



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

CLÁUDIO GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

ANÁLISE METABONÔMICA DO CONDENSADO DO AR EXALADO ANTES E APÓS
BRONCOPROVOCAÇÃO POR HIPERVENTILAÇÃO VOLUNTÁRIA EUCÁPNICA EM
ADOLESCENTES ASMÁTICOS.

RECIFE

2023

CLÁUDIO GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

ANÁLISE METABONÔMICA DO CONDENSADO DO AR EXALADO ANTES E APÓS
BRONCOPROVOCAÇÃO POR HIPERVENTILAÇÃO VOLUNTÁRIA EUCÁPNICA EM
ADOLESCENTES ASMÁTICOS.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, orientado pelo Prof. Dr. José Ângelo Rizzo, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor.

Área de Concentração: Abordagens Quantitativas em Saúde

Linha de Pesquisa: Clínica e Epidemiologia das afecções Imuno-alérgicas e Infeciosas.

Doutorando: Cláudio Gonçalves de Albuquerque

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Rizzo

RECIFE

2023

CLÁUDIO GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

ANÁLISE METABONÔNICA DO CONDENSADO DO AR EXALADO ANTES E APÓS BRONCOPROVOCAÇÃO POR HIPERVENTILAÇÃO VOLUNTÁRIA EUCÁPNICA EM ADOLESCENTES ASMÁTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovada em: 28 / 08 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ângelo Rizzo
(Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Emanuel Savio Cavalcanti Sarinho
(Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Décio Medeiros Peixoto
(Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Marco de Valois Correia Júnior
(Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco - UPE

Prof. Dr. Edil de Albuquerque Rodrigues Filho
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua presença constante em minha vida e por me fortalecer diante das dificuldades. Foi Ele quem me concedeu a sabedoria e a perseverança necessárias para enfrentar os desafios ao longo desse caminho.

À minha amada esposa, Marly Pedroza de Albuquerque, sua presença na minha vida trouxe luz, amor e alegria em todos os momentos. Agradeço por sua compreensão, paciência e incentivo constantes durante todo o período de elaboração desta tese. Seu apoio incondicional e a forma como você sempre esteve ao meu lado, apoiando meus sonhos e compartilhando minhas conquistas, são inestimáveis. Você é minha fonte de inspiração e motivação, e sou profundamente grato por tê-la ao meu lado.

Aos meus amados filhos, Lara e Lucas Pedroza de Albuquerque, que são a luz da minha vida e minha maior fonte de alegria. Agradeço por serem minha motivação diária e por compreenderem as minhas ausências enquanto me dediquei aos estudos. Vocês são meu maior orgulho e minha razão para seguir em frente. Amo vocês infinitamente.

Aos meus queridos pais, Arlete Cristina Pereira de Albuquerque e Roberto Gonçalves de Araújo, por todo o amor, apoio e incentivo que me deram ao longo desta jornada de doutorado. Vocês sempre estiveram ao meu lado, encorajando-me a persistir e superar os desafios.

Ao meu querido irmão, Roberto Gonçalves de Albuquerque, sua amizade, companheirismo e apoio foram essenciais para mim ao longo desta caminhada. Agradeço por sempre estar presente, me incentivando e compartilhando palavras de motivação.

Quero expressar minha eterna gratidão ao meu orientador, Professor Doutor José Ângelo Rizzo, que com seu profundo conhecimento e orientação, me conduziu com maestria neste fascinante caminho de pesquisa e descoberta. Sua inigualável dedicação e comprometimento foram pilares fundamentais para a concretização deste trabalho. Além disso, sou grato também por sua constante inspiração e incentivo, que impulsionaram meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Agradeço de coração por toda a confiança depositada em mim ao longo dessa jornada, tornando-a verdadeiramente enriquecedora e memorável.

Da mesma forma, agradeço ao Professor Doutor Décio Medeiros e ao Professor Doutor Emanuel Sarinho por sua orientação e apoio ao longo deste percurso acadêmico. Suas contribuições foram essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Agradeço também aos professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, que compartilharam conosco seus conhecimentos e experiências, contribuindo para o nosso crescimento acadêmico e pessoal. Incluindo também, Paulo Nascimento, pelo compromisso e dedicação ao PPGSCA.

Aos colegas da turma DO13 do PPGSCA, a jornada foi mais leve e enriquecedora com a presença de vocês. Compartilhamos momentos de estudo, alegria e superação, e hoje, celebramos juntos mais uma conquista.

Aos amigos Edil e Marco, sou grato pela colaboração e troca de conhecimentos ao longo dessa pesquisa. Vocês foram fundamentais para o sucesso deste trabalho e serão sempre fonte de inspiração em nosso caminho de amizade e cooperação.

Aos participantes do Grupo de Pesquisa em Broncoespasmo Induzido por Exercício, que vivenciaram juntos várias conquistas nesse processo.

Expresso meu profundo agradecimento ao Prof^o Dr. Ricardo e sua aluna Tatiane do departamento de Química Fundamental, por compartilharem generosamente seu vasto conhecimento e por conduzirem análises metabonômicas tão importantes para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

Não posso deixar de agradecer aos pacientes, adolescentes atendidos no Hospital das Clínicas, que aceitaram participar deste estudo, contribuindo para o avanço da ciência. Sua disposição e dedicação tornaram possível a realização deste trabalho.

Também é importante mencionar os funcionários do Hospital das Clínicas, especialmente da Área de Alergia e Imunologia, Pediatria e do Serviço de Pneumologia, e em especial a Selma Souza, que desempenharam um papel fundamental durante a coleta de dados e em todo o processo de pesquisa.

E por fim, a toda minha família, minha base sólida, meu porto seguro. Vocês foram meu alicerce em todos os momentos, me encorajando, me motivando e me inspirando a nunca desistir dos meus sonhos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado, o meu mais profundo agradecimento. Cada um de vocês fez parte dessa conquista, e sou grato por ter cada um em minha vida.

Com carinho e gratidão,

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas em crianças e adolescentes, com sintomas como dispneia, sibilância, tosse e aperto no peito. Cerca de metade dos casos apresentam o fenótipo do broncoespasmo induzido por exercício (BIE), que ocorre durante atividades físicas vigorosas, mas cujos mecanismos ainda não estão totalmente elucidados. O objetivo do estudo foi analisar, por meio da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), o perfil de metabólitos no condensado do ar exalado (CAE) em adolescentes asmáticos antes e após a broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica (HVE). Trata-se de um estudo transversal, exploratório e comparativo. Foram recrutados 44 adolescentes com diagnóstico de asma, na faixa etária dos 10 aos 20 anos, para participarem do teste de broncoprovocação por HVE e, assim, classificados em dois grupos: asmáticos com BIE (BIE +) e asmáticos sem BIE (BIE -). A coleta do CAE foi realizada antes e após a HVE, através de um equipamento construído, o qual reivindicamos a patente junto à Diretoria de Inovação e Empreendedorismo da UFPE (Processo 23076.073092/2023-39). As amostras do biofluido foram enviadas para análise metabonômica através da RMN ¹H no Departamento de Química da UFPE. O projeto de pesquisa que resultou nesta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (parecer: 2.796.049). Os perfis metabonômicos analisados no CAE antes do HVE foram capazes de discriminar a presença de BIE nos asmáticos com uma sensibilidade de 82,1% e especificidade de 83,3%. Houve separação discriminativa entre os metabólitos presentes no CAE antes e após a HVE no grupo com BIE ($p < 0,05$). No grupo de asmáticos sem BIE não foram observadas alterações nos metabólitos do CAE após o teste de broncoprovocação ($p = 0,19$). Além disso, houve uma maior intensidade do pico do sinal na RMN ¹H no deslocamento químico 1,92 ppm, relacionado ao acetato, nos adolescentes que apresentaram BIE em relação àqueles sem BIE. A análise do CAE foi capaz de discriminar BIE com bons valores de sensibilidade e especificidade. Os asmáticos com BIE apresentam alterações significativas nos metabólitos do CAE quando submetidos ao teste de broncoprovocação, em relação à análise basal. A identificação do metabólito acetato, com maior intensidade nos adolescentes com BIE, pode indicar uma potencial via metabólica associada à resposta asmática ao exercício.

PALAVRAS-CHAVE: asma; broncoespasmo induzido por exercício; condensado do ar exalado; metabolômica.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory airway disease characterized by symptoms such as dyspnea, wheezing, cough and chest tightness. The disease is very common among children and adolescents and approximately half of them exhibit the phenotype of exercise-induced bronchoconstriction (EIB), which occurs during vigorous physical activities, but whose mechanisms are not fully understood. The aim of this study was to analyze, using Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR), the metabolite profile in the exhaled breath condensate (EBC) in asthmatic adolescents before and after bronchoprovocation by eucapnic voluntary hyperventilation (EVH) for EIB diagnosis. This was a cross-sectional, exploratory, and comparative study. Forty-four adolescents with a diagnosis of asthma, aged between 10 to 20 years, were recruited to participate and were classified into two groups: asthmatics with EIB (EIB +) and those without EIB (EIB -). EBC collection was performed before and after EVH using a custom-built device for which we claimed a patent from the Innovation and Entrepreneurship Directorate of UFPE (Process 23076.073092/2023-39). Biofluid samples were sent for metabolomic analysis via ^1H NMR at the UFPE Department of Chemistry. The research project that led to this thesis was approved by the Ethics Committee for Human Research at the Center for Health Sciences of the Federal University of Pernambuco (opinion: 2,796,049). The metabolomic profiles analyzed in EBC before EVH were able to discriminate the presence of EIB in asthmatics with a sensitivity of 82.1% and specificity of 83.3%. There was a discriminative separation between the metabolites present in EBC before and after EVH in the EIB+ group ($p < 0.05$). In the group of asthmatics without EIB, no changes in EBC metabolites were observed after the bronchoprovocation test ($p = 0.19$). Furthermore, there was a higher peak intensity of the ^1H NMR signal at a chemical shift of 1.92 ppm, related to acetate, in adolescents who had EIB compared to those without EIB. The analysis of EBC was able to discriminate EIB with good sensitivity and specificity values. Asthmatics with EIB had significant changes in EBC metabolites after the bronchoprovocation test compared to the baseline. The identification of the acetate metabolite, with higher intensity in adolescents with EIB, may indicate a potential metabolic pathway associated with the asthmatic response to exercise.

KEYWORDS: asthma; exercise-induced bronchoconstriction; exhaled breath condensate; metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Mecanismo fisiopatológico da asma envolvendo as vias Th1 (verde), Th2 (laranja) e Th17 (azul), com indicação de possíveis biomarcadores (cinza)	22
Figura 02 -	Fenótipos da asma	24
Figura 03 -	Músculo liso brônquico estimulado diretamente por vários mediadores...	28
Figura 04 -	Modelo da síntese dos cisteinil-leucotrienos.....	29
Figura 05 -	Eventos promotores do broncoespasmo induzido por exercício (BIE)	30
Figura 06 -	Interconexão entre as diferentes “ômicas”	33
Figura 07 -	Fluxo de trabalho de um estudo de asma baseado em metabolômica	34
Figura 08 -	Exemplo da comparação do espectro de RMN 1H de crianças não asmáticas (superior - A) e asmáticas (inferior - B)	37
Figura 09 -	Fluxograma do Estudo	43
Figura 10 -	Diagrama do equipamento para coleta do condensado do ar exalado	44
Figura 11 -	Coleta do condensado do ar exalado no dispositivo construído em nosso laboratório	44
Figura 12 -	Teste de Função Pulmonar (Espirometria)	45
Figura 13 -	Realização da hiperventilação voluntária eucápnica	46
Figura 14 -	Análise metabonômica do condensado do ar exalado	48
Figura 15 -	Comparação do perfil de metabólitos presentes no CAE antes e após o teste da hiperventilação voluntária eucápnica nos adolescentes asmáticos com e sem BIE.....	55
Figura 16 -	Teste de validação por permutação da análise por OPLS-DA das amostras do condensado do ar exalado pré e pós HVE.....	56
Figura 17 -	Esquema proposto ilustrando as vias metabólicas dos metabólitos do CAE envolvidos com o mecanismo da broncoconstrição	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Dados gerais da amostra.	53
Tabela 02 -	Matriz de classificação do modelo metabonômico (LDA, 8 variáveis, 44 amostras).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE	Asma Induzida por Exercício
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BIE	Broncoespasmo Induzido por Exercício
CAE	Condensado do Ar Exalado
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas
CisLT	Cisteinil-leucotrienos
CO ₂	Dióxido de Carbono
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
COX	Ciclo-oxigenase
FeNO	Fração do Óxido Nítrico Exalado
FRn	Frequência de Ressonância
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i> (Iniciativa Global para Asma)
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Espectrometria de Massa
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
IL	Interleucina
IgE	Imunoglobulina E
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massa
LOOCV	Validação Cruzada <i>Leave-One-Out</i>
LDA	Análise Discriminante Linear
MassBank	MassBank Europe Spectral Database
MS	Espectrometria de Massas
Na ⁺	Sódio
OPLS-DA	Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados
PCA	Análise de Componentes Principais
PL	Fosfolipase
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
PGD ₂	Prostaglandina D ₂

PPM	Partes por milhão
QV	Qualidade de Vida
RNA	Ácido Ribonucleico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TSLP	Linfopoietina Estromal Tímica
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Células T auxiliares tipo 1
Th2	Células T auxiliares tipo 2
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEF ₁	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3	MÉTODO	40
3.1	DESENHO DO ESTUDO	40
3.2	LOCAIS DA PESQUISA	40
3.4	RECRUTAMENTO DOS PACIENTES	40
3.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	41
3.6	PROCEDIMENTOS REALIZADAS	41
3.7	PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS (EM SEQUÊNCIA)	42
3.7.1	Informações sobre a pesquisa e coleta das assinaturas dos Termos de Consentimento e de Assentimento	42
3.7.2	Medidas Antropométricas e Idade	43
3.7.3	Coleta do condensado do ar exalado (CAE)	44
3.7.4	Medida do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF ₁)	45
3.7.5	Teste de broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica (HVE)	47
3.7.6	Análise metabonômica do condensado do ar exalado	48
3.7.7	Processamento dos dados espectrais	49
3.7.8	Análise multivariada dos dados espectrais	49
3.8	PROCESSO de TABULAÇÃO e VERIFICAÇÃO DOS DADOS	49
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3.10	ASPECTOS ÉTICOS	49

3.10.1	Riscos e Benefícios	50
4	RESULTADOS	52
4.1	CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO PARA COLETA DO CAE.	52
4.2	RESULTADOS METABONÔMICOS	53
5	DISCUSSÃO	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)	76
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)	80
	APÊNDICE C - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 07 A 18 ANOS - Resolução 466/12)	84
	APÊNDICE D – PLANILHA DE TABULAÇÃO	88
	APÊNDICE E – PATENTE EQUIPAMENTO PARA COLETA DO CONDENSADO DO AR EXALADO	91
	APÊNDICE F – ARTIGO ORIGINAL DA TESE	92
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO	113

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por hiperresponsividade brônquica, obstrução variável das vias aéreas e sintomas respiratórios recorrentes como dispneia, sibilância, tosse e aperto no peito. Sua patogênese envolve uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, que desencadeiam uma resposta inflamatória mediada por células e mediadores solúveis. Essa resposta inflamatória resulta em broncoconstrição e hipersecreção de muco, podendo levar a remodelamento brônquico . (GINA, 2023; KURUVILLA, 2019; PAVORD, 2018).

Estudos epidemiológicos recentes revelaram que mais de 300 milhões de pessoas vivem com asma em todo o mundo, sendo que a prevalência da doença aumentou a partir da metade do século XX em muitos países em desenvolvimento (VON MUTIUS E SMITS H.H, 2020; VOS, 2017)

Trata-se de uma afecção respiratória que pode variar em gravidade e frequência dos sintomas, desde formas leves e esporádicas até casos graves e persistentes. Assim, caracteriza-se por ser heterogênea, apresentando diversos fenótipos nos quais podemos distinguir grupos de pacientes com características clínicas e fisiológicas semelhantes. A medicina de precisão busca direcionar o tratamento de acordo com o fenótipo específico do paciente, possibilitando uma abordagem mais personalizada e eficaz. (SCHOETTLER N, 2020; PAVORD, 2018)

Os fenótipos da asma são características observáveis resultantes da interação entre fatores genéticos e ambientais. Esses fenótipos descrevem mecanismos patofisiológicos distintos em nível celular e molecular, permitindo uma compreensão mais precisa da doença. Embora os pacientes possam apresentar sintomas clínicos semelhantes, suas respostas aos tratamentos podem variar significativamente. A classificação tradicional em asma atópica e não atópica tem sido complementada por abordagens mais abrangentes, considerando diversos fatores clínicos e inflamatórios para uma melhor compreensão e manejo da doença, por exemplo: asma infantil, asma de início tardio, asma grave, asma com alto nível de T2, asma com baixo nível de T2, asma relacionada à obesidade, asma associada ao tabagismo etc. (POPOVIĆ-GRLE, 2021; KURUVILLA, 2019)

Uma análise direcionada aos componentes da inflamação das vias aéreas pode contribuir para uma melhor compreensão dos fenótipos da asma, porém essa avaliação é desafiadora devido à dificuldade de realizar testes funcionais e coletar amostras biológicas invasivas, como o lavado broncoalveolar (BAL) e a biópsia brônquica. Além disso, os marcadores séricos podem não refletir adequadamente a inflamação local das vias aéreas. O condensado do ar exalado (CAE) tem sido discutido como uma ferramenta de obtenção relativamente fácil, não invasiva e acessível para a coleta

de uma ampla variedade de componentes do fluido de revestimento das vias aéreas. (PORPODIS, 2022; POŁOMSKA, 2021)

Uma grande variedade de compostos orgânicos voláteis (COVs) que refletem mudanças metabólicas e processos fisiológicos e fisiopatológicos podem ser avaliados a partir de amostras do ar exalado. Fatores como idade, sexo, estado fisiológico, genética, dieta e estados patológicos influenciam a quantidade e diversidade de COVs exalados, tornando-os como "impressões digitais" únicas. Esses compostos são importantes indicadores de alterações metabólicas no organismo e têm potencial diagnóstico e de monitoramento da saúde (SHARMA, KUMAR e VARADWAJ, 2023)

A análise dos COVs presentes na fase gasosa do ar exalado tem sido realizada por meio do chamado "nariz eletrônico", que é um sistema de sensores capaz de detectar e quantificar esses compostos. Um deles é o óxido nítrico exalado (FeNO), que tem recebido atenção especial na literatura científica. A medição do FeNO é considerada importante para avaliar a inflamação das vias aéreas inferiores e prever a resposta ao tratamento com corticosteroides inalados (KOREVAAR ,2023; PAVORD, 2023). Outro componente estudado é o condensado do ar exalado (CAE), que é o líquido obtido a partir da respiração oral e coletado através de um tubo resfriado. Esse condensado é composto principalmente por água, mas também contém uma pequena quantidade de componentes biológicos originados de células e do revestimento das vias aéreas que também variam com seu estado fisiológico ou patológico. (GHELLI, 2022; HORVÁTH, 2017).

A origem e composição das partículas e gotículas exaladas durante a respiração, que contribuem para a formação do CAE, ainda são amplamente desconhecidas (HORVÁTH, 2017). Estudos utilizando contadores de partículas a laser têm verificado a presença dessas partículas aerosolizadas, o que pode explicar a presença de componentes não voláteis, como citocinas e íons de sódio, no CAE. Acredita-se que pequenas quantidades de fluido surfactante sejam liberadas da superfície das vias aéreas durante a expiração, devido ao fluxo turbulento do ar ou à abertura de seções colapsadas das vias aéreas. A presença de surfactantes e proteínas surfactantes no CAE indica que os alvéolos podem ser uma fonte dessas partículas, mas ainda não está claro se elas são aerosolizadas diretamente dos alvéolos durante a expiração ou após sua migração para as vias aéreas . (DAVIS e MONTPETIT,2018)

A obtenção segura e fácil do CAE tem despertado grande atenção. Isso se deve ao desenvolvimento de técnicas sensíveis que permitem avaliar mínimas quantidades de biomarcadores provenientes do sistema respiratório, como citocinas, quimiocinas, metabólitos, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, microRNAs e L-arginina, entre outras moléculas. (KIERBIEDŹ-GUZIŁ e SOZAŃSKA, 2023; LIKOŃSKA, 2023; POŁOMSKA e SOZAŃSKA, 2022; TAHAN,2016; STELMACH, 2016; BARRETO, ZAMBARDI, VILLA, 2015; NOBAKHT, 2015; THOMAS, 2013). A análise dessas substâncias pode desempenhar um papel crucial na compreensão dos mecanismos

que envolvem os diferentes fenótipos da asma, como o broncoespasmo induzido por exercício (BIE), presente em cerca de 50% das crianças (DE AGUIAR, 2018; SILVA FILHO, 2015; CORREIA JUNIOR, 2012)

O BIE é definido como um estreitamento transitório das vias aéreas inferiores associado ao exercício. Os sintomas incluem sibilância, tosse, aperto no peito, dor no peito, falta de ar (dispneia) e produção excessiva de muco, que estão relacionados ao exercício vigoroso. No entanto, esses sintomas não são sensíveis nem específicos para identificar indivíduos com BIE, e o diagnóstico deve ser baseado em alterações na função pulmonar após broncoprovocação por exercício ou técnicas alternativas como a hiperventilação voluntária eucápnica (HVE). Uma redução no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) igual ou superior a 10% em relação ao valor basal após a broncoprovocação caracteriza a presença do BIE. (KLAIN, 2021; DE AGUIAR, 2018; SILVA FILHO, 2015; PARSONS, 2013; CORREIA JUNIOR, 2012)

Seu mecanismo envolve uma série de eventos fisiológicos. Durante o exercício físico, ocorre um aumento da ventilação pulmonar e, conseqüentemente, do fluxo de ar nas vias aéreas, levando a uma maior perda de água por evaporação na superfície das vias respiratórias. Isso resulta em aumento da osmolaridade do fluido periciliar da mucosa, liberação de mediadores como leucotrienos, histamina e prostaglandinas que causam contração dos músculos lisos dos brônquios, maior produção de muco, aumento da permeabilidade microvascular e ativação dos nervos sensoriais, resultando em broncoconstrição e edema das vias aéreas. Além disso, fatores neurológicos também desempenham um papel na fisiopatologia do BIE, como a ativação direta de nervos sensoriais pelos estímulos osmóticos e a influência das prostaglandinas na sua ativação. (KLAIN, 2021; ANDERSON, DAVISKAS, 2000; PARSONS, 2013).

Apesar de haver conhecimento sobre o mecanismo do BIE, ainda existem diversas questões que necessitam de uma compreensão mais aprofundada. Por exemplo, por que o BIE não afeta todos os indivíduos com asma e quais são os fatores que os diferenciam? Além disso, o que causa a variabilidade temporal na resposta brônquica ao exercício no mesmo indivíduo? Também é importante investigar se existem mecanismos de proteção contra a resposta osmótica em pacientes sem BIE. Outra questão relevante é compreender o motivo pelo qual o tratamento com corticosteroides inalados pode atenuar ou abolir o BIE em alguns asmáticos, mas não em outros. Essas são apenas algumas das questões relacionadas à fisiopatologia de interesse clínico bastante prático que precisam ser exploradas (RIZZO, 2021; KLAIN, 2021; BHATIA, ABU-HASAN e WEINBERGER, 2019; DE AGUIAR, 2018; PARSONS, 2013; ANDERSON, 2010; SUBBARAO, 2006; PEDERSEN, 1995).

Dada a importância da investigação dos mecanismos do BIE e em busca das respostas a esses questionamentos, desenvolvemos um equipamento de coleta do CAE, para o qual reivindicamos

a patente e descrevemos com detalhes na seção de material e métodos. Desta forma, foi possível investigar as alterações de componentes metabólicos das amostras em crianças e adolescentes com asma com e sem diagnóstico do BIE após broncoprovocação por HVE. O estudo dessas substâncias foi realizado através da análise metabômica, no Departamento de Química Fundamental da UFPE, utilizando a técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H).

A metabômica é uma abordagem analítica de alto rendimento que busca a compreensão abrangente do perfil metabólico em material biológico obtido de um organismo em seu estado natural ou em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos. Envolve a identificação e quantificação de pequenas moléculas (metabólitos) presentes em fluidos biológicos, como o CAE, utilizando técnicas analíticas avançadas, como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Em pacientes asmáticos, essa abordagem tem fornecido informações valiosas sobre a função metabólica e modificações bioquímicas nesse material (KISS, 2023; FERRARO, 2020; STERK, 2019)

Carraro et al. (2013) utilizaram a análise da metabômica do condensado do ar exalado para distinguir diferentes fenótipos da asma em crianças. Foram analisadas 42 crianças asmáticas, divididas em grupos de asma não grave e asma grave, além de um grupo de controle saudável. A análise dos metabólitos presentes no condensado permitiu uma distinção clara entre os grupos, incluindo a identificação precisa do fenótipo de asma grave. Compostos como ácido retinóico, adenosina e vitamina D foram importantes nessa distinção.

Utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear para analisar amostras de CAE em pacientes com asma e voluntários sem afecções respiratórias, Ibrahim et al. (2013) desenvolveram um modelo de classificação que permitiu distinguir os indivíduos asmáticos dos controles saudáveis, com uma precisão de 84%. O modelo foi validado externamente, com uma precisão de 91%. Além disso, foram explorados modelos para identificar subgrupos de asmáticos com base na eosinofilia e neutrofilia no escarro, controle da asma e uso de corticosteroides inalados.

O estudo de Schleich (2019) identificou compostos orgânicos voláteis exalados (COVs) como biomarcadores para distinguir os diferentes perfis inflamatórios da asma. Eles utilizaram técnicas avançadas de cromatografia e espectrometria de massa em mais de 500 pacientes, estabelecendo o maior estudo do tipo. Os COVs foram capazes de discriminar eosinofilia e/ou neutrofilia no escarro, fornecendo evidências sólidas para o desenvolvimento de perfis de biomarcadores exalados na asma. Esse estudo é um avanço importante no campo da fenotipagem inflamatória da asma.

Há quase uma década, nosso grupo tem estudado o BIE. Analisamos a hiperventilação voluntária eucápnica (HVE) como uma técnica alternativa ao exercício físico, a variabilidade da resposta ao BIE e sua comparação com a corrida em esteira em indivíduos riníticos sem asma. (RIZZO, 2022; RIZZO, 2021; RODRIGUES FILHO, 2018; DANTAS, 2015; SILVA FILHO, 2015).

A experiência adquirida com os métodos de broncoprovocação despertou nosso interesse em compreender melhor a fisiopatologia do BIE. Portanto, o objetivo desta pesquisa é analisar o perfil de metabólitos encontrados no condensado do ar exalado obtido antes e após o teste de broncoprovocação por HVE de adolescentes asmáticos com e sem resposta compatível com o diagnóstico de BIE.

JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA

Considerando a fisiopatologia do BIE e a discordância em seu diagnóstico, uma vez que indivíduos com a mesma doença (asma) podem ou não apresentar o fenômeno, e, no mesmo indivíduo, apresentar também variabilidade temporal, surgiu o interesse em tentar aprofundar os conhecimentos sobre sua fisiopatologia. Inicialmente, realizamos uma busca nas bases de dados Periódicos Capes, Pubmed/Medline e Bireme, utilizando os operadores booleanos (AND, OR, NOT) e os termos asthma, biomarkers, phenotype, endotype, metabolomics, exhaled breath condensate, nuclear magnetic resonance, exercise induced bronchospasm.

No entanto, não encontramos estudos que relacionassem as respostas metabólicas em adolescentes asmáticos com BIE. A maioria dos estudos analisou respostas a estímulos ou uso de medicamentos em asmáticos comparados a indivíduos normais, não abordando especificamente a análise dos metabólitos presentes no CAE em asmáticos com fenótipo de BIE.

Diante dessa lacuna, surge a curiosidade de investigar se há diferenças no perfil metabonômico de indivíduos asmáticos com e sem BIE, coletando e analisando o biofluido do CAE antes e após o teste de broncoprovocação por HVE.

O estudo da metabonômica no CAE em asmáticos antes e após a broncoprovocação por HVE pode contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia desse fenômeno, da variabilidade de resposta entre os asmáticos e até mesmo dentro do mesmo indivíduo em diferentes dias, além de ajudar a identificar opções terapêuticas preventivas específicas (medicina de precisão).

PERGUNTA CONDUTORA

Existem diferenças no perfil de metabólitos encontrados no condensado do ar exalado obtido antes e após o teste de broncoprovocação por HVE de adolescentes asmáticos com e sem BIE ?

OBJETIVO GERAL

Analisar através da RMN ^1H o perfil de metabólitos no condensado do ar exalado em adolescentes asmáticos antes e após a broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o perfil metabonômico do CAE em adolescentes asmáticos com e sem BIE antes do teste de HVE
- Avaliar o poder discriminante dos metabólitos do CAE para detectar BIE antes da HVE.
- Avaliar a discriminação dos metabólitos antes e após teste de HVE nos grupo de adolescentes asmáticos sem BIE.
- Avaliar a discriminação dos metabólitos antes e após teste de HVE nos grupo de adolescentes asmáticos com BIE.
- Investigar a presença de compostos químicos relacionados com as vias metabólicas envolvidas no processo fisiopatológico para o desencadeamento do BIE.

ESTRUTURA DA TESE

A tese compreende os seguintes capítulos: revisão narrativa da literatura, material e métodos, resultados, discussão e considerações finais. No capítulo de revisão da literatura, realizou-se uma revisão narrativa abrangente sobre a asma, abordando sua fisiopatologia, fenótipos e endótipos. Também foi abordado o broncoespasmo induzido por exercício e sua fisiopatologia em indivíduos asmáticos, além dos conceitos do metaboloma e sua relação com as ciências "ômicas". No contexto, foi destacada a diferenciação entre estudo metabonômico e metabolômico, bem como a investigação do metaboloma na asma. Para o desenvolvimento desse capítulo, foram utilizadas as bases de dados Periódicos Capes, Pubmed/Medline e Bireme, com os seguintes termos MeSH, isolados ou em associação: *asthma*, *biomarkers*, *phenotype*, *endotype*, *metabolomics*, *exhaled breath condensate*, *nuclear magnetic resonance* e *exercise induced bronchospasm*. Selecionaram-se os artigos cujos resumos estivessem alinhados com o objetivo do estudo.

O capítulo de material e métodos foi organizado de forma a listar todas as etapas realizadas na pesquisa, seguindo a ordem cronológica do estudo. Neste capítulo, são apresentados: o desenho do estudo, os locais onde foram realizadas as coletas e análises dos dados, o recrutamento dos participantes, os critérios de inclusão e exclusão, os procedimentos realizados, a construção do equipamento para coleta do condensado do ar exalado (com a reivindicação para o patenteamento obtido junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial), os procedimentos operacionais, o processamento e análise dos dados, bem como os aspectos éticos considerados.

No capítulo seguinte, são apresentados os resultados, onde são fornecidos dados relacionados à caracterização da amostra, bem como os resultados metabonômicos antes e após o teste de broncoprovocação, apresentados por meio de tabelas e figuras. Após essa seção, encontra-se a discussão, na qual os resultados são comparados com a literatura existente. Por fim, nas considerações finais, são apresentadas as conclusões do estudo e possíveis propostas para futuras pesquisas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Definição da asma como doença respiratória crônica

A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias respiratórias. Ela é definida pela presença de sintomas respiratórios, como chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse, que variam ao longo do tempo e em intensidade, juntamente com limitação variável do fluxo de ar expiratório (GINA, 2023). Afetando mais de um quarto de bilhão de pessoas em todo o mundo, estima-se que ultrapassará 400 milhões de indivíduos até o ano de 2025. Aproximadamente 14% das crianças têm o diagnóstico de asma, considerando-se a condição crônica mais comum na infância. (LEVY, 2023; XEPAPADAKI, 2022; ZAR, 2014).

No Brasil, estima-se que a prevalência média de asma ativa seja de 18,5% em adolescentes (Solé, 2015). Sendo a quarta causa de internações no país, com custo anual médio de R\$ 2.200,00 reais por paciente acompanhado no Sistema Único de Saúde (SUS). No sistema de saúde suplementar, estima-se um custo de quase R\$ 300,00 por atendimento no setor de emergência e R\$ 75.000,00 por internação na unidade de terapia intensiva (UTI). Esses custos poderiam ser reduzidos oferecendo tratamento personalizado de acordo com o fenótipo do paciente, considerando os processos fisiopatológicos distintos por especialistas experientes. (NASCIMENTO, 2023; CARDOSO, 2017).

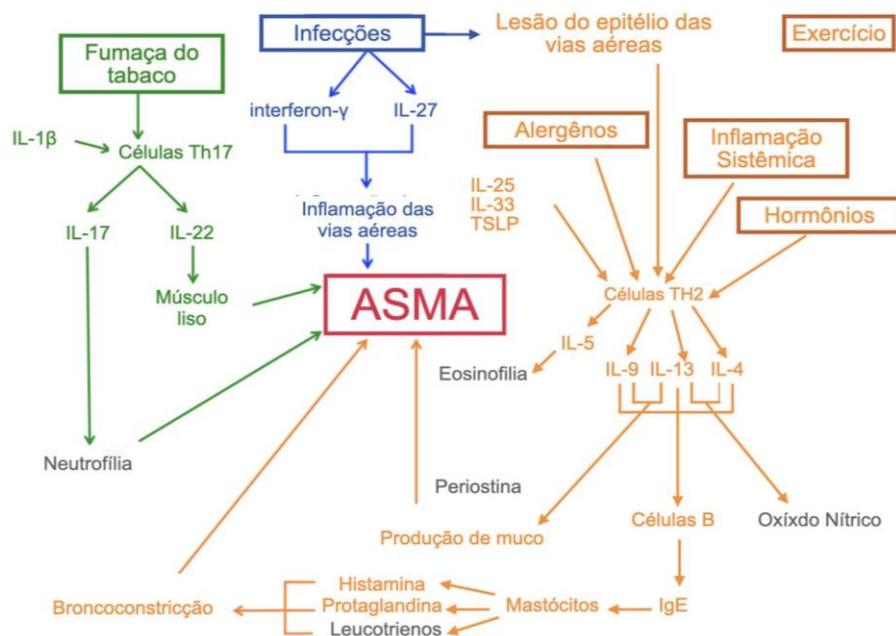
O processo fisiopatológico da asma envolve uma combinação de fatores desencadeantes da liberação de mediadores inflamatórios nas vias aéreas e da hiperresponsividade brônquica, incluindo alérgenos, infecções, obesidade, hormônios, fumaça de tabaco, exercício, ar frio e seco, mutações genéticas e eosinofilia sistêmica (GANS e GAVRILOVA, 2020; ROWE, 2020; PATEL e TEACH, 2019; WIESENTHAL, 2016; BUSSE, LEMANSKE e GERN, 2010)

Nesse processo, ocorre a ativação dos sistemas imunológicos inato e adaptativo para estimular a inflamação crônica nas vias aéreas. Essa resposta imunológica desregulada resulta em diversos eventos, como edema das vias aéreas, hipersecreção de muco, obstrução do muco e remodelação brônquica. Essas alterações estruturais são impulsionadas por processos como fibrose subepitelial, espessamento da membrana sub-basal, aumento da massa muscular lisa das vias aéreas, angiogênese e hiperplasia das glândulas mucosas. (GANS e GAVRILOVA, 2020; PATEL e TEACH, 2019)

A fisiopatologia de como alguns fatores conhecidos induzem mudanças estruturais permanentes nos diferentes endótipos da asma ocorre por meio de uma combinação das respostas das células T auxiliares (Th) 1, 2 e 17, juntamente com uma predisposição genética subjacente. A resposta Th1 é tipicamente ativada em infecções, especialmente por vírus. Os vírus aumentam a produção de

interferon- γ e interleucina (IL) 27, que ajudam a eliminar o patógeno, mas também estão envolvidos na inflamação das vias aéreas. A resposta Th2 é desencadeada quando células dendríticas nas vias aéreas apresentam alérgenos inalados às células T inativas, ativando a produção de células Th2. Essas células Th2 liberam citocinas Th2, como interleucinas (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que estimulam as células B a liberar imunoglobulina E (IgE). A IgE, por sua vez, desencadeia a degranulação dos mastócitos e a liberação de mediadores, causando broncoconstrição (GANS e GAVRILOVA, 2019). Citocinas como IL-25, IL-33 e linfopoiatina estromal tímica (TSLP) perpetuam esses mecanismos (Figura 01).

Figura 01 - Mecanismo fisiopatológico da asma envolvendo as vias Th1 (verde), Th2 (laranja) e Th17 (azul), com indicação de possíveis biomarcadores (cinza).



Fonte: GANS e GAVRILOVA, 2019.

Um dos principais aspectos da asma é a limitação do fluxo de ar nas vias aéreas, especialmente durante os episódios de exacerbação dos sintomas. Testes de função pulmonar, como a espirometria, podem ser utilizados para identificar essa limitação. O diagnóstico da asma em crianças é baseado principalmente em critérios clínicos; no entanto, a avaliação dos processos fisiológicos e patológicos por meio de biomarcadores auxilia no diagnóstico e no monitoramento da asma, leva a melhores resultados de tratamento e redução da morbidade.

A heterogeneidade da asma vai além dos fenótipos clínicos e, nas últimas duas décadas, pesquisas translacionais identificaram fatores genéticos, imunológicos e ambientais que contribuem

para o risco e a patogênese da asma. A identificação de vias imunológicas específicas relacionadas a determinados fenótipos clínicos possibilitou terapias direcionadas para um subconjunto de pacientes com asma e continua sendo uma área de pesquisa ativa. O curso clínico da asma em indivíduos diagnosticados é altamente variável. A remissão é comum e as taxas de remissão são mais altas em crianças do que em adultos (SCHOETTLER e STREK, 2020; HOLM, 2007).

Importância da identificação e compreensão dos diferentes fenótipos da asma

A asma é caracterizada por uma variedade de fenótipos, que são características observáveis da doença resultantes da interação entre genes e ambiente. A descrição dos fenótipos da asma remonta ao século XX, quando Rackeman propôs a distinção entre asma extrínseca e intrínseca, destacando o papel dos alérgenos como desencadeadores da doença (POPOVIĆ-GRLE, 2021; RACKEMAN, 1947).

Atualmente, o estudo dos fenótipos da asma continua sendo um tema cientificamente relevante, com milhares de artigos publicados sobre o assunto. Compreender os diferentes fenótipos da asma é essencial para uma abordagem mais precisa no tratamento dos pacientes e para uma melhor compreensão da diversidade da doença (CHUNG et al, 2022). Os pacientes podem apresentar respostas variadas aos tratamentos, características fisiopatológicas distintas e diferentes mecanismos patogênicos, resultando em múltiplos fenótipos da asma. Esses fenótipos agrupam pacientes com características clínicas ou biológicas semelhantes (POPOVIĆ-GRLE, 2021; HAMILTON e LEHMAN, 2019).

A asma de início precoce é frequentemente associada a fenótipos alérgicos e tem sido amplamente estudada. No entanto, a prevalência da asma em adultos está aumentando devido ao envelhecimento da população. Nesses casos, os fenótipos da asma podem ser divididos em dois principais tipos, levando em consideração a presença de inflamação eosinofílica ou sensibilização alérgica. (CHUNG, 2022; CHOWDHURY, 2021) Além disso, é importante considerar outros fenótipos da asma, como a asma induzida por exercício, a asma associada à obesidade ou ao tabagismo, ao avaliar um paciente. A asma grave, que afeta de 5% a 10% de todos os pacientes com asma, representa um desafio clínico significativo. (REYES-ANGEL, 2022; THOMSON, POLOSA e SIN, 2022; KLAIN, 2022)

Identificar e diferenciar os fenótipos da asma é fundamental para um manejo adequado da doença. Existem parâmetros que auxiliam nessa distinção, permitindo um tratamento mais direcionado e personalizado aos pacientes com asma. Os diversos fenótipos da asma podem ser

agrupados de acordo a etiologia, as características clínicas, doença de base, função pulmonar, composição celular da inflamação nas vias aéreas, controle e resposta ao tratamento, perfil de citocinas e com a etiologia (Figura 02). (POPOVIĆ-GRLE, 2021)

Figura 02 - Fenótipos da asma.



Fonte: POPOVIĆ-GRLE, 2021.

A questão dos fenótipos da asma é de extrema importância, pois um tratamento personalizado e adaptado aos mecanismos fenotípicos subjacentes oferece resultados muito mais eficazes para os pacientes asmáticos. No entanto, apenas observar características externas não é suficiente, uma vez que existem sintomas sobrepostos na doença. Por isso, é crucial compreender o mecanismo fisiopatológico comum na asma. Diante disso, surgiu um novo termo - endótipos da asma - que são definidos por mecanismos patobiológicos específicos em níveis moleculares e celulares. (BREITENEDER, 2020)

Enquanto os fenótipos são geralmente explicados e classificados com base em características observáveis, os endótipos são definidos por meio de biomarcadores, que são características especiais da doença que podem ser mensuradas e fornecem fatores quantificáveis para distinguir entre processos fisiológicos e patológicos (Kuruvilla, 2019). Esses biomarcadores também são utilizados como base para selecionar a terapia mais adequada e monitorar a resposta terapêutica. Os mecanismos

que levam ao desenvolvimento da doença são complexos, e ainda enfrentamos desafios para identificar biomarcadores adequados que permitam uma estratificação precisa dos pacientes, especialmente com a introdução de terapias biológicas no tratamento da asma. (POPOVIĆ-GRLE, 2021)

De forma geral, biomarcador é um indicador mensurável da presença e gravidade de doenças ou da resposta ao tratamento, com pontos de corte claros. No que diz respeito à previsão, diagnóstico ou monitoramento de doenças, os biomarcadores estão ganhando importância na prática clínica, pois fornecem uma forma objetiva e mensurável de caracterizar uma doença. No entanto, é desafiador identificar biomarcadores convincentes, uma vez que as redes genéticas e regulatórias podem variar significativamente entre os pacientes. Os biomarcadores representam indicadores mensuráveis que conectam uma via subjacente a um fenótipo ou endótipo de uma doença. (BREITENEDER, 2020; KAUR e CHUPP, 2019)

É importante ressaltar que os biomarcadores para a asma são menos precisos e ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, a maioria dos autores concorda que a asma pode ser dividida em dois grupos principais: asma com perfil Th2 alto e asma com perfil Th2 baixo (ou não Th2). Essa classificação é amplamente utilizada, pois auxilia na seleção do tratamento mais adequado, uma vez que as terapias direcionadas à asma grave estão focadas principalmente na via molecular Th2 alta. (POPOVIĆ-GRLE, 2021)

Por outro lado, a identificação da etiologia da asma torna-se fator muito importante para o manejo clínico, direcionando tanto o tratamento preventivo como o controle da evolução da doença. (POPOVIĆ-GRLE et al, 2021, BREITENEDER et al, 2020; KAUR e CHUPP, 2019). Nesse contexto destacam-se as seguintes categorias:

- Asma alérgica
- Asma não alérgica
- Asma ocupacional
- Asma induzida pelo exercício

O termo broncoespasmo induzido por exercício (BIE) tem sido preferível a asma induzida pelo exercício (AIE), visto que muitos pacientes com asma apresentam BIE mas nem todos pacientes com BIE são asmáticos. (OFIAELI, 2023)

Características do fenótipo com broncoespasmo induzido por exercício (BIE)

Na década de 1960, foi observado que o volume expiratório forçado em 1 segundo (VEF_1) em alguns pacientes com asma reduzia abaixo do nível de repouso durante ou após o exercício vigoroso e voltava ao normal cerca de 10-15 minutos após a atividade física, essa condição ficou conhecida inicialmente como asma induzida por exercício (AIE), hoje chamada de broncoespasmo induzido por exercício (BIE) uma vez que a doença asma não é induzida pelo exercício. (GEROW e BRUNER, 2022)

A prevalência de BIE na população em geral é de aproximadamente 5-20%. No entanto, devido a poucos estudos epidemiológicos que diferenciam pessoas com asma da população em geral, a verdadeira prevalência de BIE na população geral não asmática é pouco compreendida (Aggarwal, Mulgirigama e Berend, 2018). Atletas de alto desempenho têm uma prevalência maior de BIE em relação à população em geral devido à inalação prolongada de ar frio, seco e poluentes atmosféricos. Estudos relataram uma prevalência de BIE entre atletas de elite ou de nível olímpico de 30-70%, mas os relatos são variáveis dependendo do ambiente esportivo, do tipo de esporte e da intensidade máxima alcançada (Hostrup, 2023). Em crianças, a prevalência de BIE também é maior do que na população em geral, variando de 3 a 35%. A prevalência de BIE em crianças varia em diferentes regiões do mundo e é influenciada por fatores étnicos, ambientais e socioeconômicos. Aquelas vivem em ambientes urbanos têm maior probabilidade de experimentar BIE em comparação com as que vivem em áreas rurais, devido a fatores como histórico familiar de sintomas de asma, exposição a poluentes veiculares e condições de vida. (AGGARWAL, MULGIRIGAMA e BEREND, 2018).

A maioria dos pacientes com asma provavelmente experimentará aumento transitório nos sintomas após desafio adequado de exercício, sendo o principal fator associado. Estima-se que o BIE ocorra entre 40 a 90% dos pacientes asmáticos, com maior probabilidade naqueles com asma mal controlada ou grave. Cerca de 50% das crianças com asma apresentam sintomas de BIE, trata-se de uma condição conhecida por limitar a participação das crianças em atividades vigorosas (Correia Junior et al, 2017). Outros fatores de risco que contribuem para a prevalência do BIE incluem rinite alérgica, histórico pessoal de alergias, histórico de asma em parentes próximos ou histórico de sibilância (AGGARWAL, MULGIRIGAMA e BEREND, 2018).

O BIE está associado ao desgaste físico e emocional. Pesquisa com mais de 30.000 crianças de 6 a 14 anos no Japão revelou que crianças que relatavam sintomas de BIE, com ou sem asma, tinham pontuações significativamente mais baixas de qualidade de vida (Kojima, 2009). Atletas adolescentes nos Estados Unidos que relataram dispneia durante o exercício apresentaram pontuações

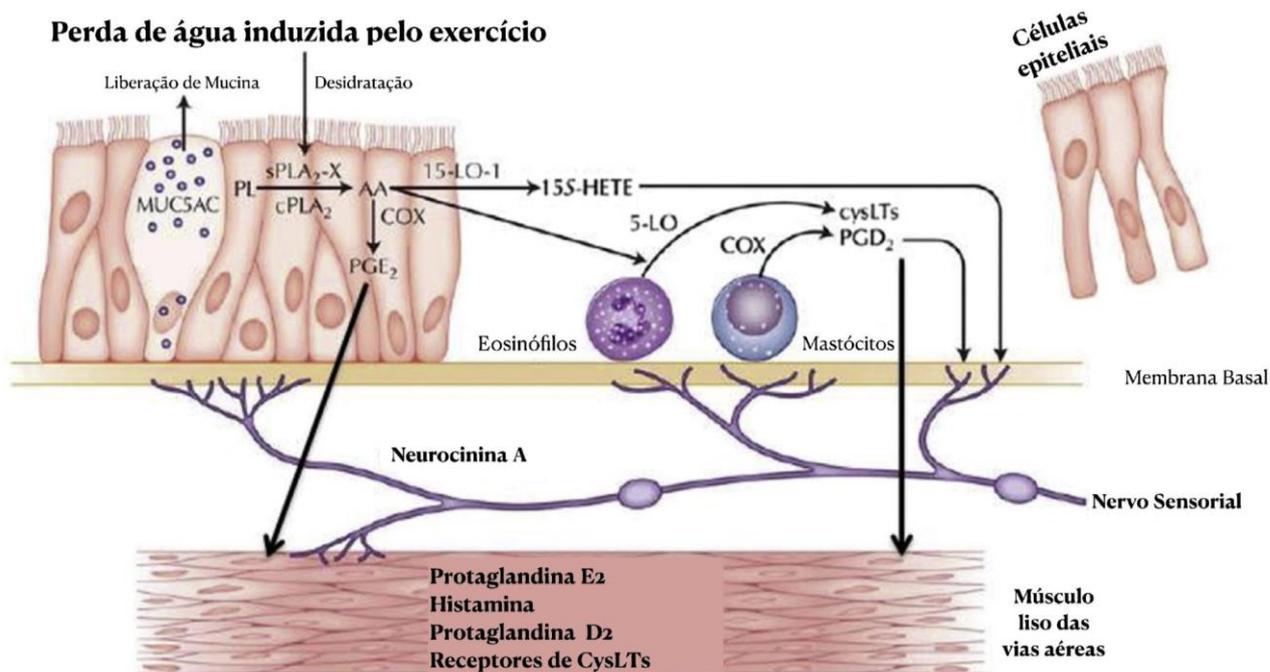
significativamente mais baixas de QV relacionada à saúde, incluindo sub pontuações de desempenho físico, bem-estar geral e estado emocional, em comparação com aqueles sem dispneia associada ao exercício (Johansson et al, 2016). Estudos também demonstraram impacto negativo na participação esportiva e no desempenho em pacientes com asma (PRICE, 2014).

Fisiopatologia do BIE

A fisiopatologia do broncoespasmo induzido por exercício (BIE) ainda não foi completamente esclarecida, mas a teoria osmótica é amplamente aceita como o mecanismo subjacente. Durante o exercício, a ventilação minuto aumenta, o que promove a desidratação das vias aéreas devido à evaporação, criando um ambiente hiperosmolar e uma redução no volume celular. Dessa forma, ocorre aumento da concentração de íons (como Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺) e, conseqüentemente, a desgranulação dos mastócitos, células responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios, como leucotrienos, histamina, triptase e prostaglandinas. Esses mediadores favorecem a contração da musculatura lisa das vias aéreas, o aumento da produção de muco e da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Também ocorre a ativação dos eosinófilos, resultando na liberação adicional de leucotrienos, agravando a broncoconstrição. (Kippelen, Anderson e Hallstrand, 2018; Aggarwal, Mulgirigama e Berend, 2018).

Na figura 03 observamos as células envolvidas no broncoespasmo induzido por exercício. Os pacientes asmáticos apresentam níveis mais baixos da prostaglandina E₂, que possui ação broncodilatadora. Os nervos sensoriais são estimulados por mediadores broncoconstritores, como o CysLT liberados por mastócitos e eosinófilos e a prostaglandina D₂ liberada pelos mastócitos, provocando o estreitamento das vias aéreas. Relacionado ao aumento dos leucotrienos, há um aumento da produção de mucina (MUC5A), liberada pelas células caliciformes, e de neuroquinina A. (Kippelen, Anderson e Hallstrand, 2018).

Figura 03 - Músculo liso brônquico estimulado diretamente por vários mediadores

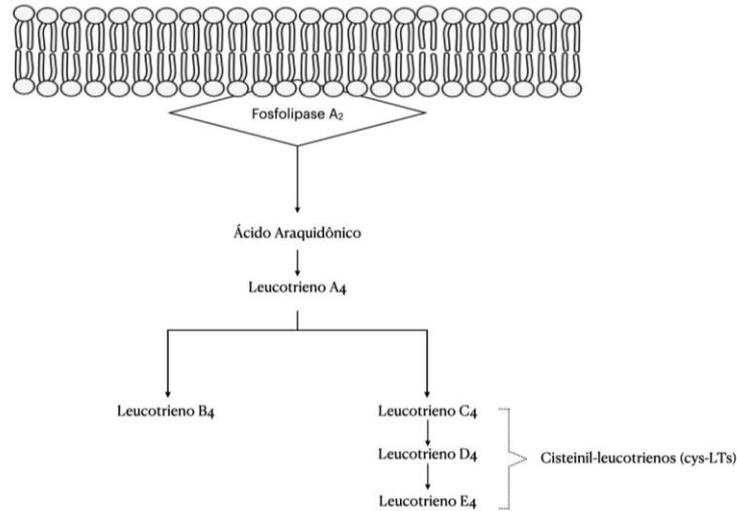


Fonte: KIPPELEN, ANDERSON e HALLSTRAND, 2018.

No estudo de Lai et al (2014), foi observado um aumento seletivo da expressão de triptase e carboxipeptidase A3 nas células epiteliais das vias aéreas em pacientes com asma e BIE, indicando a infiltração de mastócitos no epitélio como determinante crítico para desencadear broncoconstrição. Além disso, foi constatado que as citocinas derivadas do epitélio, como a linfopietina estromal tímica (TSLP) e a IL-33, desempenham papel importante na regulação do fenótipo e função dos mastócitos no BIE. Foram observados níveis elevados de CisLT obtidos no escarro em 30 minutos, 1 hora e 6 horas após o exercício em pacientes asmáticos com o BIE (HALLSTRAND, 2005; PARSONS, 2013).

Os leucotrienos, assim como as prostaglandina e os tromboxanos, formam os eicosanoides. São produzidos, principalmente, a partir da via das lipoxigenases, a fosfolipase A2 citosólica é uma enzima que atua na liberação do ácido araquidônico (AA) das membranas celulares em resposta a estímulos hormonais e aumentos nos níveis de cálcio intracelular. Uma vez no citosol, o AA serve como substrato para as lipoxigenases, que catalisam a incorporação de moléculas de oxigênio ao AA (figura 04). Como resultado da ação dessas enzimas, são produzidos leucotrienos, como os leucotrienos A4 (LTA4). O LTA4, quando liberado da célula, pode ser utilizado na produção de leucotrienos B4 (LTB4) ou leucotrienos C4 (LTC4) e leucotrienos D4 (LTD4).

Figura 04 - Modelo da síntese dos cisteinil-leucotrienos.

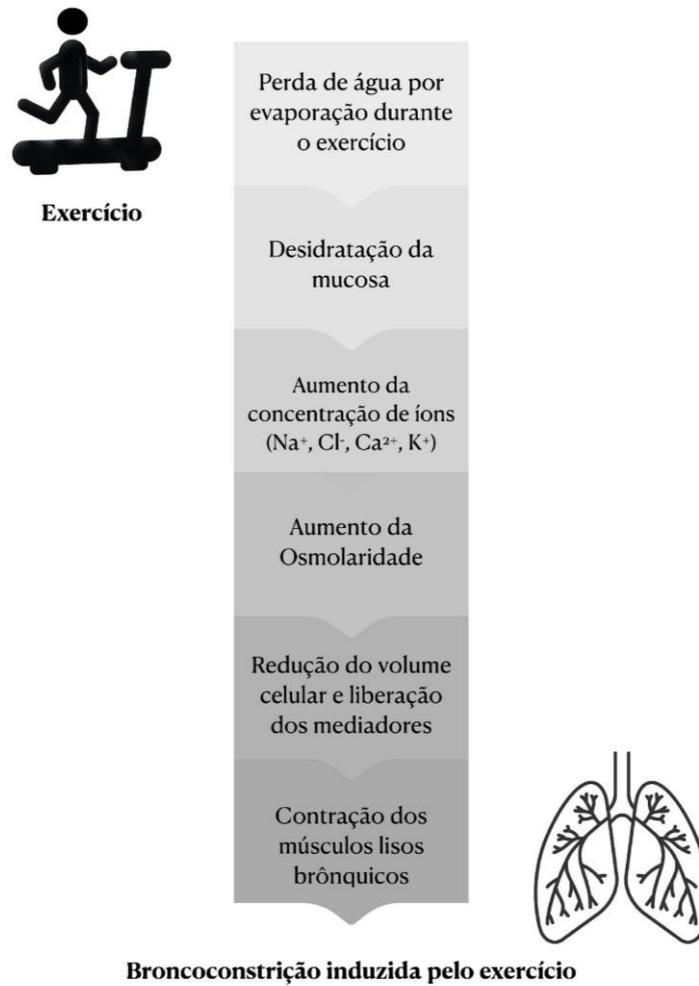


Fonte: KANAOKA e BOYCE, 2014.

O LTC₄ e seus derivados LTD₄ e LTE₄ constituem são coletivamente conhecidos por cisteinil-leucotrienos (cys-LTs), por apresentarem em suas fórmulas o aminoácido cisteína. Os cys-LTs atuam nos receptores cys-LT das células alvo como por exemplo o músculo liso brônquico, determinando contração. No homem, o principal receptor é o tipo cys-LT₁, que é fortemente ativado pelo LTC₄ e LTD₄ e menos intensamente pelo LTE₄. Os leucotrienos LTC₄ e LTD₄ atuam como potentes broncoconstritores agindo em receptores na musculatura lisa das vias aéreas, sendo de 1.000 a 10.000 vezes mais potentes que a histamina.

Um resumo dos eventos promotores do BIE são apresentados na figura 05.

Figura 05. Eventos promotores do broncoespasmo induzido por exercício (BIE).



Fonte: KIPPELEN, ANDERSON e HALLASTRAND, 2018.

É importante ressaltar que as alterações na temperatura das vias aéreas durante o exercício, ou outros fatores térmicos, apresentam efeito mínimo na broncoconstrição que ocorre após a atividade física. Evans et al (2005) investigaram a função pulmonar em indivíduos com BIE através da realização de testes de broncoprovocação em diferentes temperaturas do ar. Vinte e dois participantes foram submetidos a três testes de 6 minutos, de forma aleatória: HVE em temperatura fria (-1°C), exercício em esteira com temperatura ambiente (22,0°C) e exercício em esteira com temperatura fria (-1°C). Os resultados mostraram quedas semelhantes no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) após os testes em ambas as temperaturas, indicando que o ar seco é fator essencial nas condições de teste, enquanto a temperatura fria não teve efeito adicional na resposta de BIE (EVANS, 2005).

Diagnóstico do BIE

O diagnóstico do broncoespasmo induzido por exercício (BIE) em pacientes com asma é multifatorial, levando a condição ser frequentemente subdiagnosticada ou superdiagnosticada. Em estudos realizados por Lammers (2019-2020) constatou-se que pediatras têm habilidade limitada para diagnosticar e avaliar a gravidade do BIE apenas com base na anamnese, exame físico e vídeos pós-exercício.

O teste de broncoprovocação por exercício ou através da hiperventilação voluntária eucápnica (HVE) e a espirometria continuam sendo os métodos mais confiáveis para o diagnóstico e avaliação do BIE (Rizzo, 2021). Outros testes alternativos estão sendo estudados, como o uso de eletromiografia de superfície (EMG) para medir a atividade do diafragma, mas ainda não há evidências suficientes para recomendar sua ampla adoção como ferramenta de triagem (KLAIN, 2022).

De acordo com as diretrizes da ATS (*American Thoracic Society*) / *European Respiratory Society*, pelo menos duas medidas de VEF₁ devem ser feitas antes e após o desafio do exercício (por exemplo, esteira). O VEF₁ é geralmente medido em 5, 10, 15 e 30 minutos após o exercício. Uma redução no VEF₁ maior ou igual a 10% é diagnóstico para BIE, sendo classificado como:

- Leve: redução do VEF₁ de 10 a 25% em relação ao valor basal pré exercício.
- Moderada: redução do VEF₁ de 25 a 50% em relação ao valor basal pré exercício.
- Grave: redução maior que 50% em relação ao valor basal pré exercício.

Além dos testes de broncoprovocação por exercício e a HVE, são citados os testes com metacolina, com solução salina hipertônica e o com manitol. Embora nenhum desses testes seja específico para o BIE, eles complementam a história clínica e identificam a hiperresponsividade das vias aéreas, que é consistente com o diagnóstico de BIE. (AGGARWAL, MULGIRIGAMA e BEREND, 2018).

A escolha do teste de broncoprovocação depende dos recursos disponíveis, sendo que o teste de HVE é rápido e fácil de administrar, mas requer laboratório específico. Embora ainda haja necessidade de estabelecer a sensibilidade e especificidade do teste de manitol, ele foi desenvolvido para melhorar a disponibilidade e padronização dos testes osmóticos. Esses testes complementam a avaliação clínica e auxiliam na confirmação do diagnóstico de BIE, tanto em pacientes com asma subjacente quanto em pacientes sem asma. (AGGARWAL, MULGIRIGAMA e BEREND, 2018).

No teste da HVE o paciente hiperventila a uma taxa de 21 a 30 vezes o VEF₁ basal durante 6 minutos respirando ar seco acrescido de 5% de dióxido de carbono (CO₂) para evitar a alcalose e assegurar a eucapnia. Uma preocupação citada na literatura refere-se ao risco potencial do

desenvolvimento de broncoconstrição grave nos pacientes asmáticos (ANDERSON, 2001), algo que não temos percebido nos estudos realizados nas crianças e adolescentes asmáticos e riníticos avaliados na última década em nosso Laboratório de Função Pulmonar do Serviço de Pneumologia do Hospital das Clínicas da UFPE e nem por autores em outras instituições (RODRIGUES FILHO, 2018; SILVA FILHO, 2015).

Avaliação dos metabólitos através do condensado do ar exalado

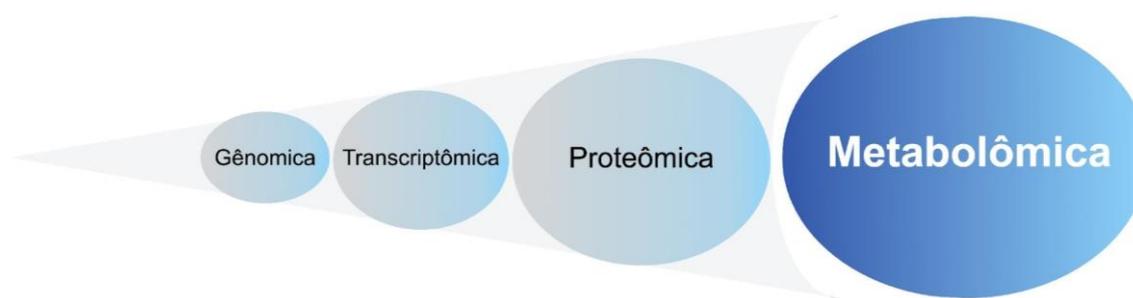
O condensado do ar exalado (CAE) tem sido discutido como uma ferramenta de fácil manuseio, não invasiva e acessível para a coleta de uma ampla variedade de componentes do fluido de revestimento das vias aéreas. (PORPODIS, 2022; POŁOMSKA, 2021)

Trata-se do líquido obtido do ar exalado pela respiração oral em volume corrente coletado através de tubo resfriado que permite a formação de um condensado que consiste, em sua quase totalidade, de água e uma pequena porção de componentes biológicos proveniente de células e do fluido de revestimento das vias aéreas (HORVÁTH, 2017).

Este material tem recebido bastante atenção devido, especialmente, à facilidade e segurança para sua obtenção e também graças ao desenvolvimento de técnicas sensíveis que possibilitam avaliar biomarcadores provenientes de células do sistema respiratório como citocinas, quimiocinas, metabólitos e mediadores lipídicos como leucotrienos, prostaglandinas e lipoxinas, e pode proporcionar avanços na compreensão dos processos fisiopatológicos da síndrome e influenciar na escolha da melhor alternativa terapêutica. Desta forma, nos últimos anos o CAE tem sido associado à metabolômica. (KUME, 2023; RODRIGUEZ, 2023; KIERBIEDŹ-GUZIK e SOZAŃSKA, 2023; LIKOŃSKA, 2023; MENDES, 2022; CHANG-CHIEN, 2021; BANNIER, 2019; STELMACH, 2016; BARRETO, ZAMBARDI e VILLA, 2015; TAHAN, 2016; NOBAKHT, 2015; THOMAS, 2013).

A força dos estudos "ômicos" está na capacidade de avaliar a atividade global de uma célula ou organismo como resultado de um estado de doença, estresse ambiental ou mutação genética. A transcriptômica identifica mudanças na transcrição dos genes. A proteômica analisa mudanças nas sequências de RNA que são traduzidas em proteínas. A metabolômica é o próximo passo lógico na cascata "ômica", trata-se de uma ciência analítica que se concentra no estudo do metabolismo (Figura 05). Utiliza várias técnicas e métodos analíticos para quantificar e identificar metabólitos. (PAPAMICHAEL, 2021; JOHNSON, IVANISEVIC e SIUZDAK, 2016)

Figura 06 - Interconexão entre as diferentes “ômicas”



.Fonte: . PAPAMICHAEL, 2021.

Os metabólitos são compostos de baixo peso molecular (< 1.000 Da) encontrados em um biofluido (por exemplo, soro, urina, etc.), célula, tecido, órgão ou organismo, são intermediários e produtos de numerosos processos celulares, que incluem produção de energia, síntese de moléculas e biomoléculas e sinalização. As medidas das concentrações de metabólitos fornecem uma visão instantânea dos processos metabólicos ativos, que são utilizados para identificar as vias metabólicas específicas afetadas por doenças, estressores ambientais ou deleção de genes. Essa abordagem analítica sistemática é extremamente útil na descoberta de biomarcadores, na previsão da resposta à terapia e na compreensão das vias patogênicas de diversas doenças complexas, como a asma (PAPAMICHAEL, 2021; JOHNSON, IVANISEVIC e SIUZDAK, 2016)

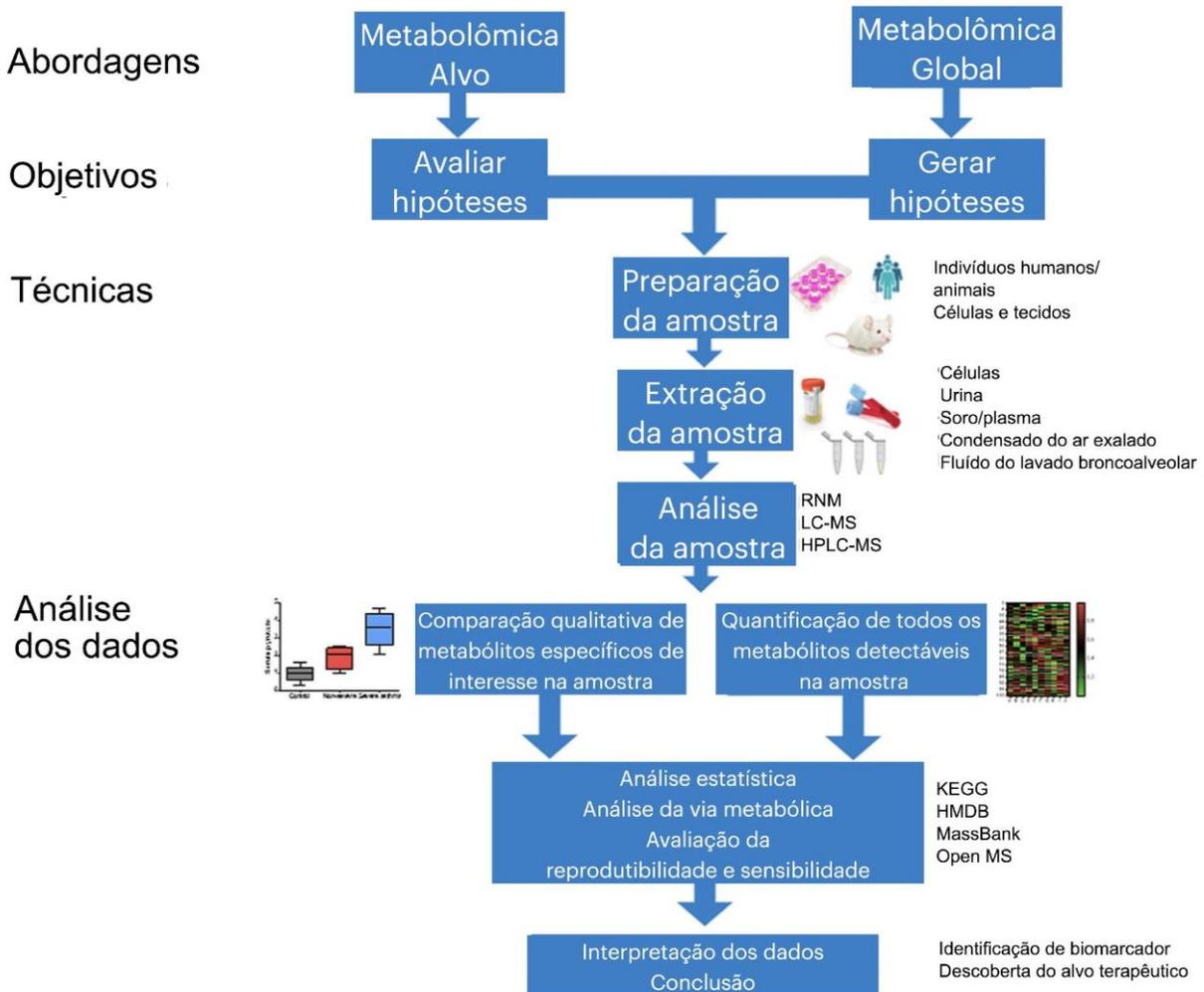
Os estudos metabolômicos realizados em amostras biológicas (incluindo ar exalado e urina) são particularmente úteis em pesquisas pediátricas, pois podem ser coletadas de forma simples e não invasiva. Além disso, esses bioespécimes abrangem uma ampla gama de metabólitos detectáveis, o que permite uma visão abrangente do metaboloma (PAPAMICHAEL, 2021; PARK, 2017; CHECKLEY, 2016).

O princípio fundamental da aplicação da metabolômica em pesquisas clínicas reside no fato de que o perfil metabólico é alterado em condições de doença em comparação com o estado saudável e, com o avanço das tecnologias metabolômicas, tornou-se possível capturar flutuações sutis nos níveis metabólitos. Essas alterações podem ser utilizadas como biomarcadores potenciais para prever e diagnosticar doenças, revelar padrões metabólicos distintos associados a diferentes condições de saúde, contribuindo para uma medicina personalizada e direcionada (XU, PANETTIERI e JUDE , 2022).

A metabolômica pode ser dividida em duas abordagens: metabolômica direcionada e metabolômica não direcionada (Figura 07). A metabolômica direcionada é conduzida com base em uma hipótese específica e analisa um conjunto selecionado de metabólitos para identificar associações precisas em um contexto fisiológico definido. Já a metabolômica não direcionada é uma análise

imparcial que investiga todos os metabólitos de um sistema de maneira exploratória, permitindo a identificação de biomarcadores e alvos terapêuticos novos (XU, PANETTIERI e JUDE , 2022).

Figura 07 - Fluxo de trabalho de um estudo de asma baseado em metabolômica.



Espectrometria de massa - cromatografia líquida de alta eficiência; KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; HMDB – Human Metabolome Database; MassBank – MassBank Europe Spectral Database; OpenMS – Open-source software for mass spectrometry. Fonte: XU, PANETTIERI e JUDE , 2022.

Abordagem técnica da metabolômica:

RMN (Ressonância Magnética Nuclear) é uma técnica que utiliza campos magnéticos e radiação eletromagnética para analisar a estrutura e composição química de moléculas. Ela é baseada na ressonância de núcleos atômicos em um campo magnético, fornecendo informações sobre a conectividade e a localização dos átomos na molécula. (LINDON, HOLMES, e NICHOLSON, 2001)

LC-MS (Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massa) combina a separação dos componentes de uma amostra por cromatografia líquida com a identificação e quantificação desses componentes por espectrometria de massa. A LC é responsável por separar os diferentes metabólitos presentes na amostra, enquanto a MS analisa os íons produzidos a partir desses metabólitos e determina sua massa e composição molecular. (LINDON; HOLMES e NICHOLSON, 2001; NICHOLSON; LINDON e HOLMES, 1999)

HPLC-MS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Espectrometria de Massa) é uma variação da LC-MS que utiliza uma coluna de alta eficiência para separar os componentes da amostra com maior resolução e velocidade. A combinação do HPLC com a MS permite uma análise mais precisa e sensível dos metabólitos presentes na amostra. (LINDON; HOLMES e NICHOLSON, 2001; NICHOLSON; LINDON e HOLMES, 1999; SMOLINSKA, 2012).

Na estratégia denominada Metabonômica, as ferramentas espectrométricas, incluindo espectroscopias na região do infravermelho, ultravioleta e RMN, bem como a espectrometria de massas por inserção direta, são utilizadas diretamente. Essas técnicas permitem a análise direta dos metabólitos, dispensando a necessidade de pré-tratamento da amostra (LINDON; HOLMES e NICHOLSON, 2001; NICHOLSON; LINDON e HOLMES, 1999; SMOLINSKA et al., 2012).

Em contraste, na estratégia Metabolômica, as técnicas cromatográficas são empregadas em conjunto com a espectrometria de massas, como é o caso da cromatografia líquida de alta eficiência. Nessa abordagem, é preciso realizar procedimentos de pré-tratamento na amostra, o que pode prolongar o tempo de análise. Esses procedimentos podem acarretar perdas ou alterações na composição bioquímica da amostra. (SMOLINSKA, 2012 DUNN e LI, 2011; ELLIS, 2005; FIEHN, 2001).

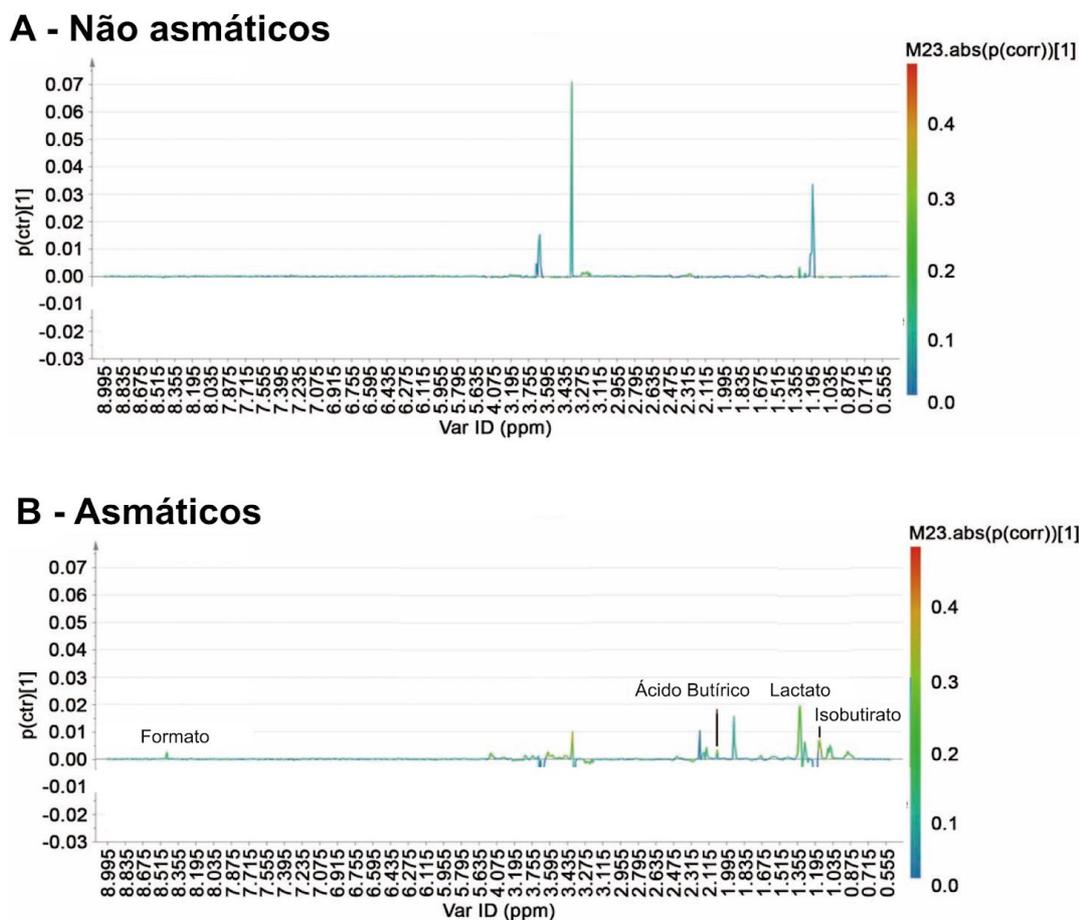
A análise metabonômica por ressonância magnética de hidrogênio (RMN ^1H) é uma técnica poderosa utilizada para investigar os perfis metabólicos de amostras biológicas. Ela se baseia no princípio da ressonância magnética nuclear (RMN), que envolve a interação entre núcleos atômicos com spin de 1/2 e um campo magnético. Essa técnica apresenta características únicas e vantajosas (NAGANA GOWDA e RAFTERY, 2021):

- É altamente reprodutível.
- É necessário apenas uma referência interna para a quantificação absoluta de todos os metabólitos presentes no espectro.
- Permite a identificação de metabólitos desconhecidos, o que é relevante devido ao aumento do número de sinais detectados em misturas biológicas complexas, muitos dos quais ainda não são conhecidos.
- Pode ser realizada em fluidos biológicos e tecidos sem a necessidade de separação ou preparação prévia da amostra, o que é importante para minimizar a variabilidade analítica introduzida por processos de preparação e separação.
- Não destrutiva, ou seja, a amostra permanece intacta após a análise e pode ser reanalisada posteriormente com RMN de ^1H ou por outras técnicas, como espectrometria de massas (MS).
- A RMN de ^1H evita tratamentos agressivos da amostra antes ou durante a análise, sendo particularmente vantajosa para a análise de metabólitos sensíveis.

Nesse tipo de análise, a amostra biológica é submetida a um campo magnético forte, que alinha os spins dos núcleos de hidrogênio presentes nos metabólitos. Em seguida, um pulso de radiofrequência é aplicado, levando os núcleos de hidrogênio a absorver energia e entrar em ressonância. Quando o pulso de radiofrequência é desligado, os núcleos liberam a energia absorvida, gerando um sinal que pode ser detectado e analisado. O sinal obtido na análise metabolômica por RMN ^1H é composto por uma série de picos correspondentes aos diferentes metabólitos presentes na amostra. Esses picos representam a quantidade de hidrogênio presente em cada metabólito e fornecem informações valiosas sobre as concentrações relativas dos metabólitos. (ALONSO-MORENO, 2023; NAGANA GOWDA e RAFTERY, 2021)

Essas características tornam a RMN ^1H uma ferramenta valiosa na metabonômica, contribuindo para a compreensão dos perfis metabólicos e fornecendo informações importantes sobre as vias metabólicas e os processos biológicos. Após a obtenção dos espectros de RMN ^1H , os dados são processados e analisados utilizando técnicas estatísticas e bioinformáticas. A análise desses espectros permite a identificação e quantificação dos metabólitos presentes na amostra, bem como a comparação entre diferentes grupos de amostras para identificar diferenças metabólicas significativas. (ALONSO-MORENO, 2023; NAGANA GOWDA e RAFTERY, 2021)

Figura 08 - Exemplo da comparação do espectro de RMN ^1H de crianças não asmáticas (superior - A) e asmáticas (inferior - B).



Fonte: adaptado de CHANG-CHIEN,2021

Na figura 08 observamos um exemplo da comparação do espectro de RMN ^1H de crianças não asmáticas e asmáticas. O gráfico mostra o coeficiente de identidade da carga de metabólitos específicos analisados na faixa de frequência de ressonância (FRn) entre 9.000 e 0.500 ppm (partes por milhão). O eixo x (Var ID) representa os intervalos da FRn que correspondem à atribuição de identidade dos metabólitos, enquanto o eixo y representa o escore de carga de cada variável, que indica a importância do metabólito na diferenciação entre os grupos.

Nesse exemplo foram identificados os metabólitos formato, ácido butírico, lactato e isobutirato. A identificação dos metabólitos pode ser realizada a partir de buscas nas diversas plataformas científicas que estudam o metaboloma disponíveis como:

- *Human Metabolome Database* – HMDB
- *Biological Magnetic Resonance Bank* – BMRB
- *Birmingham Metabolite Library* – BML

Análise dos metabólitos na asma e broncoespasmo induzido por exercício

Nos últimos anos, avanços em abordagens "ômicas" têm fornecido *insights* valiosos sobre os mecanismos subjacentes da asma. A metabonômica é uma dessas abordagens inovadoras que tem sido aplicada no estudo da asma, permitindo uma análise abrangente dos metabólitos presentes em biofluidos associados à doença. (XU, PANETTIERI e JUDE, 2022; VILLASEÑOR, 2021)

A análise desses metabólitos têm mostrado potencial para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento da asma, oferecendo rota alternativa para a compreensão da doença, fornecendo, assim, *insights* sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da doença. Estudos recentes têm explorado perfis metabonômicos associados à asma, utilizando amostras de plasma/soro, urina, fluido do lavado broncoalveolar (BAL), escarro induzido e condensado do ar exalado (CAE). (KOLMERT, 2021; CRESTANI, 2020; SCHLEICH, 2019; CHIBA, SUTO e SAKAI, 2018)

O CAE é um biofluido coletado de forma não invasiva a partir do ar exalado dos pacientes. O estudo dos componentes desse fluido tem se mostrado relevante no estudo da asma, pois permite a análise dos compostos voláteis e não voláteis presentes no condensado, que podem fornecer informações sobre mecanismo de inflamação das vias aéreas e do estresse oxidativo. A análise do CAE tem sido utilizada para identificar biomarcadores associados à asma, auxiliando no diagnóstico, no monitoramento da doença e na identificação de diferentes fenótipos asmáticos. Além disso, o CAE oferece a vantagem de método não invasivo, o que o torna mais acessível e conveniente para pacientes asmáticos, proporcionando uma abordagem promissora no estudo e manejo dessa doença respiratória crônica. (CHANG-CHIEN, 2021; SCHLEICH, 2019; CARRARO, 2013; DALLINGA, 2010)

No estudo de Sinha et al (2017), os autores investigaram o uso do CAE como matriz pouco explorada para identificar padrões metabólicos e potenciais endótipos na asma. Foram realizadas análises de espectroscopia de RMN ^1H do CAE de 89 indivíduos asmáticos e 20 indivíduos saudáveis. Os resultados demonstraram que os espectros de RMN ^1H foram capazes de diferenciar asmáticos e controles saudáveis com 80% de sensibilidade e 75% de especificidade. Além disso, no grupo de asmáticos foi possível identificar três grupos com espectros distintos, cada um com características diferentes. Um grupo (Cluster 1) apresentou escores de exacerbação a longo prazo mais baixos, e outro grupo (Cluster 3) apresentou menor quantidade de eosinófilos no sangue e maior quantidade de neutrófilos, além de uma forte história familiar de asma.

Modelos capazes de diferenciar os fenótipos eosinofílico, neutrofílico e paucigranulocítico da asma foram desenvolvidos tanto no estudo de Plaza et al. (2015) quanto no de Ibrahim et al. (2011). Foram obtidas taxas de acurácia na classificação de 73% a 74%, e índices de área sob a curva (AUROCs) variando de 0,79 (PLAZA, 2015) a 0,98 (IBRAHIM, 2011).

A abordagem metabolômica do condensado do ar exalado, atualmente denominada como *breathomics*, foi realizada por Carraro (2013) para discriminar diferentes fenótipos de asma em crianças. Foi encontrada associação entre os perfis metabonômicos e a gravidade da asma, demonstrando que está pode ser uma ferramenta eficaz para distinguir os diferentes fenótipos metabólicos da doença. Compostos relacionados ao ácido retinóico, adenosina e vitamina D foram identificados como relevantes para essa discriminação.

No estudo de Maniscalco. (2017), foram incluídos 25 pacientes asmáticos obesos (AO), 30 indivíduos não asmáticos obesos (AnO) e 30 pacientes asmáticos magros (AM). Através da análise dos perfis do espectro de RMN ¹H, foram identificados modelos de regressão que conseguiram distinguir os pacientes AO dos AnO e dos AM. Além disso, foram encontrados biomarcadores específicos que estão envolvidos em vias metabólicas relacionadas ao metano, piruvato, glicoxilato e dicarboxilato. Esses resultados indicam que os pacientes asmáticos obesos possuem um perfil metabólico respiratório distinto, sugerindo a existência de vias fisiopatológicas únicas na relação entre asma e obesidade.

Chang-Chien et al (2021) analisaram os perfis metabonômicos (baseados na RMN ¹H) do CAE de 165 crianças asiáticas, 92 com asma estável e 73 controles não asmáticos. A assinatura metabonômica do CAE, composta por lactato, formato, butirato e isobutirato, apresentou uma capacidade discriminatória superior aos testes clínicos convencionais, como FeNO e espirometria. Os resultados indicaram a relevância do CAE como uma ferramenta promissora para o diagnóstico da asma em crianças asmáticas, fornecendo informações adicionais sobre a condição respiratória.

Recentemente nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES FILHO, 2019) analisou as amostras do CAE de 26 adolescentes asmáticos. O modelo derivado da análise metabonômica por RMN ¹H apresentou uma acurácia de 96,2% (25/26), sensibilidade de 92,8%, especificidade de 100% para discriminar os grupos de pacientes com BIE positivo (n = 14) daqueles que não apresentam broncoespasmo durante o teste de broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucapnica.

Os estudos metabonômicos na asma estão avançando a partir dos estágios iniciais, os resultados são cada vez mais promissores e, à medida que mais estudos populacionais de grande porte começam a gerar dados mais robustos, é provável que isso represente a mais recente fronteira na pesquisa sobre a asma. É importante ressaltar que, enquanto a sua utilidade clínica ainda precisa ser demonstrada, a análise do metaboloma em pacientes asmáticos tem sido fundamental para aumentar a compreensão dos mecanismos bimoleculares envolvidos na patogênese do BIE.

3 METODO

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, exploratório, com amostra por conveniência e comparativo.

3.2 LOCAIS DA PESQUISA

O presente estudo foi realizado no laboratório de Função Pulmonar localizado no serviço de pneumologia do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

No Hospital das Clínicas foram realizadas as coletas dos dados clínicos e antropométricos, os testes de espirometria e de broncoprovocação por HVE e do condensados do ar exalado dos adolescentes asmáticos.

No Departamento de Química Fundamental foram realizadas as análises dos metabólitos do condensado do ar exalado através da espectroscopia de RMN ¹H.

3.4 RECRUTAMENTO DOS PACIENTES

Foram recrutados quarenta e quatro (44) adolescentes asmáticos com idade entre 10 e 20 anos, de ambos os sexos, sem tratamento regular nas 04 semanas precedentes ao teste. Todos participantes foram provenientes do ambulatório especializado de Pneumologia e de Alergologia do Hospital das Clínicas da UFPE e diagnosticados por médico assistente especialista.

Todos pacientes e pais ou responsáveis receberam informações, em linguagem acessível, sobre os objetivos da pesquisa e procedimentos metodológicos, assim como os riscos e benefícios, sendo solicitado o consentimento formalizado na assinatura do:

- Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) pelos pais/responsáveis dos pacientes menores de 18 anos e pelos maiores de 18 anos (apêndices A e B).
- Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE) pelos adolescentes com idade acima de 10 anos (apêndice C).

Após os esclarecimentos sobre todas as dúvidas e assinaturas dos termos, os participantes foram recrutados para o estudo.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

- Inclusão

Foram incluídos no estudo os adolescentes com idade entre 10 e 20 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de asma, sem tratamento regular para a asma nas últimas 4 semanas que antecederam a realização dos testes. Todos residentes da cidade do Recife-PE e Região Metropolitana. O diagnóstico de asma foi dado por médicos especialistas de acordo com os critérios do *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2017).

- Exclusão

Foram excluídos pacientes em tratamento para controle da asma, assim como aqueles com histórico de exacerbação de asma ou sintomas de infecção aguda de vias aéreas nas últimas 4 semanas que antecederam a realização dos testes. Os pacientes com VEF₁ basal menor que 60% do valor teórico previsto, incapazes de realizar as manobras necessárias para a espirometria, a hiperventilação voluntária eucápnica ou coleta do condensado do ar exalado também foram excluídos.

3.6 PROCEDIMENTOS REALIZADOS

Logo após o consentimento para participação da pesquisa, foram realizadas as coletas dos dados clínicos e antropométricos dos pacientes. Sendo registrados dados relacionados a idade, altura e peso, além de informações sobre os sintomas respiratórios apresentados nas quatro semanas antecedentes a avaliação conforme a ficha de coleta padronizada (apêndice D). Após a avaliação antropométrica, foi realizado o teste espirométrico com resposta ao broncodilatador e, encerradas as avaliações do primeiro dia de coleta de dados, os participantes foram convidados para retornar ao serviço com 48h de intervalo para realizar o teste de broncoprovocação e coleta do CAE.

No segundo dia de participação, foi realizada a coleta do CAE, durante 15 minutos, através do dispositivo customizado em nosso laboratório. Logo em seguida foi avaliado o VEF₁ basal, para determinar a taxa de volume minuto alvo durante o teste de broncoprovocação, e a manobra de HVE por seis minutos, as medidas espirométricas do VEF₁ foram repetidas após cinco, 10, 15 e 30 minutos do teste.

Para comparar o estado metabonômico no fluído das vias aéreas dos adolescentes após as manobras de broncoprovocação, uma nova coleta do CAE foi realizada durante o intervalo das avaliações do VEF₁ entre 15 e 30 minutos.

O biofluido coletado foi armazenado em eppendorf de 1,5 ml e imediatamente transportado, num recipiente preenchido com gelo e isolado termicamente, para ser congelado e acondicionado a – 80°C em freezer localizado no departamento de Química Fundamental, onde posteriormente foram realizadas as análises metabonômicas.

3.7 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS (EM SEQUÊNCIA)

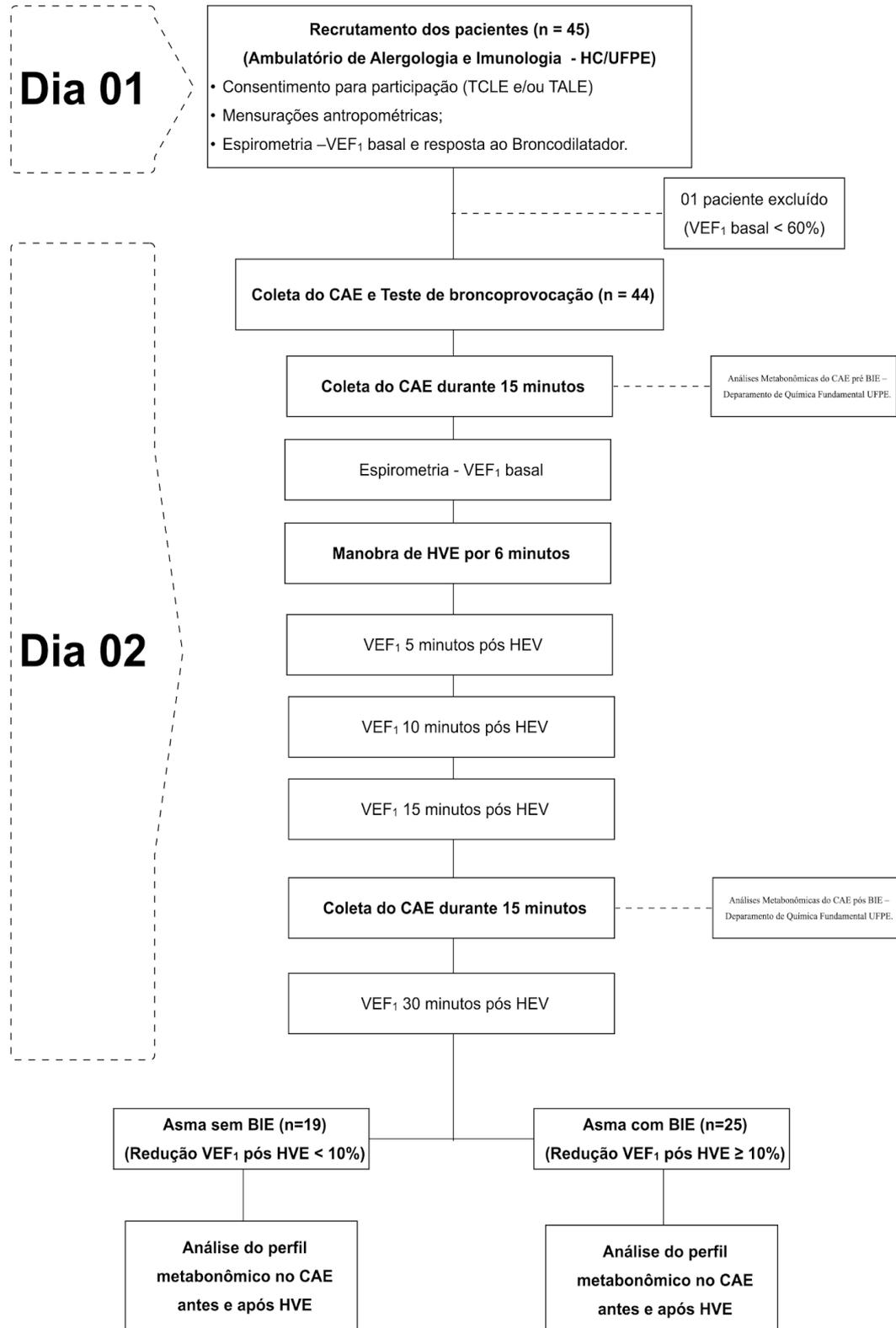
3.7.1 Informações sobre a pesquisa e coleta das assinaturas dos Termos de Consentimento e de Assentimento

Os pais ou responsáveis juntamente com os adolescentes foram acolhidos pelo pesquisador responsável no Laboratório de Função Pulmonar do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Inicialmente, foram indagados sobre a disposição em participar da pesquisa, a qual foi minuciosamente explicada após demonstrarem interesse. Os procedimentos foram comunicados de maneira clara e acessível, incentivando tanto os pais/responsáveis quanto os adolescentes a fazerem perguntas ao término de cada etapa. Após compreenderem completamente o processo e cientes de que poderiam retirar seu consentimento a qualquer momento sem prejudicar seu atendimento no hospital, todos os pais/responsáveis e maiores de 18 anos leram e firmaram os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), enquanto os adolescentes maiores de 10 anos assinaram os Termos de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE).

3.7.2 Medidas Antropométricas e Idade

O peso e a altura foram medidos em quilogramas e centímetros, respectivamente, utilizando balanças e estadiômetros calibrados (modelo Welmy W 200, fabricados em Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo - Brasil). A idade foi determinada em anos, com arredondamento para o ano seguinte quando os meses ultrapassaram o segundo semestre do ano anterior.

Figura 09 - Fluxograma do Estudo.

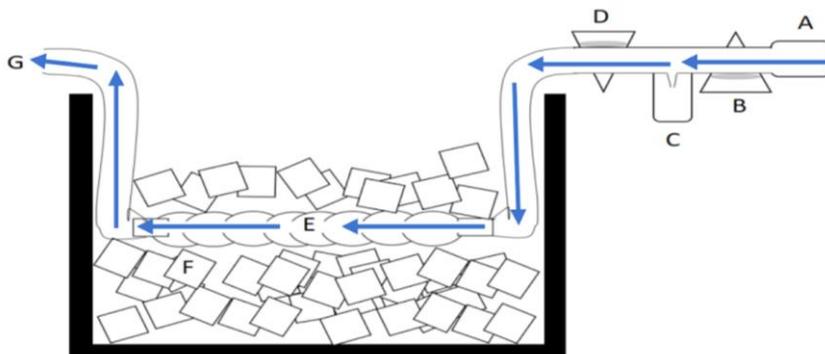


TCLE: Termos de Consentimento Livre e Esclarecido; TALE: Termos de Assentimento Livre e Esclarecido; VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo; CAE: condensado do ar exalado. HVE: hiperventilação voluntária eucápnica; BIE: broncoespasmo induzido por exerc

3.7.3 Coleta do condensado do ar exalado (CAE)

O condensado do ar exalado foi coletado através de um protótipo de dispositivo de condensação, que foi construído em nosso laboratório, conforme indicado no diagrama e nas fotos (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Diagrama do equipamento para coleta do condensado do ar exalado.



A: Tubo flexível silicone; B: Válvula unidirecional; C: Bocal para a respiração; D: Válvula unidirecional; E: Tubo submerso na mistura de água e gelo; F: Gelo; G: Saída do ar pelo tudo de silicone.

Figura 11 - Coleta do condensado do ar exalado no dispositivo construído em nosso laboratório.



Durante a coleta do CAE, o paciente, com o nariz pinçado, realizou a respiração com ritmo basal através de bocal estéril e descartável, conectado a válvula unidirecional que permitia a inspiração de ar ambiente e a expiração para um tubo flexível de silicone atóxico, foi permitido interromper para deglutir ou expectorar a saliva, se necessário. O tubo flexível de silicone penetra em recipiente térmico que proporciona área maior de contato do tubo com solução contendo água e gelo, mantendo a temperatura próxima de zero grau Celsius. Esse resfriamento faz com que o líquido presente no ar exalado condense quando ao entrar em contato com as paredes resfriadas do tubo e, assim, permitindo sua coleta e armazenamento no eppendorf. A coleta do condensado foi realizada antes do teste de broncoprovocação (pré HVE) e, posteriormente, entre quinze e trinta minutos após o teste (pós HVE) e os dois tubos de eppendorf foram transportados em recipiente com isolamento

térmico e armazenado a -80 grau Celsius no Departamento de Química Fundamental até o momento da análise metabonômica.

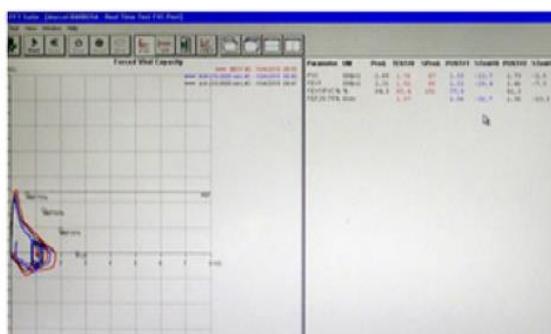
Para validar esse equipamento, foram realizadas análises metabonômicas no CAE de sete (07) indivíduos sem asma e sem histórico clínico de sintomas respiratórios relacionados à prática de atividades físicas, e os resultados foram comparados com os indivíduos asmáticos. Foi possível distinguir esses dois grupos através do modelo metabonômico, em concordância com achados da literatura.

Além disso, o processo de limpeza dos componentes dos dispositivos também foi padronizado e, para verificar uma possível interferência nos resultados, realizamos análises metabonômicas de 10 amostras de 5ml água destilada que foram coletadas nos tubos de silicone após o processo de higienização. Não verificamos resíduos no perfil metabonômico nos espectros obtidos pela RMN ^1H nessas amostras.

3.7.4 Medida do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1)

O valor do VEF_1 foi obtido por meio da espirometria e expresso em litros por segundo (figura 12). Utilizamos o espirômetro MicroQuark (COSMED, Roma, Itália), que foi calibrado diariamente. A temperatura e umidade do ar no local do teste foram registradas com um termo-higrômetro. Os valores previstos para a referência foram os propostos por Pereira (PEREIRA, 2002).

Figura 12. Teste de Função Pulmonar (Espirometria).



Os]

completa até

atingirem a capacidade pulmonar total, seguida de uma expiração no bocal do espirômetro da forma mais rápida e completa possível, sendo estimulados verbalmente pelo examinador durante a execução

da manobra. Seguimos os critérios de execução e aceitabilidade estabelecidos pelas Diretrizes para Testes de Função Pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (PEREIRA, 2002), bem como os padrões internacionais definidos pela American Thoracic Society (MILLER, 2005). Para evitar interferência das manobras de expiração forçada nos resultados do VEF₁ após a broncoprovocação por HVE, foram aceitas duas manobras semelhantes à manobra basal ou, em caso de redução no VEF₁, duas manobras com curvas fluxo-volume semelhantes e com aspecto adequado na avaliação do pico de fluxo (PARSONS, 2013).

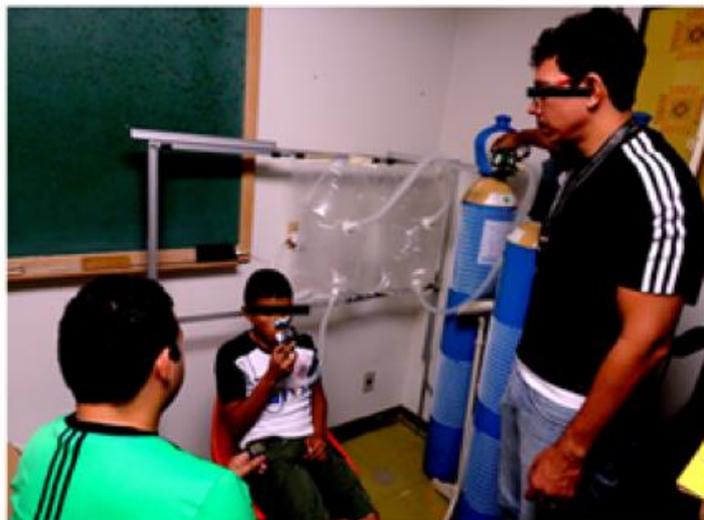
O valor do VEF₁ foi medido antes e aos cinco, 10, 15 e 30 minutos após a broncoprovocação. O BIE foi diagnosticado quando houve uma redução igual ou maior que 10% em relação ao valor basal do VEF₁. A intensidade da redução no VEF₁ em relação aos valores basais foi classificada como leve (>10% e <25%), moderada (≥25% e <50%) ou grave (>50%) (PARSONS, 2013).

3.7.5 Teste de broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica (HVE)

O teste foi conduzido através da hiperventilação de uma mistura de ar seco contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂), a fim de evitar a ocorrência de alcalose respiratória. Para essa finalidade, foi utilizado um equipamento desenvolvido e patenteado pelo nosso grupo de pesquisa. Os gases utilizados foram adquiridos na empresa White Martins (Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco - Brasil). A mistura foi armazenada em cilindros apropriados e liberada para um conjunto de sacos plásticos, dos quais os participantes inalaram o conteúdo por meio de um bocal e uma válvula unidirecional de baixa resistência (Laerdal® Pocket Mask®).

Durante o teste, os indivíduos foram instruídos a manter a taxa de ventilação alvo correspondente a 21 vezes o valor do basal (PARSONS, 2013) por um período de seis minutos (Figura 13).

Figura 13 - Realização da hiperventilação voluntária eucápnica.



A taxa de ventilação por minuto foi medida utilizando um ventilômetro analógico Nspire Wright Mark 8 (Nspire Health Ltda - Reino Unido), e os pacientes foram constantemente estimulados a manter a taxa de ventilação alvo (Figura 12). Se necessário, os adolescentes podiam fazer pequenas pausas no teste para engolir a saliva acumulada ou tossir. Não houve interrupção do teste devido a desconforto respiratório severo por parte dos participantes durante a realização desse estudo.

3.7.6 Análise metabonômica do condensado do ar exalado

Todas as aquisições de espectros de RMN ^1H foram realizadas em um espectrômetro Varian de 400 MHz a uma frequência de ^1H de 400 MHz. Todas as amostras do CAE congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente e preparadas utilizando 630 μL de amostra e 70 μL de tampão de fosfato de sódio (0,2M Na_2HPO_4 em 10% de D_2O , pH 7,0) e colocadas em tubos de RMN de 5 mm (figura 14).

Os procedimentos de aquisição seguiram os parâmetros: os espectros de RMN unidimensionais foram adquiridos com a supressão do sinal da água usando uma sequência de pulsos padrão (WET), com 14.522 pontos de dados em uma janela espectral de 5.186,7 Hz, tempo de aquisição igual a 1,4 s, 160 transientes, atraso de saturação igual a 3,0 s e temperatura de 22°C. O alargamento de linha utilizado foi de 1 Hz.

3.7.7 Processamento dos dados espectrais

Utilizando o programa MestReNova 12.0, a região entre δ 1,60 e 2,00 ppm foi dividida em 67 bins (cada um com 0,004 ppm de largura) para usar o pico presente como estudo-alvo (Chang-Chien et al, 2021). A matriz foi construída com 92 linhas (casos) e 68 variáveis (bins dos espectros de RMN ^1H mais a variável de classe) e, em seguida, foi submetida a análise multivariada.

Figura 14 - Análise metabonômica do condensado do ar exalado.



3.7.8 Análise multivariada dos dados espectrais

Primeiramente, três matrizes foram criadas:

- Uma matriz para todas as amostras coletadas antes o teste de broncoprovocação por HVE (pré HVE), comparação entre casos positivos e negativos para o diagnóstico de BIE.
- Uma matriz para todos os casos positivos de BIE, comparação das amostras coletadas antes e após o teste de broncoprovocação por HVE.
- Uma matriz para todos os casos negativos de BIE, comparação das amostras coletadas antes e após o teste de broncoprovocação por HVE.

Os conjuntos de dados foram pré-processados utilizando normalização por soma (em linha) e escalonamento automático (variáveis). Em seguida, foram empregados formalismos de PCA (Análise de Componentes Principais) e Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados (OPLS-DA), usando a plataforma online MetaboAnalyst 5.0. Os modelos de metabonômica foram validados utilizando Validação Cruzada Leave-One-Out (LOOCV) e teste de permutação, com 2000 permutações.

3.8 PROCESSO de TABULAÇÃO e VERIFICAÇÃO DOS DADOS

As variáveis medidas foram registradas em uma planilha de tabulação (APÊNDICE D) e, posteriormente, inseridas com dupla entrada no software Microsoft Excel 2010. Isso foi feito para facilitar o processo de análise estatística e a transferência para os programas SPSS for Windows 20.0 e Statistica 10.0.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados e analisados utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 20.0. Inicialmente, os dados foram inseridos no pacote estatístico SPSS por meio de digitação dupla, e foram verificadas possíveis inconsistências. Para caracterizar a amostra, os dados passaram por teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição normal e, na comparação das variáveis independentes contínuas, foi utilizado o teste t de Student

Para comparação intergrupos dos pacientes com e sem BIE foi utilizado o diagnóstico clínico ($VEF_1 < 10\%$ no teste de broncoprovocação) e o modelo metabonômico desenvolvido através da Análise Discriminante Linear (LDA) dos metabólitos presentes nas amostras do CAE obtidas antes da HVE.

O modelo metabonômico da LDA foi desenvolvido através software Statistica 10.0 e validado por meio da Validação Cruzada Leave-One-Out (LOOCV), identificando 8 picos de sinais do espectro da RMN 1H discriminantes dos 44 participantes.

Foi realizada a comparação do perfil metabonômico das amostras do CAE coletas antes e após o HVE (análise intragrupo) a partir da análise exploratória através da Análise dos componentes principais (PCA). Em seguida, foi utilizada a regressão multivariada por Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados (OPLS-DA). Para realizar as análises PCA e OPLS-DA, foi utilizada a plataforma online MetaboAnalyst 4.0.

A validação estatística foi obtida pelo teste de permutação, com 2000 permutações. Esse teste foi utilizado para avaliar se a classificação específica dos indivíduos em dois grupos designados é significativamente melhor do que qualquer outra classificação aleatória em dois grupos arbitrários. Nesse teste, os rótulos de classe de BIE positivo e BIE negativo foram permutados, ou seja, aleatoriamente designados para diferentes indivíduos. Com os rótulos de classe "errados", um novo modelo de classificação foi calculado. A ideia por trás do teste de permutação é que, com os rótulos de classe errados, o modelo de classificação recém-calculado não deve ser capaz de prever as classes com precisão.

3.10 ASPÉCTOS ÉTICOS

A pesquisa foi devidamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o número 2.796.049 (ANEXO A). Cartas de anuência foram solicitadas e assinadas pelos responsáveis dos ambulatórios, serviços e centros envolvidos no estudo, incluindo o Serviço de Pneumologia do

Hospital das Clínicas da UFPE (ANEXO B), o Ambulatório de Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas da UFPE (ANEXO C), o Chefe do laboratório do Hospital das Clínicas da UFPE (ANEXO D) e o Chefe do Departamento de Química Fundamental (ANEXO E).

Todos os indivíduos convidados a participar do estudo formalizaram sua concordância através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os maiores de 18 anos (APÊNDICE A) e pelos pais ou responsáveis (APÊNDICE B), bem como do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) pelos adolescentes (APÊNDICE C). Todas as atividades de pesquisa foram conduzidas em estrita conformidade com a resolução nº 466/12 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Os equipamentos utilizados para a realização da espirometria, da HVE e para a obtenção do CAE encontram-se disponíveis no Laboratório de Função Pulmonar do Serviço de Pneumologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

3.10.1 Riscos e Benefícios

A espirometria é um exame de rotina utilizado na avaliação de pacientes asmáticos, e seus possíveis riscos incluem o desencadeamento raro de um episódio de asma ou fadiga do paciente.

O teste de broncoprovocação por HVE para diagnóstico de BIE é realizado rotineiramente na investigação de queixas de dispneia associadas ao exercício em indivíduos com histórico clínico sugestivo de asma. Esse teste tem sido amplamente utilizado tanto na prática clínica como em várias outras pesquisas previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), sem o registro de eventos adversos considerados graves, como internações por crises de asma ou quedas com traumatismos. O risco inerente ao teste é a possibilidade de desencadear sintomas de dispneia associados à hiperventilação ou ao broncoespasmo.

Para minimizar os riscos associados ao teste, foram adotados os seguintes procedimentos:

- Apenas pacientes com VEF₁ acima de 60% do valor previsto foram incluídos na pesquisa.
- Houve a presença de um médico disponível durante o exame.
- O teste foi interrompido mediante solicitação do paciente ou em caso de evidente dispneia do paciente.
- O teste também foi interrompido se a saturação arterial periférica de hemoglobina (SpO₂) estivesse menor que 90%.
- O examinador permaneceu ao lado do paciente durante o procedimento.
- Caso o VEF₁ estivesse inferior em 10% ao valor basal 30 minutos após o teste, foi administrado salbutamol por inalação.

Os participantes puderam se beneficiar diretamente dos resultados dos exames, permitindo o diagnóstico de BIE e seu tratamento pelo médico assistente. Além disso, a população em geral está sendo beneficiada pelos conhecimentos provenientes dos resultados da pesquisa e pelas perspectivas de novos conhecimentos que podem surgir a partir das dúvidas levantadas. Todos os resultados foram disponibilizados aos pacientes e a seus médicos assistentes para um melhor acompanhamento e tratamento do BIE.

4 RESULTADOS

4.1 CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO PARA COLETA DO CAE (Apêndice E).

Dentre os métodos não invasivos, a análise do CAE leva vantagem por ser mais estável e em sua composição estarem presentes metabólitos voláteis e não voláteis além da facilidade e baixa invasividade na obtenção da amostra (BANNIER, 2019; PITE, 2016).

Existem equipamentos que conseguem coletar o CAE, sendo eles o RTube™ (Respiratory Research Inc, Charlottesville, VA, USA), o ECoScreen (Jaeger, Wurzburg, Alemanha), o Anacon (Biostec, Valência, Spain) e o TurboDeccs (Italchil, Parma, Italy), mas nenhum é comercializado em nosso país e o custo de aquisição é elevado quando levamos em consideração os financiamentos disponibilizados para a pesquisa clínica. Nosso equipamento foi construído visando ampliar esse tipo de pesquisa com um custo reduzido para a coleta do CAE, tornando acessível a obtenção desse biofluido, o que muito poderá contribuir para novos estudos, em especial na compreensão da fisiopatologia, diagnóstico e avaliação evolutiva de doenças do sistema respiratório.

Todas as coletas do CAE, em nosso estudo, foram realizadas com o dispositivo descrito na seção de material e métodos (Figuras 10 e 11) e foi solicitada a patente junto à Diretoria de Inovação e Empreendedorismo (Processo 23076.073092/2023-39).

4.2 RESULTADOS METABONÔMICOS (Apêndice F).

Foram recrutados quarenta e quatro participantes de ambos os sexos, com idades entre 10 e 20 anos. Dentre os participantes, vinte e cinco apresentaram resultado positivo para BIE após a broncoprovocação por HVE (BIE+), uma prevalência de 54,76% .

Os dados gerais desses participantes estão apresentados na tabela 01. Não houve diferença quanto a idade, peso, altura, sexo, e VEF₁ basal entre os grupos dos pacientes com teste positivo (BIE+) e negativo (BIE-) para broncoespasmo induzido por HVE. Os asmáticos com BIE apresentaram uma redução média de 25,13% \pm 14,9 no VEF₁ após a manobra de hiperventilação voluntária eucápnica. Na última avaliação espirométrica, 30 minutos após teste de broncoprovocação, todos os participantes apresentaram um VEF₁ próximo (< 10% de diferença) ao valor basal.

Tabela 01 - Dados gerais da amostra.

Grupo	BIE + (n= 25)	BIE - (n=19)	Valor de P*
Idade (anos)	12,7 ± 3,0	15,0 ± 3,2	0,74
Peso (kg)	46,8 ± 14,4	63,8 ± 21,8	0,54
Altura (cm)	151,4 ± 14,0	153,79 ± 39,9	0,73
Sexo masculino n (%)	12 (52,2%)	11 (57,9%)	0,45
VEF ₁ basal (l/seg)	2,38 ± 0,7	3,33 ± 0,9	0,77
VEF ₁ basal (% do predito)	91,6 ± 15,3	99,0 ± 15,9	0,73
VEF ₁ HVE (% basal)	-25,13 ± 14,9	-4,37 ± 3,6	<0,001

Legenda: Valores apresentado em média ± DP. BIE +: Asmáticos com broncoconstrição induzida por exercício. BIE -: Asmáticos sem broncospasmo induzido por exercício; ACT: *Asthma Control Test* (Teste de Controle da Asma); VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; VEF₁ HVE: Redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo após broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica. * teste t de Student.

Durante o protocolo de pesquisa, as condições ambientais no laboratório climatizado foram mantidas a uma temperatura média de 25,3 ± 1,56°C e uma umidade relativa do ar de 55,1 ± 3,3%. Em relação aos resultados obtidos no teste de espirometria e HVE, a água de banho do equipamento condensador teve uma temperatura média de 2,95 ± 1,35°C e o volume médio de biofluido coletado foi de 5,26 ± 3,06ml. Para comparação entre os grupos de adolescentes com BIE (BIE+) e sem BIE (BIE -) foram analisados os espectros da RMN ¹H das amostras do CAE antes da realização da HVE. Diferente das análises realizadas anteriormente na tese de doutorado de um dos membros de nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES FILHO, 2019), agora aumentamos o número de amostras de 26 para 44 participantes.

O modelo metabômico foi obtido por LDA e identificou 8 variáveis (picos de sinais no espectro) distintas entre os dois grupos (Tabela 02), com uma acurácia de 82,7%, sensibilidade de 82,1%, especificidade de 83,3%, valor preditivo positivo (VPP) igual a 83,72% e valor preditivo negativo (VPN) igual a 82,22%

Tabela 02 - Análise da acurácia do modelo metabonômico antes do teste de hiperventilação voluntária eucápnica em adolescentes asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício..

		Diagnóstico Clínico	
		BIE +	BIE -
MODELO METABONÔMIO	BIE +	23	5
	BIE -	2	14
Acurácia: 82.7%	Sensibilidade: 82,1% Especificidade: 83,3%	Valor preditivo positivo: 83,72% Valor preditivo negativo: 82,22%.	

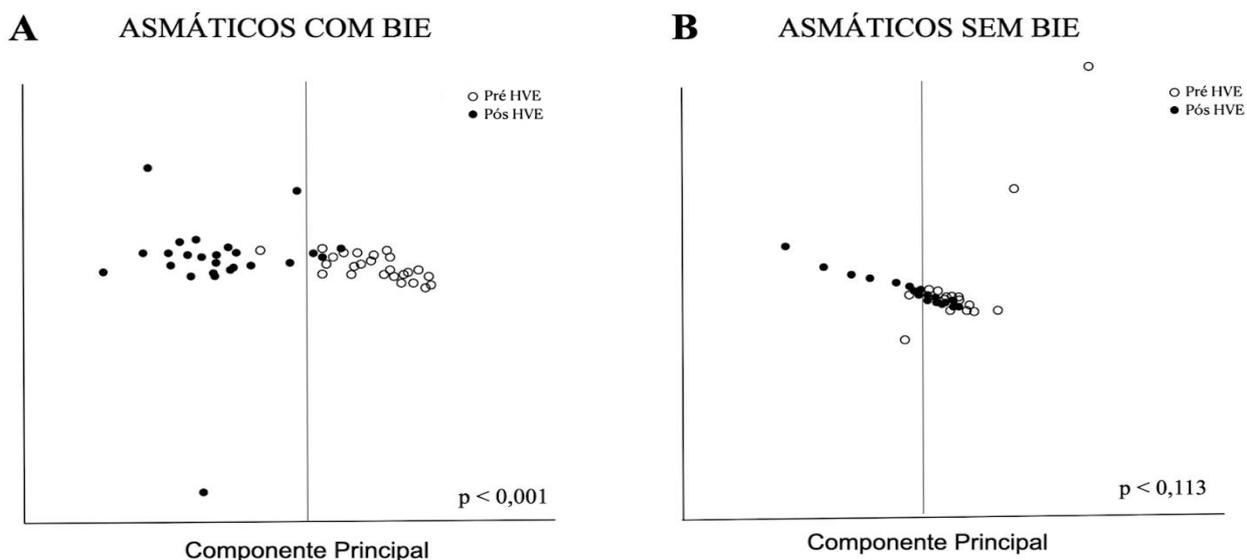
BIE +: Asmáticos com broncoespasmo induzido por exercício. BIE -:Asmáticos sem broncoespasmo induzido por exercício.

Para comparar os metabólitos presentes no CAE antes e após o HVE, foi desenvolvido o modelo metabonômico a partir da regressão multivariada por OPLS-DA. Foram analisados os picos de intensidade localizados na região entre δ 1,60 e 1,86 ppm, que foram considerados de interesse para o estudo (Chang-Chien,2021)

. A partir dos modelos desenvolvidos realizamos a comparação do perfil de metabólitos presentes no CAE antes a após o HVE tanto nos pacientes asmáticos com BIE (figura 15A) como aqueles que não apresentaram broncoespasmo durante o teste (figura 15B).

No gráfico da figura 15A a linha central refere-se ao componente principal, uma representação matemática dos sinais do espectro da RMN ^1H dos metabólitos que melhor discriminam os metabólitos presentes no CAE pré e pós HVE. O componente principal foi calculado a partir da análise multivariada das intensidades dos sinais no espectro que melhor representaram as distinção (maior variância) entre as amostras, o objetivo foi transformar matematicamente os diversos sinais para uma única representação, permitindo uma melhor visualização dos padrões de cada amostra no gráfico.

Figura 15 - Comparação do perfil de metabólitos presentes no CAE antes e após o teste da hiperventilação voluntária eucápnica nos adolescentes asmáticos com e sem BIE.



BIE +: Asmáticos com broncoespasmo induzido por exercício. BIE -:Asmáticos sem broncoespasmo induzido por exercício.. HVE: Hiperventilação voluntária eucápnica.

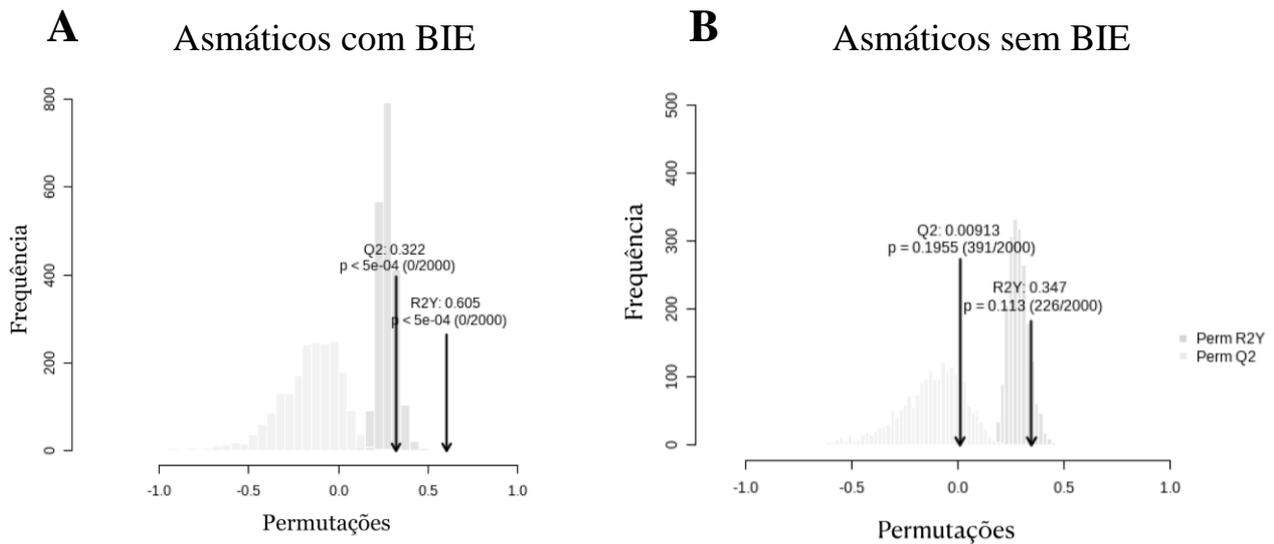
Além disso, cada círculo da figura 15 representa uma amostra do CAE antes (círculos abertos) ou após (círculos sólidos) a HVE dos adolescentes avaliados. A proximidade da amostra com o componente principal, sugere semelhanças nos perfis de metabólitos presentes no CAE, enquanto a distância sugere diferenças.

Desta forma, analisando apenas os adolescentes asmáticos com BIE, observamos na figura 15A que a maior parte das amostras do CAE obtidas antes da HVE está deslocada para a direita, enquanto aquelas amostras obtidas pós HVE estão agrupadas a esquerda do gráfico. A análise de regressão multivariada por OPLS mostrou que o perfil de metabólitos presentes no CAE pré HVE é significativamente diferente daqueles pós HVE ($p < 0,001$).

Por outro lado, nos pacientes asmáticos sem BIE, tanto as amostras coletadas pré HVE como aquelas obtidas pós HVE estão agrupadas próximas ao componentes, não sendo possível identificar uma separação entre elas (Figura 15B). Realizando a mesma análise por OPLS-DA, não houve diferenças significativas nos perfis de metabólitos presentes no CAE antes ou após a HVE nos asmáticos sem BIE ($p = 113$).

Esses resultados foram validados através do teste de permutação nos dois grupos de pacientes. O teste confirmou que há diferenças ($p < 0,001$) no perfil de metabólitos do CAE pré e pós HVE nos asmáticos com BIE (Figura 16A) e que não foi possível discriminar ($p = 0,195$) as amostras pré e pós HVE dos asmáticos sem BIE (Figura 16B).

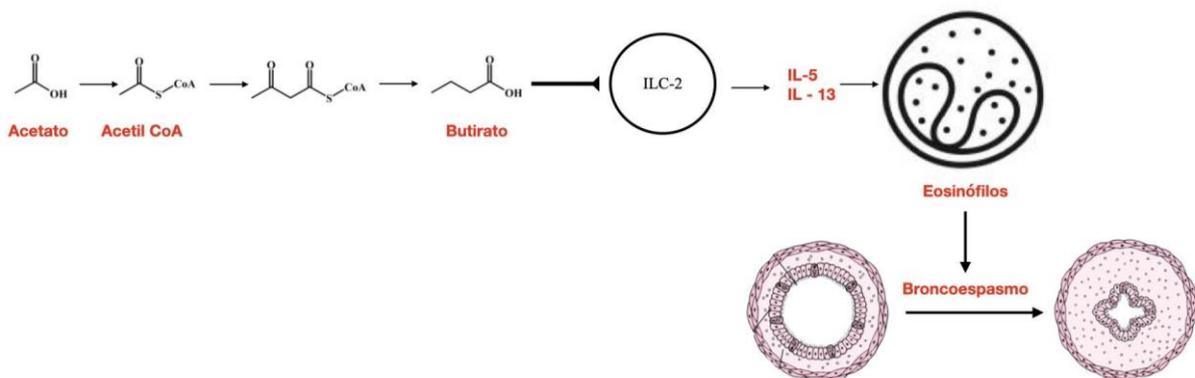
Figura 16 - Teste de validação por permutação da análise por OPLS-DA das amostras do condensado do ar exalado pré e pós HVE.



R2Y = modelagem da análise de regressão multivariada por OPLS; Q2 = predição do teste de permutação.

Além do desenvolvimento dos modelos metabonômicos citados, também realizamos a investigação de possíveis metabólitos presentes no CAE responsáveis por essa discriminação entre os grupos de pacientes asmáticos com e sem BIE, observamos uma maior intensidade do pico do sinal na RMN ^1H no deslocamento químico 1,92ppm, relacionado ao acetato, nos adolescentes que apresentaram BIE, sugerindo a participação desse composto nas vias metabólicas envolvidas no mecanismo da broncoconstricção (figura 17).

Figura 17. Esquema proposto ilustrando as vias metabólicas dos metabólitos do CAE envolvidos



Fonte: CHANG-CHIEN, 2021; YIP, 2021.

5 DISCUSSÃO

Esse estudo investigou a potencial aplicação da análise metabonômica por RMN ¹H para identificar alterações no perfil de metabólitos presentes no condensado do ar exalado antes e após a broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica em 44 adolescentes asmáticos, 25 deles com BIE. Até onde é do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo com esse objetivo a ser realizado.

Nossos resultados demonstraram diferenças dos metabólitos presentes no CAE de adolescentes asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício (BIE) antes mesmo da realização da HVE, reforçando dados iniciais. Adicionalmente, observamos que as alterações nos metabólitos presentes do CAE após a manobra de HVE ocorreram apenas no grupo de pacientes com asma que desenvolveram BIE.

A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias respiratórias. Afetando mais de um quarto de bilhão de pessoas em todo o mundo, estima-se que ultrapassará 400 milhões de indivíduos até o ano de 2025. No Brasil, estima-se que a prevalência média de asma ativa seja de 18,5% em adolescentes (SOLÉ, 2015).

A maioria dos pacientes que sofrem de asma crônica provavelmente experimentará um aumento temporário nos sintomas após exercício ou atividade física vigorosa, sendo esse o principal fator associado à suspeita do broncoespasmo induzido por exercício (BIE). Estima-se que o BIE ocorra em cerca de 40 a 90% dos pacientes asmáticos. Aproximadamente 50% das crianças com asma apresentam sintomas de BIE, uma condição conhecida por limitar a participação dessas crianças em atividades vigorosas (CORREIA JUNIOR, 2017).

Dentre os adolescentes participantes em nosso estudo, identificamos prevalência de 55% de BIE, o que está de acordo com os dados observados em estudos anteriores (SILVA FILHO et al, 2015; DANTAS, 2014). No estudo de Lin (2019), foram avaliadas 149 crianças asmáticas, com idades acima de 5 anos, submetidas a teste de broncoprovocação em esteira, os resultados mostraram que 52,5% desses pacientes apresentaram BIE. Previamente em nosso laboratório, observamos prevalência de 50% de BIE avaliando crianças e adolescentes asmáticos através do teste de broncoprovocação por HVE (SILVA FILHO, 2015).

Os pacientes de ambos os grupos estudados, com BIE e sem BIE, não apresentaram diferenças nos valores basais do VEF₁, com valores considerados aceitáveis (> 70% do predito) em todos os casos. Apenas um adolescente apresentou valor basal de VEF₁ com valor < 60% do predito, enquadrando-se em um dos critérios de exclusão para participação na pesquisa, sendo assim, o mesmo foi descontinuado do estudo.

A semelhança observada no VEF₁ basal entre os dois grupos de asmáticos avaliados também foram descritas em outros estudos de nosso grupo (CORREIA JUNIOR., 2012; RODRIGUES FILHO, 2018). Motomura et al (2022), avaliando 184 crianças e adolescentes asmáticos submetidos ao teste de broncoprovocação por exercício em cicloergômetro, não observaram diferenças nos valores basais entre os participantes com ou sem BIE.

Um dado importante observado em nossas avaliações foi que os pacientes apresentaram a maior queda no VEF₁ dentro de 15 minutos após a HVE. Assim como em nossos achados, em estudos anteriores, foi relatado que a broncoconstrição geralmente acontecia dentro de 10-15 minutos e com recuperação completamente dentro de 30 minutos (CRAPO et al, 2000; JOHANSSON, 2016). Além disso, todos os participantes apresentaram uma boa tolerância a HVE, completando o teste durante os seis minutos da manobra, como preconizado, demonstrando a viabilidade e segurança do teste.

O condensado do ar exalado (CAE), material coletado durante a expiração, através de uma técnica não invasiva, permite a obtenção de amostras do ar exalado pelos pacientes para análise. O CAE tem sido utilizado para avaliar a presença de biomarcadores, como substâncias inflamatórias e moléculas específicas, que podem fornecer informações importantes sobre a condição respiratória do indivíduo. Essa técnica tem se mostrado promissora em diversas áreas da medicina, especialmente no estudo de doenças respiratórias, como a asma, proporcionando uma forma mais fácil e menos desconfortável de avaliar a saúde pulmonar dos pacientes (KIERBIEDŹ-GUZYK e SOZAŃSKA, 2023; POŁOMSKA e SOZAŃSKA, 2022; POŁOMSKA, BAR e SOZAŃSKA, 2021)

Os biomarcadores mais frequentemente estudados no CAE são pH, citocinas e eicosanoides, incluindo 8-isoprostanos, cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs) e lipoxinas (Banner, 2019). No estudo de coorte realizado por Kreißl (2021), acompanhando 135 crianças, observaram que o pH do CAE foi altamente sensível para identificar aquelas com maior risco de desenvolver asma na idade escolar. Outro estudo, que investigou o efeito do tratamento com corticosteróide inalado e prednisona oral, observou redução significativa de Cys-LTs no CAE de noventa e quatro crianças com exacerbação moderada a grave de asma. Esses achados demonstram o potencial do estudo dos componentes do CAE para avaliação, acompanhamento e compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios e respostas ao tratamento da asma.

Os Cys-LTs são mediadores inflamatórios produzidos por diversas células do sistema imunológico. Estudos mostraram que crianças asmáticas têm níveis elevados de Cys-LTs no CAE em comparação com crianças não asmáticas (POŁOMSKA, BAR e SOZAŃSKA, 2021; LINARES SEGOVIA, 2014). Além disso, em casos de asma persistente, os níveis de Cys-LTs no CAE são mais altos do que na asma intermitente (KESKIN, 2016). Outros mediadores inflamatórios, como o leucotrieno B₄ (LTB₄), também têm sido investigados, e estudos mostraram que crianças asmáticas têm níveis mais elevados de LTB₄ no CAE em comparação com crianças saudáveis (GELFAND,

2017). Além disso, pacientes atópicos tendem a apresentar concentrações mais altas de LTB₄ em ambos os tipos de CAE coletados (TRISCHLER, 2015).

São necessárias mais pesquisas para entender completamente o papel destes mediadores inflamatórios na asma, assim como a identificação dos mecanismos que precedem as suas formações, descrevendo, por exemplo, as vias metabólicas relacionadas. Assim, torna-se fundamental aprofundar o conhecimento através do estudo metabonômicos na asma e sua utilidade na compreensão dos seus diversos fenótipos, destacando o BIE, dada sua significativa prevalência dentre as crianças e adolescentes asmáticos. Desta forma, através do conhecimento sobre os componentes bioquímicos do CAE, a partir de uma padronização na coleta desse biofluido, temos mais possibilidades de entender algumas lacunas sobre os mecanismos de desenvolvimento do BIE e a resposta ao tratamento específico desses pacientes.

Ainda não há uma padronização metodológica estabelecida para coleta do CAE nos pacientes asmáticos, apesar de dois abrangentes relatórios do Grupo de Trabalho da *European Respiratory Society* (ERS) e da *American Thoracic Society* (ATS) em 2005 e 2017, respectivamente (HORVÁTH, 2017; HORVÁTH, 2005).

Apesar de existirem equipamentos comercializados para realizar a coleta do CAE, como o *Rtube TM* (Respiratory Research Inc, Charlottesville, VA, Estados Unidos), o *EcoScreen* (Jaeger, Wurzburg, Alemanha), o *Anacon* (Biostec, Valência, Espanha) e o TurboDeccs (Italchil, Parma, Italia), nenhum deles está disponível em nosso país, aumentando demasiadamente o custo para aquisição. Dessa forma, customizamos um equipamento seguindo os padrões sugeridos por HORVATH, HUNT e BARNES (2005), para o qual reivindicamos a patente (Apêndice E), ampliando nossa possibilidade de pesquisas em nosso laboratório através do uso do CAE, considerando sua vantagem relacionada a facilidade da obtenção do biofluido com menos desconforto para as crianças e adolescentes.

Em nosso estudo, utilizando o condensador customizado, conseguimos manter o tubo de silicone submerso na água com temperatura média de $2,95 \pm 1,35^{\circ}\text{C}$ e o volume médio de biofluido coletado foi de $5,26 \pm 3,06\text{ml}$. Entendemos que a temperatura pode influenciar na concentração e na quantidade de compostos presentes no CAE (ZAMURUYEV, 2018), dessa forma padronizamos o mesmo procedimento metodológico em todas as coletas realizadas, com o objetivo de não causar viés na obtenção de dados.

O processo de limpeza dos componentes dos dispositivos também foi padronizado. Para verificar uma possível interferência nos resultados, realizamos análises metabonômicas de 10 amostras de 5ml de água destilada que foram coletadas nos tubos de silicone após o processo de higienização. Não verificamos resíduos que alterassem o perfil metabonômico nos espectros obtidos pela RMN ¹H das amostras.

Embora diversos estudos tenham avaliado os componentes do CAE em pacientes asmáticos através da RMN ^1H (IBRAHIM et al, 2013; SINHA et al, 2012; CARRARO et al, 2007), não encontramos estudos com esse perfil de análise especificamente no fenótipo com BIE.

Amostras de condensado do ar exalado de 82 adultos com asma e 35 voluntários saudáveis foram analisadas no estudo de Ibrahim (2013) usando RMN ^1H . Os autores desenvolveram modelo discriminatório baseado em cinco regiões espectrais, que conseguiu distinguir com sucesso os asmáticos dos controles saudáveis. Além disso, foi possível discriminar subgrupos dos pacientes asmáticos com base em características como eosinofilia, neutrofilia, controle da asma e uso de corticosteroides inalatórios.

Motta (2014) coletaram amostras do CAE de um grupo de 35 pacientes asmáticos e 35 indivíduos saudáveis com dois condensadores comerciais operando a $-27,3\text{ }^\circ\text{C}$ e $-4,8\text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados do estudo mostraram que os modelos a diferentes temperaturas, independentemente da análise espectral, classificaram corretamente os pacientes asmáticos e saudáveis. Os metabólitos que melhor distinguem os dois grupos de participantes foram: succinato, hippurato, piruvato, metanol, ácido graxo saturado, valina, fenilalanina, trimetilamina, acetato, ácido urocânico, etanol, 4-hidroxifenilacetato, adenosina, propionato, formato, colina/fosforilcolina e lactato. Esses metabólitos apresentaram diferenças significativas nas concentrações entre os grupos, possibilitando a correta classificação das amostras, independentemente da temperatura de condensação do CAE.

No estudo de Carraro (2007), foi realizada uma análise metabolômica utilizando a técnica de RMN ^1H no condensado do ar exalado de vinte e cinco crianças com asma alérgica controlada e onze crianças saudáveis. A análise das informações obtidas a partir dos espectros apresentou uma taxa de discriminação significativa, alcançando acurácia de aproximadamente de 86%. As variáveis de RMN ^1H selecionadas revelaram a presença de compostos acetilados na região de 1,7 a 2,2 ppm. Próximo a essa faixa de frequência (1,86 a 1,92 ppm), também identificamos diferença significativa nos espectros obtidos no CAE dos adolescentes asmáticos com BIE antes e após o HVE, o que sugere que os compostos acetilados podem apresentar papel importante no mecanismo da broncoconstrição nesse grupo de pacientes.

Em outro estudo realizado por Carraro (2013), com 42 crianças e adolescentes asmáticos e 15 não asmáticos, utilizando análise dos metabólitos através da espectrometria de massas no CAE dos participantes, foram diferenciados vários fenótipos de asma, com foco especial na asma grave. Nessa pesquisa, foram identificados compostos associados ao ácido retinóico, adenosina e vitamina D que mostraram relevância na distinção dos diferentes grupos.

Maniscalco (2017) investigará o perfil metabólico, utilizando a RMN ^1H , de 3 grupos de indivíduos: obesos com asma, obesos não-asmáticos e asmáticos não obesos. Os autores, assim como em nosso estudo, realizaram a coleta do CAE após o teste de broncoprovocação, porém utilizando o

estímulo direto com metacolina. Foram relatados envolvimento das vias metabólicas do piruvato, metano, glioxilato e dicarboxilato em amostras de CAE dos adultos com fenótipo de asma relacionada à obesidade.

O acetato foi descrito nas possíveis vias metabólicas que discriminam as crianças com asma no estudo de Chang-Chien (2021). Os autores demonstraram que a assinatura metabólica do CAE, baseada em RMN ^1H , composta por 4 metabolitos (lactato, formato, ácido butírico e isobutirato), teve propriedades discriminativas no diagnóstico da asma em crianças asiáticas em uma coorte populacional. Particularmente a associação do butirato com a hiperreatividade nas asma tem sido descrita de diversos estudos (YIP, 2021; THEILER, 2019; CAIT, 2018)

Em nosso estudo, analisando os espectros de RMN ^1H nas amostras do CAE coletadas antes da HVE nos asmáticos com BIE, observamos maior intensidade do sinal relacionado ao acetato quando comparadas às amostras dos adolescentes sem BIE. Sugerindo a participação do acetato nos mecanismos envolvidos no BIE (Figura 17).

Apoiando essa especulação, identificamos que os sinais relacionados aos compostos acetilados, na comparação pré e pós HVE, aumentaram apenas no grupo de asmáticos com BIE, permanecendo inalterados naqueles que não desencadearam a broncoconstrição durante o teste (BIE-).

Observando a figura 16, identificamos que o acetato pode ser produzido a partir da degradação do piruvato em formato e butirato, ambos compostos são mencionados como moduladores do mecanismo inflamatório e de contração do músculo liso das vias aéreas. (CHANG-CHIEN, 2021; RODUIT, 2019; RON-HARE, 2016; GREENWALD, 2010; GASTON, 1998)

Algumas considerações metodológicas que podem ser levadas em conta, como a temperatura da mistura de água e gelo maior que 0°C , impossibilitando a coleta de maiores quantidades de compostos voláteis; o processo de limpeza do equipamento que não passou por esterilização por temperatura (HORVATH, HUNT & BARNES, 2005). Também não realizamos a mensuração do pH do CAE no momento da coleta. No entanto, esses fatores não influenciaram os resultados, pois os procedimentos metodológicos foram realizados de maneira igual em todos os pacientes, desde do teste de função pulmonar, a realização do teste de broncoprovocação por HVE, o dispositivo para coleta do CAE e o processo de limpeza dos equipamentos utilizados.

Além disso, realizamos as análises de 10 amostras de água destilada que foram introduzidas no tubo de silicone do condensador após a higienização e não foram identificados alterações do espectro da RMN ^1H nessas amostras, demonstrando que o processo de limpeza não interferiu em nossos resultados. Observamos também que, mesmo com temperatura no dispositivo condensador não atingindo valores abaixo de 0°C , foi possível identificar alterações dos espectros de RMN ^1H nas amostras do CAE dos participantes, indicando mudanças nos perfis metabonômicos.

Outra observação relacionada aos procedimentos é que sabemos que um maior número de repetições das manobras de expiração forçada para avaliação do VEF₁ basal pode predispor o brocoespasma antes mesmo da HVE. Contudo, em todos os participantes do nosso estudo o VEF₁ pré teste de broncoprovocação foi obtido com 3 ou 4 manobras espirométricas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Utilizamos a hiperventilação voluntária eucápnica como método de diagnóstico do BIE, considerando sua viabilidade, praticidade, reprodutibilidade e ausência de desconforto significativo para os participantes, fatores importantes para avaliação em adolescentes asmáticos.

Além disso, empregamos a coleta do condensado do ar exalado como método de obtenção do biofluido das vias aéreas para análise metabólica. Visamos as vantagens dessa técnica por ser segura, relativamente simples e permitir coletas repetidas de forma não invasiva e, para tornar viável, desenvolvemos a construção de um equipamento condensador simples e de baixo custo.

Nossos resultados oferecem *insights* que podem ajudar a compreender melhor os mecanismos do broncoespasmo induzido pelo exercício (BIE) em adolescentes asmáticos. A identificação do acetato como metabólito relevante nas vias metabólicas associadas à broncoconstrição sugere que essa molécula desempenha papel crucial na resposta inflamatória das vias aéreas durante o exercício físico. Ao compreender o papel específico do acetato nessas vias metabólicas, podemos avançar no entendimento dos mecanismos subjacentes ao BIE em pacientes asmáticos. Essa descoberta pode orientar futuras pesquisas e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais direcionadas, proporcionando melhor gerenciamento e tratamento personalizado para o BIE nesse grupo de pacientes asmáticos.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B; MULGIRIGAMA, A; BEREND, N. **Exercise-induced bronchoconstriction: prevalence, pathophysiology, patient impact, diagnosis and management.** NPJ Prim Care Respir Med. 2018 Aug 14;28(1):31.
- ALONSO-MORENO, P; RODRIGUEZ, I; IZQUIERDO-GARCIA, JL. **Benchtop NMR-Based Metabolomics: First Steps for Biomedical Application.** Metabolites. 2023 Apr 29;13(5):614.
- BANNIER, MAGE; ROSIAS, PPR; JOBSIS, Q; DOMPELING, E. **Exhaled Breath Condensate in Childhood Asthma: A Review and Current Perspective.** Front Pediatr. 2019 Apr 25;7:150.
- BHATIA, R; ABU-HASAN, M; WEINBERGER, M. **Exercise-Induced dyspnea in children and adolescents: differential diagnosis.** Pediatr Ann. (2019) 48:e121–7. 10.3928/19382359-20190219-02
- BREITENEDER, H; PENG, YQ; AGACHE, I; DIAMANT, Z; EIWEGGER, T; FOKKENS, WJ; TRIDL-HOFFMANN, C; NADEAU, K; O'HEHIR, RE; O'MAHONY, L; PFAAR, O; TORRES, MJ; WANG, DY; ZHANG, L; AKDIS, CA. **Biomarkers for diagnosis and prediction of therapy responses in allergic diseases and asthma.** Allergy. 2020 Dec;75(12):3039-3068.
- BRINKMAN, P; VAN DE POL, MA; GERRITSEN, MG; BOS, LD; DEKKER, T; SMIDS, BS; SINHA, A; MAJOUR, CJ; SNEEBOER, MM; KNOBEL, HH; VINK, TJ; DE JONGH, FH; LUTTER, R; STERK, PJ; FENS, N. **Exhaled breath profiles in the monitoring of loss of control and clinical recovery in asthma.** Clin Exp Allergy. 2017 Sep;47(9):1159-1169.
- BURMAN, J; ELENUS, V; LUKKARINEN, H; KUUSELA, T; MAKELA, MJ; KESTI, O; VAATAINEN, K; MAUNULA, M; REMES, S; JARTTI, T. **Cut-off values to evaluate exercise-induced asthma in eucapnic voluntary hyperventilation test for children.** Clin Physiol Funct Imaging. 2020 Sep;40(5):343-350.
- BUSSE, WW; LEMANSKE, RF; JR, Gern JE. **Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations.** Lancet. 2010;376(9743):826–834
- CAIT, A; HUGHES, MR; ANTIGNANO, F; CAIT, J; DIMITRIU, PA; MAAS, KR; REYNOLDS, LA; HACKER, L; MOHR, J; FINLAY, BB; ZAPH, C; MCNAGNY, KM, MOHN, WW. **Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids.** Mucosal Immunol. 2018 May;11(3):785-795.

CARDOSO, TA; RONCADA, C; SILVA, ER. **The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system.** J Bras Pneumol. 2017;43:163–8

CARRARO, S; GIORDANO, G; RENIERO, F; CARPI, D; STOCCHERO, M; STERK, PJ; BARALDI, E. **Asthma severity in childhood and metabolomic profiling of breath condensate.** Allergy. 2013 Jan;68(1):110-7.

CARRARO, S; REZZI, S; RENIERO, F; HÉBERGER, K; GIORDANO, G; ZANCONATO, S; GUILLOU, C; BARALDI, E. **Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma.** Am J Respir Crit Care Med. 2007 May 15;175(10):986-90.

CHANG-CHIEN, J; HUANG, HY; TSAI, HJ; LO, CJ; LIN, WC; TSENG, YL; WANG, SL; HO, HY; CHENG, ML, YAO, TC. **Metabolomic differences of exhaled breath condensate among children with and without asthma.** Pediatr Allergy Immunol. 2021 Feb;32(2):264-272.

CHECKLEY, W; DEZA, MP; KLAWITTER, J; ROMERO, KM; KLAWITTER, J; POLLARD, SL; WISE, RA; CHRISTIANS, U; HANSEL, NN. **Identifying biomarkers for asthma diagnosis using targeted metabolomics approaches.** Respir Med. 2016 Dec;121:59-66.

CHIBA, Y; SUTO, W; SAKAI, H. **Augmented Pla2g4c/Ptgs2/Hpgds axis in bronchial smooth muscle tissues of experimental asthma.** PLoS One. 2018 Aug 30;13(8):e0202623.

CHOWDHURY, NU; GUNTUR, VP; NEWCOMB, DC; WECHSLER, ME. **Sex and gender in asthma.** Eur Respir Rev. 2021 Nov 17;30(162):210067.

CHUNG, KF; DIXEY, P; ABUBAKAR-WAZIRI, H; BHAVSAR, P; PATEL, PH; GUO, S; JI, Y. **Characteristics, phenotypes, mechanisms and management of severe asthma.** Chin Med J (Engl). 2022 May 20;135(10):1141-1155.

CORREIA, Junior MAV; COSTA, EC; SARINHO, SW; RIZZO, JÂ; SARINHO, ESC. **Exercise-induced bronchospasm in a hot and dry region: study of asthmatic, rhinitistic and asymptomatic adolescents.** Expert Rev Respir Med. 2017 Dec;11(12):1013-1019.

CRAPO, RO; CASABURI, R; COATES, AL; ENRGHT, PL; HANKINSON, JL; IRVIN, CG; MACINTYRE, NR; MCKAY, RT; WANGER, JS; ANDERSON, SD; COCKCROFT, DW; FISH, JE; STERK, PJ. **Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999.** Am J Respir Crit Care Med. 2000 Jan;161(1):309-29.

CRESTANI, E; HARB, H; CHARBONNIER, LM; LEIRER, J; MOTSINGER-REIF, A; RACHID, R; PHIPATANAKUL, W; KAADDURAH-DAOUK, R; CHATILA, TA. **Untargeted metabolomic profiling identifies disease-specific signatures in food allergy and asthma.** *J Allergy Clin Immunol.* 2020 Mar;145(3):897-906.

DALLINGA, JW; ROBROEKS, CM; VAN BERKEL, JJ; MOONEM, EJ; GODSCHALK, RW; JOBSIS, Q; DOMPELING, E; WOUTERS, EF; VAN SCHOOTEN, FJ. **Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children.** *Clin Exp Allergy.* 2010 Jan;40(1):68-76.

DAVIS, MD; MONTPETIT, AJ. **Exhaled Breath Condensate: An Update.** *Immunol Allergy Clin North Am.* 2018 Nov;38(4):667-678.

DE AGUIAR, KB; ANZOLIN, M; ZHANG, L. **Global prevalence of exercise-induced bronchoconstriction in childhood: A meta-analysis.** *Pediatr Pulmonol.* 2018 Apr;53(4):412-425.

EVANS, TM; RUNDELL, KW; BECK, KC; LEVINE, AM; BAUMANN, JM. **Cold air inhalation does not affect the severity of EIB after exercise or eucapnic voluntary hyperventilation.** *Med Sci Sports Exerc.* 2005 Apr;37(4):544-9.

FERRARO, VA; CARRARO, S; PIRILLO, P; GUCCIARDI, A; POLONIATO, G; STOCCHERO, M; GIORDANO, G; ZANCONATO, S; BARALDIA, E. **Breathomics in Asthmatic Children Treated with Inhaled Corticosteroids.** *Metabolites.* 2020 Sep 29;10(10):390.

GANS, Md; GAVRILOVA, T. **Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes.** *Paediatr Respir Rev.* 2020 Nov;36:118-127.

GASRTON, B; SEARS, S; WOODS, J; HUNT, J; PONAMAM, M; MCMAHON, T; STAMLER, Js. **Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure.** *Lancet.* 1998 May 2;351(9112):1317-9.

GELFAND, EW. **Importance of the leukotriene B4-BLT1 and LTB4-BLT2 pathways in asthma.** *Semin Immunol.* 2017 Oct;33:44-51.

GEROW, M; BRUNER, PJ. **Exercise-Induced Asthma.** 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan

GHELLI, F; PANIZZOLO, M; GARZARO, G; SQUILLACIOTI, G; BELLISARIO, V; COLOMBI, N; BERGAMASCHI, E; GUSEVA, Canu I; BONO, R. **Inflammatory Biomarkers in Exhaled Breath Condensate: A Systematic Review**. Int J Mol Sci. 2022 Aug 29;23(17):9820. Disponível: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2023/07/GINA-2023-Full-report-23_07_06-WMS.pdf

GINA, Report. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**. Global Initiative for Asthma, 2023. Disponível: < https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2023/07/GINA-2023-Full-report-23_07_06-WMS.pdf >. Acesso em 05 de maio de 2023.

GREENWALD, R; FITZPATRICK, AM; GASTON, B; MAROZKINA, NV; ERZURUM, S; TEAGUE, WG. **Breath formate is a marker of airway S-nitrosothiol depletion in severe asthma**. PLoS One. 2010 Jul 30;5(7):e11919.

HABIB, N; PASHA, MA; TANG, DD. **Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers**. Cells. 2022 Sep 5;11(17):2764.

HAMILTON, D; LEHMAN, H. **Asthma Phenotypes as a Guide for Current and Future Biologic Therapies**. Clin Rev Allergy Immunol. 2020 Oct;59(2):160-174.

HIZAWA, N. **The understanding of asthma pathogenesis in the era of precision medicine**. Allergol Int. 2023 Jan;72(1):3-10.

HOLM, M; OMENAAS, E; GISLASON, T. **Remission of asthma: a prospective longitudinal study from northern Europe (RHINE study)**. Eur Respir J. 2007;30(1):62-65.

HORVÁTH, I. **A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease**. Eur Respir J. 2017 Apr 26;49(4):1600965.

HORVÁTH, I. **ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions**. Eur Respir J. 2005 Sep;26(3):523-48.

HOSTRUP, M; HANSEN, ES; RASMUSSEN, SM; JESSEM, S; BACKER, V. **Asthma and Exercise-Induced Bronchoconstriction in Athletes: Diagnosis, treatment, and anti-doping challenges**. Scand J Med Sci Sports. 2023 Mar 25.

IBRAHIM, B; BASANTA, M; CADDEN, P; SINGH, D; DOUCE, D; WOODCOCK, A; FOWLER, SJ. **Non-invasive phenotyping using exhaled volatile organic compounds in asthma**. Thorax. 2011 Sep;66(9):804-9.

JOHANSSON, H; NORLANDER, K; ALVING, K; HEDENSTROM, H; JANSON, C; MALINOVSKI, A; NORDANG, L; EMTNER, M. **Exercise test using dry air in random adolescents: Temporal profile and predictors of bronchoconstriction.** *Respirology*. 2016 Feb;21(2):289-96.

JOHNSON, CH; IVANISEVIC, J; SIUZDAK, G. **Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Jul;17(7):451-9.

KANAOKA, Y; BOYCE, JA. **Cysteinyl leukotrienes and their receptors; emerging concepts.** *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014 Jul;6(4):288-95.

KAUR, R; CHUPP, G. **Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine.** *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Jul;144(1):1-12.

KELLY, RS; DAHLIN, A; MCGEACHIE, MJ; QIU, W; SORDILLO, J; WAN, ES; WU, AC; LASKY-SU, J. **Asthma Metabolomics and the Potential for Integrative Omics in Research and the Clinic.** *Chest*. 2017 Feb;151(2):262-277.

KESKIN, O; ULUCA, U; KESKIN, M; GOGEBAKAN, B; KUCUKOSMANOGLU, E; OZKARS, MY; KUL, S; BAYRAM, H; COSKUN, Y. **The efficacy of single-high dose inhaled corticosteroid versus oral prednisone treatment on exhaled leukotriene and 8-isoprostane levels in mild to moderate asthmatic children with asthma exacerbation.** *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016 Mar-Apr;44(2):138-48.

KIERBIEDZ-GUZYK, N; SOZANSKA, B. **The Potential Role of Serum and Exhaled Breath Condensate miRNAs in Diagnosis and Predicting Exacerbations in Pediatric Asthma.** *Biomedicines*. 2023 Mar 2;11(3):763.

KIPPELEN, P; ANDERSON, SD; HALLSTRAND, TS. **Mechanisms and Biomarkers of Exercise-Induced Bronchoconstriction.** *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018 May;38(2):165-182.

KISS, H; ORLOS, Z; GELLÉRT, Á; MEGYESFALVI, Z; MIKÁCSÓ, A; SÁRKOZI, A; VASKÓ, A; MIKLÓS, Z; HORVÁTH, I. **Exhaled Biomarkers for Point-of-Care Diagnosis: Recent Advances and New Challenges in Breathomics.** *Micromachines (Basel)*. 2023 Feb 4;14(2):391.

KLAIN, A; INDOLFI, C; DINARDO, G; CONTIERI, M; DECIMO, F; MIRAGLIA, Del Giudice M. **Exercise-Induced Bronchoconstriction in Children.** *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jan 3;8:814976.

KOJIMA, N; OHYA, Y; FUTAMURA, M; AKASHI, M; ODAJIMA, H; ADACHI, Y; KOBAYASHI, F; AKASAWA, A. **Exercise-induced asthma is associated with impaired quality of life among children with asthma in Japan.** *Allergol Int*. 2009 Jun;58(2):187-92.

KOLMERT, J. **Urinary Leukotriene E4 and Prostaglandin D2 Metabolites Increase in Adult and Childhood Severe Asthma Characterized by Type 2 Inflammation.** A Clinical Observational Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Jan 1;203(1):37-53.

KOREVAAR, DA; DAMEN, JA; HEUS, P; MOEN, MJ; SPIJKER, R; VAN VEEN, IH; WEERSINK, EJ; VAN KEMENADE, GJ; VAN HAL, PTW; HOOFT, L. **Effectiveness of FeNO-guided treatment in adult asthma patients: A systematic review and meta-analysis.** *Clin Exp Allergy*. 2023 Jun 9.

KURUVILLA, ME; LEE, FE; LEE, GB. **Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease.** *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019 Apr;56(2):219-233.

LAI, Y; ALTEMEIER, WA; VANDREE, J; PILIPONSKY, AM; JONHSON, B; APPEL, CL; FREVERT, CW; HYDE, DM; ZIEGLER, SF; SMITH, DE; HENDERSON, WR Jr; GELB, MH; HALLSTRAND, TS. **Increased density of intraepithelial mast cells in patients with exercise-induced bronchoconstriction regulated through epithelially derived thymic stromal lymphopoietin and IL-33.** *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1448-55.

LAMMERS, N; VAN HOESEL, MHT; BRUSSE-KEIZER, MGJ; VAN DER PALEN, J; SKELINK-VISSER, R; DRIESSEN, JMM; THIO, BJ. **Can Pediatricians Assess Exercise-Induced Bronchoconstriction From Post-exercise Videos?** *Front Pediatr*. 2020 Jan 23;7:561.

LAMMERS, N; VAN HOESEL, MHT; KAMPHUIS, M; BRUSSE-KEIZER, M; VAN DER PALEN, J; VISSER, R; THIO, BJ; DRIESSEN, JMM. **Assessing Exercise-Induced Bronchoconstriction in Children; The Need for Testing.** *Front Pediatr*. 2019 Apr 26;7:157.

LEVY, ML; BACHARIER, LB; BATEMAN, E; BOULET, LP; BRIGHTLING, C; BUHL, R; BRUSSELLE, G; CRUZ, AA; DRAZEN, JM; DUIJTS, L; FLEMING, L; INOUE, H; KO, FWS; KRISHNAN, JA; MORTIMER, K; PITREZ, PM; SHEIKH, A; YORGANCIOGLU, A; REDDEL, HK. **Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update.** *NPJ Prim Care Respir Med*. 2023 Feb 8;33(1):7.

LOKONSKA, A; NOWAK-JUREK, A; GAJEWSKI, A; ANTEZAK-MARCZAK, M; FRACHOWICZ-GUERREIRO, K; WARDZYNSKA, A; CHALUBINSKI, M. **Mepolizumab therapy decreases epithelial-derived cytokine concentrations in exhaled breath condensates from patients with severe eosinophilic asthma.** *Clin Exp Allergy*. 2023 Apr 13.

LIN, LL; HUANG, SJ; OU, LS; YAO, TC; TSAO, KC; YEH, KW; HUANG, JL. **Exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma: An observational cohort study.** *J Microbiol Immunol Infect*. 2019 Jun;52(3):471-479.

LINARES, Segovia B; CORTÉS, Sandoval G; AMADOR, Licon N; GUÍZAR, Mendoza JM; NÚÑEZ, Lemus E; ROCHA, Amador DO; RAMÍREZ, Gómez XS; MONROY, Torres R. **Parameters of lung inflammation in asthmatic as compared to healthy children in a contaminated city.** *BMC Pulm Med*. 2014 Jul 8;14:111.

LUXON, BA. **Metabolomics in asthma.** *Adv Exp Med Biol*. 2014;795:207-20.

MANISCALCO, M; PARIS, D; MELCK, DJ; D'AMATO, M; ZEDDA, A; SOFIA, M; STELLATO, C; MOTTA, A. **Coexistence of obesity and asthma determines a distinct respiratory metabolic phenotype.** *J Allergy Clin Immunol*. 2017 May;139(5):1536-1547.e5.

MONTUSCHI, P. **LC/MS/MS analysis of leukotriene B4 and other eicosanoids in exhaled breath condensate for assessing lung inflammation.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 May 1;877(13):1272-80.

MOTOMURA, C; MATSUZAKI, H; ODAJIMA, H; OKI, T; YASUNARI, Y; KAWANO, T; IWATA, M; OKABE, K; WAKATSUKI, M; MURAKAMI, Y; TABA, N; HONJO, S; OHGA, S. **Effect of age on exercise-induced bronchoconstriction in children and adolescents with asthma.** *J Asthma*. 2022 Feb;59(2):297-305.

MOTTA, A; PARIS, D; D'AMATO, M; MELCK, D; CALABRESE, C; VITALE, C; STANZIOLA, AA; CORSO, G; SOFIA, M; MANISCALDO, M. **NMR metabolomic analysis of exhaled breath condensate of asthmatic patients at two different temperatures.** *J Proteome Res*. 2014 Dec 5;13(12):6107-20.

NAGANA, Gowda GA; RAFTERY, D. **NMR-Based Metabolomics.** *Adv Exp Med Biol*. 2021;1280:19-37.

NASCIMENTO, OA; CANÇADO, JED; GAZZOTTI, MR; DOS SANTOS, FM; SATURNINO, LTM; DA SILVA, DO; GOMES, ALBB; VIANA, KP; ALFONSO-CRISTANCHO, R;

RODRIGUES, CS. **The economic impact of asthma on private healthcare system in Brazil: Economic impact of asthma in Brazil.** *Medicine (Baltimore)*. 2023 Mar 24;102(12):e33077.

PAPAMICHAEL, MM; KATSARDIS, C; SARANDI, E; GEORGAKI, S; FRIMA, ES; VARVARIGOU, A; TSOUKALA, D. **Application of Metabolomics in Pediatric Asthma: Prediction, Diagnosis and Personalized Treatment.** *Metabolites*. 2021 Apr 18;11(4):251.

PARK, YH; FITZPATRICK, AM; MEDRIANO, CA; JONES, DP. **High-resolution metabolomics to identify urine biomarkers in corticosteroid-resistant asthmatic children.** *J Allergy Clin Immunol*. 2017 May;139(5):1518-1524.e4. doi

PARSONS, JP; HALLSTRAND, TS; MASTRONARDE, JG; KAMINSKY, DA; RUNDELL, KW; HULL, JH; STORMS, WW; WEILER, JM; CHEEK, FM; WILSON, KC; ANDERSON, SD; **American Thoracic Society Subcommittee on Exercise-induced Bronchoconstriction. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: exercise-induced bronchoconstriction.** *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 May 1;187(9):1016-27.

PATEL, SJ; TEACH, SJ. **Asthma.** *Pediatr Rev*. 2019 Nov;40(11):549-567.

PAVORD, ID; BEASLEY, R; AGUSTI, A; ANDERSON, GP; BEL, E; BRUSSELLE, G; CULLINAN, P; CUSTOVIC, A; DUCHARME, FM; FAHY, JV; FREY, U; GIBSON, P; HEANEY, LG; HOLT, PG; HUMBERT, M; LLOYD, CM; MARKS, G; MARTINEZ, FD; SLY, PD; VON MUTIUS, E; WENZEL, S; ZAR, HJ; BUSH, A. **After asthma: redefining airways diseases.** *Lancet*. 2018 Jan 27;391(10118):350-400.

PAVORD, ID; DENIZ, Y; CORREN, J; CASALE, TB; FITZGERALD, JM; IZUHARA, K; DAIZADEH, N; ORTIZ, B; JOHNSON, RR; HAREL, S; DJANDJI, M; GOGA, L; CRIKELAIR, N; ROWE, PJ; BUSSE, WW. **Baseline FeNO Independently Predicts the Dupilumab Response in Patients With Moderate-to-Severe Asthma.** *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023 Apr;11(4):1213-1220.e2.

PEEL, AM; WILKINSON, M; SINHA, A; LOKE, YK; FOWLER, SJ; WILSON, AM. **Volatile organic compounds associated with diagnosis and disease characteristics in asthma - A systematic review.** *Respir Med*. 2020 Aug;169:105984.

PITÉ, H; MORAIS-ALMEIDA, M; ROCHA, SM. **Metabolomics in asthma: where do we stand?** *Curr Opin Pulm Med*. 2018 Jan;24(1):94-103.

PLAZA, V; CRESPO, A; GINER, J; MERINO, JL; RAMOS-BARBÓN, D; MATEUS, EF; TORREGO, A; COSIO, BG; AGUSTÍ, A; SIBILA, O. **Inflammatory Asthma Phenotype Discrimination Using an Electronic Nose Breath Analyzer.** J Investig Allergol Clin Immunol. 2015;25(6):431-7.

POPOVIC-GRLE, S; ŠTAJDUHAR, A; LAMPALO, M; RNJAK, D. **Biomarkers in Different Asthma Phenotypes.** Genes (Basel). 2021 May 25;12(6):801.

PORPODIS, K; TSIROUPROU, I; APOSTOLOPOULOS, A; NTONTSI, P; FOUKA, E; PAPAOKOSTA, D; VLIAGOFTIS, H; DOMVRI, K. **Eosinophilic Asthma, Phenotypes-Endotypes and Current Biomarkers of Choice.** J Pers Med. 2022 Jun 30;12(7):1093.

POLOMSKA, J; BAR, K; SOZANSKA, B. **Exhaled Breath Condensate-A Non-Invasive Approach for Diagnostic Methods in Asthma.** J Clin Med. 2021 Jun 18;10(12):2697.

POLOMSKA J; SOZANSKA, B. **Metabolites of L-ARG in Exhaled Breath Condensate and Serum Are Not Biomarkers of Bronchial Asthma in Children.** J Clin Med. 2022 Jan 4;11(1):252.

PRICE, OJ; HULL, JH; BACKER, V; HOSTRUP, M; ANSKEY, L. **The impact of exercise-induced bronchoconstriction on athletic performance: a systematic review.** Sports Med. 2014 Dec;44(12):1749-61.

RACKEMANN, F.M. **A working classification of asthma.** Am J Med. 1947 Nov;3(5):601-6.

REYES-ANGEL, J; KAVIANY, P; RASTOGI, D; FORNO, E. **Obesity-related asthma in children and adolescents.** Lancet Child Adolesc Health. 2022 Oct;6(10):713-724.

RICCIARDOLO, FLM; GUIDA, G; BERTOLINI, F; DI STEFANO, A; CARRIERO, V. **Phenotype overlap in the natural history of asthma.** Eur Respir Rev. 2023 May 17;32(168):220201.

RIZZO, JÂ; RODRIGUES, Filho EA; GONÇALVES, AV; ALBUQUERQUE, LCBB; ALBUQUERQUE, EM; ALBUQUERQUE, CG; ALMEIRDA, AHS; PEIXOTO, DM; CORREIA, Junior MAV. **Reproducibility of eucapnic voluntary hyperpnoea for exercise-induced bronchoconstriction diagnosis in asthmatic children and adolescents.** Pediatr Allergy Immunol. 2021 Nov;32(8):1700-1708.

RODRIGUES, filho. **ESTRATÉGIA METABONÔMICA no CONDENSADO do AR EXALADO de ASMÁTICOS com e sem BRONCOESPASMO INDUZIDO por**

EXERCÍCIO. 2019. 122 páginas. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente - Centro de Ciências Médicas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

RODRIGUEZ, Bauza DE; SILVEYRA, P. **Asthma, atopy, and exercise: Sex differences in exercise-induced bronchoconstriction.** *Exp Biol Med* (Maywood). 2021 Jun;246(12):1400-1409.

RODUIT, C. PASTURE/EFRAIM study group. **High levels of butyrate and propionate in early life are associated with protection against atopy.** *Allergy*. 2019 Apr;74(4):799-809.

RON-HAREL, N; SANTOS, D; GHERGUROVICH, JM; SAGE, PT; REDDY, A; LOVITCH, SB; DEPHOURE, N; SATTERSTROM, FK; SHEFFER, M; SPINELLI, JB; GYGI, S; RABINOWITZ, JD; SHARPE, AH; HAIGIS, MC. **Mitochondrial Biogenesis and Proteome Remodeling Promote One-Carbon Metabolism for T Cell Activation.** *Cell Metab*. 2016 Jul 12;24(1):104-17.

ROSHAN, Lal T; CECHINEL, LR; FREISHTAT, R; RASTOGI, D. **Metabolic Contributions to Pathobiology of Asthma. Metabolites.** 2023 Jan 31;13(2):212.

ROWE, A; MAHOY, N; FLEMING, N; DONNE, B. **The effect of diurnal variation in exercise-induced bronchoconstriction.** *J Asthma*. 2020 Oct;57(10):1063-1070.

SCHLEICH,D; STEFANUTO, PH; BESSONOV, K; SMOLINSKA, A; DALLINGA, JW; HENKERT, M, PAULUS, V; GUISSARD, F; GRAFF, S; MOERMANS, C; WOUTERS, EFM; VAN Steen, K; VAN SCHOOTEN, FJ, FOCANT, JF; LOUIS, R. **Exhaled Volatile Organic Compounds Are Able to Discriminate between Neutrophilic and Eosinophilic Asthma.** *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Aug 15;200(4):444-453.

SCHOETTLER, N; STREK, ME. **Recent Advances in Severe Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine.** *Chest*. 2020 Mar;157(3):516-528.

SHARMA, A; KUMAR, R; VARADWAJ, P. **Smelling the Disease: Diagnostic Potential of Breath Analysis.** *Mol Diagn Ther*. 2023 May;27(3):321-347.

SINHA, A; DESIRAJU, K; AGGARWAL, K; KUTUM, R; ROY, S; LODHA, R; KABRA, SK; GHOSH, B; SETHI, T; AGRAWAL, A. **Exhaled breath condensate metabolome clusters for endotype discovery in asthma.** *J Transl Med*. 2017 Dec 22;15(1):262.

SINHA, A; KRISHNAN, V; SETHI, T; ROY, S; GHOSH, B; LODHA, R; KABRA, S; AGRAWAL, A. **Metabolomic signatures in nuclear magnetic resonance spectra of exhaled breath condensate identify asthma.** *Eur Respir J.* 2012 Feb;39(2):500-2.

SLY, RM; HEIMLICH, EM; BUSSER, RJ; STRICK, L. **Exercise-induced bronchospasm: effect of adrenergic or cholinergic blockade.** *J Allergy.* 1967 Aug;40(2):93-9.

SOLÉ, D; ROSÁRIO, Filho NA; SARINHO, ES; CAMELO-NUNES, IC; BARRETO, BA; MEDEIROS, ML; FRANCO, JM; CAMARGOS, PA; MALLOL, J; GURGEL, R; ANDRADE, DM; FURLAN, FP; SILVA, AR; CARDOZO, C; ANDRADE, C. **Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012).** *J Pediatr (Rio J).* 2015 Jan-Feb;91(1):30-5.

STERK, PJ. **Modern Inflammatory Phenotyping of Asthma. Breathomics Is Here to Stay.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2019 Aug 15;200(4):405-406.

TAHAN, F; EKE, GH; BICICI, E; SARAYMEN, B; AKAR, H H. **Increased Postexercise Lipoxin A4 Levels in Exhaled Breath Condensate in Asthmatic Children With Exercise-Induced Bronchoconstriction.** *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016;26(1):19-24.

THEILER, A; BARNTHALER, T; PLATZER, W; RICHTING, G; PEINHAUPT, M; RITTCHEM, S; KARGL, J; ULVEN, T; MARSH, LM; MARSCHE, G; SCHULIGOI, R; STURM, EM; HEINEMANN, A. **Butyrate ameliorates allergic airway inflammation by limiting eosinophil trafficking and survival.** *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Sep;144(3):764-776.

THOMSON, NC; POLOSA, R; SIN, DD. **Cigarette Smoking and Asthma.** *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022 Nov;10(11):2783-2797.

TRISCHLERT, J; MULLER, CM; KONITZER, S; PRELL, E; KORTEN, I; UNVERZAGT, S; LEX, C; **Elevated exhaled leukotriene B₄ in the small airway compartment in children with asthma.** *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015 Feb;114(2):111-6.

UENO, H; KOYA, T; TAKEUCHI, H; TSUKIOKA, K; SAITO, A; KIMURA, Y; HAYASHI, M; WATANABE, S; HASEGAWA, T; ARAKAWA, M; KIKUCHI, T. **Cysteinyl Leukotriene Synthesis via Phospholipase A2 Group IV Mediates Exercise-induced Bronchoconstriction and Airway Remodeling.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020 Jul;63(1):57-66.

VILLASENÖR, A; EGUILUZ-GRACIA, I; MOREIRA, A; WHEELLOCK CE, Escribese MM. **Metabolomics in the Identification of Biomarkers of Asthma.** *Metabolites.* 2021 May 29;11(6):346.

VON MUTIUS, E.; SMITS, H.H. **Primary Prevention of Asthma: From Risk and Protective Factors to Targeted Strategies for Prevention.** *Lancet.* 2020;396:854–866.

VOS, T.; ABAJOBIR, A.A.; ABATE, K.H.; ABBAFATI, C.; ABBAS, K.M.; ABD-ALLAH, F.; ABDULKADER, R.S.; ABDULLE. A.M.; ABEBO, T.A.; ABERA, S.F.; **Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 328 Diseases and Injuries for 195 Countries, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.** *Lancet.* 2017;390:1211–1259. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2.

WANG, C; JIANG, S; ZHANG, S; OUYANG, Z; WANG, G; WANG, F. **Research Progress of Metabolomics in Asthma.** *Metabolites.* 2021 Aug 24;11(9):567.

WIESENTHAL, EN; FAGNANO, M; COOK, S; HALTERMAN, JS. **Asthma and overweight/obese: double trouble for urban children.** *J Asthma.* 2016 Jun;53(5):485-91.

XEPAPADAKI, P; ADACHI, Y; POZO, Beltrán CF; EL-SAYED, ZA; GÓMEZ, RM; HOSSMY, E; FILIPOVIC, I; LE, Souef P; MORAIS-ALMEIDA, M; MILIGKOS, M; NIETO, A; PHIPATANAKUL, W; PITREZ, PM; WANG, JY; WONG, GWK; PAPADOPOULOS, NG. **Utility of biomarkers in the diagnosis and monitoring of asthmatic children.** *World Allergy Organ J.* 2022 Dec 15;16(1):100727.

XU, S; PANETTIERI, RA Jr; JUDE, J. **Metabolomics in asthma: A platform for discovery.** *Mol Aspects Med.* 2022 Jun;85:100990.

YIP, W; HUGHES,MR; LI, Y; CAIT,A; HIRST, M; MOHN, WW; MCNAGNY, KM. **Butyrate Shapes Immune Cell Fate and Function in Allergic Asthma.** *Front Immunol.* 2021 Feb 15;12:628453.

ZAMURUYEV, KO; BORRAS, E; PETTIT, DR; AKSENOV, AA, SIMMONS, JD; WEIMER, BC; SCHIVO, M; KENYON, NJ; DELPLANQUE, JP; DAVIS, CE. **Effect of temperature control on the metabolite content in exhaled breath condensate.** *Anal Chim Acta.* 2018 May 2;1006:49-60.

ZAR, HJ; FERKOL, TW. **The global burden of respiratory disease-impact on child health.** *Pediatr Pulmonol* 2014;49:430–4.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) você para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Metabonômica e dosagem de citocinas no condensado do ar exalado – estudo exploratório para avaliar diferenças entre indivíduos asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício**”. Esta pesquisa é da responsabilidade do pesquisador EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO (Profissional de Educação Física, Mestre em Ciências da Saúde), residente na Av . Presidente Kennedy, nº7995, Candeias, Jaboatão dos Guararapes/PE – CEP: 54440-480, telefones: (81)997484466, e-mail: edil.a.r.f@hotmail.com, estando sob a orientação do PROF. DR. JOSÉ ÂNGELO RIZZO (Médico Pneumologista), telefone: (81) 986994098, e-mail: jarizzo@hotlink.com.br

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que você tem o direito de retirar o consentimento e desistir da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O objetivo do estudo é analisar e comparar os elementos químicos presentes no condensado do ar expirado em adolescentes asmáticos após teste de provocação por hiperventilação voluntária eucápnica. Nesta pesquisa queremos comparar os componentes que existem no condensado da respiração, antes e depois dos testes respiratórios.

Depois de fazer sua espirometria (exame do sopro) de rotina solicitada pelo seu médico para avaliar se seus brônquios estão apertados serão feitas algumas perguntas sobre seu tratamento e se você teve gripe ou crise de asma nas últimas 4 semanas, em seguida você será convidado a participar da pesquisa e o que você irá fazer será explicado para você. Você só continuará na pesquisa se os seus brônquios não estiverem apertados, se não tiver tido crise ou gripe nas últimas 4 semanas, se não estiver em tratamento regular para sua asma e se estiver de acordo em participar.

No mesmo dia, depois de ler e tirar suas dúvidas com o pesquisador você deve assinar este termo concordando em participar da pesquisa (Lembre: você pode desistir de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para seu atendimento nos ambulatórios). Em seguida você irá responder a um questionário com 7 perguntas, depois fará um teste alérgico em que algumas gotinhas serão depositadas no seu braço e uma pequena picada com uma lanceta será feita na sua pele através das gotinhas (7 picadas). Estas picadinhas podem provocar alguma dor mas em geral não sai sangue. Depois disso, será tirado 10ml (1 colher das de sopa) de sangue de uma veia do seu braço para análise. A picada da agulha dói um pouco e às vezes fica arroxeadado no local da picada.

Estes exames são realizados na avaliação inicial de rotina de pacientes com asma mas, neste caso, fazem parte da pesquisa também.

Você deverá comparecer em um segundo dia ao serviço (combinado entre você e o pesquisador) para a realização do restante dos exames.

Neste segundo dia, em primeiro lugar você fará um exame respirando pela boca normalmente em um tubo durante 30 segundos para medir uma substância no ar que você expira, chamada Óxido Nítrico. Depois você irá novamente respirar pela boca em outro tubo, normalmente, durante 10 minutos para coletar a água que normalmente sai com sua respiração. Depois disso você irá fazer nova espirometria (exame do sopro) e sua participação vai continuar somente se seus brônquios não estiverem apertados. depois você realizará um teste chamado hiperventilação. Você irá respirar rápido, pela boca, ar que vem de um balão através de um bocal. O examinador irá estimular você a manter o ritmo durante 6 minutos. Neste teste o risco é que pode ocorrer sensação de aperto nos brônquios e de falta de ar. Você pode interromper ou pedir para parar a qualquer momento. Se for detectado que você está com os brônquios apertados e isso estiver lhe causando desconforto, isto pode ser interrompido com a aplicação de uma medicação que atua rapidamente. Depois desse teste, você irá realizar novamente o passo de respirar em um tubo durante 10 minutos para colher a água de sua respiração.

Os participantes terão de comparecer ao ambulatório de espirometria em dois dias diferentes e os resultados em forma de relatório serão entregues para levar para o médico assistente que tomará as medidas que julgar necessárias para melhor tratar você.

As informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em reuniões ou revistas científicas, não havendo identificação dos voluntários, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo de computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Você não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo pesquisa “**Metabonômica e dosagem de citocinas no condensado do ar exalado – estudo exploratório para avaliar diferenças entre indivíduos asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício**”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Impressão digital
(opcional)

Local e data _____

Assinatura do Participante _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) {ou participante que está sob sua responsabilidade} para participar como voluntário (a) da pesquisa **“Metabonômica e dosagem de citocinas no condensado do ar exalado – estudo exploratório para avaliar diferenças entre indivíduos asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício.”**. Esta pesquisa é da responsabilidade do pesquisador EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO (Profissional de Educação Física, Mestre em Ciências da Saúde), residente na Av . Presidente Kennedy, nº7995, Candeias, Jaboatão dos Guararapes/PE – CEP: 54440-480, telefones: (8197484466, e-mail: edil.a.r.f@hotmail.com, estando sob a orientação do PROF. DR. JOSÉ ÂNGELO RIZZO (Médico Pneumologista), telefone: (81) 86994098, e-mail: jarizzo@hotmail.com.br

Este documento se chama Termo de Consentimento e pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe solicitando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido(a) sobre tudo que será feito. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que o (a) menor faça parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, nem o (a) Sr.(a) nem o/a voluntário/a que está sob sua responsabilidade serão penalizados (as) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da participação do (a) menor a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O objetivo do estudo é analisar e comparar os elementos químicos presentes no condensado do ar expirado em adolescentes asmáticos após teste de provocação por hiperventilação voluntária eucápnica. Nesta pesquisa queremos comparar os componentes que existem no condensado da respiração, antes e depois dos testes respiratórios.

Depois de fazer a espirometria (exame do sopro) de rotina solicitada pelo médico para avaliar se os brônquios estão apertados serão feitas algumas perguntas ao seu filho (a), sobre o tratamento e se teve gripe ou crise de asma nas últimas 4 semanas, em seguida ele será convidado a participar da pesquisa e o que ele irá fazer será explicado para ambos. Ele só continuará na pesquisa se os seus brônquios não estiverem apertados, se não tiver tido crise ou gripe nas últimas 4 semanas, se não estiver em tratamento regular para sua asma e se estiver de acordo em participar.

No mesmo dia, depois de ler e tirar suas dúvidas com o pesquisador você deve assinar este termo concordando na participação do seu filho(a) na pesquisa (Lembre: você pode desistir de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para seu filho (a) no atendimento nos ambulatórios). Em seguida ele irá responder a um questionário com 7 perguntas, depois fará um teste alérgico em que algumas gotinhas serão depositadas em seu braço e uma pequena picada com uma lanceta será feita na sua pele através das gotinhas (7 picadas). Estas picadinhas podem provocar alguma dor mas em geral não sai sangue. Depois disso, será tirado 10ml (1 colher das de sopa) de sangue de uma veia do seu braço para análise. A picada da agulha dói um pouco e às vezes fica arroxeadado no local da picada.

Estes exames são realizados na avaliação inicial de rotina de pacientes com asma mas, neste caso, fazem parte da pesquisa também.

Ele deverá comparecer em um segundo dia ao serviço (combinado entre você e o pesquisador) para a realização do restante dos exames.

Neste segundo dia, em primeiro lugar ele fará um exame respirando pela boca normalmente em um tubo durante 30 segundos para medir uma substância no ar que você expira, chamada Óxido Nítrico. Depois ele irá novamente respirar pela boca em outro tubo, normalmente, durante 10 minutos para coletar a água que normalmente sai com sua respiração. Depois disso ele irá fazer nova espirometria (exame do sopro) e sua participação vai continuar somente se seus brônquios não estiverem apertados. Depois ele realizará um teste chamado hiperventilação. Ele irá respirar rápido, pela boca, ar que vem de um balão através de um bocal. O examinador irá estimular ele para manter o ritmo durante 6 minutos. Neste teste o risco é que pode ocorrer sensação de aperto nos brônquios e de falta de ar. Ele pode interromper ou pedir para parar a qualquer momento. Se for detectado que você está com os brônquios apertados e isso estiver causando desconforto, isto pode ser interrompido com a aplicação de uma medicação que atua rapidamente. Depois desse teste, ele irá realizar novamente o passo de respirar em um tubo durante 10 minutos para colher a água de sua respiração.

Os participantes terão de comparecer ao ambulatório de espirometria em dois dias diferentes e os resultados em forma de relatório serão entregues para levar para o médico assistente que tomará as medidas que julgar necessárias para melhor tratar você.

As informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em reuniões ou revistas científicas, não havendo identificação dos voluntários, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo de computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Você não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a participação do seu/sua filho(a) {ou participante que está sob sua responsabilidade} serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, autorizo o meu/minha filho(a) {ou participante que está sob sua responsabilidade} a participar do estudo pesquisa “**Metabonômica e dosagem de citocinas no condensado do ar exalado – estudo exploratório para avaliar diferenças entre indivíduos asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício**”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação do meu/minha filho(a) {ou participante que está sob sua responsabilidade}. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Impressão digital
(opcional)

Local e data _____

Assinatura do Participante _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE C - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 07 A 18 ANOS - Resolução 466/12)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 07 A 18 ANOS - Resolução 466/12)**

OBS: Este Termo de Assentimento do menor de 07 a 18 anos não elimina a necessidade da elaboração de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.

Convidamos você, após autorização dos seus pais [ou dos responsáveis legais] para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Metabonômica e dosagem de citocinas no condensado do ar exalado – estudo exploratório para avaliar diferenças entre indivíduos asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício.**”. Esta pesquisa é da responsabilidade do pesquisador EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO (Profissional de Educação Física, Mestre em Ciências da Saúde), residente na Av . Presidente Kennedy, nº7995, Candeias, Jaboatão dos Guararapes/PE – CEP: 54440-480, telefones: (8197484466, e-mail: edil.a.r.f@hotmail.com, estando sob a orientação do PROF. DR. JOSÉ ÂNGELO RIZZO (Médico Pneumologista), telefone: (81) 86994098, e-mail: jarizzo@hotmail.com.br

Este documento se chama Termo de Assentimento e pode conter algumas palavras que você não entenda. Se tiver alguma dúvida, pode perguntar à pessoa a quem está lhe entrevistando, para compreender tudo o que vai acontecer. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. Após ler as informações a seguir, caso aceite participar do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema se desistir, é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O objetivo do estudo é analisar e comparar os elementos químicos presentes no condensado do ar expirado em adolescentes asmáticos após teste de provocação por hiperventilação voluntária eucápnica. Nesta pesquisa queremos comparar os componentes que existem no condensado da respiração, antes e depois dos testes respiratórios.

Depois de fazer sua espirometria (exame do sopro) de rotina solicitada pelo seu médico para avaliar se seus brônquios estão apertados serão feitas algumas perguntas sobre seu tratamento e se você teve gripe ou crise de asma nas últimas 4 semanas, em seguida você será convidado a participar da pesquisa e o que você irá fazer será explicado para você. Você só continuará na pesquisa se os seus brônquios não estiverem apertados, se não tiver tido crise ou gripe nas últimas 4 semanas, se não estiver em tratamento regular para sua asma e se estiver de acordo em participar.

No mesmo dia, depois de ler e tirar suas dúvidas com o pesquisador você deve assinar este termo concordando em participar da pesquisa (Lembre: você pode desistir de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para seu atendimento nos ambulatórios). Em seguida você irá responder a um questionário com 7 perguntas, depois fará um teste alérgico em que algumas gotinhas serão depositadas no seu braço e uma pequena picada com uma lanceta será feita na sua pele através das gotinhas (7 picadas). Estas picadinhas podem provocar alguma dor mas em geral não sai sangue. Depois disso, será tirado 10ml (1 colher das de sopa) de sangue de uma veia do seu braço para análise. A picada da agulha dói um pouco e às vezes fica arroxeadado no local da picada.

Estes exames são realizados na avaliação inicial de rotina de pacientes com asma mas, neste caso, fazem parte da pesquisa também.

Você deverá comparecer em um segundo dia ao serviço (combinado entre você e o pesquisador) para a realização do restante dos exames.

Neste segundo dia, em primeiro lugar você fará um exame respirando pela boca normalmente em um tubo durante 30 segundos para medir uma substância no ar que você expira, chamada Óxido Nítrico. Depois você irá novamente respirar pela boca em outro tubo, normalmente, durante 10 minutos para coletar a água que normalmente sai com sua respiração. Depois disso você irá fazer nova espirometria (exame do sopro) e sua participação vai continuar somente se seus brônquios não estiverem apertados. depois você realizará um teste chamado hiperventilação. Você irá respirar rápido, pela boca, ar que vem de um balão através de um bocal. O examinador irá estimular você a manter o ritmo durante 6 minutos. Neste teste o risco é que pode ocorrer sensação de aperto nos brônquios e de falta de ar. Você pode interromper ou pedir para parar a qualquer momento. Se for detectado que você está com os brônquios apertados e isso estiver lhe causando desconforto, isto pode ser interrompido com a aplicação de uma medicação que atua rapidamente. Depois desse teste, você irá realizar novamente o passo de respirar em um tubo durante 10 minutos para colher a água de sua respiração.

Os participantes terão de comparecer ao ambulatório de espirometria em dois dias diferentes e os resultados em forma de relatório serão entregues para levar para o médico assistente que tomará as medidas que julgar necessárias para melhor tratar você.

As informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em reuniões ou revistas científicas, não havendo identificação dos voluntários, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo de computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Você não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo pesquisa **“Metabonômica e dosagem de citocinas no condensado do ar exalado – estudo exploratório para avaliar diferenças entre indivíduos asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício”**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Impressão digital
(opcional)

Local e data _____

Assinatura do Participante _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE D – PLANILHA DE TABULAÇÃO

DIA 01 – data:							
NOME:					N _o (Programa)		
Data Nasc:			N ^o Pesquisa		Prontuário		
IDADE (anos):		PESO (kg):		Altura (cm):		IgE TOTAL	HEMOGRAMA
ESPIROMETRIA							Hb _____
VEF ₁ basal		% pred		VEF ₁ pós BD			% pred
							Ht _____
							Pqt _____
							Eos _____
							Neut _____
PRICK TEST (mm)							
D. Pteronyssinus.		B tropicalis		D. Farinae		Fungos do ar (Alternaria SP, Cladosporium SP e Aspergillus SP)	
Controle negativo (sol. Salina isotônica)				Controle positivo (Histamina 1mg/ml)		Epitélios de gato	Epitélios de cão
RESULTADO ACT				MEDICAMENTOS EM USO			
Avaliação de sintomas respiratórios aos exercícios							
1º: Você já sentiu algum desconforto respiratório ao praticar exercícios?				2º: Na prática de jogos, brincadeiras ou esportes, você ou sente algum desconforto ao respirar (falta de ar, tosse, dispneia, dor no peito, chiado no peito)?			
SIM		NÃO		SIM		NÃO	

TESTE DE HIPERVENTILAÇÃO VOLUNTÁRIA EUCÁPNICA (dia 1) DIA 02 - DATA:											
FeNO Pré			FeNO Pós – 5'			FeNO Pós – 15'			FeNO Pós – 30'		
1-			1-			1-			1-		
2-			2-			2-			2-		
3			3-			3-			3-		
VENTILAÇÃO TOT. COND.		°C ₁ :		UR ₁		VVM alvo (21x VEF ₁)					
						Temp.Cond.					
VVm	1'-	2'-	3'-	4'-	5'-	6'-					
FUNÇÃO PULMONAR ANTES E DEPOIS DO TESTE (dia 2)											
	Basal (l/seg)	%Pred	5'	%	10'	%	15'	%	30'	%	Pós BD / %
VEF ₁											
VOLUME TOTAL CONDENSADO PRÉ:											
VOLUME TOTAL CONDENSADO PÓS:											
FeNO AMBIENTE:											
TESTE DE HIPERVENTILAÇÃO VOLUNTÁRIA EUCÁPNICA (dia 2) DIA 03 – DATA:											
°C ₂ :		UR ₂		VVM alvo (21x VEF ₁)							
VVmin	1'-	2'-	3'-	4'-	5'-	6'-					

APÊNDICE E – PATENTE EQUIPAMENTO PARA COLETA DO CONDENSADO DO AR

01/08/2023, 15:55

SIPAC - Sistema Integrado de Patrimônio, Administração e Contratos

UFPE - SIPAC - Sistema Integrado de Patrimônio, Administração e Contratos

Ajuda?

Tempo de Sessão: 01:30

--- MUDAR DE SISTEMA ▾

JOSE ANGELO RIZZO

Orçamento: 2023

DIRETORIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS - ... (11.00.05.01)

SIST. DE PROTOCOLOS > CADASTRAR PROCESSO > COMPROVANTE

- Processo cadastrado com sucesso.



DADOS GERAIS DO PROCESSO

Nº Protocolo: 23076.073092/2023-39

Origem do Processo: Interno

Usuário de Autuação: JOSE ANGELO RIZZO

Data de Cadastro: 01/08/2023

Tipo do Processo: REGISTRO DE PATENTE

Assunto do Processo: 251 - REGISTRO DA PROPRIEDADE INTELECTUAL

Assunto Detalhado: O EQUIPAMENTO PARA CONDENSACÃO DO AR EXALADO FOI PROJETADO VISANDO A UTILIZAÇÃO DESSE MATERIAL PARA ESTUDOS A NÍVEL MOLECULAR DE ACOMETIMENTOS DO TRATO RESPIRATÓRIO. TRATA-SE DE UM SISTEMA ONDE O PACIENTE, COM NARIZ PINÇADO, REALIZA A RESPIRAÇÃO BASAL ATRAVÉS DE BOCAL ESTÉRIL E DESCARTÁVEL, ACOPLADO A UMA VÁLVULA UNIDIRECIONAL PERMITINDO QUE INSPIRE AR AMBIENTE E EXPIRE PARA UM TUBO FLEXÍVEL. ESSE TUBO PENETRA EM RECIPIENTE TÉRMICO POSSIBILITANDO UMA MAIOR ÁREA DE CONTATO DO TUBO COM A SOLUÇÃO CONTENDO ÁGUA COM GELO, ÁLCOOL E CLORETO DE SÓDIO PARA MANTER A TEMPERATURA DO BANHO PRÓXIMA A 10 GRAUS CELSIUS NEGATIVO.

Natureza do processo: OSTENSIVO

Unidade de Origem: DIRETORIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS - CCM (11.00.05.01)

Observação: ---

Situação: ATIVO

Visualizar Documento Visualizar Informações Gerais

DOCUMENTOS INSERIDOS NO PROCESSO

Ordem	Tipo de Documento	Data de Documento	Origem	Natureza		
1	OFICIO	01/08/2023	DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
2	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
3	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		

https://sipac.ufpe.br/sipac/protocolo/processo/cadastro/cadastro_4.jsf

01/08/2023, 15:55

SIPAC - Sistema Integrado de Patrimônio, Administração e Contratos

Ordem	Tipo de Documento	Data de Documento	Origem	Natureza		
4	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
5	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
6	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
7	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
8	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
9	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
10	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		
11	DOCUMENTO EXTERNO		DIRETORIA DO CENTRO DE CIENCIAS MEDICAS - CCM (11.00.05.01)	RESTRITO		

INTERESSADOS DESTE PROCESSO

Identificador	Nome	E-mail	Tipo
20183020922	CLAUDIO GONCALVES DE ALBUQUERQUE	ftclaudioalbuquerque@gmail.com	Aluno Pós-Graduação

MOVIMENTAÇÕES DO PROCESSO

Unidade Destino	Enviado Em	Enviado Por	Recebido Em	Recebido Por	Tempo Esperado	Urgente
DIRETORIA DE INOVAÇÃO E EMPREENDEDORISMO - PROPESQI (11.00.14)	01/08/2023 15:53	jarizzo	---	---	---	Não

[Cadastrar Novo Processo](#)

[Protocolo](#)

SIPAC | Superintendência de Tecnologia da Informação (STI-UFPE) - (81) 2126-7777 | Copyright © 2005-2023 - UFRN - sipac03.ufpe.br/sipac03 - v5.11.20.109

https://sipac.ufpe.br/sipac/protocolo/processo/cadastro/cadastro_4.jsf

APÊNDICE F – ARTIGO ORIGINAL DA TESE

ANÁLISE METABONÔMICA DO CONDENSADO DO AR EXALADO ANTES E APÓS BRONCOPROVOCAÇÃO POR HIPERVENTILAÇÃO VOLUNTÁRIA EUCÁPNICA EM ADOLESCENTES ASMÁTICOS.**RESUMO**

Introdução: Este estudo objetivou analisar, por meio da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), os metabólitos no condensado do ar exalado (CAE) de adolescentes asmáticos, antes e após broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica (HVE). **Métodos:** A pesquisa, transversal e exploratória, recrutou 44 adolescentes diagnosticados com asma, de 10 a 20 anos, divididos em dois grupos: asmáticos com BIE (BIE +) e asmáticos sem BIE (BIE -). As amostras de biofluido foram submetidas à análise metabonômica por RMN ^1H . **Resultados:** Observamos perfis metabonômicos distintos entre os grupos BIE + e BIE - antes da HVE, com acurácia de 82,7%, sensibilidade de 82,1%, especificidade de 83,3%, valor preditivo positivo (VPP) de 83,72% e valor preditivo negativo (VPN) de 82,22%. No subgrupo BIE +, a análise de regressão multivariada da discriminante ortogonal por mínimos quadrados (OPLS-DA) destacou a separação entre metabólitos do CAE antes e após a HVE ($p < 0,05$). Não houve alterações nos metabólitos do CAE após a broncoprovocação no grupo BIE -. Além disso, observou-se maior intensidade do pico de sinal em RMN ^1H a 1,92 ppm, relacionado ao acetato, nos adolescentes com BIE. **Conclusão:** Houve uma discriminação no perfil de metabólitos do CAE entre os grupos asmáticos com e sem BIE antes da HVE. Apenas os asmáticos com BIE apresentaram mudanças significativas nos metabólitos do CAE após a broncoprovocação. O metabólito acetato, em maior intensidade nos com BIE, sugere uma via metabólica relacionada à resposta asmática ao exercício.

PALAVRAS-CHAVE: Asma; Broncoespasmo Induzido por Exercício; Condensado do Ar Exalado; Metabolômica.

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por hiperresponsividade brônquica, obstrução das vias aéreas e sintomas respiratórios recorrentes como dispneia, sibilância, tosse e aperto no peito. Sua patogênese envolve uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, que desencadeiam uma resposta inflamatória mediada por células e compostos como citocinas, quimiocinas e prostaglandinas. (GINA, 2023; KURUVILLA, 2019; PAVORD, 2018).

Trata-se de uma afecção respiratória que pode variar em gravidade e frequência dos sintomas, desde formas leves e esporádicas até casos graves e persistentes. Assim, caracteriza-se por ser heterogênea, apresentando diversos fenótipos nos quais podemos distinguir grupos de pacientes com características clínicas e fisiológicas semelhantes. A medicina de precisão busca direcionar o tratamento de acordo com o fenótipo específico do paciente, possibilitando uma abordagem mais personalizada e eficaz. (SCHOETTLER N, 2020; PAVORD, 2018)

Uma análise direcionada aos componentes da inflamação das vias aéreas pode contribuir para uma melhor compreensão dos fenótipos da asma, porém essa avaliação é desafiadora devido à dificuldade de realizar testes funcionais e coletar amostras biológicas invasivas, como o lavado broncoalveolar (BAL) e a biópsia brônquica. Além disso, os marcadores séricos podem não refletir adequadamente a inflamação local das vias aéreas. O condensado do ar exalado (CAE) tem sido discutido como uma ferramenta de obtenção relativamente fácil, não invasiva e acessível para a coleta de uma ampla variedade de componentes do fluido de revestimento das vias aéreas. (PORPODIS, 2022; POŁOMSKA, 2021)

A obtenção segura e fácil do CAE tem despertado grande atenção (KIERBIEDŹ-GUZIŁ e SOZAŃSKA, 2023; LIKOŃSKA, 2023; POŁOMSKA e SOZAŃSKA, 2022; TAHAN, 2016;). Isso se deve ao desenvolvimento de técnicas sensíveis que permitem avaliar mínimas quantidades de biomarcadores provenientes do sistema respiratório, como citocinas, quimiocinas, metabólitos, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, microRNAs e L-arginina, entre outras moléculas. (KIERBIEDŹ-GUZIŁ e SOZAŃSKA, 2023; LIKOŃSKA, 2023; POŁOMSKA e SOZAŃSKA, 2022; TAHAN, 2016; STELMACH, 2016; BARRETO, ZAMBARDI, VILLA, 2015; NOBAKHT, 2015; THOMAS, 2013). A análise dessas substâncias pode desempenhar um papel crucial na compreensão dos mecanismos que envolvem os diferentes fenótipos da asma, como o broncoespasmo induzido por exercício (BIE), presente em cerca de 50% das crianças (DE AGUIAR, 2018; SILVA FILHO, 2015; CORREIA JUNIOR, 2012)

O BIE é definido como um estreitamento transitório das vias aéreas inferiores associado ao exercício (KLAIN, 2021). Durante o exercício físico, ocorre um aumento da ventilação pulmonar e,

consequentemente, do fluxo de ar nas vias aéreas, levando a uma maior perda de água por evaporação na superfície das vias respiratórias (ANDERSON, DAVISKAS, 2000). Isso resulta em aumento da osmolaridade do fluido periciliar da mucosa, liberação de mediadores como leucotrienos, histamina e prostaglandinas que causam contração dos músculos lisos dos brônquios, maior produção de muco, aumento da permeabilidade microvascular e ativação dos nervos sensoriais, resultando em broncoconstrição e edema das vias aéreas. Além disso, fatores neurológicos também desempenham um papel na fisiopatologia do BIE, como a ativação direta de nervos sensoriais pelos estímulos osmóticos e a influência das prostaglandinas na sua ativação. (KLAIN, 2021; ANDERSON, DAVISKAS, 2000; PARSONS, 2013).

Apesar de haver conhecimento sobre o mecanismo do BIE (RIZZO et al. 2021; BHATIA, ABU-HASAN e WEINBERGER, 2019; ANDERSON, 2010), não há clareza sobre as vias metabólicas envolvidas na sua fisiopatologia ou sobre as alterações dos metabólitos presentes nas vias aéreas dos asmáticos durante o exercício. (KLAIN, 2021; DE AGUIAR, 2018; PARSONS, 2013; SUBBARAO, 2006; PEDERSEN, 1995).

Dada a importância da investigação dos mecanismos do BIE e em busca das respostas a esses questionamentos, estudos dos metabólitos através das substâncias presentes nas vias aéreas podem contribuir para elucidar as lacunas que persistem. A metabonomica é uma abordagem analítica de alto rendimento que busca a compreensão abrangente do perfil metabólico em material biológico obtido de um organismo em seu estado natural ou em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos. Envolve a identificação e quantificação de pequenas moléculas (metabólitos) presentes em fluidos biológicos, como o CAE, utilizando técnicas analíticas avançadas, como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Em pacientes asmáticos, essa abordagem tem fornecido informações valiosas sobre a função metabólica e modificações bioquímicas nesse material (KISS, 2023; FERRARO, 2020; STERK, 2019)

Carraro(2013) utilizaram a análise da metabolômica do condensado do ar exalado para distinguir diferentes fenótipos da asma em crianças. Foram analisadas 42 crianças asmáticas, divididas em grupos de asma não grave e asma grave, além de um grupo de controle saudável. A análise dos metabólitos presentes no condensado permitiu uma distinção clara entre os grupos, incluindo a identificação precisa do fenótipo de asma grave. Compostos como ácido retinóico, adenosina e vitamina D foram importantes nessa distinção.

Utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear para analisar amostras de CAE em pacientes com asma e voluntários sem afecções respiratórias, Ibrahim (2013) desenvolveu um modelo de classificação que permitiu distinguir os indivíduos asmáticos dos controles saudáveis, com uma precisão de 84%. O modelo foi validado externamente, com uma precisão de 91%. Além

disso, foram explorados modelos para identificar subgrupos de asmáticos com base na eosinofilia e neutrofilia no escarro, controle da asma e uso de corticosteróides inalados.

É conhecido que a análise metabonômica do CAE em asmáticos se apresenta diferente dos não asmáticos (MOTTA, 2014; SINHA, 2012; CARRARO, 2007), no entanto não se sabe qual comportamento dos metabólitos presentes no CAE de adolescentes asmáticos que apresentam BIE durante a hiperventilação. Portanto, o objetivo desta pesquisa é analisar o perfil de metabólitos encontrados no condensado do ar exalado obtido antes e após o teste de broncoprovocação por HVE de adolescentes asmáticos com e sem resposta compatível com o diagnóstico de BIE.

MÉTODO

Foi realizado um estudo transversal e exploratório no laboratório de Função Pulmonar localizado no serviço de pneumologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os pais e responsáveis, assim como os participantes da pesquisa, assinaram o termo de consentimento de acordo com a regulação vigente no país.

Foram incluídos no estudo os adolescentes com idade entre 10 e 20 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de asma, criados a partir da demanda espontânea do próprio hospital, sem tratamento regular para a asma nas últimas 4 semanas que antecederam a realização dos testes. Foram excluídos os pacientes em tratamento para controle da asma, assim como aqueles com histórico de exacerbação de asma ou sintomas de infecção aguda de vias aéreas nas últimas 4 semanas que antecederam a realização dos testes. Os participantes com VEF₁ basal menor que 60% do valor teórico previsto, incapazes de realizar as manobras necessárias para a espirometria, a hiperventilação voluntária eucápnica ou coleta do condensado do ar exalado também foram excluídos.

Foram registrados dados relacionados à idade, altura e peso, além de informações sobre os sintomas respiratórios apresentados nas quatro semanas antecedentes à avaliação. Após a avaliação antropométrica, foi realizado o teste espirométrico com resposta ao broncodilatador e, encerradas as avaliações do primeiro dia de coleta de dados, os participantes foram convidados para retornar ao serviço com 48h de intervalo para realizar o teste de broncoprovocação e coleta do CAE.

A segunda avaliação foi realizada a coleta do CAE, durante 15 minutos, através do dispositivo criado e validado em nosso laboratório e solicitado patentes junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Logo em seguida foi avaliado o VEF₁ basal e realizado o teste de broncoprovocação por HVE por seis minutos, as medidas espirométricas do VEF₁ foram repetidas após cinco, 10, 15 e 30 minutos do teste.

Para comparar o estado metabonômico no fluído das vias aéreas dos adolescentes após as manobras de broncoprovocação, uma nova coleta do CAE foi realizada durante o intervalo das avaliações do VEF₁ entre 15 e 30 minutos.

O biofluido coletado foi armazenado no eppendorf de 1,5 ml e imediatamente transportado, num recipiente preenchido com gelo e isolado termicamente, para ser congelado e acondicionado a -80°C em freezer e posteriormente foram realizadas as análises metabonômicas.

Durante o protocolo de pesquisa, as condições ambientais no laboratório climatizado foram mantidas a uma temperatura média de $25,3 \pm 1,56^{\circ}\text{C}$ e uma umidade relativa do ar de $55,1 \pm 3,3\%$.

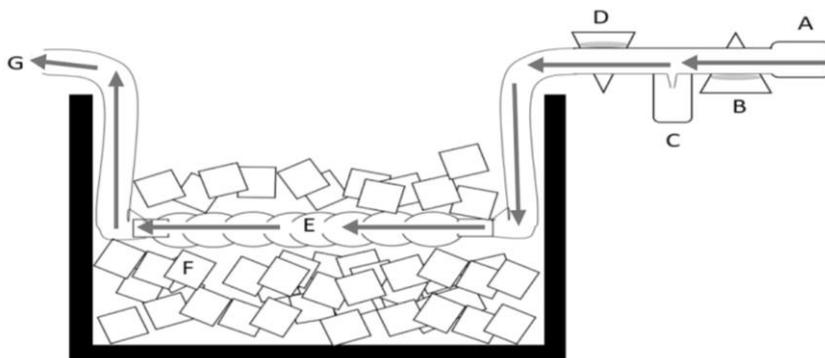
Medidas Antropométricas e Idade

O peso e a altura foram medidos em quilogramas e centímetros, respectivamente, utilizando balanças e estadiômetros calibrados (modelo Welmy W 200, fabricados em Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo - Brasil). A idade foi determinada em anos, com arredondamento para o ano seguinte quando os meses ultrapassaram o segundo semestre do ano anterior.

Coleta do condensado do ar exalado (CAE)

O condensado do ar exalado foi coletado através de um protótipo de dispositivo de condensação, que foi construído em nosso laboratório, conforme indicado no diagrama e nas fotos (Figura 01).

Figura 01 - Diagrama do equipamento para coleta do condensado do ar exalado.



A: Tubo flexível silicone; B: Válvula unidirecional; C: Bocal para a respiração; D: Válvula unidirecional;
E: Tubo submerso na mistura de água e gelo; F: Gelo; G: Saída do ar pelo tudo de silicone.

Durante a coleta do CAE, o paciente, com o nariz pinçado, realizou a respiração com ritmo basal através de um bocal estéril e descartável, conectado a uma válvula unidirecional que permitia a inspiração de ar ambiente e a expiração para um tubo flexível de silicone atóxico, foi permitido interromper para deglutir ou expectorar a saliva, se necessário. O tubo flexível de silicone é submerso em um recipiente térmico que proporciona uma área maior de contato do tubo com uma solução contendo água e gelo, mantendo a temperatura próxima de zero grau Celsius. Esse resfriamento faz com que o líquido presente no ar exalado condense quando ao entrar em contato com as paredes resfriadas do tubo e, assim, permitindo sua coleta e armazenamento no eppendorf. A coleta do condensado foi realizada em dois momentos: imediatamente antes do teste de broncoprovocação (pré HVE) e quinze minutos após o teste (pós HVE). As amostras foram transportadas em recipientes com isolamento térmico e armazenadas a -80 graus Celsius no Departamento de Química Fundamental até o momento da análise metabonômica.

Este equipamento foi validado através das análises metabonômicas no CAE de sete (07) indivíduos sem asma e sem histórico clínico de sintomas respiratórios relacionados à prática de atividades físicas, e os resultados foram comparados com os indivíduos asmáticos. Foi possível distinguir esses dois grupos através do modelo metabonômico, em concordância com achados da literatura.

O processo de limpeza dos componentes dos dispositivos também foi padronizado e, para verificar uma possível interferência nos resultados, realizamos análises metabonômicas de 10 amostras de 5ml água destilada que foram coletadas nos tubos de silicone após o processo de higienização. Não verificamos resíduos no perfil metabonômico nos espectros obtidos pela RMN ^1H nessas amostras.

Medida do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁)

O valor do VEF₁ foi obtido por meio da espirometria e expresso em litros por segundo. Utilizamos o espirômetro MicroQuark (COSMED, Roma, Itália), que foi calibrado diariamente. A temperatura e umidade do ar no local do teste foram registradas com um termo-higrômetro. Os valores previstos para a referência foram os propostos por Pereira (PEREIRA, 2002).

Os pacientes receberam instruções para realizar uma inspiração rápida e completa até atingirem a capacidade pulmonar total, seguida de uma expiração no bocal do espirômetro da forma mais rápida e completa possível, sendo estimulados verbalmente pelo examinador durante a execução da manobra. Seguimos os critérios de execução e aceitabilidade estabelecidos pelas Diretrizes para Testes de Função Pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (PEREIRA, 2002), bem como os padrões internacionais definidos pela American Thoracic Society (MILLER., 2005). Para evitar interferência das manobras de expiração forçada nos resultados do VEF₁ após a broncoprovocação por HVE, foram aceitas duas manobras semelhantes à manobra basal ou, em caso de redução no VEF₁, duas manobras com curvas fluxo-volume semelhantes e com aspecto adequado na avaliação do pico de fluxo (PARSONS, 2013).

O valor do VEF₁ foi medido antes e aos cinco, 10, 15 e 30 minutos após a broncoprovocação. O BIE foi diagnosticado quando houve uma redução igual ou maior que 10% em relação ao valor basal do VEF₁. A intensidade da redução no VEF₁ em relação aos valores basais foi classificada como leve (>10% e <25%), moderada (≥25% e <50%) ou grave (>50%) (PARSONS et al., 2013).

Teste de broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica (HVE)

O teste foi conduzido através da hiperventilação de uma mistura de ar seco contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂), a fim de evitar a ocorrência de alcalose respiratória. Para essa finalidade, foi utilizado um equipamento desenvolvido e patenteado pelo nosso grupo de pesquisa. Os gases utilizados foram adquiridos na empresa White Martins (Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco - Brasil). A mistura foi armazenada em cilindros apropriados e liberada para um conjunto de sacos plásticos, dos quais os participantes inalaram o conteúdo por meio de um bocal e uma válvula unidirecional de baixa resistência (Laerdal®, Stavanger - Noruega).

Durante o teste, os indivíduos foram instruídos a manter a taxa de ventilação alvo correspondente a 21 vezes o valor do basal (PARSONS, 2013) por um período de seis minutos.

A taxa de ventilação por minuto foi medida utilizando um ventilômetro analógico NSpire Wright Mark 8 (Nspire® Health Ltda - Reino Unido), e os pacientes foram constantemente estimulados a manter a taxa de ventilação alvo. Se necessário, os adolescentes podiam fazer pequenas pausas no teste para engolir a saliva acumulada ou tossir. Não houve interrupção do teste devido a desconforto respiratório severo por parte dos participantes durante a realização desse estudo.

Análise metabonômica do condensado do ar exalado

Todas as aquisições de espectros de RMN ^1H foram realizadas em um espectrômetro Varian de 400 MHz a uma frequência de ^1H de 400 MHz (Varian® - Califórnia - EUA). Todas as amostras do CAE congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente e preparadas utilizando 630 μL de amostra e 70 μL de tampão de fosfato de sódio (0,2M Na_2HPO_4 em 10% de D_2O , pH 7,0) e colocadas em tubos de RMN de 5 mm.

Os procedimentos de aquisição seguiram os parâmetros: os espectros de RMN unidimensionais foram adquiridos com a supressão do sinal da água usando uma sequência de pulsos padrão (WET), com 14.522 pontos de dados em uma janela espectral de 5.186,7 Hz, tempo de aquisição igual a 1,4 s, 160 transientes, atraso de saturação igual a 3,0 s e temperatura de 22°C. O alargamento de linha utilizado foi de 1 Hz.

Análise estatística

O processamento dos dados espectrais foi realizado utilizando o programa MestReNova 12.0 (Mnova® - Califórnia - EUA , a região entre δ 1,60 e 2,00 ppm foi dividida em 67 bins (cada um com 0,004 ppm de largura) para usar o pico presente como estudo-alvo (Chang-Chien et al, 2021). A matriz foi construída com 92 linhas (casos) e 68 variáveis (bins dos espectros de RMN ^1H mais a variável de classe) e, em seguida, foi submetida a análise multivariada, identificando 8 variáveis (picos de intensidade do sina da RNM) significativos.

A análise multivariada dos dados espectrais foi realizada obedecendo o seguinte:

Primeiramente, três matrizes foram criadas:

- Uma matriz para todas as amostras coletadas antes o teste de broncoprovocação por HVE (pré HVE), comparação entre casos positivos e negativos para o diagnóstico de BIE.
- Uma matriz para todos os casos positivos de BIE, comparação das amostras coletadas antes e após o teste de broncoprovocação por HVE.
- Uma matriz para todos os casos negativos de BIE, comparação das amostras coletadas antes e após o teste de broncoprovocação por HVE.

Os conjuntos de dados foram pré-processados utilizando normalização por soma (em linha) e escalonamento automático (variáveis). Em seguida, foram empregados formalismos de PCA (Análise de Componentes Principais) e Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados (OPLS-DA), usando a plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (Edmonton - Alberta - Canadá). Os modelos de metabonômica foram validados utilizando Validação Cruzada *Leave-One-Out* (LOOCV) e teste de permutação, com 2000 permutações.

O componente principal foi calculado a partir da análise multivariada das intensidades dos sinais no espectro que melhor representaram as distinção (maior variância) entre as amostras, o objetivo foi transformar matematicamente os diversos sinais para uma única representação, permitindo uma melhor visualização dos padrões de cada amostra no gráfico. Cada círculo do gráfico representa uma amostra do CAE antes (círculos abertos) ou após (círculos sólidos) a HVE dos adolescentes avaliados. A proximidade da amostra com o componente principal, sugere semelhanças nos perfis de metabólitos presentes no CAE, enquanto a distância sugere diferenças.

Os dados gerais foram processados e analisados utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0. Inicialmente, os dados foram inseridos no pacote estatístico SPSS por meio de digitação dupla, e foram verificadas possíveis inconsistências. Para caracterizar a amostra, os dados passaram por teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição normal e, na comparação das variáveis independentes contínuas, foi utilizado o teste t de Student

Para comparação entre os grupos dos pacientes com e sem BIE foi utilizado o diagnóstico clínico ($VEF_1 < 10\%$ no teste de broncoprovocação) e o modelo metabonômico desenvolvido através da Análise Discriminante Linear (LDA) dos metabólitos presentes nas amostras do CAE obtidas antes da HVE.

O modelo metabonômico da LDA foi desenvolvido através software Statistica 10.0 e validado por meio da Validação Cruzada *Leave-One-Out* (LOOCV), identificando 8 picos de sinais do espectro da RMN 1H discriminantes dos 44 participantes, identificando aqueles com BIE e sem BIE.

Foi realizada a comparação do perfil metabonômico das amostras do CAE coletas antes e após o HVE (análise intragrupo) a partir da análise exploratória através da Análise dos componentes principais (PCA). Em seguida, foi utilizada a regressão multivariada por Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados (OPLS-DA). Para realizar as análises PCA e OPLS-DA, foi utilizada a plataforma online MetaboAnalyst 4.0.

A validação estatística foi obtida pelo teste de permutação, com 2000 permutações. Esse teste foi utilizado para avaliar se a classificação específica dos indivíduos em dois grupos designados é significativamente melhor do que qualquer outra classificação aleatória em dois grupos arbitrários. Nesse teste, os rótulos de classe de BIE positivo e BIE negativo foram permutados, ou seja, aleatoriamente designados para diferentes indivíduos. Com os rótulos de classe "errados", um novo modelo de classificação foi calculado. A ideia por trás do teste de permutação é que, com os rótulos de classe errados, o modelo de classificação recém-calculado não deve ser capaz de prever as classes com precisão.

RESULTADOS

Foram recrutados quarenta e cinco adolescentes asmáticos de ambos os sexos, com idades entre 10 e 20 anos, que não estavam em tratamento regular nas quatro semanas anteriores aos testes. Contudo, após a triagem inicial, um dos adolescentes foi excluído da amostra por apresentar um valor de VEF₁ basal inferior a 60% do valor teórico previsto e, por esse motivo, foi excluído do grupo de amostra.

Dos 44 pacientes, vinte e três (54,73%) apresentaram resultado positivo para BIE após a broncoprovocação por HVE (BIE+).

Os dados gerais desses participantes estão apresentados na tabela 01. A amostra foi homogênea quanto a idade, peso, altura, sexo, e VEF₁ basal entre os grupos dos pacientes com teste positivo (BIE+) e negativo (BIE-) para broncoespasmo induzido por HVE. Os asmáticos com BIE apresentaram uma redução média de $25,13 \pm 14,9$ no VEF₁ após a manobra de hiperventilação voluntária eucápnica. Na última avaliação espirométrica, 30 minutos após o teste de broncoprovocação, todos os participantes apresentaram um VEF₁ próximo (< 10% de diferença) ao valor basal.

Grupo	BIE + (n= 25)	BIE – (n=19)	Valor de P*
Idade (anos)	12,7 ± 3,0	15,0 ± 3,2	0,74
Peso (kg)	46,8 ± 14,4	63,8 ± 21,8	0,54
Altura (cm)	151,4 ± 14,0	153,79 ± 39,9	0,73

Sexo masculino n (%)	12 (52,2%)	11 (57,9%)	0,45
VEF ₁ basal (l/seg)	2,38 ± 0,7	3,33 ± 0,9	0,77
VEF ₁ basal (% do predito)	91,6 ± 15,3	99,0 ± 15,9	0,73
VEF ₁ HVE (% basal)	-25,13 ± 14,9	-4,37 ± 3,6	<0,001

Tabela 01 - Dados gerais da amostra.

Valores apresentados em média ± DP. BIE +: Asmáticos com broncoconstrição induzida por exercício. BIE -: Asmáticos sem broncospasmo induzido por exercício; ACT: *Asthma Control Test* (Teste de Controle da Asma); VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; VEF₁ HVE: Redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo após broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica. * teste t de Student.

Em relação aos resultados obtidos no teste de espirometria e HVE, a água de banho do equipamento condensador teve uma temperatura média de 2,95 ± 1,35°C e o volume médio de biofluido coletado foi de 5,26 ± 3,06ml.

A análise do perfil metabonômico desenvolvido através da Análise Discriminante Linear (LDA) antes do HVE foi capaz de discriminar BIE com bons valores psicométricos (Tabela 02).

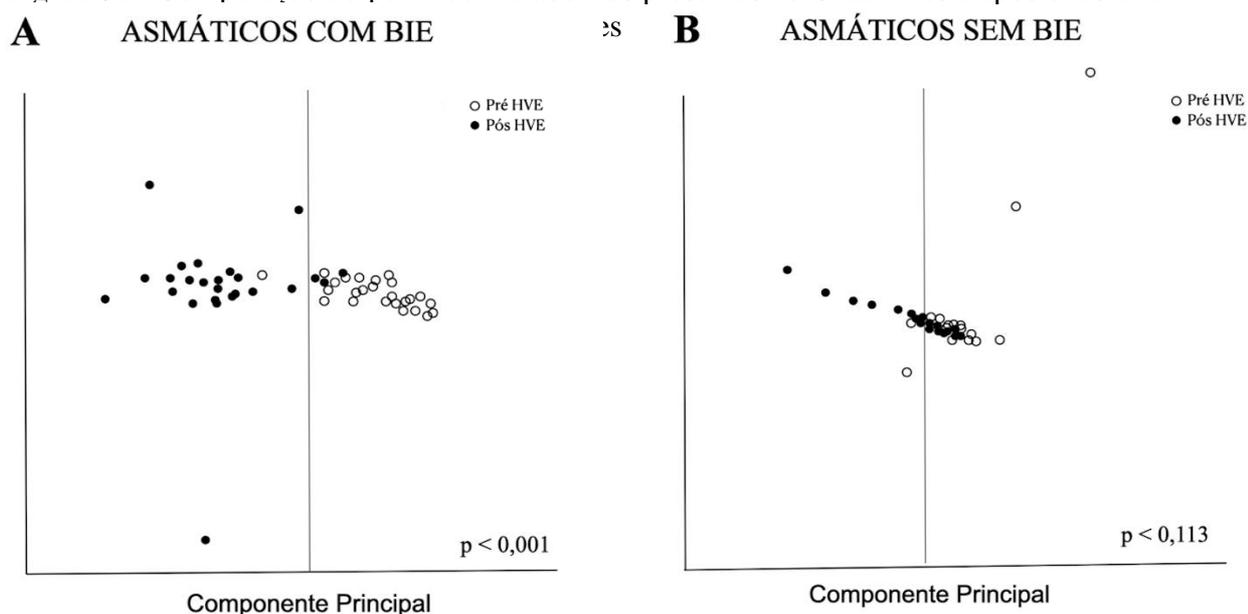
Tabela 02 - Análise da acurácia do modelo metabonômico antes do teste de hiperventilação voluntária eucápnica em adolescentes asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício.

		Diagnóstico Clínico	
		BIE +	BIE -
Modelo Metabonômico	BIE +	23	5
	BIE -	2	14
Acurácia: 82,7%	Sensibilidade: 82,1% Especificidade: 83,3%	Valor preditivo positivo: 83,72% Valor preditivo negativo: 82,22%.	

BIE +: Asmáticos com broncoespasmo induzido por exercício. BIE -: Asmáticos sem broncoespasmo induzido por exercício.

A partir dos modelos desenvolvidos realizamos a comparação do perfil de metabólitos presentes no CAE antes e após o HVE tanto nos pacientes asmáticos com BIE (figura 02A) como aqueles que não apresentaram broncoespasmo durante o teste (figura 02B). Os pacientes com BIE apresentaram diferenças no perfil de metabólitos em comparação ao basal considerando o mesmo grupo. Não houve diferenças entre os asmáticos sem BIE em relação ao basal no mesmo grupo (figuras 02A e 02B)

Figura 02 - Comparação do perfil de metabólitos presentes no CAE antes e após o teste da



BIE +: Asmáticos com broncoespasmo induzido por exercício. BIE -: Asmáticos sem broncoespasmo induzido por exercício. HVE: Hiperventilação eucápnica voluntária. Análise por OPLS, a linha central refere-se ao componente principal, uma representação matemática dos sinais do espectro da RMN 1H dos metabólitos que melhor discriminam os metabólitos presentes no CAE pré e pós HVE.

No gráfico da figura 02A a linha central refere-se ao componente principal, uma representação matemática dos sinais do espectro da RMN ^1H dos metabólitos que melhor discriminam os metabólitos presentes no CAE pré e pós HVE.

Desta forma, analisando apenas os adolescentes asmáticos com BIE, observamos na figura 02A que a maior parte das amostras do CAE obtidas antes da HVE está deslocada para a direita, enquanto aquelas amostras obtidas pós HVE estão agrupadas a esquerda do gráfico. A análise de regressão multivariada por OPLS mostrou que o perfil de metabólitos presentes no CAE pré HVE é significativamente diferente daqueles pós HVE ($p < 0,001$).

Por outro lado, nos pacientes asmáticos sem BIE, tanto as amostras coletadas pré HVE como aquelas obtidas pós HVE estão agrupadas próximas ao componentes, não sendo possível identificar uma separação entre elas (Figura 04B). Realizando a mesma análise por OPLS-DA, não houve diferenças significativas nos perfis de metabólitos presentes no CAE antes ou após a HVE nos asmáticos sem BIE ($p = 113$).

Esses resultados foram validados através do teste de permutação nos dois grupos de pacientes. O teste confirmou que há diferenças ($p < 0,001$) no perfil de metabólitos do CAE pré e pós HVE nos asmáticos com BIE e que não foi possível discriminar ($p = 0,195$) as amostras pré e pós HVE dos asmáticos sem BIE.

Foi observada uma maior intensidade do pico do sinal na RMN ^1H no deslocamento químico 1,92ppm, relacionado ao acetato, nos adolescentes que apresentaram BIE, sugerindo a participação desse composto nas vias metabólicas envolvidas no mecanismo da broncoconstricção .

DISCUSSÃO

Esse estudo investigou a potencial aplicação da análise metabonômica por RMN ^1H para identificar alterações no perfil de metabólitos presentes no condensado do ar exalado antes e após a broncoprovocação por hiperventilação voluntária eucápnica em 44 adolescentes asmáticos, 25 deles com BIE. Até onde é do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo com esse objetivo a ser realizado.

Nossos resultados demonstraram diferenças dos metabólitos presentes no CAE de adolescentes asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício (BIE) antes mesmo da realização da HVE. Adicionalmente, observamos que as alterações nos metabólitos presentes do CAE após a manobra de HVE ocorreram apenas no grupo de pacientes com asma que desenvolveram BIE. A análise espectral permitiu identificar um agrupamento que parecer ser o acetato naqueles com BIE.

O condensado do ar exalado (CAE) é um material coletado durante a expiração, através de uma técnica não invasiva. Esse método permite a obtenção de amostras do ar exalado pelos pacientes para análise. O CAE tem sido utilizado para avaliar a presença de biomarcadores, como substâncias inflamatórias e moléculas específicas, que podem fornecer informações importantes sobre a condição respiratória do indivíduo. Essa técnica tem se mostrado promissora em diversas áreas da medicina, especialmente no estudo de doenças respiratórias, como a asma, proporcionando uma forma mais fácil e menos desconfortável de avaliar a saúde pulmonar dos pacientes (KIERBIEDŹ-GUZIŁ e SOZAŃSKA, 2023; POŁOMSKA e SOZAŃSKA, 2022; POŁOMSKA, BAR e SOZAŃSKA, 2021)

Os biomarcadores mais frequentemente estudados no CAE são pH, citocinas e eicosanóides, incluindo 8-isoprostanos, cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs) e lipoxinas (Banner, 2019). No estudo de coorte realizado por KreiĹl (2021), acompanhando 135 crianças, observaram que o pH do CAE foi altamente sensível para identificar aquelas com maior risco de desenvolver asma na idade escolar. Outro estudo, que investigou o efeito do tratamento com corticosteróide inalado e prednisona oral, observou uma redução significativa de Cys-LTs no CAE de noventa e quatro crianças com exacerbação moderada a grave de asma. Esses achados demonstram o potencial do estudo dos componentes do CAE para avaliação, acompanhamento e compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios e respostas ao tratamento da asma.

Os Cys-LTs são mediadores inflamatórios produzidos por diversas células do sistema imunológico. Estudos mostraram que crianças asmáticas têm níveis elevados de Cys-LTs no CAE em comparação com crianças não asmáticas (POŁOMSKA, BAR e SOZAŃSKA, 2021; LINARES SEGOVIA, 2014). Além disso, em casos de asma persistente, os níveis de Cys-LTs no CAE são mais altos do que na asma intermitente (KESKIN, 2016). Outros mediadores inflamatórios, como o leucotrieno B4 (LTB4), também têm sido investigados, e estudos mostraram que crianças asmáticas têm níveis mais elevados de LTB4 no CAE em comparação com crianças saudáveis (GELFAND, 2017). Ademais, pacientes atópicos tendem a apresentar concentrações mais altas de LTB4 em ambos os tipos de CAE coletados (TRISCHLER, 2015).

São necessárias mais pesquisas para entender melhor o papel destes mediadores inflamatórios na asma, assim como a identificação dos mecanismos que precedem as suas formações, descrevendo, por exemplo, as vias metabólicas relacionadas. Contribuindo, por exemplo, para entender porque apenas uma parte dos pacientes asmáticos apresentam BIE, e se as diferenças nos metabólitos presentes nas vias aéreas podem explicar as diferentes respostas ao exercício.

Ainda não há uma padronização metodológica estabelecida para coleta do CAE nos pacientes asmáticos, apesar de dois abrangentes relatórios do Grupo de Trabalho da European Respiratory Society (ERS) e da American Thoracic Society (ATS) em 2005 e 2017, respectivamente (HORVÁTH, 2017; HORVATH, HUNT e BARNES, 2005).

Embora diversos estudos tenham avaliado os componentes do CAE em pacientes asmáticos através da RMN ^1H (IBRAHIM, 2013; SINHA, 2012; CARRARO, 2007), não encontramos estudos com esse perfil de análise especificamente no fenótipo com BIE.

Amostras de condensado do ar exalado de 82 adultos com asma e 35 voluntários saudáveis foram analisadas no estudo de Ibrahim (2013) usando RMN ^1H . Os autores desenvolveram um modelo discriminatório baseado em cinco regiões espectrais, que conseguiu distinguir com sucesso os asmáticos dos controles saudáveis. Além disso, foi possível discriminar subgrupos dos pacientes asmáticos com base em características como eosinofilia, neutrofilia, controle da asma e uso de corticosteroides inalatórios.

Motta (2014) coletaram amostras do CAE de um grupo de 35 pacientes asmáticos e 35 indivíduos saudáveis com dois condensadores comerciais operando a $-27,3\text{ }^\circ\text{C}$ e $-4,8\text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados do estudo mostraram que os modelos a diferentes temperaturas, independentemente da análise espectral, classificaram corretamente os pacientes asmáticos e saudáveis. Os metabólitos que melhor distinguem os dois grupos de participantes foram: succinato, hippurato, piruvato, metanol, ácido graxo saturado, valina, fenilalanina, trimetilamina, acetato, ácido urocânico, etanol, 4-hidroxifenilacetato, adenosina, propionato, formato, colina/fosforilcolina e lactato. Esses metabólitos apresentaram diferenças significativas nas concentrações entre os grupos, possibilitando a correta classificação das amostras, independentemente da temperatura de condensação do CAE.

No estudo de Carraro (2007), foi realizada uma análise metabolômica utilizando a técnica de RMN ^1H no condensado do ar exalado de vinte e cinco crianças com asma alérgica controlada e onze crianças saudáveis. A análise das informações obtidas a partir dos espectros apresentou uma taxa de discriminação significativa, alcançando uma acurácia de aproximadamente de 86%. As variáveis de RMN ^1H selecionadas revelaram a presença de compostos acetilados na região de 1,7 a 2,2 ppm. Próximo a essa faixa de frequência (1,86 a 1,92 ppm), também identificamos uma diferença significativa nos espectros obtidos no CAE dos adolescentes asmáticos com BIE antes e após o HVE, o que sugere que os compostos acetilados podem apresentar um papel importante no mecanismo da broncoconstricção nesse grupo de pacientes.

Em outro estudo realizado por Carraro (2013), com 42 crianças e adolescentes asmáticos e 15 não asmáticos, utilizando análise dos metabólitos através da espectrometria de massas no CAE dos participantes, foram diferenciados vários fenótipos de asma, com foco especial na asma grave. Nessa pesquisa, foram identificados compostos associados ao ácido retinóico, adenosina e vitamina D que mostraram relevância na distinção dos diferentes grupos.

Maniscalco (2017) investigaram o perfil metabólico, utilizando a RMN ^1H , de 3 grupos de indivíduos: obesos com asma, obesos não-asmáticos e asmáticos não obesos. Os autores, assim como em nosso estudo, realizaram a coleta do CAE após o teste de broncoprovocação, porém utilizando o

estímulo direto com metacolina. Foram relatados envolvimento das vias metabólicas do piruvato, metano, glicoxilato e dicarboxilato em amostras de CAE dos adultos com fenótipo de asma relacionada à obesidade.

O piruvato foi descrito nas possíveis vias metabólicas (Figura 05) que discriminam as crianças com asma no estudo de Chang-Chien (2021). Os autores demonstraram que a assinatura metabólica do CAE, baseada em RMN ^1H , composta por 4 metabólitos (lactato, formato, ácido butírico e isobutirato), teve propriedades discriminativas no diagnóstico da asma em crianças asiáticas em uma coorte populacional.

Em nosso estudo, analisando os espectros da RMN ^1H nas amostras do CAE coletadas antes da HVE nos asmáticos com BIE, observamos uma maior intensidade do sinal relacionado ao acetato quando comparadas as amostras do adolescentes sem BIE. Sugerindo a participação do acetato nos mecanismos envolvidos BIE.

Apoiando essa especulação, identificamos que os sinais relacionados aos compostos acetilados, na comparação pré e pós HVE, aumentaram apenas no grupo de asmáticos com BIE, permanecendo inalterados naqueles que não desencadearam a broncoconstrição durante o teste (BIE-).

Observando a figura 05, identificamos que o acetato pode ser produzido a partir da degradação do piruvato em formato e butirato, ambos compostos são mencionados como moduladores do mecanismo inflamatório e de contração do músculo liso das vias aéreas. (CHANG-CHIEN, 2021; RODUIT, 2019; RON-HARE, 2016; GREENWALD, 2010; GASTON, 1998)

Algumas considerações metodológicas que podem ser levadas em conta, como a temperatura da mistura de água e gelo maior que 0°C , impossibilitando a coleta de maiores quantidades de compostos voláteis; o processo de limpeza do equipamento que não passou por esterilização por temperatura (HORVATH, HUNT & BARNES, 2005). Também não realizamos a mensuração do pH do CAE no momento da coleta. No entanto, esses fatores não influenciaram os resultados, pois os procedimentos metodológicos foram realizados de maneira igual em todos os pacientes, desde do teste de função pulmonar, a realização do teste de broncoprovocação por HVE, o dispositivo para coleta do CAE e o processo de limpeza dos equipamentos utilizados.

Além disso, realizamos as análises de 10 amostras de água destilada que foram introduzidas no tubo de silicone do condensador após a higienização e não foram identificados alterações do espectro da RMN ^1H nessas amostras, demonstrando que o processo de limpeza não interferiu em nossos resultados. Observamos também que, mesmo com temperatura no dispositivo condensador não atingir valores abaixo de 0°C , foi possível identificar alterações dos espectros de RMN ^1H nas amostras do CAE dos participantes, indicando mudanças nos perfis metabonômicos.

Outra observação relacionada aos procedimentos é sabemos que um maior número de repetições das manobras de expiração forçada para avaliação do VEF_1 basal pode predispor o

brocoespasmo antes mesmo da HVE. Contudo, em todos os participantes do nosso estudo o VEF1 pré teste de broncoprovocação foi obtido com 3 ou 4 manobras espirométricas.

CONCLUSÃO

Os perfis metabonômicos analisados no CAE antes do HVE foram capaz de discriminar a presença de BIE nos asmáticos com bons valores psicométricos. Os asmáticos com BIE apresentam alterações significativas nos metabólitos do CAE quando submetidos ao teste de broncoprovocação, em relação ao basal. A identificação do metabólito acetato, com maior intensidade nos adolescentes com BIE, pode indicar uma potencial via metabólica associada à resposta asmática ao exercício.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, S. D.; DAVISKAS, E. **O mecanismo da asma induzida por exercício...** J Allergy Clin Immunol, v. 106, n. 3, p. 453-459, 2000.
- ANDERSON, S. D. **Reprodutibilidade da resposta das vias aéreas a um protocolo de exercício padronizado para intensidade, duração e condições de ar inspirado, em indivíduos com sintomas sugestivos de asma.** Respir Res, v. 11, n. 1, p. 120, 2010.
- BHATIA, R.; ABU-HASAN, M.; WEINBERGER, M. **Dispneia induzida por exercício em crianças e adolescentes: diagnóstico diferencial.** Pediatr Ann, 48:e121-7, 2019.
- BARRETO, M.; ZAMBARDI, R.; VILLA, M. P. J. **Óxido nítrico exalado e outros biomarcadores exalados no desafio brônquico com exercício em crianças asmáticas: conhecimento atual.** Paediatr Respir Rev, v. 16, n. 1, p. 68-74, 2015.
- CARRARO, S. **Gravidade da asma na infância e perfil metabólico do condensado do ar exalado.** Allergy, v. 68, n. 1, p. 110-117, 2013.
- CARRARO, S. **Metabólica aplicada ao condensado do ar exalado na asma infantil.** Am J Respir Crit Care Med, v. 175, n. 10, p. 986-990, 2007.
- CHANG-CHIEN, J. **Diferenças metabólicas do condensado do ar exalado entre crianças com e sem asma.** Pediatr Allergy Immunol, v. 32, n. 2, p. 264-272, 2021.
- CORREIA JUNIOR, M. A. V. **Broncoespasmo induzido por exercício em uma região quente e seca: estudo em adolescentes asmáticos, riniticos e assintomáticos.** Expert Rev Respir Med, v. 11, n. 12, p. 1013-1019, 2017.
- CORREIA JUNIOR, M. A. V. **Efeito do broncoespasmo induzido por exercício e das crenças dos pais na atividade física de adolescentes asmáticos de uma região tropical.** Ann Allergy Asthma Immunol, v. 108, n. 4, p. 249-253, 2012.
- DE AGUIAR, K. B. **Prevalência global de broncoconstrição induzida por exercício na infância: uma meta-análise.** Pediatr Pulmonol, v. 53, n. 4, p. 412-425, 2018.
- FERRARO, V. A. **Breathomics em crianças asmáticas tratadas com corticosteroides inalatórios.** Metabolites, v. 10, n. 10, p. 390, 2020.
- GELFAND, E. W. **Importância das vias de leucotrieno B4-BLT1 e LTB4-BLT2 na asma.** Semin Immunol, v. 33, p. 44-51, 2017.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. **Estratégia Global para o Manejo e Prevenção da Asma.** 2023. Disponível em: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2023/07/GINA-2023-Full-report-23_07_06-WMS.pdf. Acesso em: 05 de maio de 2023.

GREENWALD, R. **Formato do ar expirado é um marcador de depleção de S-nitrosotiol das vias aéreas na asma grave.** PLoS One, v. 5, n. 7, p. e11919, 2010.

HORVÁTH, I. **Um padrão técnico da European Respiratory Society: biomarcadores exalados em doenças pulmonares.** Eur Respir J, v. 49, n. 4, p. 1600965, 2017.

HORVATH; HUNT; BARNES. **ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Condensado de ar exalado: recomendações metodológicas e questões não resolvidas.** Eur Respir J, v. 26, n. 3, p. 523-548, 2005.

IBRAHIM, B. **Perfil metabólico do ar expirado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear na asma.** Allergy, v. 68, n. 8, p. 1050-1056, 2013.

KESKIN, O. **A eficácia do tratamento com corticosteroides inalatórios em dose única alta versus prednisona oral sobre os níveis de leucotrieno exalado e 8-isoprostanos em crianças asmáticas com exacerbação da asma.** Allergol Immunopathol (Madr), v. 44, n. 2, p. 138-148, 2016.

KIERBIEDŹ-GUZIŁ, N.; SOZAŃSKA, B. **O potencial papel dos miRNAs no soro e no condensado de ar exalado na diagnóstico e predição de exacerbações na asma pediátrica.** Biomedicines, v. 11, n. 3, p. 763, 2023.

KLAIN, A. **Broncoconstrição induzida por exercício em crianças.** Front Med (Lausanne), v. 8, p. 814976, 2022.

KREIßL, S. **pH reduzido do condensado do ar exalado e gravidade da sensibilização alérgica predizem a asma na idade escolar.** J Allergy Clin Immunol Pract, v. 9, n. 4, p. 1570-1577, 2021.

KURUVILLA, M. E. **Compreensão dos fenótipos, endótipos e mecanismos da asma.** Clin Rev Allergy Immunol, v. 56, n. 2, p. 219-233, 2019.

LIKONSKA, A. **A terapia com mepolizumabe diminui as concentrações de citocinas derivadas do epitélio no condensado de ar exalado de pacientes com asma eosinofílica grave.** Clin Exp Allergy, v. 11, n. 3, p. 763, 2023.

MANISCALCO, M. **Coexistência de obesidade e asma determina um fenótipo metabólico respiratório distinto.** J Allergy Clin Immunol, v. 139, n. 5, p. 1536-1547, 2017.

MOTTA, A. **Análise metabólica por RMN do condensado do ar exalado de pacientes asmáticos em duas temperaturas diferentes.** J Proteome Res, v. 13, n. 12, p. 6107-6120, 2014.

NOBAKHT, M. G. H. B. F. **A metabólica das doenças das vias aéreas, incluindo DPOC, asma e fibrose cística.** Biomarkers, v. 20, n. 1, p. 5-16, 2015.

PARSONS, J. P. **Diretriz oficial de prática clínica da American Thoracic Society: broncoconstrição induzida por exercício.** Am J Respir Crit Care Med, v. 187, n. 9, p. 1016-1027, 2013.

PAVORD, I. D. **Após a asma: redefinindo as doenças das vias aéreas.** Lancet, v. 391, n. 10118, p. 350-400, 2018.

PEREIRA, C. A. **Espirometria.** J Pneumol, v. 28, n. 3, p. S1-S82, 2002.

POŁOMSKA, J.; BAR, K.; SOZAŃSKA, B. **Condensado de ar exalado - uma abordagem não invasiva para métodos de diagnóstico na asma.** J Clin Med, v. 10, n. 12, p. 2697, 2021.

POŁOMSKA, J.; SOZAŃSKA, B. **Metabolitos de L-ARG no condensado de ar exalado e no soro não são biomarcadores de asma brônquica em crianças.** J Clin Med, v. 11, n. 1, p. 252, 2022.

RIZZO, J.Â. **Reprodutibilidade da eucapnia voluntária hiperventilatória para o diagnóstico de broncoconstrição induzida por exercício em crianças e adolescentes asmáticos.** Pediatr Allergy Immunol, v. 32, n. 8, p. 1700-1708, 2021.

RODRIGUES FILHO, E. A. **Broncoespasmo induzido por exercício em crianças e adolescentes com rinite alérgica por desafios em esteira e hiperventilação.** Respir Med, v. 138, p. 102-106, 2018.

RODUIT, C. **High levels of butyrate and propionate in early life are associated with protection against atopy.** Allergy, v. 74, n. 4, p. 799-809, 2019.

SILVA FILHO, M. J. C. M. **Diagnóstico de broncoconstrição induzida por exercício em crianças asmáticas: comparação entre corrida em esteira e hiperventilação voluntária eucápnica.** Ann Allergy Asthma Immunol, v. 115, n. 4, p. 277-281, 2015.

SINHA, A. **Assinaturas metabólicas em espectros de ressonância magnética nuclear do condensado de ar exalado identificam a asma.** Eur Respir J, v. 39, n. 2, p. 500-502, 2012.

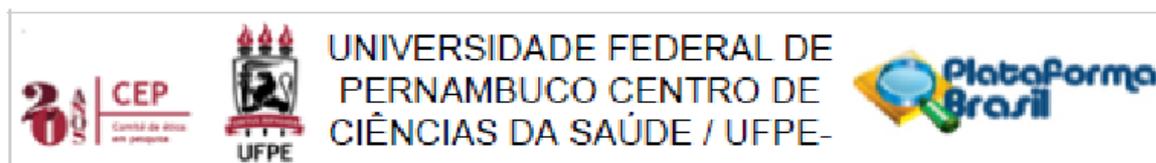
STELMACH, I. **Nível sérico de triptase e marcadores inflamatórios no condensado de ar exalado de crianças com sintomas induzidos por exercício.** Allergy Asthma Proc, v. 37, n. 5, p. 84-92, 2016.

STERK, P. J. **Fenotipagem inflamatória moderna da asma. A breathomics está aqui para ficar.** Am J Respir Crit Care Med, v. 200, n. 4, p. 405-406, 2019.

TAHAN, F. **Aumento dos níveis de lipoxina A4 no condensado de ar exalado em crianças asmáticas com broncoconstrição induzida por exercício.** J Investig Allergol Clin Immunol, v. 26, n. 1, p. 19-24, 2016.

THOMAS, P. S. . **Condensado de ar exalado na asma pediátrica: promissora nova descoberta ou água fria em muito ar quente? Uma revisão sistemática.** Pediatr Pulmonol, v. 48, n. 5, p. 419-442, 2013.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: METABONÔMICA E DOSAGEM DE CITOCINAS NO CONDENSADO DO AR EXALADO & ESTUDO EXPLORATÓRIO PARA AVALIAR DIFERENÇAS ENTRE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS COM E SEM BRONCOESPASMO INDUZIDO POR EXERCÍCIO.

Pesquisador: EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91082318.7.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

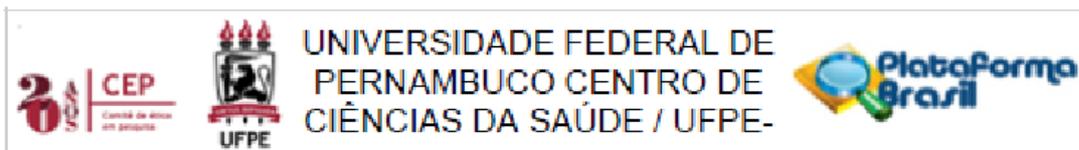
Número do Parecer: 2.706.040

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do Doutorando Edil de Albuquerque Rodrigues Filho, sob a Orientação do Prof. Dr. José Ângelo Rizzo e Co-Orientação do Prof. Dr. Décio Medeiros Peixoto, a ser apresentado ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Tem como objetivo analisar e comparar o perfil de metabólitos e de citocinas inflamatórias presentes no condensado do ar exalado(CAE) em crianças e adolescentes asmáticos com e sem Broncoespasmo Induzido por Esforço(BIE) após teste de broncoprovocação por Hiperventilação Eucápnica Voluntária. Trata-se de um estudo transversal, exploratório, comparativo, aberto e com amostra por conveniência que será realizado no serviço de pneumologia da Universidade Federal de Pernambuco-Hospital das Clínicas (UFPE-HC), onde serão coletadas as informações clínicas e antropométricas e realizados os testes de função pulmonar, medidas do FeNO (Fração exalada do Ácido Nitrico), coleta dos condensados do ar exalado(CAE) e as técnicas de broncoprovocação para determinação do BIE. A análise dos metabólitos no condensado do ar exalado será realizada no Departamento de Química Fundamental, da Universidade Federal de Pernambuco. A análise das citocinas no condensado do ar exalado será realizada no Departamento de Imunologia do Centro

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.796.049

de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.

Serão selecionadas 40 crianças e adolescentes asmáticos diagnosticados por médico assistente especialista e provenientes do ambulatório especializados de Pneumologia e de Alergologia do Hospital das Clínicas da UFPE, sem tratamento regular nas últimas 4 semanas, com idade entre 10 e 20 anos e de ambos os sexos. Os voluntários residem na cidade do Recife e Região Metropolitana com diagnóstico de asma dado por médicos especialistas dos referidos ambulatórios e classificados de acordo com os critérios do Global Initiative for Asthma (GINA, 2017).

Os pesquisadores, mediante aplicação de técnicas minuciosamente detalhadas no projeto e com amplo embasamento científico, esperam verificar se existem diferenças no espectro metabonômico e de citocinas do condensado do ar exalado entre crianças e adolescentes asmáticos com e sem broncoespasmo induzido por exercício, possibilitando um melhor entendimento na fisiopatologia do broncoespasmo induzido por exercício em indivíduos asmáticos.

Objetivo da Pesquisa:

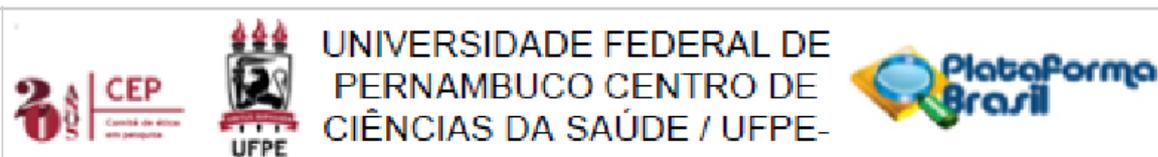
OBJETIVOS GERAL

Analisar e comparar o perfil metabonômico e de citocinas inflamatórias presentes no condensado do ar exalado em adolescentes asmáticos com e sem BIE após teste de broncoprovocação por Hiperventilação Eucápnica Voluntária.

ESPECÍFICOS –

- 1- Construir modelos metabonômicos, usando dados espectrais de RMN obtidos no CAE de adolescentes asmáticos com e sem BIE, comparando dados obtidos pré e pós testes de broncoprovocação;
- 2- Identificar os metabólitos endógenos associados com a discriminação entre os grupos de estudo e investigar as rotas metabólicas envolvidas no processo.
- 3 - Analisar e comparar as concentrações de citocinas inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL8, IL-13, IL-15, IL-16, IL17A, MCP-1, MIG e TNF-) no condensado do ar exalado em adolescentes asmáticos com e sem BIE;
- 4 -Medir e comparar os níveis de fração de óxido nítrico exalado (FeNO) antes e após a broncoprovocação em adolescentes asmáticos com e sem BIE -Verificar as correlações entre a FeNO, o modelo metabonômico espectral e a concentração de citocinas no CAE de pacientes com e

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.796.049

sem BIE.

5- Correlacionar modelo metabolômico espectral e a concentração de citocinas em pacientes com e sem BIE com a eosinofilia sanguínea, IgE total e atopia. - Estudar a associação entre a intensidade da redução do VEF1 após a broncoprovocação com a concentração e tipo de metabólitos e de citocinas no CAE - Verificar a associação entre o estado de controle da asma pela pontuação no Teste de Controle da Asma (ACT) e concentrações de metabólitos e citocinas no CAE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

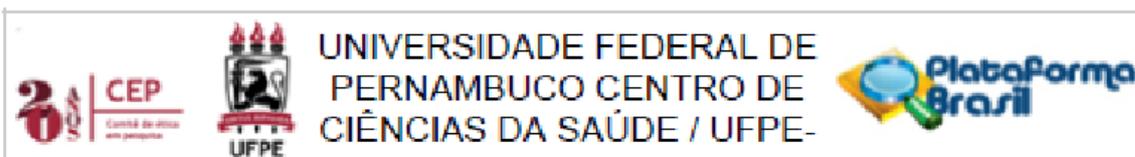
Riscos: Dor e sangramento discretos por ocasião da punção venosa para realização do hemograma e dosagem de IgE total. Os testes alérgicos cutâneos já fazem parte da rotina de avaliação de pacientes asmáticos e tem como principal evento adverso discreto sangramento no local das puncturas. A espirometria é também exame de rotina na avaliação de pacientes asmáticos e tem como possibilidade de riscos o desencadeamento de episódio de asma (raro) ou a fadiga do paciente. O teste de Hiperventilação Eucápnica Voluntária para diagnóstico de BIE é realizado rotineiramente na investigação de queixas de dispneia associada a exercício em indivíduos com história clínica sugestiva de asma. Tem sido utilizado seja na clínica assistencial como em diversas outras pesquisas anteriormente aprovadas pelo CEP/CCS/UFPE sem que tenham sido registrados eventos adversos considerados graves (necessidade de internação por crises de asma ou quedas com traumatismos). O risco inerente ao teste é o desencadeamento de sintomas de dispneia associados à hiperventilação ou ao broncoespasmo desencadeado. A mensuração do FeNO não apresenta riscos para os pacientes, de acordo com a literatura, Não são relatados efeitos adversos durante a coleta do condensado do ar exalado.

Benefícios: Os participantes poderão se beneficiar diretamente dos resultados dos exames pelo diagnóstico de BIE e do seu tratamento pelo médico assistente. A população em geral será beneficiada pelos conhecimentos advindos dos resultados da pesquisa e pelas perspectivas de novos conhecimentos a serem gerados pelas dúvidas suscitadas. Todos os resultados serão disponibilizados aos pacientes e a seus médicos assistentes para um melhor tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa muito bem definido e com metodologia fundamentada em ampla revisão bibliográfica. Os critérios de inclusão e exclusão estão claros e bem definidos assim como as técnicas a serem utilizadas minuciosamente apresentadas mediante descrição e

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.796.049

representação gráfica e com fotos dos procedimentos. Os documentos anexados ao projeto atendem às exigências necessárias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma: Coleta de dados programada para o período de agosto a dezembro de 2018;

Orçamento: estimado no total em R\$ 14.107,00 referente a aquisição de Cilindros de gases e material de escritório;

Folha de Rosto preenchida de forma adequada;

TGLE redigido de forma clara e acessível aos voluntários maiores e menores de 18 anos;

Curriculum vitae dos pesquisadores anexados, plataforma lattes;

Cartas de anuência do Laboratório Aggeu Magalhães, Departamento de química, Serviço de Pneumologia e Serviço de Alergia e Imunologia do HC anexadas;

Termo de confidencialidade.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

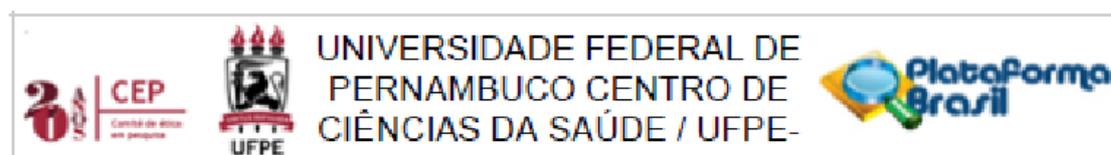
O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 486/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



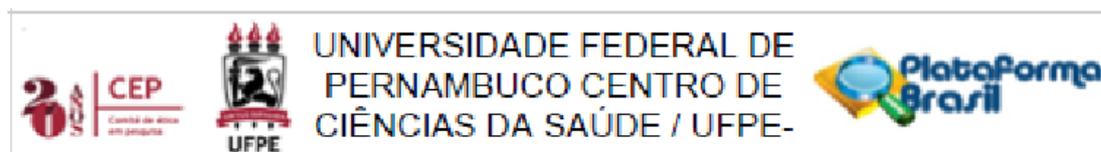
Continuação do Parecer: 2.796.049

Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1129982.pdf	08/06/2018 08:32:40		Aceito
Outros	SIGA.jpg	05/06/2018 12:35:33	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	Termo_Confidencialidade.pdf	05/06/2018 12:33:34	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	RONALDO.pdf	05/06/2018 12:26:46	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	RICARDO.pdf	05/06/2018 12:26:29	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	MARCO.pdf	05/06/2018 12:26:12	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	EMANUEL.pdf	05/06/2018 12:25:51	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	EDIL.pdf	05/06/2018 12:25:36	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	DECIO.pdf	05/06/2018 12:25:17	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	CLAUDIO.pdf	05/06/2018 12:24:59	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-500
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepecs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.796.049

Outros	ANGELO.pdf	05/06/2018 12:24:41	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Outros	ANDERSON.pdf	05/06/2018 12:24:20	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	METABONOMICA_E_DOSAGEM_DE_ CITOCINAS_NO_CONDENSAO_DO_ AR_EXALADO.pdf	05/06/2018 12:10:11	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel_legal.pdf	05/06/2018 12:08:46	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_de_18.pdf	05/06/2018 12:07:38	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	05/06/2018 12:07:18	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_pronta.pdf	04/06/2018 21:26:42	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAS_LABORATORIO_HC_AGGEU .pdf	16/05/2018 11:46:46	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_PNEUMOLOGIA.pdf	16/05/2018 11:46:22	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_DEPARTAMENTO_DE_QUIMI CA.pdf	16/05/2018 11:46:07	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ALERGIA_E_IMUNOLOGIA.pdf	16/05/2018 11:45:25	EDIL DE ALBUQUERQUE RODRIGUES FILHO	Aceito

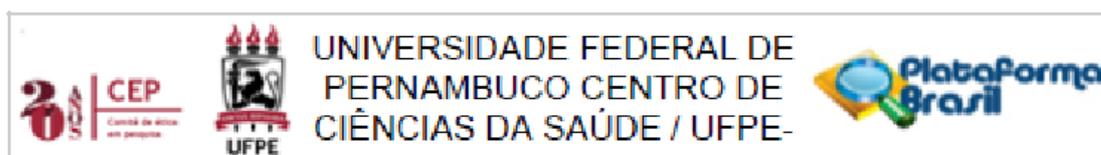
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.796.049

RECIFE, 02 de Agosto de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br