatível com realidade brasileira para RN de muito baixo peso entre 2001 e 2005. Dados de sobrevida da Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais, disponíveis a partir de 2008, indicam uma sobrevida de 61% em 2008 [57] e 64,2% em 2009 [58]. Estes números são inferiores aos obtidos em países desenvolvidos, relatando-se uma sobrevida de 85% nos EUA entre 1997 e 2002, [59] e de 90% em um grupo de unidades da Rede Vermont-Oxford entre 1998 e 2001. [60] A possibilidade de que a sobrevida de crianças mais graves e mais imaturas nestes centros altere o resultado obtido neste estudo precisa ser investigada. Entretanto, não

Artigo Original

encontramos relação com displasia broncopulmonar ou idade gestacional abaixo de 30 semanas na amostra avaliada.

Como pontos positivos, destaca-se a disponibilidade de dados confiáveis e completos do período neonatal, o controle para possíveis fatores de confusão como situações de estresse e nível socioeconômico, e o tipo de célula avaliada. Muitos estudos em crianças utilizam a medida em células do *swab* bucal em função da dificuldade de obter amostras de sangue em crianças. O *swab* bucal pode conter outros tipos de células, como as do sistema imunológico, que tem dinâmica dos telômeros diferente das células bucais. Um estudo em pacientes com síndromes hereditárias de falência da medula óssea mostrou correlação entre o comprimento dos telômeros de leucócitos e células bucais, [61] enquanto outro não encontrou correlação em adultos com Doença de Alzheimer, [62] e outros estudos, com amostras maiores, são necessários para avaliar a questão. Embora existam evidências de erosão dos telômeros em células bucais, associada a estresse psicossocial em crianças, os estudos em adultos indicando desfechos negativos associados a encurtamento dos telômeros, em sua grande maioria, avaliaram os leucócitos ou o sangue periférico. [63]

Em resumo, os resultados indicam que não há relação entre nascimento prematuro ou muito baixo peso ao nascer e comprimento dos telômeros nos leucócitos na idade escolar. Entretanto, as conclusões são preliminares e os achados precisam ser replicados por outros grupos. Estudos longitudinais avaliando telômeros e prematuridade são desejáveis, para confirmar esses achados, bem como permitir um melhor entendimento da dinâmica dos telômeros nos prematuros.

Referências:

1. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 2006;12(10):1133-8.
 2. Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(5):842-6.
 3. Saliques S, Zeller M, Lorin J, Lorgis L, Teyssier JR, Cottin Y, et al. Telomere length and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis* 2010;103(8-9):454-9.
 4. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179(7):566-71.
 5. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, Dunning AM, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2011;6(6):e20466.
 6. Hohensinner PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. *Aging Dis* 2011;2(6):524-37.
 7. Bakaysa SL, Mucci LA, Slagboom PE, Boomsma DI, McClearn GE, Johansson B, et al. Telomere length predicts survival independent of genetic influences. *Aging Cell* 2007;6(6):769-74.
 8. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003;361(9355):393-5.
 9. Njajou OT, Hsueh WC, Blackburn EH, Newman AB, Wu SH, Li R, et al. Association between telomere length, specific causes of death, and years of healthy life in health, aging, and body composition, a population-based cohort study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64(8):860-4.
 10. Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, et al. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107 Suppl 1:1710-7.
 11. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008;44(3):235-46.
 12. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 2010;464(7288):520-8.
-

Artigo Original

13. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005;366(9486):662-4.
 14. Zannolli R, Mohn A, Buoni S, Pietrobelli A, Messina M, Chiarelli F, et al. Telomere length and obesity. *Acta Paediatr* 2008;97(7):952-4.
 15. Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, et al. Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environ Health* 2009;8:41.
 16. McCracken J, Baccarelli A, Hoxha M, Dioni L, Melly S, Coull B, et al. Annual ambient black carbon associated with shorter telomeres in elderly men: Veterans Affairs Normative Aging Study. *Environ Health Perspect* 2010;118(11):1564-70.
 17. O'Donovan A, Epel E, Lin J, Wolkowitz O, Cohen B, Maguen S, et al. Childhood trauma associated with short leukocyte telomere length in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2011;70(5):465-71.
 18. O'Donovan A, Tomiyama AJ, Lin J, Puterman E, Adler NE, Kemeny M, et al. Stress appraisals and cellular aging: a key role for anticipatory threat in the relationship between psychological stress and telomere length. *Brain Behav Immun* 2012;26(4):573-9.
 19. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(49):17312-5.
 20. Damjanovic AK, Yang Y, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Nguyen H, Laskowski B, et al. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer's disease patients. *J Immunol* 2007;179(6):4249-54.
 21. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* 2008;9(11):1048-57.
 22. Buxton JL, Walters RG, Visvikis-Siest S, Meyre D, Froguel P, Blakemore AI. Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(5):1500-5.
 23. Needham BL, Fernandez JR, Lin J, Epel ES, Blackburn EH. Socioeconomic status and cell aging in children. *Soc Sci Med* 2012;74(12):1948-51.
 24. Drury SS, Theall K, Gleason MM, Smyke AT, De Vivo I, Wong JYY, et al. Telomere length and early severe social deprivation: linking early adversity and cellular aging. *Mol Psychiatry* 2012;17(7):719-27.
 25. Shalev I, Moffitt TE, Sugden K, Williams B, Houts RM, Danese A, et al. Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. *Mol Psychiatry* 2013;18(5):576-81.
-

Artigo Original

26. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS One* 2012;7(2):e31136.
 27. Entringer S, Epel ES, Lin J, Buss C, Shahbaba B, Blackburn EH, et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208(2):134 e1-7.
 28. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(33):E513-8.
 29. Henckel E, Svenson U, Osterman P, Roos G, Bohlin K. Telomere length in preterm babies and infants with bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatrica* 2009;98:276-7.
 30. Henckel E, Brostrom EB, Hedlin G, Roos G, Bohlin K. Prematurity and lung function in relation to telomere length and inflammation in 10-year old children. *Pediatr Res* 2011;70:136-.
 31. Kajantie E, Pietilainen KH, Wehkalampi K, Kananen L, Raikkonen K, Rissanen A, et al. No association between body size at birth and leucocyte telomere length in adult life--evidence from three cohort studies. *Int J Epidemiol* 2012;41(5):1400-8.
 32. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15(4):191-5.
 33. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res* 2009;66(2):121-7.
 34. de Jong F, Monuteaux MC, van Elburg RM, Gillman MW, Belfort MB. Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension* 2012;59(2):226-34.
 35. Parkinson JR, Hyde MJ, Gale C, Santhakumaran S, Modi N. Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* 2013;131(4):e1240-63.
 36. Tinnion R, Gillone J, Cheetham T, Embleton N. Preterm birth and subsequent insulin sensitivity: a systematic review. *Arch Dis Child* 2014;99(4):362-8.
 37. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2(8663):577-80.
 38. Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 1996;87(2):163-8.
 39. Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. Critério de Classificação Econômica Brasil. [cited 20/10/2012]; Available from: <http://www.abep.org/criterioBrasil.aspx>
-

Artigo Original

40. Williamson DE, Birmaher B, Ryan ND, Shiffrin TP, Lusk JA, Protopapa J, et al. The stressful life events schedule for children and adolescents: development and validation. *Psychiatry Res* 2003;119(3):225-41.
 41. Zeni CP, Coelho RPS, Ferreira AAM, Machado PdO, Tramontina S, Grassi-Oliveira R. Tradução e adaptação semântica para versão em português do Stressful Life Events Schedule (SLES). *Psico-USF* 2013;18(2):221-9.
 42. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(10):e47.
 43. Lin J, Epel E, Blackburn E. Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutat Res* 2012;730(1-2):85-9.
 44. Shalev I, Entringer S, Wadhwa PD, Wolkowitz OM, Puterman E, Lin J, et al. Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology* 2013;38(9):1835-42.
 45. Vassallo PF, Simoncini S, Ligi I, Chateau AL, Bachelier R, Robert S, et al. Accelerated senescence of cord blood endothelial progenitor cells in premature neonates is driven by SIRT1 decreased expression. *Blood* 2014;123(13):2116-26.
 46. Shalev I. Early life stress and telomere length: investigating the connection and possible mechanisms: a critical survey of the evidence base, research methodology and basic biology. *Bioessays* 2012;34(11):943-52.
 47. Theall KP, McKasson S, Mabile E, Dunaway LF, Drury SS. Early hits and long-term consequences: tracking the lasting impact of prenatal smoke exposure on telomere length in children. *Am J Public Health* 2013;103 Suppl 1:S133-5.
 48. Al-Attas OS, Al-Daghri N, Bamakhramah A, Shaun Sabico S, McTernan P, Huang TT. Telomere length in relation to insulin resistance, inflammation and obesity among Arab youth. *Acta Paediatr* 2010;99(6):896-9.
 49. Freck RW, Jr., Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(10):5607-10.
 50. Aviv A, Valdes AM, Spector TD. Human telomere biology: pitfalls of moving from the laboratory to epidemiology. *Int J Epidemiol* 2006;35(6):1424-9.
 51. Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, et al. Telomere length in the newborn. *Pediatr Res* 2002;52(3):377-81.
 52. Masi S, Nightingale CM, Day IN, Guthrie P, Rumley A, Lowe GD, et al. Inflammation and not cardiovascular risk factors is associated with short leukocyte telomere length in 13- to 16-year-old adolescents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(8):2029-34.
 53. Zhu H, Wang X, Gutin B, Davis CL, Keeton D, Thomas J, et al. Leukocyte telomere length in healthy Caucasian and African-American adolescents:
-

Artigo Original

relationships with race, sex, adiposity, adipokines, and physical activity. *J Pediatr* 2011;158(2):215-20.

54. Xu J, Ye J, Wu Y, Zhang H, Luo Q, Han C, et al. Reduced fetal telomere length in gestational diabetes. *PLoS One* 2014;9(1):e86161.

55. Akkad A, Hastings R, Konje JC, Bell SC, Thurston H, Williams B. Telomere length in small-for-gestational-age babies. *Bjog* 2006;113(3):318-23.

56. Davy P, Nagata M, Bullard P, Fogelson NS, Allsopp R. Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. *Placenta* 2009;30(6):539-42.

57. Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais - Relatório Anual 2008. [cited 2015 10 jan]; Available from:

<http://www.redeneonatal.fiocruz.br/images/stories/relatorios/rbpn2008.pdf>

58. Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais - Relatório Anual 2009. [cited 2015 10 jan; Available from:

<http://www.redeneonatal.fiocruz.br/images/stories/relatorios/rbpn2009.pdf>

59. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(2):147 e1-8.

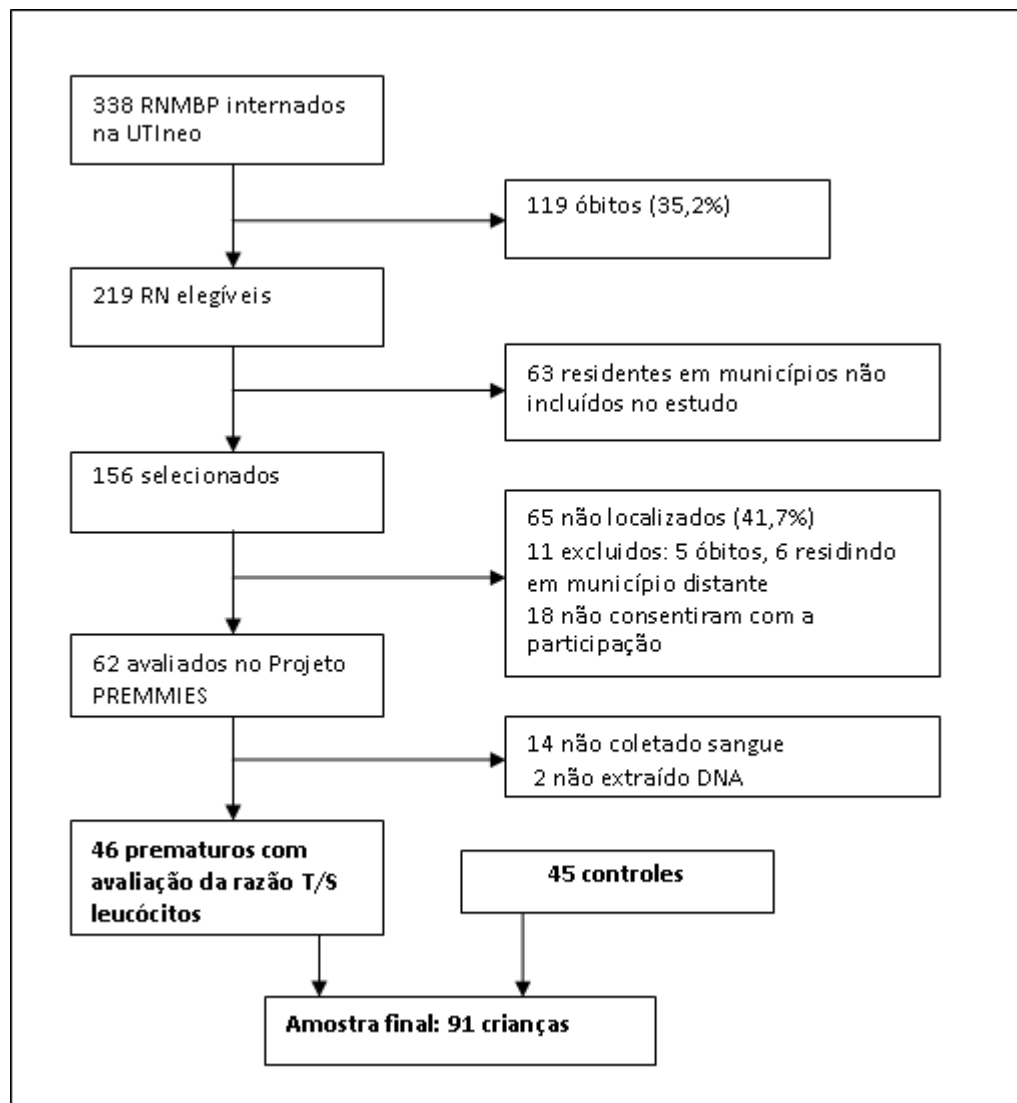
60. Payne NR, Finkelstein MJ, Liu M, Kaempf JW, Sharek PJ, Olsen S. NICU practices and outcomes associated with 9 years of quality improvement collaboratives. *Pediatrics* 2010;125(3):437-46.

61. Gadalla SM, Cawthon R, Giri N, Alter BP, Savage SA. Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Aging (Albany NY)* 2010;2(11):867-74.

62. Thomas P, NJ OC, Fenech M. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 2008;129(4):183-90.

63. Starkweather AR, Alhaeeri AA, Montpetit A, Brumelle J, Filler K, Montpetit M, et al. An integrative review of factors associated with telomere length and implications for biobehavioral research. *Nurs Res* 2014;63(1):36-50.

Figura 3.1 Descrição da formação da amostra



RNMBP: recém-nascidos de muito baixo peso

Tabela 3.1 Comparação entre as crianças elegíveis e aquelas com avaliação do comprimento dos telômeros nos leucócitos

Variável	Crianças com avaliação dos telômeros n=46	Crianças elegíveis não avaliadas n=173	p*
Sexo masculino, n/total (%)	17/46 (37,0)	91/173 (52,6)	0,085
Recebeu corticoide antenatal, n/total (%)	29/44 (65,9)	101/164 (61,6)	0,726
Peso ao nascimento (g), mediana (IQ)	1.210 (1.022-1.292)	1.240(1.070-1.239)	0,157
Peso nascimento<1000 g, n/total (%)	9/46 (19,6)	28/173 (16,2)	0,747
Idade gestacional (semanas), mediana (IQ)	30,0 (28,0-32,0)	31,0 (29,0-32,5)	0,078
Idade gestacional<30 semanas, n/total (%)	19/46 (41,3)	48/173 (27,7)	0,111
PIG, n/total (%)	20/46 (43,5)	82/173 (47,4)	0,758
Parto cesáreo, n/total (%)	23/46 (50,0)	100/173 (57,8)	0,435
Apgar 5 min <7, n/total (%)	7/46 (15,2)	33/167 (19,8)	0,627
Displasia broncopulmonar, n/total (%)	6/45 (13,3)	24/169 (14,2)	1,000
Tempo de internação (dias), mediana (IQ)	48,0 (37,0-66,2)	44,0 (36,0-55,5)	0,139

IQ= intervalo interquartil; PIG= pequeno para a idade gestacional

Resultados expressos em número (percentagem) ou mediana (intervalo interquartil)

* Valores referentes a comparação entre os RN elegíveis e aqueles com avaliação do comprimento dos telômeros realizada com sucesso.

Tabela 3.2 Características da população estudada

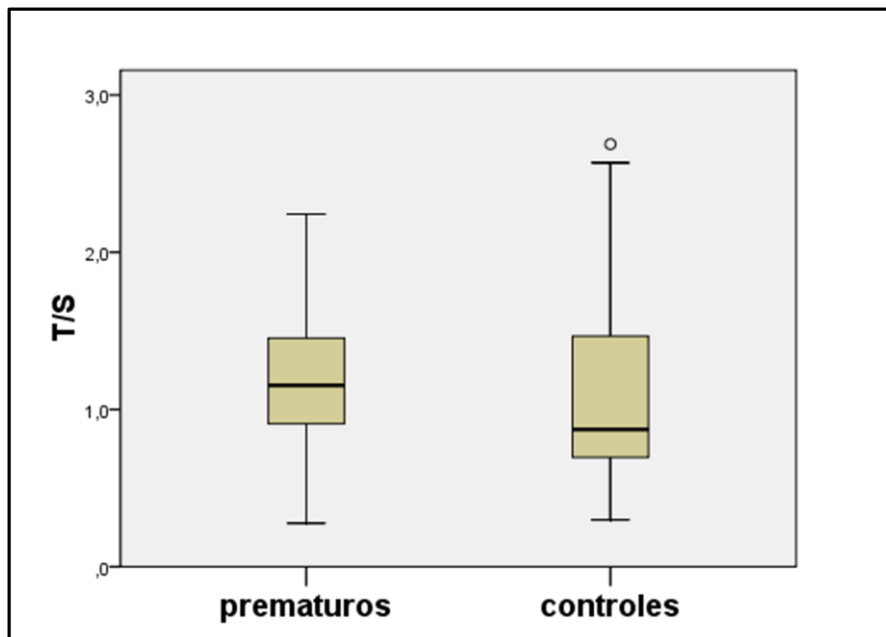
Variáveis	Prematuros n=46	Controles n=45	p*
Sexo masculino, n (%)	17 (37,0)	16 (35,6)	1,000
Raça branca, n (%)	37 (80,6)	43 (84,3)	0,794
Idade (anos), mediana (IQ)	10,0 (8,8-11,0)	10,0 (9,0-11,0)	0,641
Peso ao nascimento (g), mediana (IQ)	1.210 (1.022-1.292)	3.250 (3.095-3.435)	-
Idade gestacional (semanas), mediana (IQ)	30,0 (28,0-32,0)	39,0 (38,0-40,0)	-
Idade do pai (anos), mediana (IQ)	35,0 (30,5- 46,0)	42,5 (35,5- 48,0)	0,024
Idade da mãe (anos), mediana (IQ)	35,0 (30,0- 45,5)	40,5 (35,0- 46,7)	0,050
Escolaridade chefe família além do fundamental completo, n (%)	26 (56,5)	17 (37,8)	0,091
Escolaridade cuidador além do fundamental completo, n (%)	17 (37,0)	8 (17,8)	0,070
Tabagismo materno na gestação, n (%)	7 (15,2)	7 (15,5)	1,000
Total estressores últimos 12 meses, mediana (IQ)	9,0 (5,0- 14,0)	3,5 (2,0- 7,7)	<0,001
Algum estressor grave nos últimos 12 meses, n (%)	31 (67,4)	19 (42,2)	0,028

IQ= intervalo interquartil

Resultados expressos em número (percentagem) ou mediana (intervalo interquartil)

* Valores referentes a comparação entre os prematuros e o grupo controle.

Figura 3.2 *Boxplot* mostrando a mediana da razão T/S dos leucócitos no grupo de crianças prematuras e no grupo controle



T/S: *Telomere signal/single copy signal*

Tabela 3.3 Relação entre as variáveis e a razão T/S nos leucócitos*

Variáveis avaliadas	β (IC _{95%})	<i>p</i>
Sexo	0,198 (-0,070 a 0,466)	0,147
Idade	0,005 (-0,095 a 0,105)	0,924
Escolaridade chefe família além do fundamental completo	-0,253 (-0,538 a 0,032)	0,531
Escolaridade cuidador além do fundamental completo	-0,084 (-0,345 a 0,178)	0,082
Idade do pai	0,011 (-0,004 a 0,026)	0,162
Idade da mãe	0,000 (-0,016 a 0,015)	0,984
Tabagismo materno na gestação	0,241 (-0,110 a 0,592)	0,178
Total estressores últimos 12 meses	0,002 (-0,018 a 0,021)	0,881
Algum estressor grave nos últimos 12 meses	-0,051 (-0,311 a 0,209)	0,700

T/S: *Telomere signal/single copy signal*; IC= intervalo de confiança

*Análise univariada.

Tabela 3.4 Relação das variáveis perinatais com a razão T/S nos leucócitos nos ex-prematuros*

Variáveis avaliadas	β (IC _{95%})	<i>p</i>
Peso < 1000 g	0,133 (-0,141 a 0,406)	0,341
Idade gestacional < 30 semanas	0,030 (-0,209 a 0,270)	0,803
Pequeno para a idade gestacional	-0,174 (-0,407 a 0,058)	0,141
Corticoide antenatal	0,183 (-0,069 a 0,434)	0,155
Pré-eclâmpsia materna	0,151 (-0,143 a 0,445)	0,314
RPM	0,036 (-0,313 a 0,386)	0,838
Displasia broncopulmonar	0,213 (-0,166 a 0,591)	0,271
Tempo de internação	0,005 (-0,001 a 0,012)	0,112

T/S: *Telomere signal/single copy signal*; IC= intervalo de confiança; RPM= ruptura prolongada de membranas.

*Análise univariada

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

- Não se detectou associação entre nascimento prematuro com muito baixo peso ao nascer e comprimento dos telômeros nos leucócitos em crianças, na idade escolar;

- Não se verificou associação entre comprimento dos telômeros nos leucócitos, na idade escolar, e: idade gestacional, peso de nascimento, coticoide antenatal, pré-eclâmpsia materna, ruptura prolongada de membranas, necessidade de oxigênio com 36 semanas de idade pós-concepcional ou tempo de internação, em ex-prematuros de muito baixo peso.

APÊNDICES

Apêndice A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da prematuridade na saúde de crianças em idade escolar

Pesquisador: MARCUS HERBERT JONES

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 3

CAAE: 12323413.7.0000.5338

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 278.697

Data da Relatoria: 17/05/2013

Apresentação do Projeto:

apresentação formal acadêmica, com material complementar anexado, com cartas de de chefias

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as condições de saúde na idade escolar de crianças prematuras nascidas com muito baixo peso, em comparação com crianças nascidas a termo.

(e objetivos específicos)

o projeto está inserido na área temática de genética humana - por que?

segundo parecer - ainda pendente quanto à inserção do projeto em genética

terceiro parecer- Embora o objetivo principal do estudo seja "Avaliar as condições de saúde na idade escolar de crianças prematuras nascidas com muito baixo peso, em comparação com crianças nascidas a termo", entre os objetivos específicos destaca-se como desfecho principal a "Quantificação do comprimento absoluto dos telômeros utilizando reação de polimerase de cadeia quantitativa em tempo real". Telômeros são estruturas localizadas nas pontas dos cromossomos que consistem em uma sequência de DNA repetida várias vezes, e são necessários para a

Endereço: Av.Ipiranga, 6681

Bairro: CEP: 90.619-900

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)320-3345 **Fax:** (51)320-3345 **E-mail:** cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 278.697

replicação adequada do DNA e manutenção da estabilidade dos cromossomos. Para medida do comprimento dos telômeros será necessária a extração de DNA genômico, o que nos levou a inserir o projeto na área temática de genética humana. O projeto envolve análise genética (extração e mensuração de sequências de DNA) portanto deve ser classificado na temática de genética humana, conforme resolução 196/96 do CNS, parágrafo VIII.4

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

riscos mínimos "Como este estudo não envolve a pesquisa de nenhum medicamento, os riscos associados se restringem aos procedimentos a serem realizados no estudo. Não existe nenhum procedimento que cause risco à saúde de seu(sua) filho(a), no caso da coleta de sangue pode haver mancha roxa, inchaço ou dor no local da retirada de sangue".

benefícios "Ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre a interferência da prematuridade e baixo peso na vida da população pediátrica no Brasil, trazendo benefícios para uma forma mais completa de diagnóstico e cuidados para saúde respiratória, crescimento, qualidade de vida e desenvolvimento cognitivo".

segundo parecer - está esclarecido

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

população e amostra não constam no projeto (p. 19); cálculo amostral (p. 29) está um pouco confuso, quantos serão ao final (100 + 100?); somente como serão contatados;

não consta termo de confidencialidade de acesso e retirada dos dados do banco de dados da secretaria da saúde, pois estão vários autores, nem a ficha informativa onde estes dados serão registrados para posterior análise, que não estão no projeto;

no orçamento apercebam os custos todos bancados por patrocinador, quem é (dentre todos os colaboradores e patrocinador)?

segundo parecer -ainda não esclarecido

teerceiro parecer- o 'patrocinador' na realidade é aprovação de projeto praias (não consegui detectar entre os documentos). na réplica constya "O projeto foi contemplado com o valor de R\$20.000,00 no edital PRAIAS 2013 BPA da PUCRS, a informação foi colocada no final da página do

Endereço: Av.Ipiranga, 6681
 Bairro: CEP: 90.619-900
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (513)320-3345 Fax: (513)320-3345 E-mail: cep@puccs.br

Apêndices

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 278.697

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 21 de Maio de 2013

Assinador por:
caio coelho marques
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681
Bairro: CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)320-3345 Fax: (51)320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

Apêndice B Termo de consentimento livre e esclarecido

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA- CEP – PUCRS

Termo de consentimento livre e esclarecido**I. Justificativa e objetivos da pesquisa.**

Seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar do “PREMMIES”, um estudo que contará com a participação de cerca de 220 crianças. O estudo pretende avaliar se há diferenças entre crianças que nasceram prematuras e as que não foram prematuras, quando elas estão com idade entre 7 e 11 anos.

Antes de consentir com a participação de seu (sua) filho (a), solicitamos que vocês leiam as informações contidas neste termo de consentimento.

O estudo irá avaliar o crescimento, a função pulmonar, a qualidade de vida, o desenvolvimento cognitivo (raciocínio, inteligência,...) e o comprimento dos telômeros (estruturas que estão dentro das células e podem sofrer alteração quando passamos por um estresse grande), nas crianças nascidas prematuras com menos de 1.500g, e comparar com crianças que não foram prematuras.

A avaliação dessas variáveis em crianças nascidas prematuras na idade pré-escolar podem trazer benefícios em termos de saúde pública, ajudando a tratar de maneira mais adequada os prematuros durante e depois na internação na UTI.

Se, após a leitura deste termo, você decidir que concorda com a participação do(a) seu(sua) filho(a) neste estudo, será pedido que você assine este documento, para confirmar que você recebeu todas as informações necessárias e permitiu voluntariamente a participação do(a) seu(sua) filho(a). Podem existir palavras ou exames difíceis de entender. Caso não entenda, por

Apêndices

favor, solicite a algum dos pesquisadores que explique antes de assinar o consentimento.

II. Procedimentos a serem utilizados.

Se você concordar com a participação do seu(sua) filho(a), vocês serão convidados a comparecer ao Campus da Universidade de Caxias do Sul, em data agendada previamente e que não interfira com seu horário de trabalho e atividades escolares de se(sua) filho(a). Neste dia vocês participarão de alguns procedimentos.

Você será convidado a responder um questionário sobre as condições de saúde do seu filho e sobre condições socioeconômicas, além de um questionário sobre saúde mental, uso de drogas e álcool. Também pediremos que responda um questionário sobre situações de estresse na vida de seu filho (a).

Seu filho(a) irá responder um questionário sobre qualidade de vida (Questionário KINL QV-Genérico e um questionário de atividade física e vamos verificar o peso e a altura. Também será feito um teste para avaliar a função do pulmão (para este teste seu(sua) filho(a) irá “soprar” no circuito de um aparelho, para saber se a prematuridade causou alguma alteração que possa ser percebida na respiração.

Para avaliar a cognição (raciocínio, inteligência em vários tipos de atividades), vão ser aplicados vários testes: Teste Raven para avaliação cognitiva global, tarefas Hayling, MAC e NEUPSILIN para avaliação de funções cognitivas específicas e Teste de Desempenho Escolar (TDE) para avaliação do desempenho acadêmico.

Também vamos precisar coletar sangue e saliva do seu(sua) filho(a), para que possamos avaliar o comprimento dos telômeros. Os telômeros ficam dentro das células, e medindo o comprimento sabemos se a célula está mais “velha” do que o normal, o que pode estar associado ao surgimento de doenças. A saliva é coletada com um cotonete passado dentro da boca. O sangue, cerca de 2ml, será coletado com ajuda de um profissional com

Apêndices

experiência em coletar sangue. Pedimos também que você autorize que cerca de 1ml de sangue retirado do seu filho(a) seja armazenado, para que outros exames possam ser realizados no futuro se for necessário, sem que tenhamos que retirar sangue novamente. O sangue será utilizado somente para objetivos relacionados a este estudo.

Se seu(sua) filho(a) não foi prematuro, serão feitas as mesmas avaliações, para saber se outras situações interferiram na qualidade de vida, crescimento, função do pulmão, comprimento dos telômeros.

Essas avaliações serão realizadas por pesquisadores treinados. O tempo estimado para que sejam feitas todas as avaliações é de 3 horas, com intervalo para descanso e lanche.

III. Desconfortos ou riscos esperados.

Como este estudo não envolve a pesquisa de nenhum medicamento, os riscos associados se restringem aos procedimentos a serem realizados no estudo. Não existe nenhum procedimento que cause risco à saúde de seu(sua) filho(a), no caso da coleta de sangue pode haver mancha roxa, inchaço ou dor no local da retirada de sangue.

Os resultados deste estudo serão publicados somente em revistas científicas e a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. O Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS poderá ter acesso aos dados da pesquisa para poder assegurar que seus direitos estão sendo protegidos.

IV. Benefícios que se pode obter.

Ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre a interferência da prematuridade e baixo peso na vida da população pediátrica no Brasil, trazendo benefícios para uma forma mais completa de diagnóstico e cuidados para saúde respiratória, crescimento, qualidade de vida e desenvolvimento cognitivo.

Apêndices

V. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos.

Não haverá custos para os participantes do estudo. Você e seu (sua) filho (a) também não receberão nenhum pagamento pela participação no trabalho. Você será ressarcido (reembolsado) pelas despesas com transportes e alimentação no dia da avaliação.

Você receberá cópia do resultado dos exames de avaliação do crescimento, da função dos pulmões, do desenvolvimento cognitivo, assim como uma explicação dos pesquisadores sobre os resultados.

VI. Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

VII. Garantia de resposta a qualquer pergunta.

Os pesquisadores se comprometem a responder qualquer dúvida que você tenha sobre os procedimentos do estudo. Seu(sua) filho(a) pode participar mesmo que você não concorde com a participação em todos os procedimentos do estudo, por isso pediremos que você assinale se está ou não de acordo com a participação em cada um dos procedimentos.

VIII. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si.

Os participantes e/ou representantes podem em qualquer momento cancelar sua participação no estudo. Isto não influenciará o andamento do estudo e seus resultados futuramente, nem no tratamento de seu filho pela equipe.

IX. Garantia de privacidade.

Os dados das avaliações são confidenciais e não poderão ser utilizadas para outros objetivos que não estejam descritos neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, mas a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento.

Apêndices

PROCEDIMENTO

Questionário KINL QV-Genérico	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Critério de Classificação Econômica Brasil - ABEP	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Questionário de Atividade Física	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Teste de Função Pulmonar	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Medidas Antropométricas (peso e estatura)	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Teste Raven	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Hayling Partes A e B	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
MAC Evocação lexical e discurso narrativo oral	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
NEUPSILIN Span auditivo	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Teste de Desempenho Escolar (TDE)	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Avaliação do comprimento dos telômeros	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____
Armazenamento do sangue para outros exames	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Rubrica Responsável _____

X. Dúvidas

Se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante do estudo, você pode ligar e contatar os pesquisadores no telefone (51) 3320-3000 Renato Stein, (54) 9196-1610 Deise Schumann, (54) 8157-0000 Aline Dill Winck, (54) 9141-6917 Helen Zatti e (51)- 3320 7739 Adriane, assim como entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS pelo telefone (51) 3320-3345.

Apêndices

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos desta pesquisa de maneira clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas, e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas, e que poderei retirar meu (minha) filho (a) do estudo a qualquer momento. Caso tenha novas perguntas sobre este estudo, posso chamar um dos pesquisadores citado acima pelo telefone acima mencionado. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante do estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da PUC, telefone: (51) 3320-3345. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome da criança (sujeito da pesquisa)

_____	_____	_____
Assinatura do representante legal	Nome	Data

_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Nome	Data

Este formulário foi lido para _____
em ____/____/____ por _____ enquanto eu
estava presente.

_____	_____	_____
Assinatura de testemunha	Nome	Data

Apêndices

Apêndice C – Termo de assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PROJETO PREMMIES

Eu, _____, aceito a participar da pesquisa denominada acima. Declaro que os pesquisadores me explicaram todas as etapas e exames que farei no presente estudo, bem como, os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Compreendo que não sou obrigado a participar da pesquisa, decidindo quanto à participação ou não do estudo. Desta forma, concordo livremente em participar deste estudo sabendo que posso desistir a qualquer momento, se assim desejar.

Eu concordo em participar desta pesquisa, e aceito realizar as seguintes avaliações:

Questionário KINL QV-Genérico	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Critério de Classificação Econômica Brasil - ABEP	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Questionário de Atividade Física	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Teste de Função Pulmonar	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Medidas Antropométricas (peso e estatura)	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Teste Raven	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Hayling Partes A e B	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
MAC Evocação lexical e discurso narrativo oral	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
NEUPSILIN Span auditivo	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Teste de Desempenho Escolar (TDE)	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar
Avaliação do comprimento dos telômeros	<input type="checkbox"/> Sim, estou de acordo	<input type="checkbox"/> Não, não estou de acordo	Rubrica do Escolar

Caxias do Sul, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do Escolar

Assinatura do Pesquisador

Apêndices

Apêndice D – Informações do período neonatal

IDENTIFICAÇÃO

Nº Caso:

Nº Prontuário hospitalar:

Nome:

Nome da mãe:

Data de nascimento: ____/____/____

DADOS DA GESTAÇÃO:

Idade da mãe:

Gesta:____ Para:____ Aborto:____

Nº consultas pré-natal:

Doenças na gestação:

Corticoide antenatal: () não () sim

DADOS DO PARTO:

Tipo de parto: () Vaginal () Cesárea

Local do parto: () HGCS () outro hospital () domiciliar

Idade gestacional obstétrica:

Idade gestacional pediátrica:

Peso Nascimento (g):

Comprimento (cm):

Perímetro cefálico (cm):

Apêndices

Sexo: () masculino () feminino () indeterminado

Apgar: 1': _____ 5': _____

Gemelar: () sim () não

DADOS DA INTERNAÇÃO NA UTI NEONATAL

Data da internação: ____/____/____

Tempo de ventilação mecânica (dias): _____

Tempo de O2 (dias): _____

Corticóide para displasia broncopulmonar: () Sistêmico ()

Inalatório

() Não () Sem dados Idade do início do corticóide (dias): _____

Hemorragia cerebral: () Sim () Não () Sem dados Se sim, grau: _____

Retinopatia da prematuridade: () Sim () Não () Sem dados Se sim, grau: _____

Data da alta: ____/____/____

Peso alta (g): _____

Apêndices

Apêndice E – Condições de Saúde e Socioeconômicas

BA BLOCO A - DADOS GERAIS:

Q1 Data da entrevista

00 Nome do entrevistador (Somente Iniciais):

Q2 ID (código de identificação do paciente no estudo; use formato xxx)

Q3 Nome do entrevistado (responsável)

Q4 Quem respondeu a este questionário?

- Pai (1)
- Mãe (2)
- Outra Pessoa. Por favor, descreva no espaço o grau de parentesco: (3)

Q5 O Sr(a). possui telefone fixo em sua residência?

- Sim. Por favor, descreva o número do telefone abaixo no modelo: (00)0000-0000
(1) _____
- Não (2)

Q6 Você poderia passar outros números de telefones fixo ou celulares para que possamos entrar em contato com o Sr(a)?

Dados: descreva o número do telefone abaixo no modelo: (00)0000-0000		
	Telefone: (1)	Nome para contato: (2)
Telefone 01: (2)		
Telefone 02: (3)		
Telefone 03: (4)		
Telefone 04: (5)		
Telefone 05: (6)		

Apêndices

Q7 Qual é o seu endereço completo?

- Rua/Avenida: (1)
- Número: (2)
- Complemento: (3)
- Bairro: (4)
- Cidade: (5)
- CEP: (6)

Q8 Qual é a sua idade?

BB BLOCO B - PERGUNTAS SOBRE DADOS DEMOGRÁFICOS:

I2 Nesse questionário "seu/sua filho(a)" refere-se a criança que está participando do estudo.

Q9 Qual é o nome completo do seu filho (a)?

Q10 Qual é a cor ou raça do seu filho (a)?

- Branco (1)
- Preto (2)
- Parda (3)
- Indígena (4)
- Amarela (5)

BC BLOCO C - PERGUNTAS SOBRE SIBILÂNCIA:

Q11 Alguma vez na vida, o seu filho (a) teve sibilos (chiado) no peito?

- Sim (1)
- Não (2)

Q12 O seu filho (a) teve sibilos (chiado) no peito nos últimos 12 meses?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

Q13 Quantas crises ou ataques de sibilos (chiado) no peito o seu filho (a) teve nos últimos 12 meses?

- Nenhum (1)
- 1 a 3 (2)
- 4 a 12 (3)
- Mais de 12 (4)

Q14 Nos últimos 12 meses, com que frequência, seu filho (a) teve o sono perturbado ou acordou por causa dos sibilos (chiado)?

- Nunca acordou com sibilos (1)
- Menos de uma noite por semana (2)
- Uma ou mais noites por semana (3)

Q15 Nos últimos 12 meses, os sibilos (chiado) no peito foram tão fortes a ponto de impedir que seu filho(a) conseguisse dizer mais de duas palavras entre cada respiração?

- Sim (1)
- Não (2)

Q16 Alguma vez na vida, o seu filho(a) teve Asma/Bronquite?

- Sim (1)
- Não (2)

Q17 Nos últimos 12 meses, seu filho(a) teve sibilos (chiado) no peito durante ou após exercícios?

- Sim (1)
- Não (2)

Q18 Nos últimos 12 meses, o seu filho (a) teve tosse seca durante à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?

- Sim (1)
- Não (2)

BC BLOCO C - PERGUNTAS SOBRE RINITE:

Q19 Alguma vez na vida, seu filho(a) teve problemas com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando NÃO estava resfriado ou gripado?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

Q20 Nos últimos 12 meses, seu filho(a) teve problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando NÃO estava resfriado ou gripado?

- Sim (1)
- Não (2)

Q21 Nos últimos 12 meses, esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?

- Sim (1)
- Não (2)

Q22 Em qual dos últimos 12 meses, esse problema nasal ocorreu?

- Janeiro (1)
- Fevereiro (2)
- Março (3)
- Abril (4)
- Maio (5)
- Junho (6)
- Julho (7)
- Agosto (8)
- Setembro (9)
- Outubro (10)
- Novembro (11)
- Dezembro (12)

Q23 Nos últimos 12 meses, com que frequência as atividades do seu filho(a) foram atrapalhadas por esse problema nasal?

- Nunca (1)
- Poucas vezes (2)
- Frequentemente (3)
- Muito frequentemente (4)

Q24 Alguma vez na vida, seu filho(a) teve alergia nasal ou rinite?

- Sim (1)
- Não (2)

BD BLOCO D - PERGUNTAS SOBRE ALERGIA DE PELE (ECZEMA):

Apêndices

Q25 Alguma vez na vida, seu filho(a) teve manchas avermelhadas na pele com coceira que aparecem e desaparecem por pelo menos 6 meses?

- Sim (1)
- Não (2)

Q26 Seu filho(a) apresentou estas manchas avermelhadas com coceira alguma vez durante os últimos 12 meses?

- Sim (1)
- Não (2)

Q27 Estas manchas avermelhadas na pele com coceira apareceram alguma vez em dos seguintes lugares?

- Dobras dos cotovelos (1)
- Atrás dos joelhos (2)
- Na frente dos tornozelos (3)
- Abaixo das nádegas (4)
- Em volta do pescoço, olhos ou orelhas (5)
- Nenhum destes locais (6)

Q28 Com que idade apareceram pela primeira vez no seu filho(a) essas manchas avermelhadas na pele com coceira ?

- Antes dos dois anos (1)
- De dois a quatro anos (2)
- Cinco anos ou mais (3)

Q29 Nos últimos 12 meses, alguma vez essas manchas avermelhadas na pele com coceira desapareceram completamente?

- Sim (1)
- Não (2)

Q30 Nos últimos 12 meses, com que frequência, em média, seu filho(a) ficou acordado à noite por causa dessa coceira?

- Nunca nos últimos 12 meses (1)
- Menos de 1 noite por semana (2)
- Uma ou mais vezes por semana (3)

Q31 Alguma vez na vida seu filho(a) teve alergia de pele ou eczema ou dermatite atópica?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

BE BLOCO E - PERGUNTAS SOBRE TOSSE E/OU CATARRO:

Q32 Nos últimos 12 meses, seu filho(a) geralmente tem apresentado o peito congestionado ou encatarrado ou com tosse com secreção quando ESTÁ resfriado?

- Sim (1)
- Não (2)

Q33 Nos últimos 12 meses, geralmente seu filho(a) tem apresentado o peito congestionado ou encatarrado ou com tosse com secreção quando NÃO está resfriado?

- Sim (1)
- Não (2)

Q34 Seu filho(a) tem apresentado o peito congestionado ou encatarrado ou com tosse com secreção na maioria dos dias (4 ou mais dias por semana) ao menos 3 meses ao ano?

- Sim (1)
- Não (2)

Q35 Durante quantos anos isto tem acontecido?

BF BLOCO F - PERGUNTAS SOBRE SIBILÂNCIA E FALTA DE AR:

Q36 Nos últimos 12 meses, o peito do(a) seu filho(a) sibilou (chiou) durante ou após os exercícios?

- Sim (1)
- Não (2)

Q37 Nos últimos 12 meses, o peito do seu filho(a) sibilou (chiou) quando ele estava em repouso e SEM ter feito exercício recentemente?

- Sim (1)
- Não (2)

Q38 Nos últimos 12 meses, o peito do seu filho(a) apresentou sibilos (chiado) quando ele(a) ESTAVA resfriado(a) ou gripado(a)?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

Q39 Nos últimos 12 meses, o peito do seu filho(a) apresentou sibilos (chiado) quando ele(a) NÃO estava resfriado(a) ou gripado(a)?

- Sim (1)
- Não (2)

Q40 Seu filho(a) acordou com falta de ar alguma vez na vida?

- Sim (1)
- Não (2)

Q41 Seu filho(a) acordou com aperto no peito alguma vez na vida?

- Sim (1)
- Não (2)

Q42 Nos últimos 12 meses, o que fez o seu filho(a) piorar dos sibilos (chiado)? (marque todas as alternativas que forem necessárias)

- Clima (1)
- Pólen (2)
- Emoções (3)
- Fumaças (4)
- Poeira (5)
- Animais domésticos (6)
- Roupas de lã (7)
- Resfriados/ gripe (8)
- Fumaça de cigarro (9)
- Comidas/ bebidas (10)
- Sabonetes/ sprays/detergentes (11)
- Outros. Por favor, descreva a seguir qual (12) _____

BG BLOCO G - PERGUNTAS SOBRE TRATAMENTO PARA ASMA/BRONQUITE:

Q43 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) recebeu tratamento para asma com corticoides (cortisonas) inalados (bombinhas) por exemplo: Beclosol®, Clenil®, Clenil Compositum®, Busonid®, Seretide®, Symbicort®, Flixotide®, Budesonida, Miflasona®, Pulmicort®, Beclometasona, Fluticasona, Alenia®, Oximax®, Alvesco®?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

Q44 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) recebeu tratamento para asma com corticoides orais por exemplo: Predsin®, Prednisolona, Prednisona, Meticorten®, Oralpred®, Prelone®?

- Sim (1)
- Não (2)

Q45 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) recebeu tratamento para asma com medicamentos inalados (broncodilatadores) por nebulizadores ou inaladores (bombinhas) por exemplo: Aerolin®, Berotec®, Aerojet®, Aerodine®, Aerogold®, Combivent®, Salbutamol, Fenoterol?

- Sim (1)
- Não (2)

Q46 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) recebeu tratamento para asma com antileucotrienos por exemplo: Singulair®

- Sim (1)
- Não (2)

Q47 Nos últimos 12 meses, seu filho(a) usou algum remédio, comprimidos, bombinhas ou outra medicação para sibilância (chiado) ou asma antes, durante ou depois de realizar exercícios?

- Sim (1)
- Não (2)

Q48 Você tem um plano de tratamento escrito que explica como cuidar da asma do seu filho(a)?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

Q49 Quantas visitas o seu filho(a) fez a qualquer um dos seguintes profissionais ou locais de saúde por causa de um episódio agudo de asma ou de sibilos (chiados) no peito nos últimos 12 meses?

	Nenhuma (1)	1-3 (2)	4-12 (3)	Mais de 12 (4)
Médico (1)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Enfermeiro (2)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pediatra (3)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pneumologista (4)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sala de Emergência (5)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outros. Por favor, descreva qual (6)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Q50 Quantas visitas o(a) seu/sua filho(a) fez a qualquer um dos seguintes profissionais ou locais de saúde para uma visita de revisão de asma ou de sibilos (chiados) no peito nos últimos 12 meses?

	Nenhuma (1)	1-3 (2)	4-12 (3)	Mais de 12 (4)
Médico (1)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Enfermeiro (2)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pediatra (3)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pneumologista (4)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sala de emergência (5)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outros. Por favor, descreva qual (6)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Apêndices

Q51 Nos últimos 12 meses, quantas vezes seu filho(a) internou no hospital devido a sibilos (chiado) no peito ou asma?

- Nenhuma (1)
- 1 (2)
- 2 (3)
- Mais de 2 (4)

Q52 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) consultou com algum dos seguintes profissionais, por causa dos sibilos (chiado) no peito ou asma?

- Acupunturista (1)
- Curandeiro (2)
- Homeopata (3)
- Fisioterapeuta (4)
- Psiquiatra ou psicólogo (5)
- Assistente Social (6)
- Outros. Por favor, descreva qual (7) _____
- Nenhum (8)

Q53 O seu filho(a) alguma vez fez injeção de vacina para alergia, a fim de prevenir ou tratar asma?

- Sim (1)
- Não (2)

Q54 Nos últimos 12 meses, quantos dias (completos ou em parte) de escola seu filho(a) perdeu por causa dos sibilos (chiado) no peito ou asma?

- Nenhum (1)
- 1 a 5 dias (2)
- 5 a 10 dias (3)
- Mais de 10 dias (4)

BH BLOCO H - PERGUNTAS SOBRE TRATAMENTO PARA RINITE:

Q55 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) recebeu tratamento para rinite com corticoides nasais em spray, por exemplo: Budecort®, Busonid®, Blecosol aquoso®, Clenil aquoso®, Avanys®, Flixonase®, Nasonex®, Nasacort®, Aminaris®, Noex®?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

Q56 Nos últimos 12 meses, o seu filho (a) recebeu tratatamento para rinite com soro nasal ou com descongestionantes nasais, por exemplo: Rinosoro®, Sorine®, Afrin®, Rinolon®, Aturgyl®

- Sim (1)
- Não (2)

Q57 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) recebeu tratamento para rinite com antialérgicos orais por exemplo: Claritin®, Loratadina®, Loranil®, Zyrtec®, Cetirizina, Allegra®, Desalex®, Polaramine®, Hixizine®, Rupafin®?

- Sim (1)
- Não (2)

Q58 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) recebeu tratatamento para rinite com corticoides orais por exemplo: Predsin®, Prednisolona, Prednisona, Meticorten®, Oralpred®, Prelone®, Celestamine®?

- Sim (1)
- Não (2)

Q59 Nos últimos 12 meses, quantas visitas o seu filho(a) fez a qualquer um dos seguintes profissionais da saúde por problemas de nariz ou rinite?

	Nenhuma (1)	1-3 (2)	4-12 (3)	Mais de 12 (4)
Médico (1)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Enfermeiro (2)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pediatra (3)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pneumologista (4)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sala de Emergência (5)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outros. Por favor, descreva qual (6)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Apêndices

Q60 Nos últimos 12 meses, o seu filho(a) fez alguma injeção de vacina para alergia, a fim de prevenir ou tratar problemas de nariz ou rinite?

- Sim (1)
- Não (2)

Q61 Nos últimos 12 meses, seu filho (a) consultou com algum dos seguintes profissionais, a fim de prevenir ou tratar problemas de nariz ou rinite?

- Quiroprata (1)
- Acupunturista (2)
- Homeopata (3)
- Curandeiro (4)
- Outro. Por favor descreva qual (5) _____
- Nenhum (6)

Q62 Nos últimos 12 meses, quantos dias (completos ou em parte) de escola o seu filho (a) perdeu por causa da rinite ou problemas de nariz?

- Nenhum (1)
- 1 a 5 (2)
- 6 a 10 (3)
- Mais de 10 (4)

BI BLOCO I - PERGUNTAS SOBRE HISTÓRIA DOS PRIMEIROS ANOS DE VIDA DO(A) SEU/SUA FILHO(A):

Q63 Seu filho(a) foi alimentado no peito?

- Sim (1)
- Não (2)

Q64 Durante quando tempo alimentou no peito?

- Menos de 6 meses (1)
- 6-12 meses (2)
- Mais de 1 ano (3)

Q65 Caso o seu filho tenha recebido leite materno, durante quando tempo ele foi alimentado exclusivamente no peito sem acrescentar outros alimentos ou bebidas como leite em pó, sucos, "papinhas", iogurte, chás, etc? _____ meses.

Apêndices

Q66 Seu filho(a) tem irmãos?

- Sim (1)
- Não (2)

Q67 Em caso afirmativo, quantos?

Q68 Seu filho(a) frequentou creche alguma vez na vida?

- Sim (1)
- Não (2)

Q69 Em caso afirmativo, desde que idade? _____ meses

Q70 O seu filho(a) ficava na creche mais de meio turno (mais do que 4 horas) durante a semana no primeiro ano de vida dele(a)?

- Sim (1)
- Não (2)

BJ BLOCO J - PERGUNTAS SOBRE HISTÓRIA DOENÇAS PRÉVIAS DO(A) SEU/SUA FILHO(A):

Q71 Seu filho(a) já necessitou internação hospitalar por algum motivo além dos que citamos nas perguntas anteriores?

- Sim (1)
- Não (2)

Q72 Seu filho(a) usa óculos?

- Sim (1)
- Não (2)

Q73 Seu filho(a) usa prótese auditiva?

- Sim (1)
- Não (2)

Q74 Alguma vez na vida algum médico disse que seu filho(a) tem algum problema neurológico?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Apêndices

Q75 Caso afirmativo, qual o problema neurológico diagnosticado:

- Dificuldade motora (movimentos) (1)
- Dificuldade de aprendizado (2)
- Deficit de atenção (3)
- Convulsões (4)
- Outro. Por favor descreva qual (5) _____
- Nenhum (6)

Q76 O seu filho(a) faz uso de alguma medicação diariamente?

- Sim (1) Descreva _____
- Não (2)

BK BLOCO K - PERGUNTAS SOBRE CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA:

Q77 Sistema de pontos

	0 (1)	1 (2)	2 (3)	3 (4)	4 (5)
Televisão em cores (1)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Rádio (2)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Banheiro (3)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Automóvel (4)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Empregada mensalista (5)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Máquina de lavar (6)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Videocassete e/ ou DVD (7)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Geladeira (8)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex) (9)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Apêndices

Q78 Grau de Instrução do Chefe da Família

- Analfabeto/ Primário incompleto- Analfabeto /Até a 3ª Série Fundamental (1)
- Primário completo/ Ginásial incompleto-Até a 4ª Série Fundamental (2)
- Ginásial completo/ Colegial incompleto-Fundamental completo (3)
- Colegial completo/Superior incompleto-Médio completo (4)
- Superior completo-Superior completo (5)

BL BLOCO L - PERGUNTAS SOBRE CIGARRO:

Q79 Qual das opções a seguir melhor descreve a situação da casa onde mora atualmente seu filho(a) em relação ao cigarro?

- Dentro da minha casa ninguém fuma (1)
- Há pessoas que ocasionalmente fumam em casa (2)
- Há pessoas que freqüentemente fumam em casa (3)

Q80 Se alguém fuma na casa onde mora seu filho(a), em média, quantos cigarros são fumados por dia? (Observação: 1 maço contém 20 cigarros, meio maço contém 10 cigarros)

- 1 a 10 cigarros por dia (1)
- 11 a 20 cigarros por dia (2)
- 21 a 40 cigarros por dia (3)
- 41 ou mais cigarros por dia (4)

Q81 A mãe da criança fuma, atualmente, pelo menos uma vez por dia?

- Sim (1)
- Não (2)

Q82 A mãe da criança fumou pelo menos uma vez por dia?

	Durante a gravidez do seu filho (a) (1)	Durante o 1º ano de vida do seu filho(a) (2)
Sim (1)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Não (2)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Apêndices

Apêndice F - Escala de Eventos Estressores de Vida

Nome da criança: _____

Nome do entrevistado: _____ Data: ____/____/____

INSTRUÇÕES: Por favor, leia cada linha e circule SOMENTE se o evento aconteceu com seu filho(a) nos últimos 12 meses, e então quanto este evento afetou seu filho(a).

Evento	Preencha este círculo se isto aconteceu	Nem um pouco	Um pouco	Bastante	Muito	
1. Meu filho teve problemas com as notas ou trabalhos na escola	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
2. Minha filha começou sua menstruação.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
3. Os pais não estavam em casa por causa do trabalho.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
4. Os pais foram demitidos de um emprego.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
5. Os pais se agrediram.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
6. Meu filho testemunhou no tribunal.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
7. A namorada do meu filho estava grávida.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
8. Os pais tiveram problemas no trabalho.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
9. Meu filho foi assaltado.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
10. Meu filho teve notícias realmente ruins.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
11. Meu filho foi molestado ou tocado sexualmente.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
12. Meu filho mudou de escola.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
13. Meu filho mudou de residência.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
14. Nossa família teve problemas financeiros.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
15. Os pais do meu filho se divorciaram ou se separaram.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
16. Amigos próximos ou membros da família do meu filho tiveram problemas com a polícia.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
18. A mãe ou o pai de meu filho se casaram novamente.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
20. Meu filho não foi aceito em uma escola.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
21. Meu filho teve um acidente ou problemas de saúde.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
23. Os pais de meu filho (incluindo padrastos) tiveram ou estão esperando um filho.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
24. Meu filho contou a alguém notícias <i>realmente</i> ruins.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4
25. Um amigo próximo de meu filho morreu.	O	Quanto isto lhe afetou?	O 1	O 2	O 3	O 4

Apêndices

Evento	Preencha este círculo se isto aconteceu	Nem um pouco	Um pouco	Bastante	Muito	
26. Meu filho começou a namorar com alguém.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
27. Meu filho terminou seu namoro.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
28. Meu filho discutiu com sua namorada (o).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
29. Meu filho teve relações sexuais pela primeira vez.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
30. Alguém se mudou embora da casa de meu filho.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
31. Meu filho esteve no hospital ou sofreu uma cirurgia.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
32. Amigos próximos ou membros da família foram assaltados.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
33. Amigos próximos ou membros da família ficaram muito doentes.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
34. Meu filho teve problemas com alguém no trabalho.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
35. Meu filho brigou mais com os pais.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
36. Meu filho brigou mais com outros familiares (não os pais).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
37. Um parente próximo morreu.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
38. Meu filho tentou entrar em um time ou um clube e não conseguiu.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
39. Alguém em casa teve um bebê (não os pais de meu filho).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
40. Meu filho teve uma mudança física que não gostou (espinhas, etc.)	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
41. Meu filho foi assediado sexualmente na escola ou no trabalho.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
43. Nossa família teve problemas para comprar ou vender uma casa.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
44. Meu filho foi fisicamente/sexualmente abusada(o) por sua namorada (o)	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
45. Meu filho foi machucado ou apanhou de alguém.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
46. Meu filho foi pego cometendo um crime.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
47. Amigos próximos ou membros da família estiveram no hospital ou sofreram uma cirurgia.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
48. Minha filha teve um aborto.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
49. Debocharam de meu filho na escola ou vizinhança.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
50. Meu filho teve maus resultados em um teste importante.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
51. Houve problemas com minha casa (pessoas demais, precisava ser consertada, ratos ou insetos).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
52. Meu filho parou de conversar com um bom amigo.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
53. Meu filho brigou com um bom amigo.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4

Apêndices

Evento	Preencha este círculo se isto aconteceu	Nem um pouco	Um pouco	Bastante	Muito	
54. Meu filho teve problemas com membros da família, amigos próximos ou colegas de aula.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
55. Alguém novo se mudou para a casa de meu filho.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
57. O animal de estimação de meu filho morreu ou fugiu.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
58. Um amigo próximo ou membro da família viu um médico por causa de seus sentimentos.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
59. Meu filho descobriu que foi adotado (a).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
60. O pai ou mãe de meu filho estavam sem trabalho ou não estavam trabalhando.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
61. Meu filho morou com outra pessoa (não seu pai e mãe).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
62. Meu filho teve problemas de saúde.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
63. A vizinhança de meu filho não era segura (violência, crimes, gangues).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
64. Um amigo próximo ou membro da família se machucou.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
65. Meu filho teve problemas seus colegas da escola não gostavam dele.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
66. Amigos ou familiares próximos tentaram se machucar.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
67. O pai/mãe ou irmão/irmã de meu filho morreu.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
68. O pai/mãe de meu filho foi demitido(a).	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
69. Os irmãos (irmãs) brigaram mais com seus pais.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
70. Meu filho viu algo ruim acontecer.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
71. Minha filha engravidou.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
72. Os pais de meu filho tiveram dificuldades em se entender.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
73. A casa de meu filho foi danificada por causa de incêndio, enchente, tempestade, tornado, ou outros eventos.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
74. Meu filho parou de ir para a escola.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
75. Meu filho brigou com alguém na escola.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
76. Meu filho brigou mais com seus irmãos/irmãs.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
77. A namorada do meu filho teve um aborto.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
78. Meu filho contou para alguém que ele era bissexual ou homossexual.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
79. Meu filho fugiu de casa.	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4
80. Outros problemas ou outras coisas importantes aconteceram?	0					
	0	Quando isto lhe afetou?	0 1	0 2	0 3	0 4

Apêndices

Evento	Preencha este círculo se isto aconteceu	Nem um pouco	Um pouco	Bas- tante	Muito
	○ Quanto isto lhe afetou?	○ 1	○ 2	○ 3	○ 4
	○ Quanto isto lhe afetou?	○ 1	○ 2	○ 3	○ 4
	○ Quanto isto lhe afetou?	○ 1	○ 2	○ 3	○ 4
