



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TATIANE PRISCILA SANTOS RODRIGUES DA LUZ

METABONÔMICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DE ASMA E BRONCOESPASMO
INDUZIDO POR EXERCÍCIO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Recife

2019

TATIANE PRISCILA SANTOS RODRIGUES DA LUZ

METABONÔMICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DE ASMA E BRONCOESPASMO
INDUZIDO POR EXERCÍCIO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Coorientador: Ronaldo Dionísio da Silva

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L979m Luz, Tatiane Priscila Santos Rodrigues da.
Metabonômica aplicada ao diagnóstico de asma e broncoespasmo induzido por exercício em crianças e adolescentes / Tatiane Priscila Santos Rodrigues da Luz.– 2019.
73 f.: il., fig.; tab.

Orientador: Ricardo Oliveira da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Programa de Pós-graduação em Química, Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Asma. 2. Broncoespasmo induzido por exercício. 3. Condensado do ar exalado. 4. RMN. 5. Metabolômica. I. Silva, Ricardo Oliveira da. II. Título.

310

CDD (23. ed.)

UFPE - CCEN 2024 – 69

Tatiane Priscila Santos Rodrigues da Luz

“METABONÔMICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DE ASMA E BRONCOESPASMO INDUZIDO POR EXERCÍCIO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 10/10/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ricardo Oliveira da Silva
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Fernando Hallwass
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof^a. Andrea Lopes Bandeira Delmiro Santana
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Antibióticos

Prof. Antônio Gomes de Castro Neto
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Antibióticos

Dedico aos meus pais, por todo o apoio e investimento em meus estudos, e por acreditarem no poder de transformação da educação. Também, ao meu sobrinho, que espero, que quando ele crescer, ainda tenha o direito de escolher por uma educação pública, gratuita e de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, por todo apoio, amor, dedicação, por acreditarem em mim, acreditarem no poder de transformação da educação e por sempre lutarem em busca da melhor educação possível para suas duas filhas.

Quero agradecer, também, ao professor Ricardo Oliveira da Silva pela orientação e pela oportunidade concebida em aprender um pouco mais sobre a espectroscopia de ressonância magnética nuclear e a metabonômica, por todo apoio, disposição, ensinamentos, explicações e paciência.

Também, ao professor Ronaldo Dionísio pela coorientação e toda ajuda com a metabonômica.

Aos colegas de grupo, Milena, Luísa, Leticia, Márcio, Ronmilson e Tiago, por todos os momentos descontraídos e de análise juntos, pela parceria e auxílio.

Aos colegas do mestrado, Julia, Bárbara, Flavio, Sidney, Abinoan, Isabela, Lizandra, Miriam e Hector pelos momentos de estudos juntos, de ajuda, confraternização e tornarem minha pós-graduação mais leve e divertida.

Aos amigos que adquiri durante a vida, Lethícia, Jéssica Moura, Jessica Caroline, Maysa, Tereza, Nayara, por me ouvirem e ajudarem quando precisei.

Aos professores do dQF pela contribuição de aprendizado que me foram cedidas cursando as disciplinas do departamento durante este um ano e meio.

À central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE por ceder os laboratórios e equipamento para realização deste trabalho.

Ao Hospital das Clínicas e ao departamento de Alergia e Imunologia, Pediatria e departamento de Pneumologia, ao professor Ângelo Rizzo, Edil Rodrigues e Cláudio Albuquerque pela colaboração e fornecimento das amostras utilizadas na realização deste trabalho

Ao CNPq pelo fomento da bolsa de mestrado e à FACEPE pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A asma é uma doença que acomete aproximadamente 19% da população de crianças e adolescentes no Brasil. Este número vai para 16% na América latina e 14% mundialmente. Há relatos que indicam alta prevalência de broncoespasmo induzido por exercício (BIE) entre crianças e adolescentes asmáticos, variando entre 40 e 90%, mas que existe uma discordância em relação à resposta positiva dos asmáticos apresentarem o broncoespasmo em 24%. A metabonômica pode ser descrita como uma ferramenta que combina técnicas analíticas e estatísticas multivariada para identificar alterações nas concentrações de perfis metabólitos de um biofluido em resposta a alguma perturbação sofrida no organismo causado por um agente externo. Sendo assim, no presente estudo foram construídos modelos metabonômicos baseados nos dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^1H a partir do condensado do ar exalado fornecido por voluntários, visando identificar a asma e BIE em crianças e adolescentes. O estudo contou com 49 indivíduos, sendo 37 com diagnóstico positivo para asma e 12 negativos. Dentre os 37 asmáticos, 27 tiveram diagnóstico positivo para o BIE e 10 negativos. Três modelos foram construídos para (1) diagnóstico de asma utilizando as 49 amostras; (2) diagnóstico de BIE, independente da incidência de asma, com as 49 amostras; e (3) diagnóstico de BIE, utilizando apenas amostras de indivíduos asmáticos. Em todos os modelos foi utilizado o formalismo Análise Discriminante Linear com cinco variáveis discriminantes, com as figuras de mérito extraídas após a validação cruzada. Para o diagnóstico de asma, o modelo classificou corretamente 89,9% os grupos. Para o diagnóstico de BIE, independente da ocorrência de asma, o modelo classificou corretamente 77,5% das amostras. Finalmente, para o diagnóstico BIE, em indivíduos asmáticos, o modelo teve uma predição de 83,8%. Assim sendo, a estratégia metabonômica mostrou-se promissora para o diagnóstico de asma e de BIE entre asmáticos. Também foi possível identificar as regiões espectrais mais importantes para a discriminação.

Palavras-chave: asma; broncoespasmo induzido por exercício; condensado do ar exalado; RMN; metabolômica.

ABSTRACT

Asthma is a disease that affects approximately 19% of the children and adolescents' population in Brazil. This number goes to 16% in Latin America, and it is 14% worldwide. There are reports that indicate a high prevalence of exercise-induced bronchospasm (EIB) among asthmatic children and adolescents, varying between 40 and 90%, but there is a disagreement regarding the positive response of asthmatics to bronchospasm in 24%. Metabonomics can be described as a tool that combines multivariate analytical and statistical techniques to identify changes in the concentrations of metabolic profiles of a biofluid in response to some disturbance in the body caused by an external agent. Thus, in the present study were constructed metabonomic models based on spectral data of ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) from the exhaled breath condensate provided by volunteers to identify asthma and EIB in children and adolescents. The study was consisted of 49 individuals, whom 37 had positive diagnoses for asthma and 12 negatives. Of the 37 asthmatics, 27 had a positive diagnosis for EIB and 10 negatives. Three models were constructed for (1) diagnosis of asthma using the 49 samples; (2) diagnosis of EIB, regardless of the incidence of asthma, with the 49 samples; and (3) diagnosis of EIB, using only samples from asthmatic individuals. In all models, the Linear Discriminant Analysis formalism was used with five discriminant variables, with the merit figures extracted after the cross validation. For the diagnosis of asthma, the model correctly classified 89.9% of the groups. For the diagnosis of EIB, regardless of the occurrence of asthma, the model correctly classified 77.5% of the samples. Finally, for the EIB diagnosis, in asthmatic subjects, the model had an accuracy of 83.8%. Thus, the metabonomic strategy was promising for the diagnosis of asthma and EIB among asthmatics. It was also possible to identify the most important spectral regions for discrimination.

Keywords: asthma; exercise-induced bronchospasm; exhaled breath condensate; NMR; metabolomic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação da diferença de um pulmão saudável e um com asma.	14
Figura 2 –	Regiões espectrais onde são observados os sinais para alguns núcleos (grupos) no espectro de RMN de ¹ H.	19
Figura 3 –	Espectro de RMN de ¹ H (CAE, 400 MHz) obtido usando a sequência WET para supressão do sinal da água.	21
Figura 4 –	Ilustração do equipamento utilizado na coleta do CAE. Em A, tem-se a conexão onde o voluntário coloca a boca; em B, tem-se uma válvula unidirecional, que evita a passagem de saliva e o retorno do ar exalado. O ar passa pelo banho de gelo, onde é condensando.	27
Figura 5 –	Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos.	29
Figura 6 –	Representação de espectros de RMN de ¹ H da saliva (a) e condensado do ar exalado (b) do grupo controle.	31
Figura 7 –	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz D ₂ O) excluída a região entre 4 e 6,5 ppm da amostra 01.	32
Figura 8 –	Espectro de RMN ¹ H obtido a 400 MHz das amostras 01 e 03 de asmáticos positivo e negativo para BIE, respectivamente, após passar por processamento manual no MestReNova 12.0.	33
Figura 9 –	Distribuição das amostras em cada grupo. BIE - Broncoespasmo Induzido por Exercício	34
Figura 10 –	Panorama das duas primeiras PCs, reunindo 82,9% da variância para Asma (à esquerda), e 84,6% para BIE (à direita). Legenda: Bolinhas verdes, positivo para asma/BIE; bolinhas vermelhas, negativo para asma/BIE.	34
Figura 11 –	Panorama PLSA-DA para Asma (à esquerda) e para BIE (à direita). Legenda: Bolinhas verdes, positivo para asma/BIE; bolinhas vermelhas, negativos para asma/BIE.	35
Figura 12 –	Panorama OPLSA-DA para Asma (à esquerda) e para BIE	35

- (à direita). Legenda: Bolinhas verdes, positivo para asma/BIE; bolinhas vermelhas, negativos para asma/BIE.
- Figura 13 – Modelo LDA – gráfico de valores preditos versus valores observados. Em vermelho, as amostras que foram classificadas no grupo errado. 37
- Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H (CAE, 400 MHz) da amostra 01. 40
- Figura 15 – LDA – gráfico de valores preditos versus valores observados para o MM2 (diagnóstico de BIE), independente da presença de asma. 42
- Figura 16 – LDA – gráfico de valores preditos versus valores observados - diagnóstico de BIE entre asmáticos. 44
- Figura 17 – Zoom dos espectros de RMN de ^1H da Amostra 50 sem e com a adição do ácido acético, respectivamente, comparando o aumento da intensidade do sinal do acetato em δ 1.91 ppm. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isótopos com seus respectivos números de spins, I, e abundância isotópica natural.	17
Tabela 2 – Matriz de classificação do modelo metabonômico I (LDA, 5 variáveis, 49 amostras)	36
Tabela 3 – Matriz de classificação do modelo metabonômico II (LDA, 5 variáveis, 49 amostras)	41
Tabela 4 – Matriz de classificação do modelo metabonômico III (LDA, 5 variáveis, 37 amostras)	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	<i>Asthma Control Test</i>
BIE	Broncoespasmo Induzido por Exercício
CAE	Condensado do Ar Exalado
DA	do inglês <i>Discriminants Analysis</i>
FeNO	Fração Exalada de Óxido Nítrico
GARD	Aliança Global Contra Doenças Respiratórias
HEV	Hiperventilação Eucápnica Voluntária
LDA	do inglês <i>Linear Discriminants Analysis</i>
LOOCV	do inglês <i>Leave-One-Out Cross Validation</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLS-DA	do inglês <i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PCA	do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	do inglês <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
SNV	<i>Standard Normal Variate</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TALE	Termo de Assentimento Livre Esclarecido
VEF ₁	Volume Espiratório Forçado no primeiro segundo
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	ASMA E BRONCOESPASMO INDUZIDO POR EXERCÍCIO (BIE)	15
2.2	METABONÔMICA	16
2.3	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	17
2.4	QUIMIOMETRIA	22
2.4.1	Análise Discriminante Linear (LDA)	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	GERAIS	25
3.2	ESPECÍFICOS	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	RECRUTAMENTO DOS PACIENTES	26
4.1.1	Crítérios de Inclusão e Exclusão	26
4.1.2	Intervenções Realizadas	27
4.2	COLETA DAS AMOSTAS DE CONDENSADO DO AR EXALADO (CAE)	28
4.3	ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR RMN	28
4.4	TRATAMENTO DOS ESPECTROS	29
4.5	CONSTRUÇÃO DA MATRIZ E ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	MODELO I	37
5.2	MODELO II	42
5.3	MODELO III	44
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO	55
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)	62
	ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)	66
	ANEXO D - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TALE)	70

1 INTRODUÇÃO

Em 2006 a Organização Mundial da Saúde (OMS) fundou a Aliança Global Contra Doenças Respiratórias Crônicas (GARD) com o intuito de agregar conhecimentos no mundo todo para a melhoria de vida dos milhões de indivíduos afetados por estas enfermidades. Dentre as doenças crônicas respiratórias, a asma tem sido uma das mais comuns, atingindo 14% das crianças em todo mundo (*Forum of International Respiratory Societies*, 2017). Segundo o *Global Asthma Report* (2018), estima-se que 339.4 milhões de pessoas no mundo são afetadas por alguma enfermidade do trato respiratório.

Como o pulmão é um órgão bastante vulnerável ao ambiente externo, vários fatores podem provocar ou até agravar uma crise asmática, tais como exposição à poeira, fumaça, pólen e partículas em geral, aos ácaros, fungos, vírus e organismos invasores infecciosos, mudanças climáticas, produtos químicos etc. Geneticamente, os fatores que podem desencadear a asma são histórico familiar, rinite e obesidade (BRASIL, 2019). Pessoas obesas são mais propensas a asma (ARTEAGA-SOLIS, 2013).

Em casos muito raros e extremos, a asma pode levar ao óbito. No Brasil, o número de mortes tem sido superior a dois mil casos por ano. Este número tem caído com o aumento das taxas de internação, exceto em áreas desassistidas na região do Nordeste, sendo a quarta maior causa de internamentos hospitalares no país (*Global Asthma Report*, 2018). Ademais, a asma não tem cura, mas o Sistema Único de Saúde (SUS) fornece tratamento gratuito desde 2011 para o seu controle (BRASIL, 2019).

Durante a crise asmática, existe a necessidade de ajuda (ventilação), devido à dificuldade de respirar e a capacidade reduzida de realizar atividade física (BRASIL, 2019). Isto porque os sintomas da asma geralmente estão associados a uma broncoconstrição e o exercício físico é um desencadeante conhecido do broncoespasmo. Ao realizar um exercício físico, o indivíduo asmático pode apresentar um estreitamento transitório das vias aéreas, o Broncoespasmo Induzido por Exercício (BIE).

A ocorrência do BIE é maior em pessoas clinicamente diagnosticadas com asma, chegando a 50% de incidência entre jovens asmáticos (CORREIA JR. et al., 2012). Estudos mostram que tem sido muito relatado em atletas de elite e recrutas

militares (RUNDELL et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2012; SINCLAIR, 1995). Isto porque o tipo de exercício, intensidade e duração que estas pessoas realizam são fatores que influenciam no episódio de BIE.

Por ser considerado atualmente um grande problema na saúde pública devido ao aumento da prevalência, especialmente em crianças, tem-se a importância de um diagnóstico e tratamento adequado. O diagnóstico precoce também é importante para reduzir a exposição aos elementos estimulantes e agravantes da asma. Recentemente, a disponibilidade de técnicas não invasivas, como a análise do Condensado do Ar Exalado (CAE) por ressonância magnética nuclear (RMN), cria oportunidades de averiguar e monitorar as inflamações das vias respiratórias. O foco é o desenvolvimento de um modelo diagnóstico com uma abordagem centrada nos metabólitos gerados por um tipo de doença.

A metabonômica une os dados de uma ferramenta analítica com dados clínicos e estatísticas multivariadas para encontrar mudanças nas concentrações de metabólitos em um dado biofluido e conectar essas mudanças às perturbações que um organismo vivo experimentou, seja essa mudança devido a um estímulo fisiopatológico ou alteração genética (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Portanto, desde que o biofluido adequado seja usado e as informações sejam extraídas corretamente, ela pode detectar qualquer doença no organismo. O objetivo da metabonômica é encontrar padrões de alterações que ocorrem como resultado de estímulos ou modificações no sistema em estudo.

Com o progresso da metabonômica, o interesse por pesquisas de doenças do trato respiratório vindo crescendo, podendo-se utilizar a metabonômica para o diagnóstico de diversas doenças respiratórias como a fibrose cística pulmonar (MONTUSCHI et al., 2011), doenças relacionadas a pessoas fumantes (LAURENTIIS et al., 2013), doença pulmonar obstrutiva crônica (NOBANKHT et al., 2014) e asma (SINHA et al, 2017; CARRARO et al, 2007). Para o BIE ainda não há dados na literatura com a metabonômica, sendo este presente trabalho algo inédito.

As ferramentas analíticas para classificação e diagnóstico clínico com altos valores de predição e minimamente invasivo vêm sendo cada vez mais requisitadas. A metabonômica entraria como uma técnica que visa diagnosticar indivíduos de possuem uma determinada doença com o mínimo de exposição a riscos e que não exige uma periodicidade e muitos retornos do paciente.

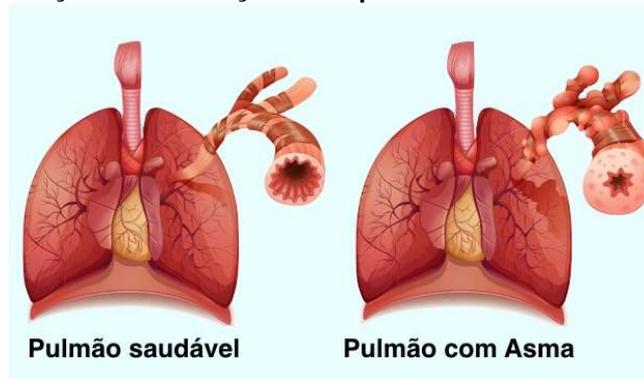
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASMA E BRONCOESPASMO INDUZIDO POR EXERCÍCIO (BIE)

A asma é uma doença crônica respiratória caracterizada pela inflamação das vias aéreas. As principais características são eventos periódicos, chiado no peito, dificuldade de respirar, pressão torácica e tosse que são comumente associadas a uma broncoconstrição e restrição do fluxo aéreo. Estes sintomas pioram particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã. Os episódios podem ser desencadeados em resposta à exposição ambiental, mudanças climáticas, à prática de atividade física e exposição à alérgenos (HUSAIN, 2010).

Pessoas com asma apresentam o calibre dos brônquios reduzidos. A **Figura 1** ilustra como são os brônquios de um pulmão saudável e um pulmão com asma. As células que atuam na resposta inflamatória são, em particular, linfócitos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais (HUSAIN, 2010).

Figura 1 – Representação da diferença de um pulmão saudável e um com asma.



Fonte: Ministério da Saúde (2019).

Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/asma>. Acesso em: julho de 2019.

O diagnóstico da asma é principalmente o clínico, feito a partir da consulta e avaliação do médico, mas também pode ser confirmado por exame físico e de função pulmonar (espirometria) (BRASIL, 2019). O teste físico caracteriza-se por exercícios controlados, podendo ser corrida em esteira ou livre, ou ainda por estímulos substitutivos, como a hiperventilação eucápnica voluntária (HEV) ou por meio de inalação de soluções hiperosmolares como técnica de provocação alternativa ao exercício.

Como já citado na introdução, o exercício físico é um desencadeador do broncoespasmo. No teste físico, é medido o Volume Expiratório Forçado no primeiro

segundo (VEF_1). Quando a queda do VEF_1 medido após o exercício for superior a 10% do que antes do teste, o indivíduo é diagnosticado com BIE (PARSONS, et al., 2013). Isto ocorre porque há ressecamento na superfície das vias aéreas durante a hiperventilação devido ao aumento na osmolaridade do muco. Com o desequilíbrio osmótico, as células que atuam na resposta inflamatória liberam mediadores que induzem o broncoespasmo e secreção do muco (ANDERSON, DAVISKAS, 2000; PARSONS, et al., 2013).

Para um melhor diagnóstico, o teste precisa ser repetido para o caso de falso negativo. Levando em consideração que o diagnóstico de BIE pode não ser preciso devido aos fatores relacionados ao exercício. O presente trabalho apresenta a estratégia Metabonômica como alternativa para o diagnóstico de asma e BIE, usando amostras de condensado do ar exalado pelo paciente. Algumas vantagens podem ser elencadas com essa estratégia, tais como: ser uma técnica não-invasiva; não expor o paciente aos riscos associados a uma atividade física exaustiva; não precisar da presença de um profissional da saúde (médico) durante o ensaio; e, com uma única medida, ter o diagnóstico para asma e BIE.

2.2 METABONÔMICA

A metabonômica surgiu no final dos anos 1990, sendo definida como “a medida quantitativa da resposta metabólica, multiparamétrica, dinâmica, de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética. Seu princípio se baseia na homeostase, ou seja, o processo através do qual um sistema vivo conserva seu estado de equilíbrio. Este processo está diretamente ligado à concentração dos metabólitos envolvidos no sistema em estudo, o biofluido (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

Na medicina, esta técnica tem sido bastante empregada para diversos sistemas biológicos em estudo (DONA et al, 2014; GRATTON et al, 2016) visando diagnósticos, prognósticos e compreensão da fisiopatologia de doenças (GIKA et al, 2014). Um biofluido que tem se mostrado promissor na Metabonômica, para doenças do trato respiratório, é o condensado do ar exalado (CAE) (PRIEGO-CAPOTE, 2019). Há relatos de estudos com resultados de diagnósticos de doenças respiratórias como asma em crianças e jovens via CAE (SINHA et al, 2017;

CARRARO et al, 2007), doença pulmonar obstrutiva crônica (BERTINI et al, 2014) e fibrose cística (MONTUSCHI et al., 2011).

O CAE é um biofluido constituído essencialmente por água e uma baixa concentração de metabólitos, compostos voláteis e não voláteis. É obtido a partir do resfriamento da respiração expirada, e a avaliação deste material tem sua importância por ser uma avaliação não invasiva das vias aéreas, quando comparado com o padrão ouro como o lavado broncoalveolar e a biópsia endobrônquica, (BANNIER et al, 2019; Hospital Sírio-Libanês, 2019).

A Metabonômica busca uma análise global, que visa compreender as mudanças em um sistema provocado por um agente externo, associando ferramentas analíticas e formalismos de estatística multivariada para um diagnóstico (ou prognóstico) clínico. Uma das ferramentas analíticas mais empregadas na Metabonômica é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, uma técnica não seletiva, pois analisa de forma simultânea os metabólitos endógenos presente no biofluido, gerando uma impressão digital, um padrão ou perfil metabólico para uma determinada resposta do organismo ao agente externo.

Na asma, por exemplo, os trabalhos publicados tiveram como objetivo discriminar indivíduos com e sem asma, utilizando a espectroscopia de RMN e o CAE. Os modelos metabonômicos se mostraram eficazes, com acertos de classificação da ordem de 86% para crianças e 80% para adolescentes (SINHA et al, 2017; CARRARO et al, 2007). Além disso, com as mesmas ferramentas e material de análise, foi possível avaliar os fenótipos envolvidos na discriminação. A técnica também não demanda de uma preparação prévia muito elaborada da amostra, sendo praticamente analisada *in natura*, além de não ser destrutiva (BARALDI, et al., 2009).

2.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de RMN é uma técnica capaz de fornecer dados a respeito da estrutura e dinâmica das moléculas a partir da interação delas, na presença de um campo magnético externo, com a radiação eletromagnética. Descoberta por Purcell e Bloch, em 1946 (MLYNARIK 2016), a RMN é possível porque se pode associar ao núcleo atômico um momento magnético e um número quântico de spin (I), que, quando diferente de 0 (zero), permite a observação por RMN. Quando o

número de massa (A) e/ou o número atômico é ímpar, o I é diferente de zero. A **Equação 1** apresenta a relação entre o momento magnético (μ) e o spin nuclear (I).

$$\mu = \frac{h\gamma}{2\pi} \cdot I \quad \text{Equação 1}$$

Sendo h é a constante de Planck, e γ é a constante magnetogírica, que é uma característica física única para cada núcleo, dada pela razão do momento magnético nuclear pelo seu momento angular, podendo admitir valores positivos e negativos (ATKINS, 2006).

O momento angular só pode assumir certos valores quantizados, sendo expressos em número quântico de momento angular. O número de estados de spin possíveis é dependente no número quântico de spin (I), segundo a expressão $2I + 1$. Portanto, se I for igual a 0 (zero), apenas um estado de spin é possível e, conseqüentemente, não é possível observar esse núcleo por espectroscopia de RMN (NASCIMENTO, 2001). A **Tabela 1** apresenta exemplos de isótopos observáveis por RMN com seus números quânticos de spin, abundância isotópica e constante magnetogírica.

Tabela 1 – Isótopos com seus respectivos números de spins, I , e abundância isotópica natural.

Isótopo	^1H	^2H	^{13}C
I	1/2	1	1/2
Abundância (%)	99,8	0,015	1,1
γ ($10^{-7}\text{rad}\cdot\text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$)	26,752	4,107	6,728

Fonte: Paiva (2010).

Quando estes núcleos com I não nulos são imersos em um campo magnético externo B_0 , o momento magnético do núcleo interage com o B_0 (interação de Zeeman) se alinhando ao sentido do campo de forma paralela ou antiparalela, dando origem a $2I + 1$ estados degenerados de energia. Se, por exemplo, núcleos de ^1H que possuem spin $1/2$ forem submetidos a um campo magnético externo, dois estados de energia são observados: um de mais baixa energia podendo ser chamado de α e um de mais alta energia, denominado β . A diferença de energia entre estes dois estados do spin depende da força do campo. Quanto maior a intensidade do campo, maior será a separação entre os estados e maior será a sensibilidade do espectrômetro (PAVIA, 2010). A diferença de energia em função do

campo aplicado pode ser determinada usando a equação (2), denominada de Equação Fundamental da RMN:

$$\Delta E = E_{\alpha} - E_{\beta} = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Equação 2}$$

A espectroscopia de RMN é de grande importância para elucidação estrutural, sobretudo, na química orgânica. A frequência de ressonância dos núcleos é dependente do campo externo, B_0 . Para evitar problemas ao tentar comparar espectros de mesmas espécies obtidos usando diferentes intensidades de campo (diferentes aparelhos de RMN), foi criada uma escala independente chamada de deslocamento químico (δ). O deslocamento químico é dado pela razão da diferença entre as frequências de ressonância do núcleo de interesse e da referência pela frequência de ressonância da referência. Como a diferença entre as frequências de ressonância é da ordem de Hz e a frequência de ressonância da referência é dada em MHz, utiliza-se um fator de 10^6 , obtendo o deslocamento químico em partes por milhão (ppm) como mostra a equação (3). Desta forma, o deslocamento químico para um dado núcleo será sempre o mesmo, independente do aparelho de ressonância (PAVIA, 2010).

$$\delta = \frac{\nu_i - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \quad \text{Equação 3}$$

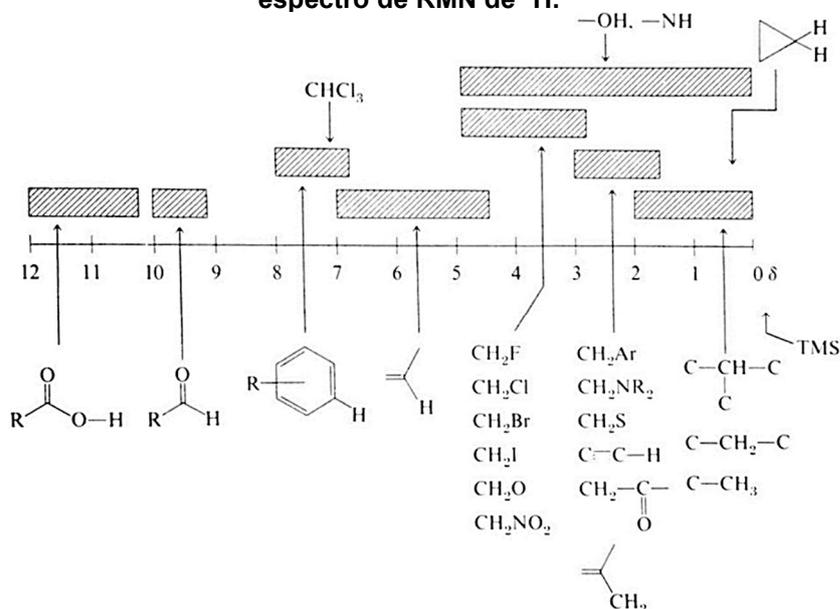
A frequência de ressonância dos núcleos não depende apenas do campo externo. O ambiente químico muda, ligeiramente, a frequência de ressonância dos núcleos. Essa mudança é chamada de deslocamento químico e está associada à maior ou menor densidade eletrônica sobre o núcleo. O deslocamento químico é o quanto a frequência de ressonância se afasta, em função do ambiente químico, da frequência calculada considerando apenas o campo externo. Para isso, utiliza-se sempre um padrão. No caso da RMN de ^1H e ^{13}C , utiliza-se, comumente, o TMS (tetrametil silano). No espectro de RMN, na horizontal é fornecido o deslocamento químico, em partes por milhão (ppm), e na vertical, a intensidade dos sinais (PAVIA, 2010).

Os elétrons de valência dos átomos vizinhos ao núcleo de interesse sofrem o efeito do campo magnético externo também, sendo forçados a circular, ocasionando uma corrente diamagnética local devido a este fluxo de elétrons. Este fluxo de corrente gera um campo magnético induzido secundário em direção oposta ao campo externo. Este campo causa uma blindagem diamagnética nos núcleos, chamada de anisotropia magnética. Quanto maior a densidade eletrônica de grupos

vizinhos ao redor do núcleo, mais blindado ele será. Da mesma forma, se o grupo vizinho for um substituinte eletronegativo, ele vai retirar densidade eletrônica de valência ao redor do núcleo, desblindando-o (PAVIA, 2010).

No espectro de RMN de ^1H , núcleos fortemente blindados apresentam-se mais à direita, com um deslocamento químico menor. Enquanto núcleos mais desblindados aparecem mais à esquerda do espectro, apresentando um deslocamento químico maior (PAVIA, 2010). A **Figura 2** apresenta regiões de deslocamentos químicos esperados para diferentes núcleos de ^1H .

Figura 2 – Regiões espectrais onde são observados os sinais para alguns núcleos (grupos) no espectro de RMN de ^1H .



Fonte: Pavia (2010).

A espectroscopia de RMN faz-se importante porque nem todos os núcleos de uma mesma espécie química possuem exatamente a mesma frequência. Prótons que possuem ambientes químicos (e magnéticos) idênticos dentro de uma espécie química possuem o mesmo deslocamento químico, pois são quimicamente equivalentes. Isto também vale para moléculas simétricas em relação a um eixo. No entanto, núcleos que não são quimicamente equivalentes terão deslocamentos químicos distintos. O deslocamento químico pode sofrer variação em função tanto do ambiente químico, como também devido à concentração, temperatura e solvente (PAVIA, 2010).

Os sinais no espectro de RMN não fornecem somente os tipos de núcleos presentes, mas também a quantidade, pois a área de integração sob cada pico, se as condições experimentais forem ajustadas para isso, é proporcional ao número de prótons na molécula. Núcleos que possuem spin $1/2$ não apresentam momento quadrupolar (o que provoca um alargamento dos sinais), o que possibilita obtenção de espectros bem resolvidos e largura de linhas discretas (PAVIA, 2010).

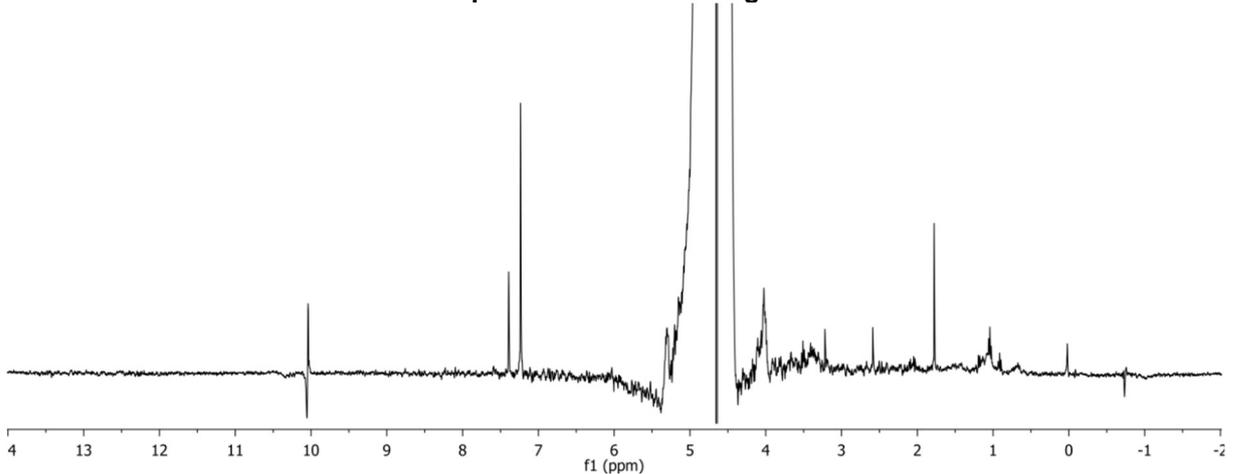
Outra informação importante que pode ser extraída do espectro está associada à multiplicidade do sinal. Este fenômeno ocorre porque o núcleo interage (acopla) com os núcleos vizinhos a ele. Esses núcleos vizinhos causam uma mudança na região espectral onde esse sinal seria observado. Essa mudança depende, dentre outros fatores, do spin nuclear, da abundância isotópica natural desse núcleo e do número de núcleos vizinhos. Portanto, isto resulta na multiplicidade do sinal, que obedece a regra $2n+1$. Ou seja, se o núcleo de ^1H está vizinho a dois outros núcleos de ^1H , seu sinal apresenta-se no espectro como um tripleto ($2 \times 2(1/2) + 1 = 3$), e a área de integração deste tripleto terá valor 1 (PAVIA, 2010).

O núcleo de ^1H apresenta as melhores propriedades para estudos de RMN, pois sua abundância natural é quase 100%, seu spin tem valor $1/2$ não apresentando momento quadrupolar, tem a maior constante magnetogírica e, quando se trata de amostras biológicas, é o núcleo mais encontrado em sistemas orgânicos. Essas informações são importantes para identificar os compostos presentes nas amostras biológicas analisadas e, em última instância, identificar os metabólitos presentes no biofluido analisado e correlacioná-los com o status bioquímico dos voluntários que forneceram as amostras. Entretanto, amostras biológicas são constituídas principalmente de água, com isso, tem-se um sinal bastante intenso e alargado no espectro que pode ir de δ 4 a 6 ppm, fazendo-se necessário “suprimir” este sinal (BECKONERT, 2007).

Como o sinal da água é muito pronunciado quando comparado aos demais componentes na amostra, estes últimos têm sua observação dificultada. Assim, foram desenvolvidas sequências de pulsos para possibilitar a observação destes compostos em menor concentração. Dentre eles temos o PRESAT, WET e WATERGATE (BECKONERT, 2007).

A WET é uma sequência de pulso de rádio frequência que utiliza pulsos de gradiente de campo, que provoca a supressão do sinal de interesse. No caso, o sinal atribuído à água (SMALLCOMBE,1995). A **Figura 3** apresenta um exemplo de espectro de RMN de ^1H , utilizando da sequência WET.

Figura 3 – Espectro de RMN de ^1H (CAE, 400 MHz) obtido usando a sequência WET para supressão do sinal da água



Fonte: A autora (2019).

Entretanto, apesar da RMN ser eficiente para elucidação estrutural, identificação de metabólitos, os espectros obtidos de uma matriz biológica geralmente possuem informações sobrepostas, tornando a interpretação confusa. Para extrair o máximo de informação química a partir de análise de dados, a metabonômica faz uso de ferramentas de análise multivariada, denominada de Quimiometria.

2.4 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é um campo na química que se utiliza da matemática e estatística para extrair informações a partir de dados químicos. A rigor, são três os campos de atuação da Quimiometria: (a) planejamento e otimização de experimentos; (b) reconhecimento de padrões; e (c) calibração multivariada (NETO et al., 2002). Em sistemas multivariados, o cálculo estatístico multivariado é o que fundamenta os modelos metabonômicos.

Como a RMN das amostras são sistemas multivariados, faz-se necessário de tratamentos quimiométricos para extrair a informação que é a impressão digital da

perturbação sofrida pelo sistema. A análise multivariada voltada para o reconhecimento de padrões pode ser dividida em técnicas supervisionadas e não supervisionadas. As supervisionadas são as que se utilizam de informações de classe para que, através da calibração, predição e validação, possibilite a construção de modelos estatísticos para discriminar grupos. (BRERETON, 2013).

A análise de discriminantes (DA, do inglês *Discriminants Analysis*) é uma ferramenta utilizada quando a variável de resposta é uma variável de classe. Como o objetivo deste trabalho trata-se de um diagnóstico, tendo a variável de classe sendo positivo ou não para uma determinada doença, a DA é empregada para o reconhecimento de padrão no desenvolvimento de modelos de classificação neste diagnóstico (FERREIRA, 2015).

Atualmente, existem vários formalismos disponíveis que permitem a identificação das variáveis que mais se sobressaem na discriminação das classes. Dentre elas, temos o formalismo adotado no estudo, a LDA (do inglês *Linear Discriminants Analysis*).

2.4.1 Análise Discriminante Linear (LDA)

A LDA se baseia em buscar uma ou mais funções lineares discriminantes que permitam promover uma máxima separação espacial entre os grupos e uma mínima separação intra-grupo, projetando os dados de grandes dimensões em planos menores, selecionando a direção de máxima separação. No estudo aqui apresentado, busca-se promover uma máxima separação entre as classes de indivíduos asmáticos e de voluntários sem asma, e minimizar a separação dentro das classes, onde as classes seguem uma distribuição normal e são linearmente espaçáveis (BRERTON, 2013).

Para a LDA, a hipótese admitida é que as amostras do grupo doença tenham um grau de similaridade que permita uma discriminação de amostras do grupo controle, pois a análise presume características intrínsecas ao grupo. Sendo assim, as variáveis devem seguir distribuição normal, as matrizes devem apresentar certa homogeneidade e devem-se excluir amostras anômalas. A seleção dessas variáveis é coordenada por testes estatísticos, como por exemplo, o lambda de Wilks (FERREIRA, 2015).

A função linear discriminante é matematicamente expressa por:

$$k(x) = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \dots + a_nx_n = 0 \quad \text{Equação 4}$$

Esta função cria um plano de classificação, no qual as amostras de uma classe sejam segregadas de um lado da superfície, agrupando as amostras da outra classe do outro lado do plano. Na equação, $k(x)$ representa a variável dependente, a_n são os coeficientes discriminantes para cada variável e x_n as variáveis elucidativas do formalismo LDA (FERREIRA, 2015).

O valor de $k(x)$ varia entre zero e um. Se para a classe de doentes for atribuído o valor 1, resultando em positivo para asma, por exemplo, amostras que tiverem valores de $k(x)$ maiores que 0,5 serão classificadas como doentes, sendo dispostas acima do plano. Consequentemente, amostras com valores de $k(x)$ menor que 0,5 serão classificadas como controle, agrupando-se abaixo do plano. (FERREIRA, 2015).

A Equação 1 que resulta na superfície discriminante é uma consequência da combinação linear das variáveis que predizem e melhor delimitam a LDA. Em relação à escolha das variáveis, o lambda de Wilks (Λ) é o mais empregado, permitindo a investigação da presença da variedade de médias entre as classes para cada variável. A Equação 5 expressa o valor do Λ , que pode variar de 0 a 1.

$$\Lambda = \frac{SQ_{dg}}{SQT} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo SQ_{dg} é a soma quadrática dos erros dentro do grupo, e SQT é a soma quadrática residual total. O conjunto de variáveis que predizem o modelo é selecionado em função do Λ e deve ser o menor possível, pois se busca minimizar o erro dentro do grupo. Isso diminui a razão (o lambda).

Com isso, a hipótese admitida é que a asma, bem como o broncoespasmo induzido por exercício, altera o perfil de metabólitos endógenos presentes no condensado do ar exalado, tornando-se possível a discriminação entre amostras analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , seguida da aplicação de métodos quimiométricos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Construir modelos metabonômicos, a partir de espectros de RMN de ^1H , de amostras de condensado do ar exalado, para o diagnóstico de asma e de broncoespasmo induzido por exercício (BIE), entre aqueles que têm o diagnóstico de asma.

3.2 ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições analíticas para obtenção de espectros de RMN de ^1H de amostras de condensado de ar exalado (CAE);
- Investigar quais formalismos de estatística multivariada são mais adequados para a construção dos modelos metabonômicos desejados;
- Identificar as variáveis discriminantes e fazer atribuição desses sinais;

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado numa parceria entre o serviço de pneumologia do Hospital das Clínicas onde foram coletadas as informações clínicas, antropométricas e realizados os testes de função pulmonar, medidas da fração exalada de óxido nítrico, coleta dos condensados do ar exalado e as técnicas de broncoprovocação para determinação do BIE, e no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram coletados os dados espectrais e construídos os modelos metabonômicos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE sob o número do parecer: 2.794.049, 2018 (ANEXO A).

4.1 RECRUTAMENTO DOS PACIENTES

Foram selecionadas 49 crianças e adolescentes voluntárias de ambos os sexos com idade entre 10 e 20 anos (pois seriam capazes de realizar a manobra de hiperventilação), diagnosticados por médico assistente especialista, provenientes do ambulatório especializado de Pneumologia e de Alergologia do Hospital das Clínicas da UFPE e sem tratamento regular nas últimas quatro semanas.

Para que pudessem participar da pesquisa, os objetivos e procedimentos metodológicos foram explicados em linguagem acessível aos pais ou responsáveis e voluntários, sendo solicitado, também, o consentimento formalizado na assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) pelos pais ou responsáveis dos indivíduos para menores de 18 anos e pelos indivíduos para maiores de 18 anos, disponíveis nos ANEXO B e C, respectivamente. Para os indivíduos com idade de 10a 20 anos foi solicitada, também, a assinatura do Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE), disponível em ANEXO D.

4.1.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

4.1.1.1 Inclusão

Participaram do estudo, crianças e adolescentes com diagnóstico de asma com idade entre 10 e 20 anos, residentes na Região Metropolitana do Recife. Os voluntários estudados tiveram o diagnóstico de asma dado por médicos especialistas dos referidos ambulatórios e controle da asma classificado de acordo com os critérios do *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2017).

4.1.1.2 Exclusão

Foram excluídos pacientes em tratamento regular para a asma nas últimas quatro semanas, aqueles com histórico de exacerbação de asma ou sintomas de infecção aguda de vias aéreas no mesmo período. Foram excluídos, também, pacientes com asma não controlada com escore no questionário *Asthma Control Test* adaptado para a língua portuguesa (ACT) menor que 16 (ROXO et al., 2010), com VEF₁ basal menor que 60% do valor teórico previsto, aqueles incapazes de realizar as manobras necessárias para a espirometria, a hiperventilação eucápnica voluntária ou coleta do condensado do ar exalado.

4.1.2 Intervenções Realizadas

Após os procedimentos de avaliação inicial dos critérios de inclusão e exclusão (inclusive com a execução da espirometria), deu-se prosseguimento à coleta da assinatura dos termos de consentimento e assentimento. Na sequência, os voluntários foram submetidos à avaliação antropométrica e responderam ao questionário *Asthma Control Test* (ACT), versão validada para o Brasil (ROXO et al., 2010) e, em seguida, foram coletados 10 mL de sangue, realizados os testes alérgicos cutâneos e agendado um outro dia para realização dos demais procedimentos.

No segundo dia de participação, os indivíduos selecionados foram convidados para executar a manobra de expiração lenta para a avaliação do óxido nítrico, seguindo-se a coleta do condensado do ar exalado (CAE) e depois a espirometria para determinação do valor do VEF₁ basal que visa evitar possíveis alterações produzidas pelas manobras de expiração forçada da espirometria na medida da fração exalada de óxido nítrico (ATS/ERS, 2005.) e no CAE (HORVÁTH, et al., 2017).

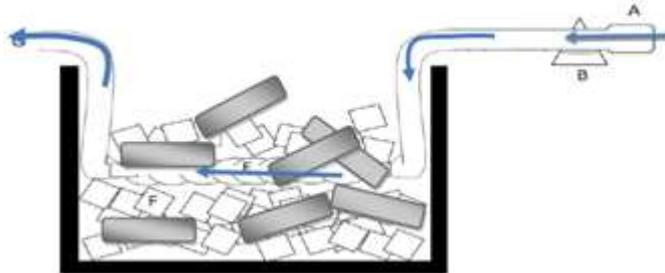
Em seguida, foi realizada a técnica de broncoprovocação por hiperventilação eucápnica voluntária (HEV) e medidas de VEF₁ em 5, 10, 15 e 30 minutos após a broncoprovocação para avaliar a resposta brônquica (BIE). Uma nova coleta do óxido nítrico, e do CAE foram realizadas meia hora após a última manobra de espirometria. O CAE foi congelado em refrigerador a -40° Celsius.

O teste HEV foi repetido entre 24 horas e 72 horas após o primeiro teste para os adolescentes que não apresentaram o BIE no primeiro dia, para confirmar a resposta negativa ao teste de broncoprovocação.

4.2 COLETA DAS AMOSTAS DE CONDENSADO DO AR EXALADO (CAE)

A coleta do CAE foi realizada através da respiração do indivíduo pela boca (com um clipe no nariz) em uma válvula unidirecional acoplada a uma mangueira que passava por um banho de gelo. O ar exalado pelo voluntário foi, então, condensado nesta mangueira e coletado, reservando-o em um frasco pequeno de plástico. Este material era reservado em um freezer a -40°C . O esquema do equipamento utilizado nesta coleta pode ser visualizado na **Figura 4** a seguir:

Figura 4 – Ilustração do equipamento utilizado na coleta do CAE. Em A, tem-se a conexão onde o voluntário coloca a boca; em B, tem-se uma válvula unidirecional, que evita a passagem de saliva e o retorno do ar exalado. O ar passa pelo banho de gelo, onde é condensando.



Fonte: Adaptado (RODRIGUES FILHO, 2019).

4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR RMN

Inicialmente, foi investigado se a amostra de CAE poderia conter resíduos do processo de esterilização do condensador ou do próprio sistema. Nesse sentido, foram obtidos espectros de RMN ^1H utilizando amostras de água destilada, que passou pelo sistema de coleta, funcionando como brancos.

As amostras foram preparadas utilizando-se $630\ \mu\text{L}$ do CAE, $70\ \mu\text{L}$ de solução tampão de fosfato $0,2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,0) e uma gota de D_2O (água deuterada) para um melhor sinal do lock, em um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos usando um espectrômetro de RMN com campo externo igual a 9,0 T, operando a 400 MHz para o núcleo de ^1H . A sequência de pulsos de radiofrequência utilizada para a obtenção dos espectros foi a WET, que faz supressão do sinal da água, empregando os seguintes

parâmetros: janela espectral de 6.410 Hz (16 ppm), tempo de aquisição igual a 1,40 s, tempo de espera igual a 3,0s, pulsos de RF de 90° igual a 10.4 μ s e 160 repetições, em 22°C. Após as análises, o restante das amostras foi devolvido para o grupo do Hospital das Clínicas.

4.4 TRATAMENTO DOS ESPECTROS

O sinal atribuído ao grupo metil do lactato (β CH₃), δ 1,33 ppm, foi utilizado como referência de deslocamento químico (MANISCALCO et al, 2018). Cada espectro foi processado com *linebroadening* igual a 1,0 Hz. Utilizando o Software MestReNova 12.0 (MestrelabResearch S.L.), foram utilizadas as regiões entre 0,5-4,0 ppm e de 6,5-9,0 ppm, excluindo-se a região da água. As linhas de base foram corrigidas automaticamente pelo método de Polinômio de Bernstein e as fases dos espectros foram corrigidas manualmente. Os espectros foram divididos em regiões de mesma largura iguais a 0,04 ppm (bins) (CARRARO et al., 2007), nos intervalos compreendidos entre 0,5-4,0 ppm e de 6,5-9,0 ppm, dando um total de 163 bins.

4.5 CONSTRUÇÃO DA MATRIZ E ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

Uma matriz foi construída com os dados espectrais, de forma que cada linha na matriz representa uma amostra, ou seja, um espectro, enquanto cada coluna é preenchida com a integral do espectro no bin correspondente. Assim, o estudo foi realizado com uma matriz com 49 linhas (número de amostras) e 165 variáveis (163 bins mais as variáveis de classe – Asma e BIE), que foi submetida ao tratamento quimiométrico (**Figura 5**).

Figura 5 – Matriz de bins para construção dos modelos metabonômicos.

	DG53		f _i																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV	AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ	BK	BL	BM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT	BU	BV	BW	BX	BY	BZ	CA	CB	CC	CD	CE	CF	CG	CH	CI	CJ	CK	CL	CM	CN	CO	CP	CQ	CR	CS	CT	CU	CV	CW	CX	CY	CZ	DA	DB	DC	DD	DE	DF	DG	DH	DI	DJ	DK	DL	DM	DN	DO	DP	DQ	DR	DS	DT	DU	DV	DW	DX	DY	DZ	EA	EB	EC	ED	EE	EF	EG	EH	EI	EJ	EK	EL	EM	EN	EO	EP	EQ	ER	ES	ET	EU	EV	EW	EX	EY	EZ	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH	FI	FJ	FK	FL	FM	FN	FO	FP	FQ	FR	FS	FT	FU	FV	FW	FX	FY	FZ	GA	GB	GC	GD	GE	GF	GG	GH	GI	GJ	GK	GL	GM	GN	GO	GP	GQ	GR	GS	GT	GU	GV	GW	GX	GY	GZ	HA	HB	HC	HD	HE	HF	HG	HH	HI	HJ	HK	HL	HM	HN	HO	HP	HQ	HR	HS	HT	HU	HV	HW	HX	HY	HZ	IA	IB	IC	ID	IE	IF	IG	IH	II	IJ	IK	IL	IM	IN	IO	IP	IQ	IR	IS	IT	IU	IV	IW	IX	IY	IZ	JA	JB	JC	JD	JE	JF	JG	JH	JI	IJ	JK	JL	JM	JN	JO	JP	JQ	JR	JS	JT	JU	JV	JW	JX	JY	JZ	KA	KB	KC	KD	KE	KF	KG	KH	KI	KJ	KK	KL	KM	KN	KO	KP	KQ	KR	KS	KT	KU	KV	KW	KX	KY	KZ	LA	LB	LC	LD	LE	LF	LG	LH	LI	LJ	LK	LL	LM	LN	LO	LP	LQ	LR	LS	LT	LU	LV	LW	LX	LY	LZ	MA	MB	MC	MD	ME	MF	MG	MH	MI	MJ	MK	ML	MM	MN	MO	MP	MQ	MR	MS	MT	MU	MV	MW	MX	MY	MZ	NA	NB	NC	ND	NE	NF	NG	NH	NI	NJ	NK	NL	NM	NO	NP	NQ	NR	NS	NT	NU	NV	NW	NX	NY	NZ	OA	OB	OC	OD	OE	OF	OG	OH	OI	OJ	OK	OL	OM	ON	OO	OP	OQ	OR	OS	OT	OU	OV	OW	OX	OY	OZ	PA	PB	PC	PD	PE	PF	PG	PH	PI	PJ	PK	PL	PM	PN	PO	PP	PQ	PR	PS	PT	PU	PV	PW	PX	PY	PZ	QA	QB	QC	QD	QE	QF	QG	QH	QI	QJ	QK	QL	QM	QN	QO	QP	QQ	QR	QS	QT	QU	QV	QW	QX	QY	QZ	RA	RB	RC	RD	RE	RF	RG	RH	RI	RJ	RK	RL	RM	RN	RO	RP	RQ	RR	RS	RT	RU	RV	RW	RX	RY	RZ	SA	SB	SC	SD	SE	SF	SG	SH	SI	SJ	SK	SL	SM	SN	SO	SP	SQ	SR	SS	ST	SU	SV	SW	SX	SY	SZ	TA	TB	TC	TD	TE	TF	TG	TH	TI	TJ	TK	TL	TM	TN	TO	TP	TQ	TR	TS	TU	TV	TW	TX	TY	TZ	UA	UB	UC	UD	UE	UF	UG	UH	UI	UJ	UK	UL	UM	UN	UO	UP	UQ	UR	US	UT	UU	UV	UW	UX	UY	UZ	VA	VB	VC	VD	VE	VF	VG	VH	VI	VJ	VK	VL	VM	VN	VO	VP	VQ	VR	VS	VT	VU	VV	VW	VX	VY	VZ	WA	WB	WC	WD	WE	WF	WG	WH	WI	WJ	WK	WL	WM	WN	WO	WP	WQ	WR	WS	WT	WU	WV	WW	WX	WY	WZ	XA	XB	XC	XD	XE	XF	XG	XH	XI	XJ	XK	XL	XM	XN	XO	XP	XQ	XR	XS	XT	XU	XV	XW	XX	XY	XZ	YA	YB	YC	YD	YE	YF	YG	YH	YI	YJ	YK	YL	YM	YN	YO	YP	YQ	YR	YS	YT	YU	YV	YW	YX	YY	YZ	ZA	ZB	ZC	ZD	ZE	ZF	ZG	ZH	ZI	ZJ	ZK	ZL	ZM	ZN	ZO	ZP	ZQ	ZR	ZS	ZT	ZU	ZV	ZW	ZX	ZY	ZZ
1	Title	Asma	BIÉ	0,04	0,08	0,12	0,159999	0,199999	0,239999	0,279999	0,319999	0,359999	0,399999	0,439998	0,479998	0,519998	0,559998	0,599998	0,639998	0,679998	0,719997	0,759997	0,799997	0,839997	0,879997	0,919997	0,959997	0,999997	1,039997	1,079997	1,119997	1,159997	1,199997	1,239997	1,279997	1,319997	1,359997	1,399997	1,439997	1,479997	1,519997	1,559997	1,599997	1,639997	1,679997	1,719997	1,759997	1,799997	1,839997	1,879997	1,919997	1,959997	1,999997	2,039997	2,079997	2,119997	2,159997	2,199997	2,239997	2,279997	2,319997	2,359997	2,399997	2,439997	2,479997	2,519997	2,559997	2,599997	2,639997	2,679997	2,719997	2,759997	2,799997	2,839997	2,879997	2,919997	2,959997	2,999997	3,039997	3,079997	3,119997	3,159997	3,199997	3,239997	3,279997	3,319997	3,359997	3,399997	3,439997	3,479997	3,519997	3,559997	3,599997	3,639997	3,679997	3,719997	3,759997	3,799997	3,839997	3,879997	3,919997	3,959997	3,999997	4,039997	4,079997	4,119997	4,159997	4,199997	4,239997	4,279997	4,319997	4,359997	4,399997	4,439997	4,479997	4,519997	4,559997	4,599997	4,639997	4,679997	4,719997	4,759997	4,799997	4,839997	4,879997	4,919997	4,959997	4,999997	5,039997	5,079997	5,119997	5,159997	5,199997	5,239997	5,279997	5,319997	5,359997	5,399997	5,439997	5,479997	5,519997	5,559997	5,599997	5,639997	5,679997	5,719997	5,759997	5,799997	5,839997	5,879997	5,919997	5,959997	5,999997	6,039997	6,079997	6,119997	6,159997	6,199997	6,239997	6,279997	6,319997	6,359997	6,399997	6,439997	6,479997	6,519997	6,559997	6,599997	6,639997	6,679997	6,719997	6,759997	6,799997	6,839997	6,879997	6,919997	6,959997	6,999997	7,039997	7,079997	7,119997	7,159997	7,199997	7,239997	7,279997	7,319997	7,359997	7,399997	7,439997	7,479997	7,519997	7,559997	7,599997	7,639997	7,679997	7,719997	7,759997	7,799997	7,839997	7,879997	7,919997	7,959997	7,999997	8,039997	8,079997	8,119997	8,159997	8,199997	8,239997	8,279997	8,319997	8,359997	8,399997	8,439997	8,479997	8,519997	8,559997	8,599997	8,639997	8,679997	8,719997	8,759997	8,799997	8,839997	8,879997	8,919997	8,959997	8,999997	9,039997	9,079997	9,119997	9,159997	9,199997	9,239997	9,279997	9,319997	9,359997	9,399997	9,439997	9,479997	9,519997	9,559997	9,599997	9,639997	9,679997	9,719997	9,759997	9,799997	9,839997	9,879997	9,919997	9,959997	9,999997																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															

Fonte: A autora (2019).

Os dados da matriz acima foram pré-processados usando o *Standard Normal Variate* (SNV) na linha, e o auto escalonamento na coluna, resultando numa matriz final. Na linha, isto consiste em subtrair do valor de cada célula de uma mesma amostra (linha) a média de todos os bins da determinada amostra em todas as variáveis e dividir este valor pelo desvio-padrão da amostra. Na coluna, cada célula de uma mesma variável (coluna) é subtraída da média de todos os bins da determinada coluna e dividido pelo desvio padrão da mesma variável, conforme descrito na **Equação 6**.

$$x = \frac{(x_i - \bar{x})}{s} \tag{Equação 6}$$

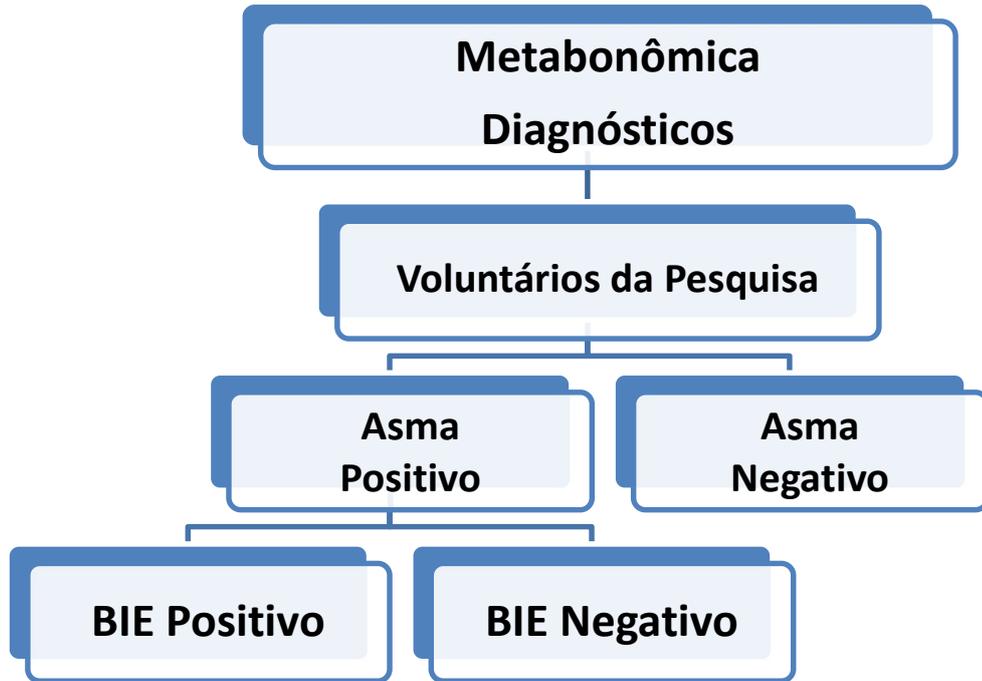
Sendo x é o valor obtido após o SNV (ou auto escalonamento), sendo a intensidade do sinal num determinado deslocamento químic, x_i é a intensidade no espectro original, ou seja, a área de integração da variável i, \bar{x} é a média de x para aquela amostra (ou variável) e s é o desvio-padrão de x na amostra (ou variável).

A matriz final foi submetida à análise exploratória – Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). Posteriormente, partiu-se para os formalismos supervisionados PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis* e OPLS-DA do inglês, *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*. Esses ensaios – PCA, PLS-DA e OPLS-DA - foram realizados na plataforma online MetaboAnalyst 4.0. Por fim, os dados foram submetidos ao formalismo LDA, por meio do software Statística 10.0. Na LDA, os modelos foram construídos usando cinco variáveis, selecionados a partir do lambda de Wilks. Os

modelos foram validados usando o LOOCV (do inglês *Leave-One-Out Cross Validation*). Foram calculados os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), sensibilidade e especificidade de cada modelo após validação cruzada.

O **Fluxograma 1** esquematiza a estratégia adotada no estudo.

Fluxograma 1 – Esquema que sintetiza os objetivos deste trabalho.

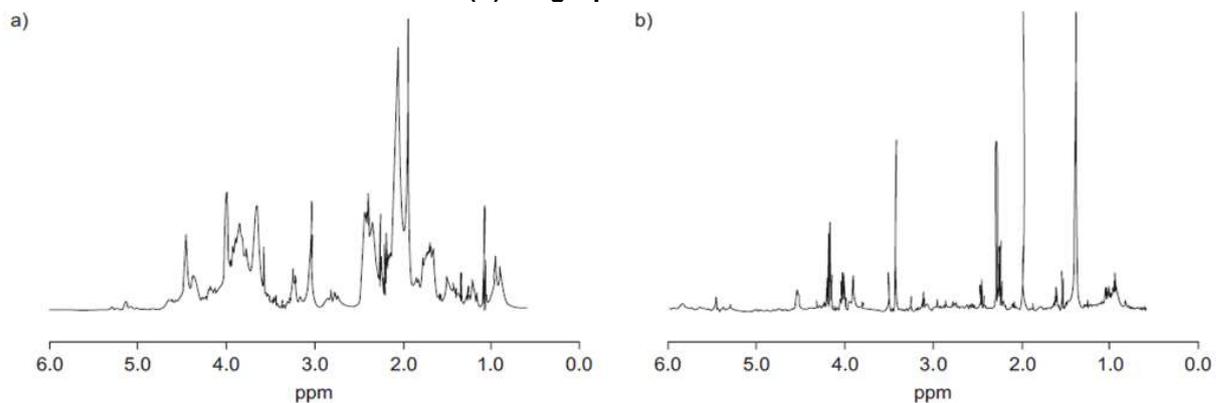


Fonte: A autora (2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da análise do branco, os resultados indicam que os espectros obtidos continham apenas o sinal da água, o que significa que não foram encontrados compostos residuais que pudessem estar presentes no equipamento e que interferissem nos resultados metabonômicos entre uma coleta e outra, confirmando a não contaminação do equipamento e a boa higienização do mesmo. LAURENTIIS et al (2008) mostram que espectros de saliva diferem muito dos CAE, como pode ser observado na **Figura 6**:

Figura 6 – Representação de espectros de RMN de ^1H da saliva (a) e condensado do ar exalado (b) do grupo controle.



Fonte Laurentiis et al. (2008).

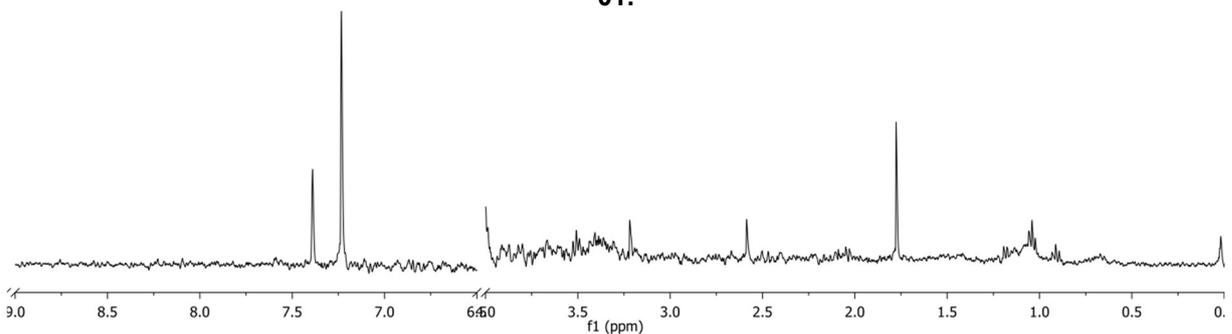
Outra questão é que a temperatura e umidade do ar podem influenciar no diagnóstico do BIE (CAILLAUD et al., 2014; PARSONS et al., 2013), desta forma, durante todas as coletas os indivíduos estavam em local climatizado, permitindo, assim, uma padronização destes parâmetros que pudessem influenciar a responsividade brônquica. Ademais, a temperatura do banho de gelo para a coleta do CAE não obteve valores abaixo de zero grau, o que poderia acarretar numa maior coleta de compostos voláteis. Os espectros do CAE obtidos aqui diferem daqueles apresentados por LAURENTIIS e colaboradores (2008), uma vez que as temperaturas de condensação foram bem diferentes. Porém, estes fatores, como serão demonstrados adiante, não interferiram nos resultados, pois as coletas e análises foram realizadas de maneira igual para todos.

Quanto à possível presença de saliva nas amostras, não foram observados sinais na região onde são observados sinais atribuídos a grupos carbinólicos, típicos de açúcares. Os espectros foram coletados utilizando solução tampão, garantindo

assim que o mesmo pH fosse mantido para todas as análises, garantindo as mesmas condições experimentais (LAURENTIIS et al, 2008 e AIROLDI et al, 2016).

Ainda não existe um padrão para qual sequência de pulso utilizar, bem como os parâmetros de aquisição para a coleta dos dados espectrais de RMN ^1H para o CAE. AIROLDI et al., (2016), IZQUIERDO-GARCÍA et al., (2012) e BERTINI et al. (2014) utilizam uma sequência a base do efeito nuclear Overhauser (NOESY), enquanto SOFIA et al., (2011) e MANISCALCO et al. (2018) não especificam qual pulso utilizaram, apenas relatam que foi um pulso específico designado para suprimir o sinal da água, possivelmente a sequência WET ou WATERGATE. A **Figura 7** apresenta um exemplo de espectro de RMN ^1H de CAE obtido neste estudo nas condições de análise mencionadas anteriormente com a sequência de pulsos WET.

Figura 7 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz D2O) excluída a região entre 4 e 6,5 ppm da amostra 01.



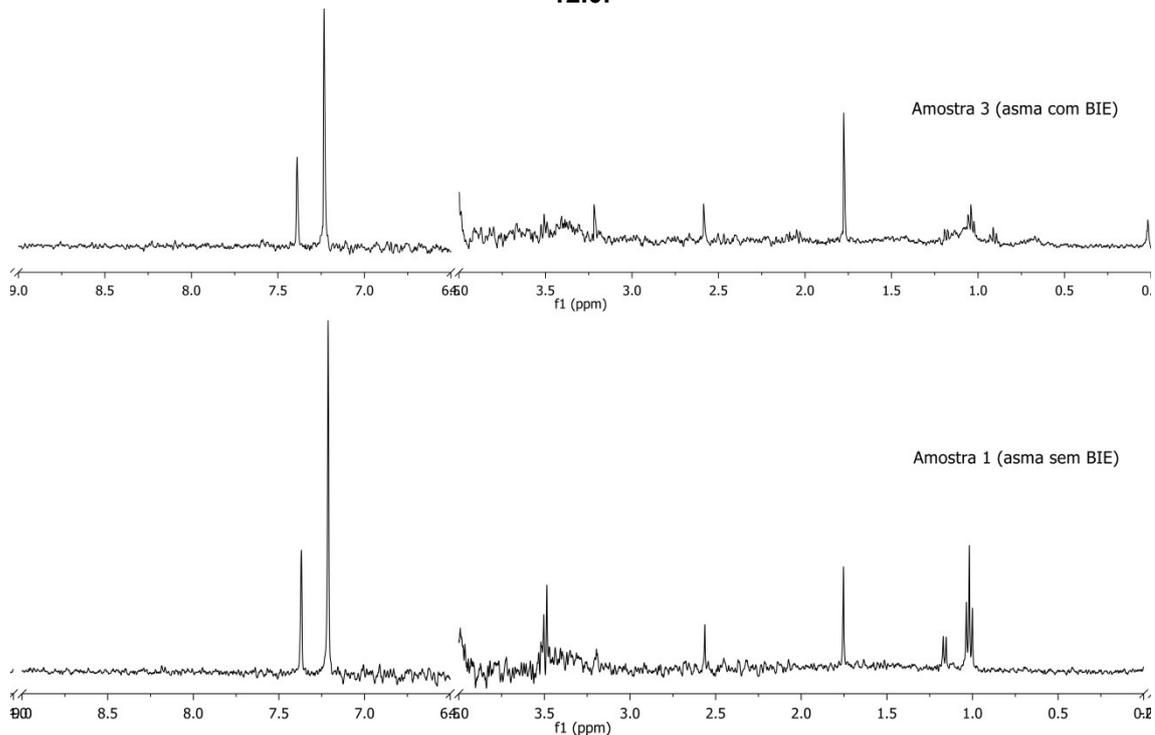
Fonte: A autora (2019).

O CAE é um material que é constituído essencialmente por água, contendo concentrações baixas de metabólitos. Assim, é necessário ter uma sequência de pulsos eficiente para a supressão do sinal da água. Foram testadas as sequências PRESAT e WET. Os melhores resultados foram alcançados usando a sequência de pulsos WET, com tempo de análise igual a 12 minutos por amostra. Na literatura, os dados espectrais são coletados com pelo menos 30 minutos para cada amostra (AIROLDI et al., 2016).

A **Figura 8** exemplifica como ficam os espectros após os processamentos no software MestReNova 12.0. A análise visual dos espectros não permite uma discriminação dos indivíduos de pesquisa - grupo asmático e grupo controle, tampouco os que apresentaram BIE dos que foram negativos ao teste, pois os

espectros são semelhantes. Podem-se observar diferenças pontuais entre os espectros das amostras, individualmente, mas busca-se uma diferença sistemática entre os grupos.

Figura 8 – Espectro de RMN ^1H obtido a 400 MHz das amostras 01 e 03 de asmáticos positivo e negativo para BIE, respectivamente, após passar por processamento manual no MestReNova 12.0.

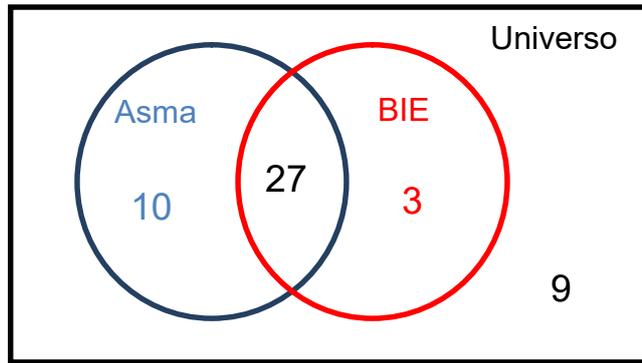


Fonte: A autora (2019).

Descrição do universo da pesquisa

Foram utilizadas 49 amostras, sendo 37 de indivíduos asmáticos e 12 de sem asma. Quando consideramos o diagnóstico de BIE, temos 30 indivíduos com BIE e 19 com diagnóstico negativo de BIE. O diagnóstico negativo para as duas doenças foi observado em 09 casos, enquanto o diagnóstico positivo para as duas doenças foi observado em 27 casos. A **Figura 9** abaixo apresenta, de forma esquemática, a distribuição das amostras utilizadas no estudo preliminar.

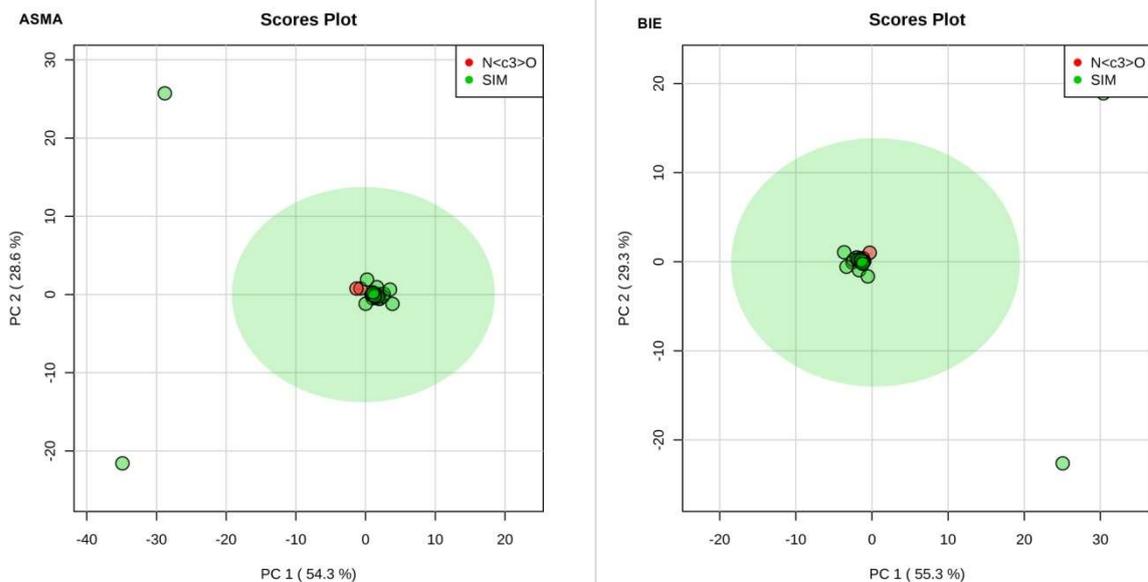
Figura 9 – Distribuição das amostras em cada grupo. BIE - Broncoespasmo Induzido por Exercício



Fonte: A autora (2019).

Ao se realizar a PCA, utilizando a matriz de covariância, observou-se que não houve um agrupamento natural nas classes de interesse, que pode ser observado na **Figura 10**. Isto sugere um cenário bioquímico no qual a variância no conjunto de dados associada ao objeto de investigação é muito pequena, indicando que a abordagem de métodos supervisionados para a modelagem seja recomendável. As duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) reuniram 82,9% da variância total dos dados para Asma, e 84,6% para o BIE

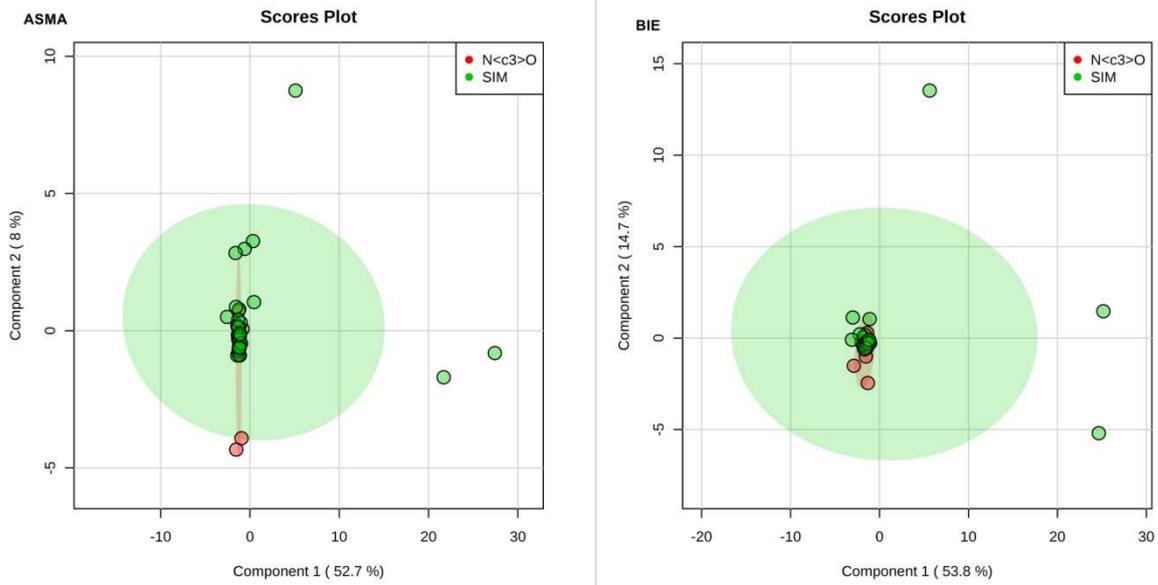
Figura 10 – Panorama das duas primeiras PCs, reunindo 82,9% da variância para Asma (à esquerda), e 84,6% para BIE (à direita). Legenda: Bolinhas verdes, positivo para asma/BIE; bolinhas vermelhas, negativo para asma/BIE.



Fonte: A autora (2019).

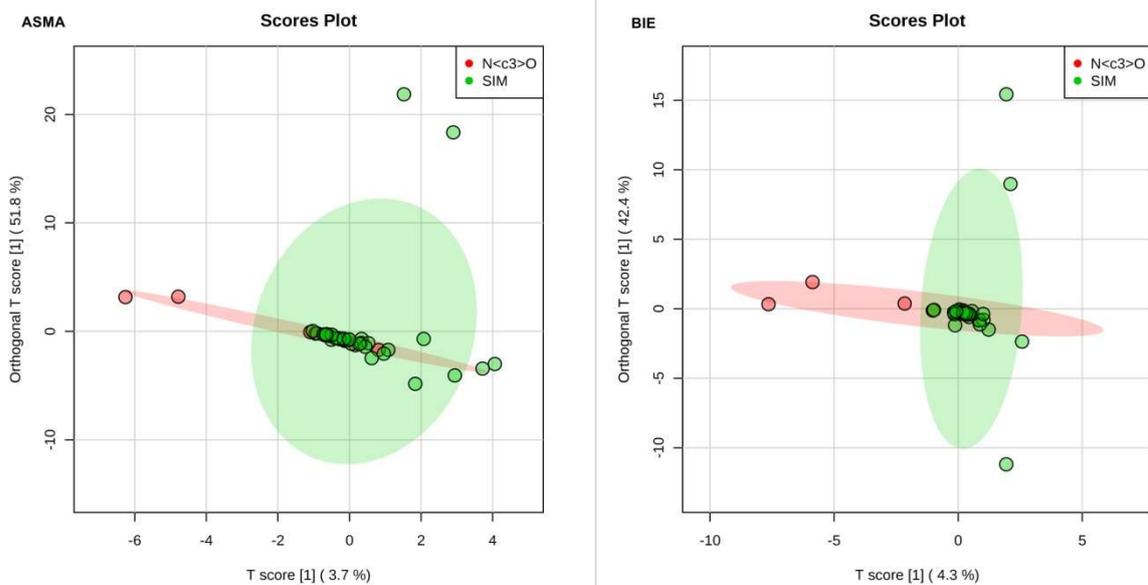
Quando seguimos para os modelos utilizando os formalismos PLS-DA (Figura 11) e OPLS-DA (Figura 12), observamos que também não foram obtidos resultados satisfatórios, pois não houve separação significativa.

Figura 11 – Panorama PLSA-DA para Asma (à esquerda) e para BIE (à direita). Legenda: Bolinhas verdes, positivo para asma/BIE; bolinhas vermelhas, negativos para asma/BIE.



Fonte: A autora (2019).

Figura 12 – Panorama OPLSA-DA para Asma (à esquerda) e para BIE (à direita). Legenda: Bolinhas verdes, positivo para asma/BIE; bolinhas vermelhas, negativos para asma/BIE.



Fonte: A autora (2019).

Sendo assim, partiu-se para o formalismo LDA, que apresentou resultados significativos, tornando-se o formalismo adotado neste estudo para a construção dos modelos, como descritos a seguir:

Foram construídos 03 modelos metabonômicos, usando o formalismo LDA:

- Modelo I – Diagnóstico de asma (37 positivos versus 12 negativos);
- Modelo II – Diagnóstico de BIE (30 positivos versus 19 negativos) e;
- Modelo III – Diagnóstico de BIE em pacientes com diagnóstico positivo para asma (27 positivos versus 10 negativos).

Todos os modelos foram validados por LOOCV (*Leave-One-Out Cross Validation*), sendo os valores de predição, sensibilidade, especificidade, Valor Preditivo positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) extraídos da matriz de classificação após validação cruzada.

5.1 MODELO I

Foram selecionadas 05 variáveis para a construção do modelo, que resultou na seguinte função discriminante (FD1):

$$FD1 = -5,13457 \cdot \delta_{1,56} + 3,92318 \cdot \delta_{1,72} + 1,73280 \cdot \delta_{2,52} - 2,05329 \cdot \delta_{7,40} + 2,78747 \cdot \delta_{7,44} - 3,35504$$

As variáveis importantes para a discriminação deste modelo foram: 1,56 ppm, 1,72 ppm, 2,52 ppm, 7,40 ppm e 7,44 ppm. Valores de FD1 superiores a 0,5 resultam em classificação positiva para asma; amostras com valores menores que 0,5 são classificadas como oriundas de voluntários sem asma.

A Tabela 2 apresenta a matriz de classificação, após validação cruzada, para o diagnóstico de asma.

Tabela 2 – Matriz de classificação do modelo metabonômico I (LDA, 5 variáveis, 49 amostras).

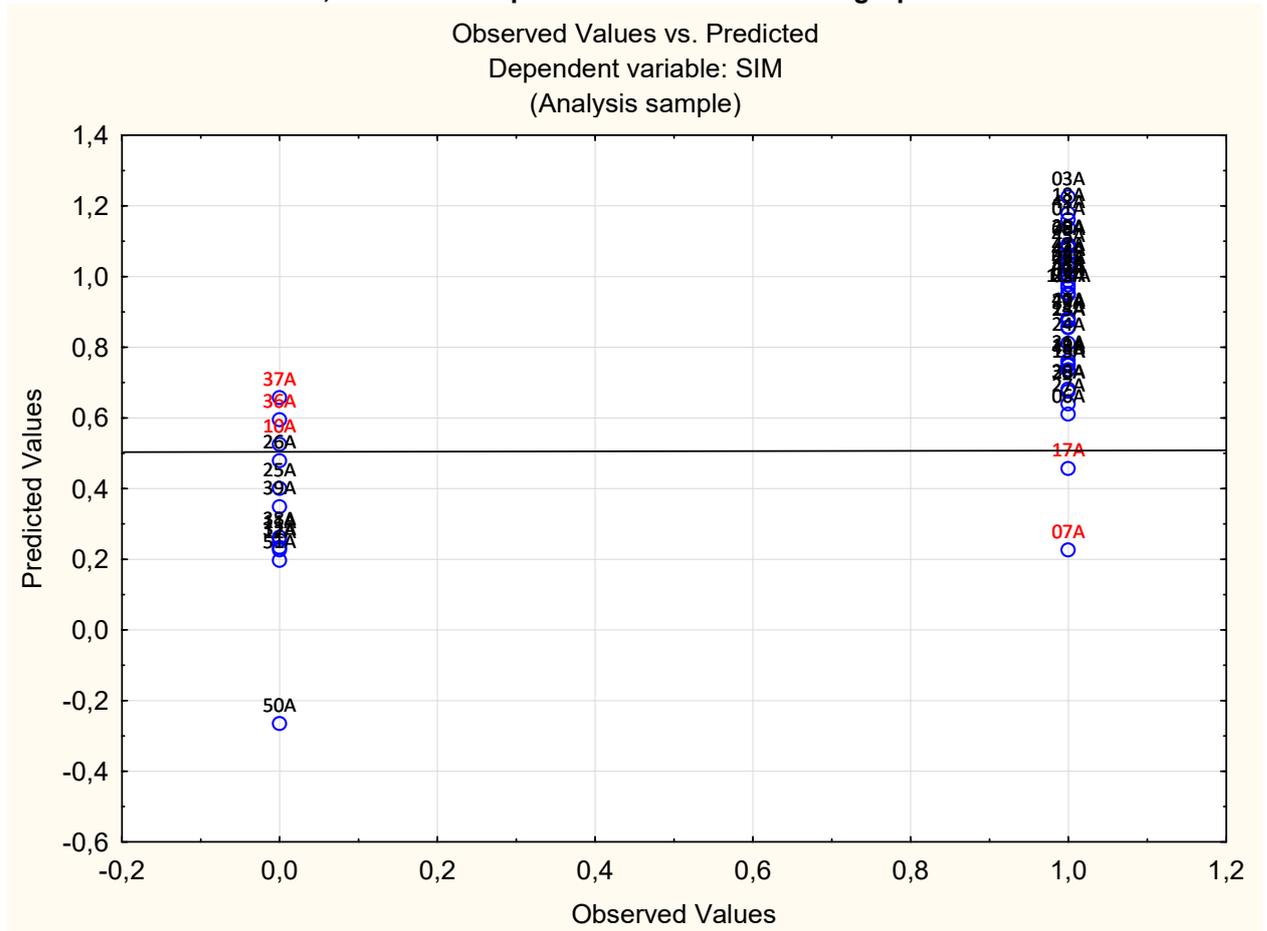
		Diagnóstico Clínico	
		Asma	Controle
MM1	Asma	35	3
	Controle	2	9

MM1 = modelo metabonômico 1

Fonte: a autora (2019).

A **Figura 13** apresenta o gráfico de valores preditos pelo modelo metabonômico LDA versus os valores observados para cada amostra (0 = Controle; 1 = Asma).

Figura 13 – Modelo LDA – gráfico de valores preditos versus valores observados. Em vermelho, as amostras que foram classificadas no grupo errado.



Fonte: A autora (2019).

O modelo apresentou um poder de predição de 89,8%, ou seja, classificou corretamente 44 amostras das 49 investigadas. A sensibilidade indica o número de classificações corretas entre aqueles que, de fato, apresentam a doença. No caso, o modelo metabonômico MM1 classificou como positivos 35 das 37 (35+2) amostras, resultando numa sensibilidade de 94,6% (35/37). A especificidade diz que entre os que são negativos para a doença, quantos o modelo classificou como negativo para asma. MM1 apresentou especificidade de 75,0% (9/12). O valor preditivo positivo (VPP) indica a probabilidade de classificação correta quando o modelo classifica uma amostra como positiva. MM1 classificou 38 (35+3) amostras como positivas

para asma, sendo que 35, de fato, foram fornecidas por pacientes diagnosticados com asma. Assim, o modelo apresentou VPP igual a 92,1% (35/38). Por fim, o valor preditivo negativo (VPN) diz a probabilidade de o modelo não indicar a presença da doença quando de fato não existe, e foi igual a 81,8% (9/11). Foi realizado o teste F de Fischer para investigar se o modelo tem significância estatística. Foram utilizados cinco e 43 graus de liberdade, resultando em $F_{5,43} = 11,33$ ($p < 0.001$).

O valor de F calculado pelo modelo foi significativo, sendo muito maior que o valor $F_{5,43}$ tabelado (2,43), apresentando $p < 0,001$. Observamos que o modelo desenvolvido na validação cruzada continuou classificando erradas as amostras 07, 17, 10, 36 e 37 que o modelo original já tinha errado. Analisaram-se os dados espectrais e pré-processamentos dessas amostras, mas não foram conferidas falhas que explicassem o equívoco do modelo. Os dados clínicos destes indivíduos com classificação equivocada serão investigados posteriormente.

No presente estudo, por LDA utilizando a seleção dos cinco melhores subconjuntos para discriminar os dois grupos, obteve-se uma taxa de 89,8% de confiança após a validação LOOCV. CARRARO et al., (2007), utilizando o mesmo material biológico, demonstram que fazendo a LDA com sinais selecionados de RMN obtiveram sucesso de discriminação de 86%, porém utilizando uma faixa de 0,5 a 4,5 ppm (excluindo o sinal do lactato, um quarteto em 4,12 ppm e um duplete em 1,33 ppm). SINHA et al (2017) reportaram que espectros de RMN do CAE podem diferenciar indivíduos asmáticos de grupo controle sem asma com sensibilidade de 80% e especificidade de 75%, também utilizando uma região reduzida, de 1 a 4,7 ppm. Embora estes autores tiverem utilizado um CAE diferente do nosso (muito mais rico em sinais), pois utilizaram um condensador comercial e, portanto, temperaturas bem inferiores às nossas, nós conseguimos resultados classificatórios semelhantes, usando um sistema de condensação mais simples.

Para a análise estatística multivariada, IBRAHIM et al. (2013) foram os únicos que usaram a região após 7 ppm. Eles diagnosticaram asma em casos e controles com idade entre 30 e 69 anos com as regiões de 0,16–0,18 ppm, 0,78–0,84 ppm, 0,88–0,94 ppm, 7,36–7,42 ppm e 7,44–7,52 ppm. Eles obtiveram uma exatidão geral de 82,3% relatando que as regiões de 7,53-7,59 e 7,86-7,90 ppm foram significativas para a diferença entre as pessoas com asma que usavam corticosteroides.

Neste estudo, a região utilizada foi de 0,5 a 9 ppm, excluindo a região da água de 4 a 6,5 ppm. De acordo com as funções discriminantes, as variáveis selecionadas por LDA derivadas da região com sinais em δ 7,4 e de 1 a 3 ppm são as mais relevantes na discriminação da asma. A região de 7.4 ppm pode ser um fator determinante para que o nosso estudo apresente melhores resultados.

Ao se investigar os possíveis metabólitos presentes no CAE, SANTINI et al., (2016) utilizaram o nariz eletrônico (sensores artificiais que permitem uma descrição qualitativa e/ou quantitativa de misturas de compostos orgânicos voláteis) e a cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC/MS) para detectar semivoláteis ou compostos voláteis na fase gasosa do ar exalado, enquanto utilizaram a espectroscopia de RMN ou cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC/MS) para identificar e fornecer uma avaliação quantitativa de não voláteis ou compostos semivoláteis nas partículas de aerossol que são coletados pela fase condensada (CAE).

SANTINI et al., (2016) demonstraram que se pode encontrar compostos voláteis, não voláteis ou semivoláteis que podem ser distribuídos em dois grupos biológicos: a fase gasosa e a fase condensada. Para a fase gasosa estão os compostos: etano, etanol, acetona, 1,2-pentadieno, pentano, isopreno, 2-propanol e limoneno. Enquanto na fase condensada, temos a acetona, formato, 2-propanol, etanol, ácidos graxos saturados, L-fenilalanina, acetato, propionato e treonina.

Para caracterizar estas moléculas de forma mais adequada, seriam necessários experimentos mais complexos de RMN tais como experimentos bidimensionais homo e heteronuclear, porém estes procedimentos não estavam previstos para este estudo. No entanto, MOTTA et al., (2012) fizeram as atribuições dos sinais de RMN presentes no espectro do CAE obtido a temperaturas mais baixas, realizando espectros de RMN 2D, confirmando alguns com os metabólitos associados previamente por LAURENTIIS et al., (2008).

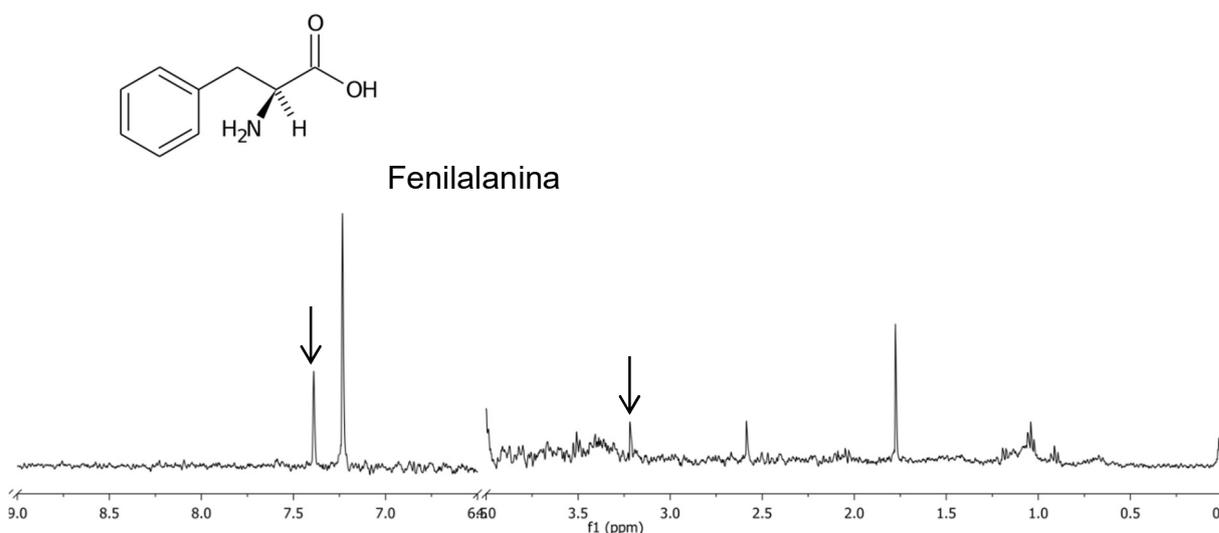
Buscando caracterizar qual metabólito estaria associado ao deslocamento químico que se mostrou relevante para o diagnóstico de asma, diferenciando-se dos outros relatos na literatura, o único que poderia ser associado seria a fenilalanina endógena que possui sinais em 7,3-7,0 ppm. Para os sinais das regiões de 1,7-2,2 e 3,2-3,4 ppm, são descritos a presença de acetato e compostos oxidados (SANTINI et al., 2016). No entanto, a multiplicidade dos sinais da fenilalanina não corresponde

a multiplicidade observada (singleto) no espectro em questão, necessitando ampliar esta investigação.

Utilizamos o banco de dados Human Metabolome Database (HMDB) para investigar os deslocamentos químicos destes compostos presentes no CAE. A L-fenilalanina em H₂O possui sinais em 7,3-7,4 ppm devido aos prótons de seu anel aromático e o próton vizinho a este anel, e sinais em 3,9-4,0 ppm para os demais prótons da cadeia linear, grupo amina e hidroxila. Porém, estes últimos, saíram sobrepostos com o sinal da água, região que foi cortada.

No espectro da amostra 01 (**Figura 14**), de um indivíduo com asma, por exemplo, observamos dois sinais na região atribuída a núcleos aromáticos. O sinal em δ 7,4 ppm foi selecionado como relevante para a discriminação entre os grupos. Nesse sentido, é importante atribuir esse sinal. Como mencionado, estamos investigando a possibilidade de ser fenilalanina.

Figura 14 – Espectro de RMN de ¹H (CAE, 400 MHz) da amostra 01.



Fonte: A autora (2019).

Os sinais referentes às regiões de baixo deslocamento químico, de 1 a 3 ppm, serão atribuídos posteriormente, com a realização de mais experimentos.

O segundo modelo visa diferenciar indivíduos com diagnóstico positivo para o BIE dos que não apresentaram a doença.

5.2 MODELO II

Foram selecionadas 05 variáveis para a construção do modelo, que resultou na seguinte função discriminante (FD1):

$$FD1 = 0,70327 \cdot \delta_{1,84} - 0,48425 \cdot \delta_{3,04} + 0,44806 \cdot \delta_{3,28} - 1,60313 \cdot \delta_{3,68} + 1,42245 \cdot \delta_{3,72} - 0,62424$$

As variáveis importantes para a discriminação deste modelo foram: 1,84 ppm, 3,04 ppm, 3,28 ppm, 3,68 ppm e 3,72 ppm. Valores de FD1 superiores a 0,5 resultam em classificação positiva para BIE; amostras com valores menores que 0,5 são classificadas como voluntários sem BIE (podendo ser asmáticos ou não).

A Tabela 3 apresenta a matriz de classificação, após validação cruzada, para o diagnóstico de BIE.

Tabela 3 – Matriz de classificação do modelo metabonômico II (LDA, 5 variáveis, 49 amostras).

		Diagnóstico Clínico	
		BIE	Controle
MM2	BIE	25	6
	Controle	5	13

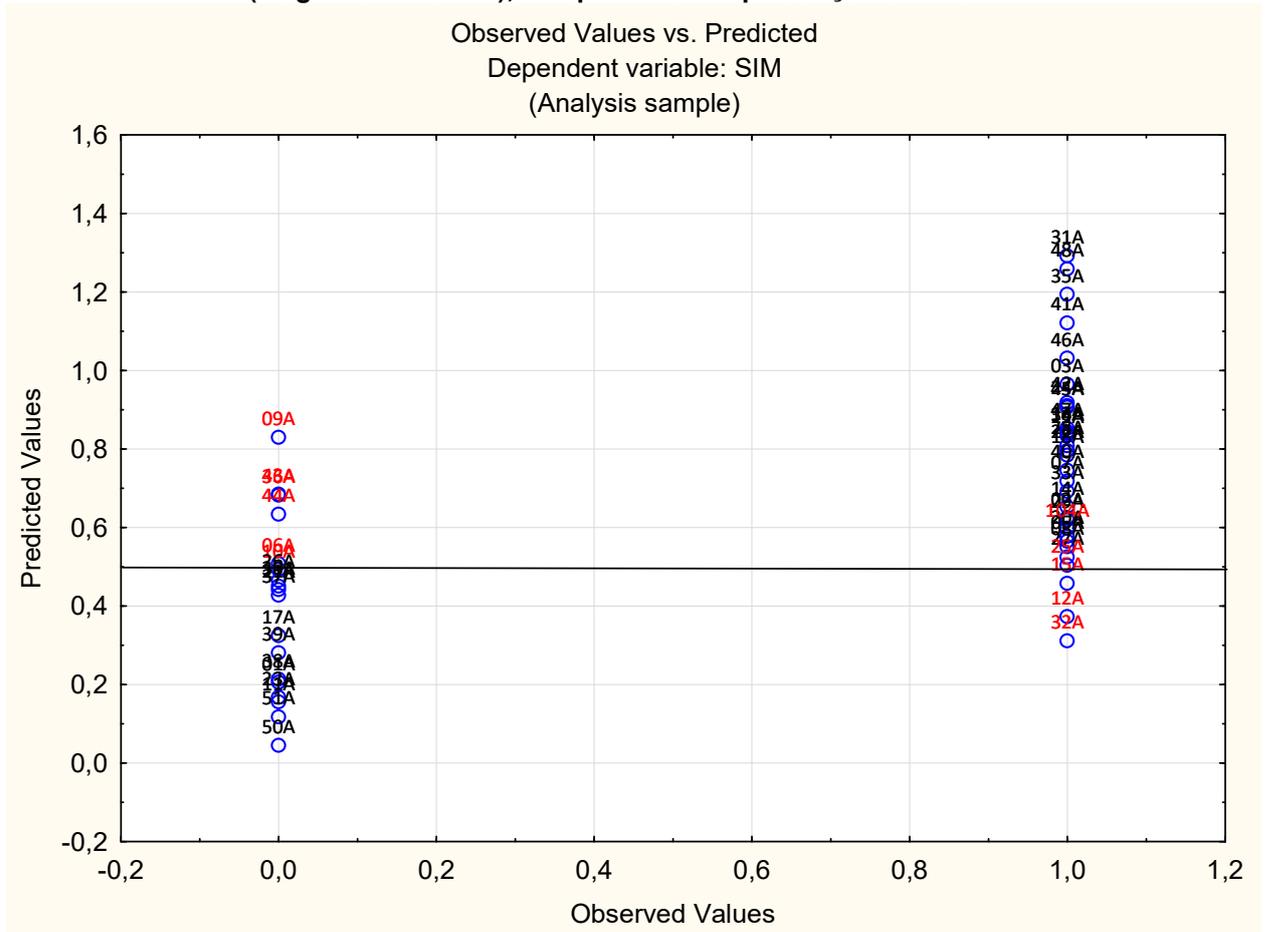
MM2 = modelo metabonômico 2

Fonte: a autora (2019).

O modelo apresentou um poder de predição de 77,5% (38/49), sensibilidade de 83,3% (25/30), especificidade de 68,4% (13/19), VPP igual a 80,6% (25/31) e VPN igual a 72,2% (13/18). Foi realizado o teste F de Fischer para investigar se o modelo tem significância estatística. Foram utilizados 5 e 43 graus de liberdade, resultando em $F_{5,43} = 5,13$ ($p = 0,000879$).

A **Figura 15** apresenta o gráfico de valores preditos pelo modelo metabonômicos versus os valores observados para cada amostra (0 = Controle; 1 = BIE).

Figura 15 – LDA – gráfico de valores preditos versus valores observados para o MM2 (diagnóstico de BIE), independente da presença de asma.



Fonte: A autora (2019).

Embora o valor de F calculado pelo modelo tenha significância estatística, sendo duas vezes maior que o valor $F_{5,43}$ tabelado, apresentando $p < 0,0008$, os resultados foram inferiores, em relação ao modelo para o diagnóstico de asma, errando 11 amostras após a LOOCV. No entanto, o conjunto de amostras utilizado incluiu pacientes com diagnóstico positivo para BIE que não tem asma e pacientes do grupo controle do modelo I. Isso pode ser um viés que está dificultando a modelagem.

MOTTA et al (2014) reportaram a influência da temperatura na coleta dos CAE dos indivíduos sem asma. MOTTA mostrou que para CAE coletados à $-4,8^{\circ}\text{C}$ e $-27,3^{\circ}\text{C}$, devido à temperatura de condensação mais alta, os espectros de RMN são menos intensos. Porém, a redução da intensidade influencia numa diferenciação maior no grupo controle do que nos asmáticos. Isto porque os metabólitos presentes no CAE no grupo controle são mais sensíveis à temperatura do que os metabólitos

presentes no CAE dos asmáticos. Já para os asmáticos, a coleta feita para ambas as temperaturas não altera significativamente os metabólitos. Sendo assim, para testar essa hipótese, partimos para o modelo III, utilizando apenas amostras de pacientes diagnosticados com asma.

5.3 MODELO III

Excluindo todos os indivíduos que tiveram diagnóstico negativo para asma, foram selecionadas 05 variáveis para a construção do modelo, que resultou na seguinte função discriminante (FD1):

$$FD1 = -1,43801 \cdot \delta_{0,80} - 0,62515 \cdot \delta_{1,52} + 2,47724 \cdot \delta_{1,84} - 2,74462 \cdot \delta_{3,68} + 1,32055 \cdot \delta_{3,72} - 0,57356$$

As variáveis importantes para a discriminação deste modelo foram: 0,80 ppm, 1,52 ppm, 1,84 ppm, 3,68 ppm e 3,72 ppm. Valores de FD1 superiores a 0,5 resultam em classificação de asmáticos positivos para BIE; amostras com valores menores que 0,5 são classificadas como asmáticos negativos para BIE.

Diferentemente, dos modelos anteriores, aqui foram utilizadas 37 amostras (apenas voluntários asmáticos), sendo 27 de pacientes asmáticos com diagnóstico positivo para BIE e 10 de pacientes asmáticos com diagnóstico negativo para BIE (ver figura 10 da página 34). A Tabela 4 apresenta a matriz de classificação, após validação cruzada, para o diagnóstico de BIE entre indivíduos asmáticos.

Tabela 4 – Matriz de classificação do modelo metabonômico III (LDA, 5 variáveis, 37 amostras).

		Diagnóstico Clínico	
		BIE	Controle
MM3	BIE	23	2
	Controle	4	8

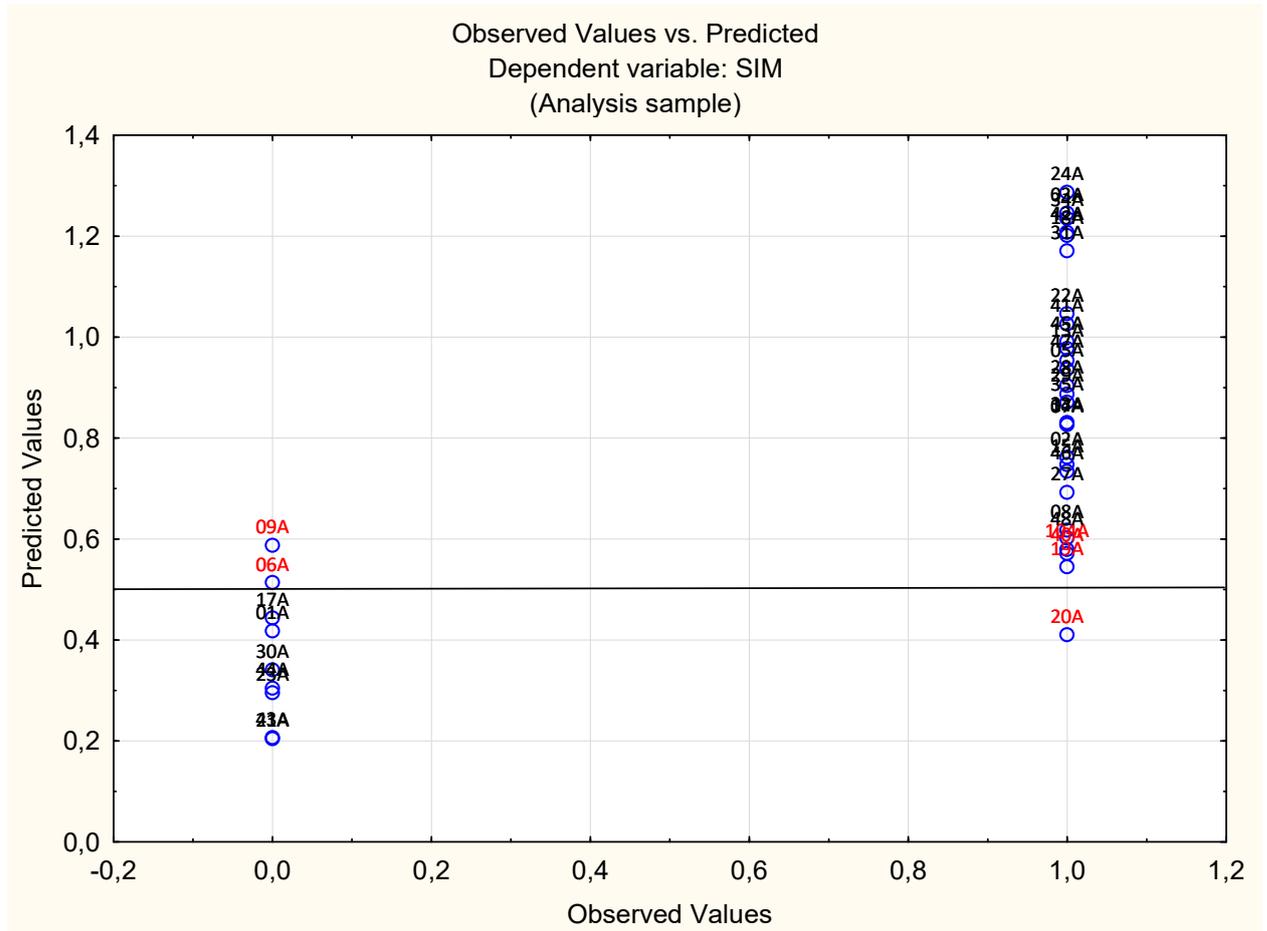
MM3 = modelo metabonômico 3

Fonte: a autora (2019).

O modelo apresentou um poder de predição de 83,8% (31/37), sensibilidade de 85,2% (23/27), especificidade de 80% (8/10), VPP igual a 92% (23/25) e VPN igual a 66,7% (8/12). Foi realizado o teste F de Fischer para investigar se o modelo tem significância estatística. Foram utilizados 5 e 31 graus de liberdade, resultando em $F_{5,31} = 6,54$ ($p < 0,001$).

A **Figura 16** apresenta o gráfico de valores preditos pelo modelo metabonômicos versus os valores observados para cada amostra (0 = Asma sem BIE; 1 = Asma e BIE).

Figura 16 – LDA – gráfico de valores preditos versus valores observados - diagnóstico de BIE entre asmáticos.



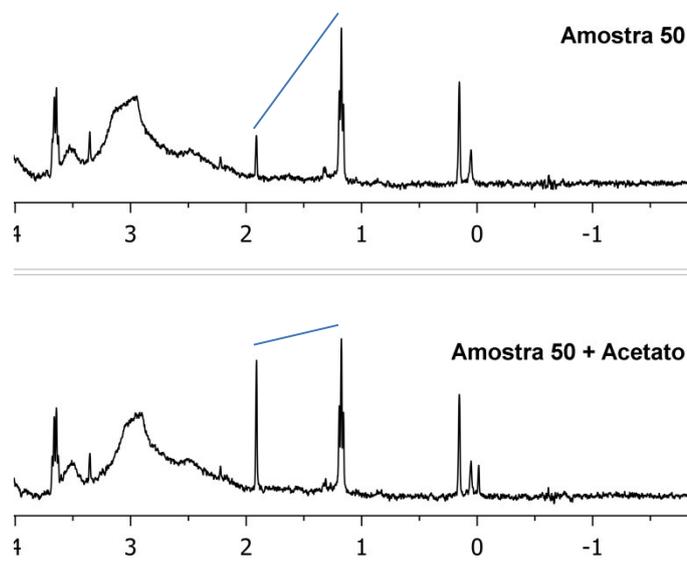
Fonte: A autora (2019).

Observamos que o modelo desenvolvido na validação cruzada continuou classificando erradas as mesmas amostras 06, 09, 19, 20 e 104 que o modelo original. As amostras aqui classificadas erradas diferem das do modelo I, pois se trata de classificação para o BIE, e não para asma.

Ao se observar as funções discriminantes, as variáveis mais relevantes na discriminação foram da região com sinais entre δ 0,8 a 3,72ppm. A região de 1,7 a 2,2 ppm pode ser atribuído a produtos acetilados (CARRARO et al, 2007). Buscando novamente no banco de dados HMDB, o sinal atribuído ao grupo metil do acetato em água a um pH 7,0 é 1.91 ppm. Um experimento simples foi feito para

comprovação deste sinal que se deu por adicionar à amostra uma gota de uma solução muito diluída de ácido acético (uma gota de ácido acético em 10 mL de água) para observar o aumento da concentração desta espécie e, conseqüentemente, aumento do sinal esperado para este composto. Este aumento pôde ser observado na comparação dos espectros da amostra 50 na **Figura 17**.

Figura 17 - Zoom dos espectros de RMN de ^1H da Amostra 50 sem e com a adição do ácido acético, respectivamente, comparando o aumento da intensidade do sinal do acetato em δ 1.91 ppm.



Fonte: A autora (2019).

Com isso, está comprovada a atribuição do acetato como variável importante para a classificação/discriminação entre portadores de BIE no grupo de asmáticos. Estudos mostram que a frequência do BIE em indivíduos asmáticos varia de 40 a 90% (JONES et al., 1962, KAWABORI et al., 1976, MELLIS et al., 1978, POPPIUS et al., 1970) e no Brasil a prevalência entre crianças foi de 45% (CABRAL et al., 1999). Para brasileiros obesos, a prevalência é de 50% (LOPES et al., 2010). No estudo, aqui apresentado, temos uma frequência de 75,7% (28/37) de BIE em asmáticos com idade entre 10 e 20 anos.

Apesar de ser um estudo piloto, os valores de predição de 83,8%, sensibilidade de 82,1%, especificidade de 80% obtidos a partir da LDA indica que a estratégia metabonômica tem potencial como ferramenta no emprego para diagnóstico do BIE, sendo uma técnica não invasivo visto que é utilizado um material

que já comumente expelido pelo ser humano sem esforços adicionais e que provém diretamente das vias aéreas. Ademais, o valor do F calculado tem significância estatística, pois foi duas vezes maior que o F tabelado $F_{5,31} = 2,54$.

O modelo ainda classificou três amostras como falso positivo e duas amostras como falso negativo. Estudos mostram que existe uma discordância de 24% dos casos em serem positivos ou negativos para os dois dias de teste do BIE (ANDERSON, et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

Foram construídos três modelos metabonômicos, usando o formalismo LDA aplicados a dados espectrais de RMN de ^1H obtidos de condensados de ar exalado por voluntários participantes da pesquisa. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o formalismo LDA mostrou-se uma estratégia metabonômica promissora para o diagnóstico de doenças do trato respiratório como a asma e o BIE, pois, mesmo com o número reduzido de amostras para o estudo, os valores de predição, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN descritos pelo modelo metabonômico foram bastante significativos, indicando grande potencial no emprego para diagnóstico destas doenças como ferramenta investigativa.

Em relação ao diagnóstico de asma, vimos que a variável com deslocamento em 7.40 ppm é relevante na discriminação entre os grupos, variável que possivelmente está atribuída a estrutura da L-fenilalanina endógena. Com esta variável, o modelo conseguiu ter um desempenho de aproximadamente 90%, semelhante em um caso, e superior em outro, aos encontrados na literatura usando um CAE obtido de forma mais simples, no caso aqui apresentado.

Quanto aos modelos para o BIE, este estudo é pioneiro, uma vez que não encontramos relatos de emprego da espectroscopia de RMN associada à quimiometria para diagnosticar BIE e identificar metabólitos associados. Os resultados alcançados até o momento são bastante expressivos, pois o modelo conseguiu uma classificação de aproximadamente 84% entre indivíduos asmáticos e de aproximadamente 78% em todo o universo amostral. Porém, precisa-se ampliar a base de dados e fazer experimentos que melhor atribuam às variáveis discriminantes para baixos deslocamentos químicos.

Por fim, a questão de nosso estudo estar lidando com um analito completamente não invasivo para a investigação de uma doença causa entusiasmo. Até então, o diagnóstico da asma é feito através da espirometria, que busca identificar o estreitamento dos brônquios. Um exame relativamente simples e rápido, mas como os valores do VEF_1 e FEV_1 variam com a idade, sexo e o tamanho da pessoa, os resultados necessitam de um profissional experiente para uma boa interpretação médica.

Para o BIE, o diagnóstico é um pouco mais complicado, pois o indivíduo precisa ser submetido a um esforço físico e ainda assim faz-se necessário que ele

retorne ao laboratório para a confirmação da doença e conclusão do diagnóstico. Assim, o modelo metabonômico seria um elemento a mais para fechar o diagnóstico de broncoespasmo induzido por exercício.

REFERÊNCIAS

- AIROLD C., Ciaramelli C., Fumagalli M., et al. ¹H NMR To Explore the Metabolome of Exhaled Breath Condensate in α 1-Antitrypsin Deficient Patients: A Pilot Study. **Journal of Proteome**. 2016
- ANDERSON, S. D.; DAVISKAS, E. The mechanism of exercise-induced asthma is. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 106, p. 453–459, 2000.
- ATKINS, P., Paula, J., Físico-Química. Vol 1. 8^a ed. LTC, **2006**.
- BANNIER, Michiel A. G. E., et al. Exhaled Breath Condensate in Childhood Asthma: A Review and Current Perspective. **Frontiers in Pediatrics**. Vol 7, Abril de 2019.
- BECKONERT O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum, and tissue extracts. **Nature Protocols**. 2007;2: 2692–2703. doi:10.1038/nprot.2007.376
- BERTINI, I.; Luchinat, C.; • Miniati, M. Phenotyping COPD by ¹H NMR metabolomics of exhaled breath condensate. **Metabolomics** (2014) 10:302–311.
- BRERETON, R. G. Chemometrics and Statistics: Multivariate Classification Techniques. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Elsevier, 2013.
- CABRAL, A. L. B. Exercise-induced Bronchospasm in Children Effects of Asthma Severity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Volume 159. pp 1819–1823, 1999
- CAILLAUD, D.; HORO, K.; BAIZ, N. et al. Exercise-induced bronchospasm related to different phenotypes of rhinitis without asthma in primary schoolchildren: the French Six Cities Study. **Clinical & Experimental Allergy**, volume 44, n. 6, p. 858 – 866 2014.
- CARRARO, S.; REZZI, S.; RENIERO, F. et al. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 986-990, 2007.
- DONA, A. C.; Jiménez, B.; Schäfer, H.; et al. Precision High-Throughput Proton NMR Spectroscopy of Human Urine, Serum, and Plasma for Large-Scale Metabolic Phenotyping. **Analytical Chemistry**, 2014

FERREIRA, Marcia Miguel Castro. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. (2015).

Forum of International Respiratory Societies. The Global Impact of Respiratory Disease – Second Edition. Sheffield, European Respiratory Society, 2017.

GIKA, H. G.; THEODORIDIS, G. A.; PLUMB, R. S.; WILSON, I. D. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. **J Pharm Biomed Anal**, v. 87, p. 12-25, 2014.

GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION. Global Initiative for Asthma (GINA) 2019. Disponível em: < <http://www.ginasthma.org/>>. Acesso em: julho de 2019.

GRATTON, J.; Phetcharaburanin, J.; Mullish, B. H.; et al. Optimized Sample Handling Strategy for Metabolic Profiling of Human Feces. **Analytical Chemistry**. 2016.

HORVATH I, Barnes PJ, Loukides S, Sterk PJ, Hogman M, Olin AC, et al. A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease. **Europe Respiratory Journal**, v. 49:1600965. doi: 10.1183/13993003.00965-2016

HORVATH I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. **Europe Respiratory Journal**, v. 26, p. 523-548, 2005. doi: 10.1183/09031936.05.00029705

HORVÁTH, I.; BARNES, P. J.; LOUKIDES, S. et al. A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease. **Europe Respiratory Journal**, v. 49, n. 4, 2017.

IZQUIERDO-GARCÍA, J. L.; Germaín Peces-Barba and Jesus Ruiz-Cabello. Influence of ambient air on NMR-based metabolomics of exhaled breath condensates. **European Respiratory Journal**. 2012. Vol. 40. N 5.

JONES, R. S., M. H. Buston, and M. J. Wharton. 1962. The effect of exercise on ventilatory function in the child with asthma. **British Journal Diseases of the Chest** v. 56, p. 78–86.

KAWABORI, I., W. E. Pierson, L. L. Conquest, and C. W. Bierman. Incidence of exercise-induced asthma in children. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, 1976. V. 58, p. 447–455.

LAURENTIIS, G.; Melk, D.; Marsico, S.; et al. Metabonomic analysis of exhaled breath condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **European Respiratory Journal**, 2008; v. 32, p. 1175–1183.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Peer Reviewed: So What's the Deal with Metabonomics? **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 384 A-391 A, set. 2003.

LOPES, W. A.; Rosário N.; Leite, N. Exercise-induced bronchospasm in obese and non-obese asthmatic adolescents. **Revista Paulista de Pediatria**, 2010; v. 28, p. 36-40.

MANISCALCO, M.; Paris, D.; Melck, D. et al. Biomonitoring of workers using nuclear magnetic resonance-based metabolomics of exhaled breath condensate: A pilot study. **Toxicology Letters**, v. 298 p. 4–12, 2018.

MELLIS, C. M., M. Kattan, T. G. Keens, and H. Levison. 1978. Comparative study of histamine and exercise challenges in asthmatic children. **American Review of Respiratory Disease**, v. 117, p. 911–915.

MLYNARIK, V., 2016. Introduction to nuclear magnetic resonance. **Analytical Biochemistry**, in press, pp.1–6.

MOTTA, A.; Paris, D.; A1Amato, M. et al. NMR Metabolomic Analysis of Exhaled Breath Condensate of Asthmatic Patients at Two Different Temperatures. **Journal of Proteome Research**. 2014, v. 13, p. 6107–6120

MOTTA, A.; PARIS, D.; MELCK, D. et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics of exhaled breath condensate: methodological aspects. **European Respiratory Journal**, v. 39, p. 498-500, 2012.

NASCIMENTO, C. J., Block, C., RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR : Gradus Primus*. **2001**, 1–4.

NETO, B., Scarminio, I. & Bruns, R., 2002. 25 Anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 25(4), p. 689–695.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 29, n. 11, p. 1181–9, nov. 1999.

PARSONS, J. P.; HALLSTRAND, T. S.; MASTRONARDE, J. G. et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: exercise-induced bronchoconstriction. American Thoracic Society Subcommittee on Exercise-induced Bronchoconstriction. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, n. 9, p. 1016-1027, 2013.

PARSONS, J. P.; HALLSTRAND, T. S.; MASTRONARDE, J. G. et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: exercise-induced bronchoconstriction. American Thoracic Society Subcommittee on Exercise-induced Bronchoconstriction. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, n. 9, p. 1016-1027, 2013.

PAVIA, D. L.; et al. Introdução à Espectroscopia. 4^a ed. São Paulo: Cengage Learning, **2010**.

POPPIUS, H., A. Muittari, K.-E. Kreuz, O. Korhonen, and A. Viljanen. 1970. Exercise asthma and disodium cromoglycate. *B.M.J*, v. 4, p. 337–339.

Hospital Sírio-Libanês, Doenças Pulmonares e Torácicas: Broncoscopia. Disponível em: <https://www.hospitalsiriolibanes.org.br/hospital/especialidades/nucleo-doencas-pulmonares-toracicas/Paginas/broncoscopia.aspx>. Acessado em: 29 de agosto de 2019.

HUSAIN, Aliya N. O Pulmão. In: ROBBINS & COTRAN – **Patologia: Bases Patológicas das Doenças** – Editora Saunders Eusevier, 8^a Ed. 2010 p.685-700.

PRIEGO-CAPOTE, F. **Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications || Potential of Metabolomics to Breath Tests**. 2019. p. 69–81. doi:10.1016/B978-0-12-815249-2.00007-5

ROXO, J. P. F.; PONTE, E. V.; RAMOS, D. C. B. et al. Validação do Teste de Controle a Asma em português para uso no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 2, p. 159-166, 2010.

RUNDELL KW, Im J, Mayers LB, Wilber RL, Szmedra L, Schmitz HR: Selfreported symptoms and exercise-induced asthma in the elite athlete. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. 2001, v. 33(2), p. 208-213

SANTINI, G. et al. Electronic Nose and Exhaled Breath NMR-based Metabolomics Applications in Airways Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 14, p. 1610-1630, 2016.

SINCLAIR DG, Sims MM, Hoad NA, Winfield CR: Exercise-induced airway narrowing in army recruits with a history of childhood asthma. **Europe Respiratory Journal**. 1995, v. 8(8), p.1314-1317.

SINHA, A.; Desiraju, K.; Aggarwal K.. et al. Exhaled breath condensate metabolomeclusters for endotype discovery in asthma. **J Translational Med** (2017) v. 15, p. 262.

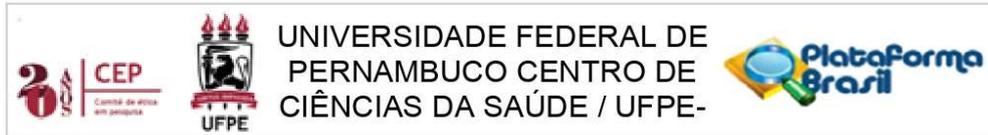
SOFIA, M.; Maniscalco, M.; Laurentiis, G. et al. Exploring Airway Diseases by NMR-BasedMetabonomics: A Review of Application to Exhaled Breath Condensate. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2011.

SOLÉ, D. et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. **J Pediat**, v. 82, n. 5, p. 341–346, 2006.

TEIXEIRA, R. N.; TEIXEIRA, L. R.; COSTA, L. A. R.; et al. Broncoespasmo induzido por exercício em corredores brasileiros de longa distância de elite. **Jornal Brasileiro devPneumologia**. 2012; v. 38(3), p. 292-298.

The Global Asthma Report 2018. Auckland, New Zealand: Global Asthma Network, 2018.

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

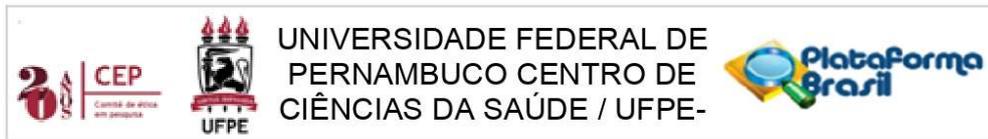
Número do Parecer: 2.796.049

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:** cepocs@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:

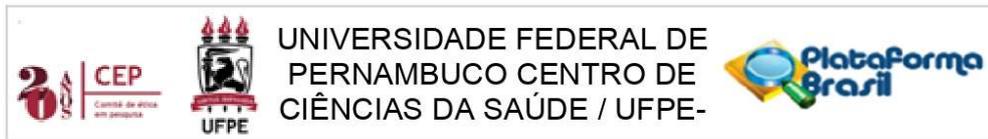
OBJETIVOS GERAL

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:** cepps@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.796.049

sem BIE.

5- Correlacionar modelo metabólico 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 as 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:

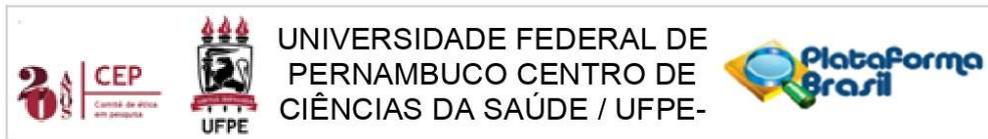
Riscos: Dor e sangramento discretos por ocasião da punção venosa para realização do hemograma e dosagem de IgE total. Os testes alérgicos cutâneos já fazem parte da rotina de avaliação de pacientes asmáticos e tem como principal evento adverso discreto sangramento no local das puncturas. A espirometria 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 dispnéia associa 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 dispnéia 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;

TCLE 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:

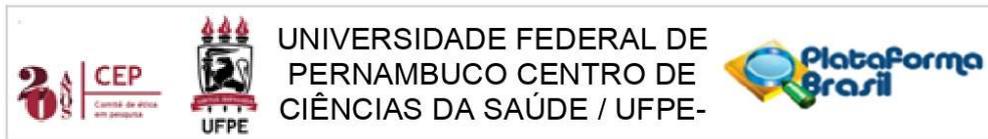
O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "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 466/12).

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



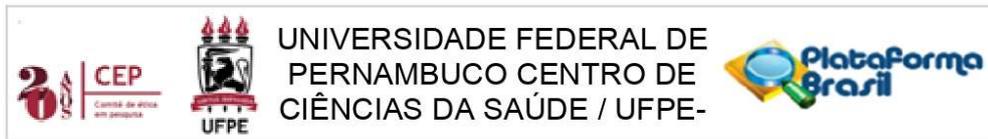
Continuação do Parecer: 2.796.049

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:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@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_CONDENSADO_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

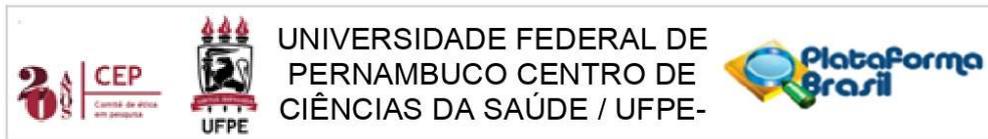
Situação do Parecer:

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:** cepccs@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

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

0

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

(APÊNDICE B)

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: (81)97484466, 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, 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 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 Eucápnica Voluntária. 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.

Os participantes da pesquisa poderão se beneficiar diretamente dos resultados dos exames pelo diagnóstico de BIE e 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 participantes e a seus médicos assistentes para um melhor tratamento.

As informações desta pesquisa serão 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 assumidos 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, 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).

Local e data _____

Assinatura do Participante _____

Impressão digital
(opcional)

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:

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

0

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

(APÊNDICE A)

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@hotmail.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, 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 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 Eucápnica Voluntária. 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 para você 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.

Você poderá se beneficiar diretamente dos resultados dos exames pelo diagnóstico de BIE e 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 a vocês e a seus médicos assistentes para um melhor tratamento.

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 serão 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:

ANEXO D - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TALE)

0

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

(APÊNDICE C)

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: (81)97484466, 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@hotlink.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 Eucápnica Voluntária. 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 para você 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.

Você poderá se beneficiar diretamente dos resultados dos exames pelo diagnóstico de BIE e 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 a vocês e a seus médicos assistentes para um melhor tratamento.

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 serão 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 assumidos 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).

Local e data _____

Assinatura do Participante _____

Impressão digital
 (opcional)

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: