



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ASMA POR ANÁLISE  
PROTEÔMICA E METABOLÔMICA

**Aluna:** Larissa Prado Maia

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Coorientador:** Prof. Dr. Thulio Marquez Cunha

Uberlândia - MG

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ASMA POR ANÁLISE  
PROTEÔMICA E METABOLÔMICA

**Aluna:** Larissa Prado Maia

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Coorientador:** Prof. Dr. Thulio Marquez Cunha

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética).

Uberlândia - MG

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M217 Maia, Larissa Prado, 1989-  
2019 Classificação dos fenótipos da asma por análise proteômica e  
metabolômica [recurso eletrônico] / Larissa Prado Maia. - 2019.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Coorientador: Thulio Marquez Cunha.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-  
graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2580>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo ,1962-, (Orient.). II.  
Cunha, Thulio Marquez,1979-, (Coorient.). III. Universidade  
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica.  
IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese em Doutorado Acadêmico - nº 19/2019 /PPGGB				
Data:	Doze de dezembro de 2019	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	12:45h
Matrícula do Discente:	11523GBI014				
Nome do Discente:	Larissa Prado Maia				
Título do Trabalho:	Análise proteômica e metabolômica de fenótipos na asma.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INCT em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT – TERANANO).				

Aos doze dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, às 08:30 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Irma de Godoy, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Gobbi Amorin, Dr<sup>ª</sup>. Hebréia Oliveira Almeida Souza, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO (A).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério**



**Superior**, em 12/12/2019, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/12/2019, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hebreia Oliveira Almeida Souza, Usuário Externo**, em 12/12/2019, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **IRMA DE GODOY, Usuário Externo**, em 12/12/2019, às 12:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Gobbi Amorim, Usuário Externo**, em 12/12/2019, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1690687** e o código CRC **C970BF95**.

*Dedico essa conquista aos meus pais, Antonio e Maria Dalva, que não pouparam esforços para me proporcionar uma educação de qualidade, me apoiando em todas as etapas da minha formação.*

*As minhas irmãs, Luciana e Cíntia, meus exemplos de dedicação, sempre presentes em minha vida.*

*Ao meu marido, Bruno, pelo carinho, apoio, incentivo, paciência, auxílio e compreensão.*

*Ao meu sobrinho, Guilherme, que trouxe alegria e leveza para nossas vidas.*

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por ter me guiado durante esses anos, me iluminando pelos caminhos mais difíceis e me dando forças para concluir essa etapa.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho*, pelo acolhimento em seu laboratório há 8 anos, pelo auxílio na construção do conhecimento científico, por sempre me estimular a continuar, por me abrir portas e por ter acreditado em mim e no meu trabalho durante todos esses anos.

Ao meu coorientador *Prof. Dr. Thulio Marquez Cunha*, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho, pelo empenho para a realização desse trabalho, me ajudando em todo o processo, e por sempre me motivar.

Aos Profs. *Fatima Ferreira Briza* e *Peter Briza*, por me receberem tão bem na Universitat Salzburg durante meu período de Doutorado Sanduíche, e por todo o conhecimento adquirido nesse período.

Aos membros da Banca Examinadora, *Profa. Dra. Irma de Godoy*, *Dra. Fernanda Gobbi Amorim*, *Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila* e *Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Junior*, pela disponibilidade e atenção.

A equipe do Ambulatório de Pesquisa em Asma da Disciplina de Pneumologia UNIFESP, liderado pela *Dra Ana Luiza Godoy*, por ceder gentilmente as amostras para a realização desse trabalho, e a *Marta Amorim*, pelo treinamento da coleta de escarro induzido e paciência em responder todas as minhas dúvidas.

Ao *Prof Anderson Santos*, pela colaboração com as análises de inteligência artificial, enriquecendo ainda mais esse trabalho.

Aos amigos *Paula Souza* e *Mário Machado*, que estiveram diretamente envolvidos nesse estudo, estando junto comigo em grande parte do estudo, e não pouparam

esforços para me auxiliar. Agradeço pela amizade, colaboração, ensinamento, paciência e dedicação com esse trabalho.

Ao *Victor Alexandre* e a *Jéssica Souza*, que também contribuíram para esse trabalho, além de serem mais que colegas de laboratório, se tornaram grandes amigos.

A *Emília Rezende*, que foi muito além que uma colega de laboratório. Agradeço pelos anos que moramos juntas e por estar sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida.

Aos demais amigos do laboratório, *Aline Souza*, *Hebréia Oliveira*, *Tafarel Andrade* e *Ana Flávia Notário*, pela amizade, apoio, convivência diária e companhia ao longo desta etapa, tornando os dias mais leves.

A *Luciana Machado*, que se tornou uma grande amiga, e a *Natássia Corrêa*, pela atenção, auxílio, disponibilidade e pela dedicação ao Laboratório de Nanobiotecnologia.

Aos demais colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia, pela convivência e discussões científicas.

A todos os meus amigos e familiares que estiveram sempre presentes, fazendo com que o meu caminho seja mais leve e fácil de ser trilhado.

As pacientes do Ambulatório de Pesquisa em Asma da Disciplina de Pneumologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo;

A secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, *Janaína Lobato*, por toda ajuda e atenção;

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e a Universidade Federal de Uberlândia pelo ensino e pesquisa de qualidade.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Fenótipos inflamatórios da asma.</b> .....	4
<b>Figura 2: Unidade trófica epitelial-mesenquimal.</b> .....	7
<b>Figura 3: Mecanismos patológicos da inflamação das vias aéreas na asma.</b> 9	
<b>Figura 4: Análise proteômica baseada em espectrometria de massas.</b> .....	15
<b>Figura 5 Representação esquemática do desenho experimental.</b> .....	24
<b>Figura 6: Imagem representativa da eletroforese em gel das proteínas do soro após depleção das proteínas mais abundantes.</b> .....	38
<b>Figura 7: Proteínas identificadas no escarro e soro de pacientes com asma.</b> .....	41
<b>Figura 8: Volcano plot mostrando a diferença e significância (<math>-\log_{10}</math> p-value) das proteínas diferencialmente expressas entre os fenótipos eosinofílico (E), neutrofilico (N), misto (M) e paucigranulocítico (P) no escarro (A) e soro (B).</b> .....	43
<b>Figura 9 Heatmap da intensidade normalizada das proteínas diferencialmente expressas no escarro (A) e soro (B) de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofilica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P).</b> .....	46
<b>Figura 10: Rede de interação proteína-proteína das proteínas alteradas no escarro de pacientes com asma eosinofílica (A), neutrofilica (B) e mista (C).</b> . .....	49
<b>Figura 11: Principais vias enriquecidas pelas proteínas alteradas no escarro (A) e soro (B) de pacientes com asma eosinofílica (azul), neutrofilica (roxo) e mista (amarelo).</b> .....	50
<b>Figura 12: Rede de interação proteína-proteína das proteínas alteradas no soro de pacientes com asma eosinofílica (A) e mista (B).</b> .....	52
<b>Figura 13: Dendograma mostrando a comparação entre os quatro grupos de pacientes (eosinofílico, neutrofilico, misto e paucigranulocítico), utilizando a intensidade normalizada dos metabólitos significantes.</b> .....	57
<b>Figura 14: Modelo de predição por PLS-DA.</b> .....	59
<b>Figura 15: Modelo de predição por J48.</b> .....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da população de estudo. ....	36
Tabela 2: Total de proteínas identificadas no escarro e soro de pacientes com asma. ....	38
Tabela 3: Proteínas exclusivas de dois ou mais grupos identificadas no escarro de pacientes com asma. ....	39
Tabela 4: Proteínas exclusivas de um ou mais grupos identificadas no soro de pacientes com asma. ....	39
Tabela 5: Lista de proteínas alteradas significativamente no escarro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P). ....	44
Tabela 6: Lista de proteínas alteradas significativamente no soro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P). ....	47
Tabela 7: Matriz dos metabólitos do escarro gerada após o teste Tukey. ....	54
Tabela 8: Lista de metabólitos diferencialmente expressos no escarro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P). ....	55
Tabela 9: Matriz dos metabólitos do soro gerada após o teste Tukey. ....	56
Tabela 10: Lista de metabólitos diferencialmente expressos no soro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P). ....	56
Tabela 11: Matriz de confusão gerada a partir da análise dos dados de escarro pelo algoritmo Random Forest. ....	62
Tabela 12: Matriz de confusão gerada a partir da análise dos dados de soro pelo algoritmo Random Forest. ....	63
Tabela 1.A Proteínas identificadas no escarro (E) e soro (S) de pacientes com asma, exclusivas de um ou mais grupos fenotípicos. N ....	87
Tabela 2.A Proteínas significativamente alteradas no escarro de pacientes com asma. ....	87
Tabela 3.A Proteínas significativamente alteradas no soro de pacientes com asma. ....	89

<b>Tabela 1.B: Vias enriquecidas identificadas pelo Reactome associadas a proteínas diferencialmente expressas no escarro de grupos fenotípicos da asma.....</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 2.B Vias enriquecidas identificadas pelo Reactome associadas a proteínas diferencialmente expressas no soro de grupos fenotípicos da asma. ....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE ABREVEATURAS

ACN	Acetonitrila
AM	Aprendizado de Máquina
IL5R	Receptor de IL5
ANXA1	Anexina A1
ARHGDIB	Inibidor da dissociação de Rho GPD
BCA	Ácido Bicinconínico
BD	Broncodilatador
BPIFA1	Família A membro 1 contendo repetição BPI
BSA	Albumina de soro bovino
BTD	Biotinidase
C1QA	Subcomponente do complemento C1 subunidade A
CALML5	Proteína semelhante a calmodulina 5
CDs	Células dendríticas imaturas
CRIS3	Proteína secretória rica em cisteína 3
CST4	Ccistatina-S
CTSG	Catepsina G
CVF	Capacidade vital forçada
CXCL8	Ligante de quimiocina com motivo C-X-C 8
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DEFA3	Defensina de neutrófilo 3
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DTT	Ditiotreitol
E	Eosinofílico
ELANE	Elastase de neutrófilos
ESI	<i>Electrospray</i>
FCN3	Ficolina-3
FDR	<i>False discovery rate</i> - taxa de falsa descoberta
FENO	<i>Fractional exhaled nitric oxide</i> - Fração de oxido nítrico exalado
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IGHV3-66	imunoglobulina de cadeia pesada 3-66
IL	Interleucina
ILC2	Células linfóides inatas do tipo 2
ILC3	Células linfóides inatas do tipo 3
IMC	Índice de Massa Corporal
LAMP2	Glicoproteína de membrana associada a lisossomo 2
LC	<i>Liquid chromatography</i> - Cromatografia líquida
LDHA	Lactato desidrogenase cadeia A
LPA	Apolipoproteína
LPS	Lipopolissacarídeos bacterianos
M	Misto
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIF	Fator de inibição de migração de macrófagos
MMP9	Metaloproteinases de matriz 9
MoNA	<i>MassBank of North America</i>
MPO	Mieloperoxidase
MS	<i>Mass spectrometry</i> - Espectrometria de massas
MYH9	miosina 9
N	Neutrófilo
OEA	Oleoetanolamina
P	Paucigranulocítico
PCA	Análise de componentes principais
PDG2	Prostaglandina D2
Pep	Peptídeo único
PF4	Fator de plaquetas 4
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PRG4	Proteoglicano 4

PRTN3	Mieloblastina
Q	Quadupolo
TOF	<i>Time-of-flight</i> – Tempo-de-vôo
S100A7	Proteína S100-A7
S100A8	Proteína S100-A8
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SCGB1D2	Secretoglobina família 1D membro 2
SDS/PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate –Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
SMR3B	Proteína 3B regulada por andrógeno da glândula submaxilar
SMR3B	Proteína da glândula submaxilar regulada por andrógeno 3B
TA	Temperatura ambiente
TCA	Teste de controle da asma
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador- $\beta$ 1
Th	T auxiliar ( <i>helper</i> )
THBS1	Trombospondina 1
TIC	<i>Total ion current</i> - Corrente de íons totais
TLR	<i>Toll-like receptors</i> - receptores tipo toll
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TSLP	Linfopietina estromal do timo
ultra-HPLC	Sistema de ultra cromatografia líquida de alta performance
VC	Validação Cruzada
VEF <sub>1</sub>	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VTN	Vitronectina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiologia e etiologia da asma .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Fenótipos da asma .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Fisiopatologia da asma .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Diagnóstico e biomarcadores promissores .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Tratamento .....</b>	<b>12</b>
<b>1.6 Proteômica e metabolômica por espectrometria de massas.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivos Gerais.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Desenho de estudo .....</b>	<b>21</b>
3.1.1 População .....	21
3.1.2 Critérios de inclusão .....	21
3.1.3 Critérios de exclusão .....	22
3.1.4 Grupos de estudo .....	22
<b>3.2 Coleta e processamento de amostras.....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Escarro induzido.....	23
3.2.2 Soro.....	26
<b>3.3 Depleção de proteínas do soro.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 SDS-Page.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5 Quantificação de proteínas .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6 Redução, alquilação e digestão de proteínas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.7 Sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas .....</b>	<b>28</b>

<b>3.8</b>	<b>Identificação e quantificação <i>label-free</i> das proteínas</b>	<b>29</b>
<b>3.9</b>	<b>Análise funcional e rede de interação das proteínas</b>	<b>30</b>
<b>3.10</b>	<b>Preparo dos metabólitos</b>	<b>31</b>
<b>3.11</b>	<b>Metabolômica por MS</b>	<b>31</b>
<b>3.12</b>	<b>Análise estatística do metaboloma</b>	<b>31</b>
<b>3.13</b>	<b>Identificação e caracterização dos metabólitos</b>	<b>32</b>
<b>3.14</b>	<b>Algoritmos de classificação</b>	<b>32</b>
<b>3.15</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>33</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Características da população de estudo</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise do proteoma do soro e escarro de pacientes com asma</b>	<b>37</b>
4.2.1	Análise da depleção das proteínas do soro	37
4.2.2	Identificação e ontologia genética	38
4.2.3	Análise de significância	42
4.2.4	Vias enriquecidas	48
<b>4.3</b>	<b>Análise do metaboloma do soro e escarro de pacientes com asma</b>	<b>53</b>
4.3.1	Análise de significância	53
4.3.2	Clusterização Hierárquica	57
4.3.3	Análise de classificação por algoritmos	58
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>92</b>

## RESUMO

A asma é uma doença heterogênea caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas. A resposta ao medicamento pode diferir mediante à resposta inflamatória desencadeada pelas células imunológicas presentes no microambiente pulmonar. Assim, a fenotipagem da asma com base no perfil inflamatório local pode auxiliar na definição do tratamento e na identificação de novos alvos terapêuticos. Esse estudo buscou identificar as mudanças no perfil proteico e metabólico do escarro induzido e soro de pacientes com asma eosinofílica, neutrofílica, mista e paucigranulocítica, e estabelecer um painel de moléculas capazes de discriminar os grupos analisados. A análise proteômica *shotgun* foi conduzida por um sistema de ultra cromatografia líquida de alta performance (ultra-HPLC) acoplado ao espectrômetro de massas quadupolo Exactive Orbitrap. Já o perfil metabolômico foi analisado no sistema de HPLC acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadupolo-tempo-de-vôo. 52 proteínas apresentaram diferença significativa entre pelo menos 2 grupos estudados no escarro induzido, enquanto apenas 12 estavam alteradas entre pelo menos 2 grupos no soro ( $p < 0,05$ ). A maioria das proteínas estava associada a vias do sistema imune, principalmente relacionadas a degranulação de neutrófilos. Um painel de 5 proteínas identificadas no escarro induzido (BP1FA1, MUC5AC, CAMP, CTSG, e ANXA1) foi capaz de discriminar os grupos fenotípicos estudados, e no soro o painel de 4 proteínas (FCN3, THBS1, LAMP2 e CRISP3) só não diferenciou neutrofílicos de paucigranulocíticos. O perfil metabólico permitiu identificar 17 metabólitos no escarro e 15 no soro com alguma alteração significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Ainda, utilizando o algoritmo de classificação Random Forest, foi possível discriminar os grupos fenotípicos com acurácia de 98,62 % no escarro e 97,98 % no soro. Esse estudo demonstrou que, pelo perfil proteico e metabólico do escarro e soro foi possível identificar as alterações moleculares dos fenótipos inflamatórios da asma. Essas proteínas e metabólitos devem ser validados para que essas moléculas possam ser utilizadas na fenotipagem da asma, auxiliando o tratamento da doença.

Palavras-chave: fenótipos inflamatórios da asma, proteômica, metabolômica, inteligência artificial.

## ABSTRACT

Asthma is a heterogeneous disease characterized by chronic airway inflammation. The drug response may differ due to the inflammatory response triggered by the immune cells present in the pulmonary microenvironment. Thus, asthma phenotyping based on local inflammatory profile may aid in treatment definition and in the identification of new therapeutic targets. This study aimed to identify the changes in protein and metabolic profile of induced sputum and serum from patients with eosinophilic, neutrophilic, mixed and paucigranulocytic asthma, and to establish a panel of molecules capable of discriminating the analyzed groups. Proteomic analysis was performed by a high performance ultra-liquid chromatography (ultra-HPLC) system coupled to the quadupole Exactive Orbitrap mass spectrometer. The metabolomic profile was analyzed in an HPLC system coupled to a quadrupole-flight-time mass spectrometer. 52 proteins showed significant difference between at least 2 groups in induced sputum, while only 12 were altered between at least two groups in the patients' serum ( $p < 0.05$ ). Most proteins were associated with immune system pathways, mainly related to neutrophil degranulation. A panel of 5 proteins identified in induced sputum (BPIFA1, MUC5AC, CAMP, CTSG, e ANXA1) was capable of discriminating the phenotypic groups, and a panel of 4 proteins identified in serum (FCN3, THBS1, LAMP2 e CRISP3) just did not differentiate neutrophils from paucigranulocytes. In the metabolic profile, 17 metabolites that showed some significant change between the groups were identified in sputum and 15 in serum ( $p < 0.05$ ). Also, using the Random Forest classification algorithm, it was possible to discriminate the phenotypic groups with accuracy of 98.62% in sputum and 97.98% in serum. This study demonstrated that, due to the protein and metabolic profile of sputum and serum, it was possible to identify the molecular changes of the inflammatory phenotype of asthma. These proteins and metabolites must be validated so that these molecules can be used in asthma phenotyping, relevant to the treatment of the disease.

Keywords: inflammatory phenotypes of asthma, proteomics, metabolomics, artificial intelligence.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia e etiologia da asma

A organização *Global Initiative for Asthma* (GINA) define a asma como uma doença heterogênea, que é caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, com limitação variável do fluxo de ar expiratório e sintomas respiratórios que variam com o tempo e a intensidade. Os sintomas dessa doença são: episódios de sibilância, falta de ar, aperto no peito e/ou tosse e limitação variável do fluxo de ar expiratório, que podem ser desencadeados ou exacerbados por alguns fatores, como exercício, exposição a alérgenos ou irritantes, infecções respiratórias e alterações climáticas (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

A asma é uma das principais doenças respiratórias crônicas e figura entre uma das mais prevalentes no mundo, afetando mais de 339 milhões de pessoas no mundo, sendo que no Brasil aproximadamente 20 milhões são afetadas (THE GLOBAL ASTHMA REPORT 2018, 2018). Estima-se que em 2025 esse número aumentará em 100 milhões, resultando em 400 milhões de pessoas com asma. Apesar do alto número, é uma doença considerada subdiagnosticada tanto em países de alta renda quanto em países de baixa e média renda, sendo que nos países mais pobres também é uma doença subtratada, resultando em uma alta taxa de morbidade e mortalidade. A asma é responsável por 1 a cada 250 mortes no mundo, sendo que a maioria dos casos poderiam ser evitados com a realização de um tratamento adequado (MASOLI et al., 2004; BOUSQUET; KHALTAEV, 2007).

A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostra a prevalência de diversas doenças no Brasil e a asma está entre elas. Em 2013 a prevalência da asma no Brasil em indivíduos com mais de 18 anos era de 4,4 %, sendo que não houve uma grande variação entre as regiões do país. A maior prevalência foi na região Sul (5,3%), seguida da região Sudeste (4,8%), Norte (4,5%), Centro-Oeste (4,2%), e a menor prevalência foi encontrada na região Nordeste (3,2%). Ainda, a proporção de mulheres diagnosticadas com asma foi aproximadamente 30% maior do que a de homens (IBGE, 2014). Segundo dados consultados no banco de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), o número

de internações por asma também é alto no Brasil, variando de aproximadamente 5 a 9 mil internações por mês no ano de 2018 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O alto impacto gerado nos serviços de saúde e, conseqüentemente, na economia é principalmente devido ao grande número de internações e também de medicamentos dispendidos no tratamento da doença (BAHADORI et al., 2009; NUNES; PEREIRA; MORAIS-ALMEIDA, 2017). A economia também é afetada devido às faltas em trabalho e escola, pois os sintomas da asma geram um impacto na qualidade de vida do paciente, de forma que quando não há controle da doença, o risco de limitações de atividade física é duas vezes maior, e de atividades diárias é 66% (HASELKORN et al., 2010). Entretanto, quando há o controle da asma a qualidade de vida dos pacientes é semelhante aos indivíduos que não possuem a doença (JANSSON et al., 2016).

A asma pode se desenvolver em qualquer idade, entretanto, na maioria dos casos é diagnosticada na infância, e mesmo os casos que são diagnosticados em indivíduos adultos parecem ter o processo da doença iniciado durante a infância (STERN et al., 2008). Dentre os fatores de risco para desenvolvimento da asma está a susceptibilidade genética, porém o histórico familiar de asma não é suficiente e nem necessário para o desenvolvimento da doença (BURKE et al., 2003).

A exposição ao tabaco também é outro fator relacionado a asma, e aqueles cujas mães sofreram exposição durante a gravidez também apresentam o risco de desenvolver a doença. Durante o período pré-natal também estão relacionados a dieta e nutrição materna, bem como o estresse. Outros fatores perinatais como prematuridade, baixo peso ao nascer e ausência de aleitamento materno também são fatores relacionados. Além desses, as infecções virais respiratórias, obesidade, dietas com baixa ingestão de vitaminas C e E, exposição a animais e sensibilização a alérgenos são importantes fatores para o desenvolvimento da asma. Durante a vida adulta, a exposição ocupacional figura como um fator primordial, sendo que os agentes variam desde reagentes químicos a pó de farinha (NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE, 2007; SUBBARAO; MANDHANE; SEARS, 2009; BEASLEY; SEMPRINI; MITCHELL, 2015).

Por outro lado, a hipótese da higiene propõe que a limpeza de ambientes deixaria as crianças menos expostas a microrganismos e outros alérgenos.

Acredita-se que as condições higiênicas e o maior tamanho da família estão associados a menor prevalência de asma, devido ao desbalanço da resposta imune promovida por células T auxiliar (*helper*) 1 (Th1) e Th2. A supressão da resposta Th2, muito frequente na asma, seria desencadeada pela exposição a microrganismos que ativam receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores tipo toll (TLR – *toll-like receptors*) ou CD14. Entretanto, outras explicações são necessárias para tentar compreender essa proteção, uma vez que exposição a endotoxina pode promover uma resposta Th1 reduzida, e não aumentada, apresentando redução na produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), interleucina (IL) 12 e IL-10. Além disso, o convívio com cachorros na infância também poderia ser um fator protetor da asma (BROOKS; PEARCE; DOUWES, 2013).

Por outro lado, a infecção por alguns microrganismos podem favorecer o desencadeamento de episódios de asma, como o vírus sincicial respiratório. Ainda, as infecções que estão envolvidas na tolerância e consequente proteção da asma, podem causar outros problemas de saúde, gerado um questionamento sobre essa hipótese (VAN TILBURG BERNARDES; ARRIETA, 2017).

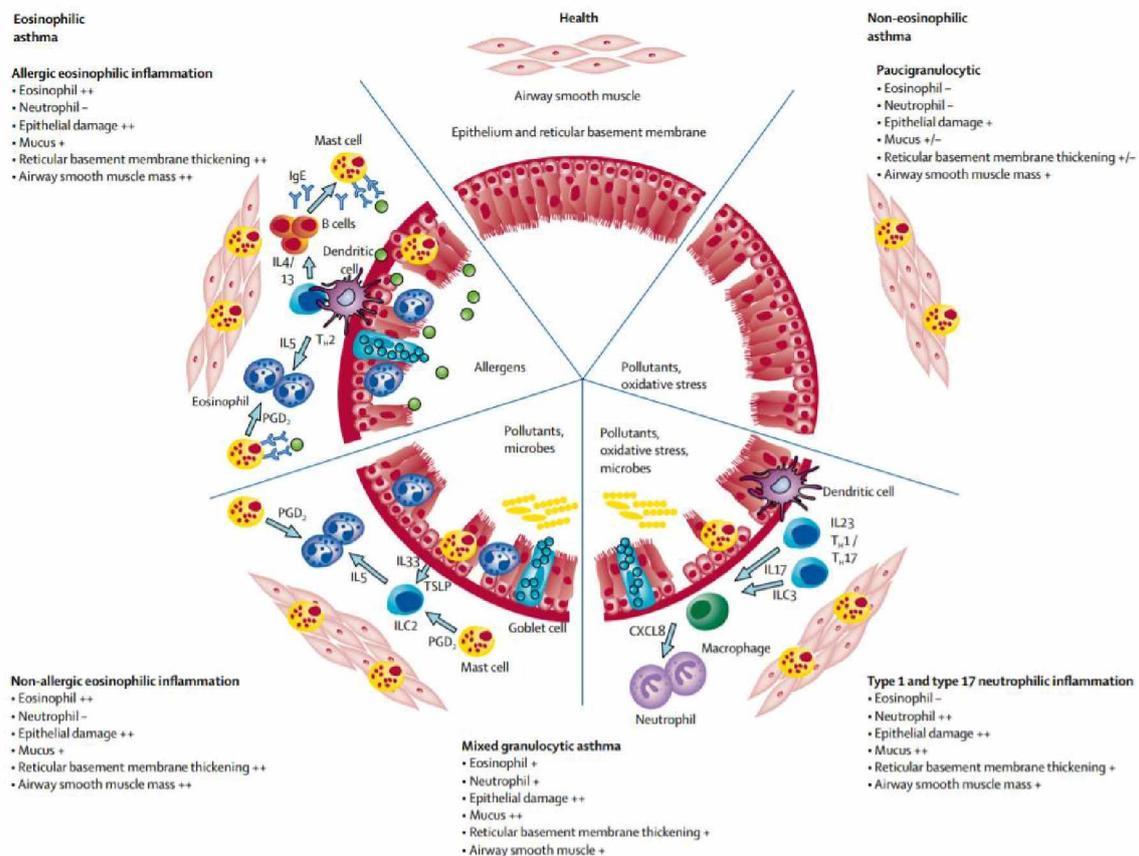
## 1.2 Fenótipos da asma

Devido à heterogeneidade da asma, é possível classificar os pacientes por meio de características observáveis de ordem clínica, fisiológica e patológica, o que pode facilitar o tratamento, uma vez que na maior parte das vezes pacientes de fenótipos distintos possuem respostas diferentes ao mesmo medicamento. Os fenótipos não estão bem estabelecidos, mas a caracterização desses pacientes ocorre principalmente pela fenotipagem inflamatória, com base no tipo celular inflamatório predominante nas vias aéreas (Figura 1) (SCHLEICH et al., 2013).

A asma eosinofílica corresponde a um alto número de eosinófilos encontrados no escarro. Ela pode ser alérgica ou não-alérgica. A asma alérgica acomete em sua maioria crianças e está associada a alergia e outras doenças atópicas, como rinite alérgica e dermatite atópica. Esses pacientes possuem níveis mais altos de eosinófilos, mastócitos, imunoglobulina (Ig) E total e específica e citocinas encontradas no perfil de resposta imune mediada por células Th2. Pode

se apresentar nas formas leve ou grave, e possivelmente está relacionada com o histórico familiar e tem influência genética e ambiental (WOODRUFF et al., 2009; WENZEL, 2012; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019). A asma eosinofílica não-alérgica pode ser associada a sinusite, pólipos nasais e doença respiratória exacerbada pela aspirina. Normalmente se desenvolve em adultos, e a resposta inflamatória é diferente do processo mediado por células Th2 e mais complexa. Esse fenótipo ocorre em formas mais graves e parece não ter relação com a história familiar (MIRANDA et al., 2004; WENZEL, 2012).

**Figura 1: Fenótipos inflamatórios da asma.** Os fenótipos inflamatórios da asma são divididos em asma eosinofílica alérgica e não alérgica, asma neutrofílica, asma paucigranulocítica e asma granulocítica mista. IL: interleucina. Th: T auxiliar. PDG2: prostaglandina D2. TSLP: linfopoietina estromal do timo. ILC2: células linfóides inatas do tipo 2. CXCL8: ligante de quimiocina com motivo C-X-C 8. ILC3: células linfóides inatas do tipo 3.



Fonte: PAPI, et al., 2018.

A asma neutrofílica é caracterizada pela presença de altos níveis de neutrófilos no escarro. Parece estar associada com a resistência ao tratamento com corticoesteróides e a gravidade da doença, uma vez que esses pacientes

comumente apresentam função pulmonar alterada, paredes das vias aéreas mais espessas e maior expressão de metaloproteinases da matriz. Além disso, há indícios que esse fenótipo desencadeie uma resposta inflamatória do tipo Th1 e Th17 (WOODRUFF et al., 2001).

A asma mista granulocítica consiste na inflamação eosinofílica e neutrofílica concomitantemente, verificada pela alta contagem de eosinófilos e neutrófilos no escarro. Esses pacientes costumam ter altos níveis de fibrinogênio, menor função pulmonar e alto grau de hiperresponsividade das vias aéreas, processo que será explicado no subtópico 1.3. Por outro lado, a asma paucigranulocítica consiste na baixa contagem de células inflamatórias no escarro. Em sua maioria, os pacientes paucigranulocíticos não são alérgicos, possuem função pulmonar próxima do normal ou pouco alterada e apresentam uma baixa resposta corticosteroide inalatório (SIMPSON et al., 2006; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

Além da fenotipagem inflamatória, os pacientes asmáticos podem ser classificados de acordo com outros fatores, como o início da doença. A asma de início precoce é o fenótipo mais comum, e tem seu início na infância. Na maioria das vezes ocorre na forma eosinofílica alérgica, podendo ser leve ou grave. Já a asma de início tardio inicia-se já na idade jovem ou adulta pela primeira vez. Normalmente ocorre mais em mulheres na forma eosinofílica não-alérgica, em formas mais graves, de forma que a função pulmonar desses pacientes é geralmente mais baixa (PAPI et al., 2018; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

A asma relacionada a obesidade pode estar associada com o estado inflamatório que pode ocorrer nesses indivíduos, que apresentam altos níveis de determinados mediadores, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e leptinas. Apesar disso, pessoas obesas tendem a apresentar maior gasto energético durante a respiração, falta de condicionamento físico, maior grau de dispneia para uma mesma atividade física e maior probabilidade de refluxo gastroesofágico, com tosse e aperto no peito associados, o que torna difícil o diagnóstico pois podem ser fatores de confusão, e não fatores determinantes na asma (PAKHALE et al., 2010; WENZEL, 2012).

A asma induzida pelo exercício consiste em pacientes asmáticos que apresentam os sintomas principalmente após o exercício. O processo inflamatório que ocorre nesse fenótipo ainda não é bem esclarecido, mas esses pacientes

costumam ter asma leve e broncoconstrição após exercício. A contagem de eosinófilos no escarro e a resposta Th2 não são bem estabelecidas, com achados contraditórios (KARJALAINEN et al., 2000; HALLSTRAND et al., 2005).

### 1.3 Fisiopatologia da asma

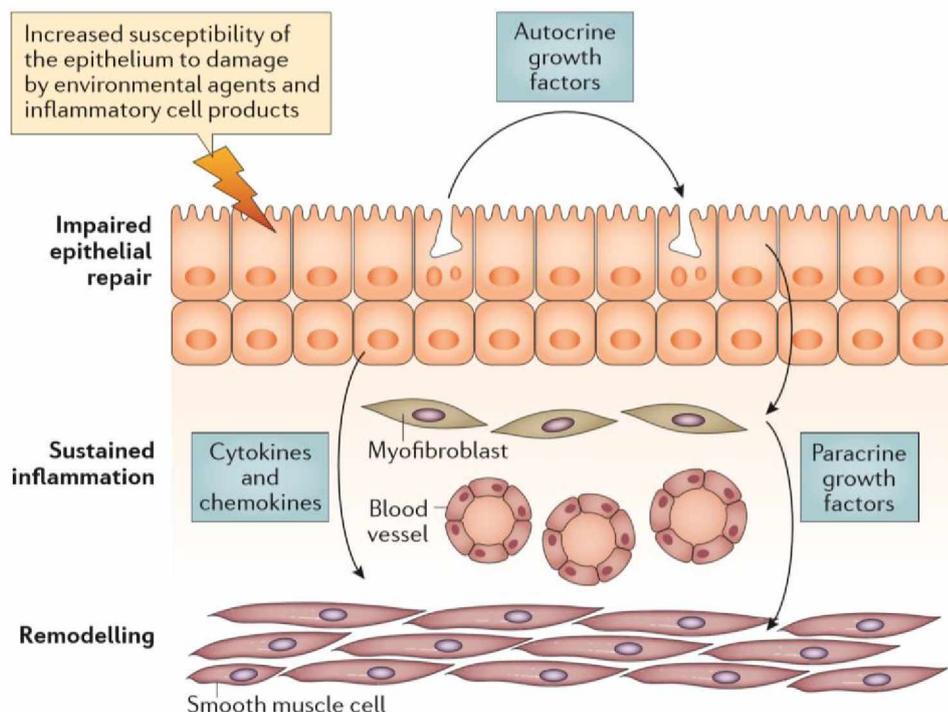
A limitação variável das vias aéreas é uma característica de pacientes asmáticos que pode ocorrer em uma fração de minutos a dias, podendo se tornar fixa ou parcialmente reversível se não tratada corretamente. A inflamação pode aumentar essa obstrução por meio do infiltrado celular, da superprodução de muco e da broncoconstrição, que durante as exacerbações agudas, é aumentada gerando um estreitamento das vias aéreas em resposta a um estímulo. Dessa forma, a exposição a alérgenos e infecções virais ou bacterianas podem agravar ainda mais o quadro clínico. Ainda, outros fatores podem promover uma obstrução aguda, como o uso de aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroides, bem como exercícios físicos, ar frio, irritantes e até mesmo o estresse. (NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE, 2007; MCCRACKEN et al., 2017).

Como citado acima, a limitação do fluxo de ar nem sempre é reversível. O remodelamento das vias aéreas é uma combinação de alterações estruturais e celulares permanentes que pode ocorrer em pacientes asmáticos, de forma que a espessura da parede das vias torna-se mais grossa quanto mais grave é a doença. Nesse processo ocorre a hiperplasia e hipertrofia do músculo liso das vias aéreas, associada a deposição de matriz extracelular; angiogênese; neovascularização; espessamento da lâmina reticular subepitelial, devido a deposição de colágeno, periostina, tenascina, osteopontina e fibronectina; e metaplasia epitelial, com aparecimento de células mucosas e consequente aumento da produção de muco (KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013).

Os eosinófilos também contribuem para o remodelamento das vias produzindo vários fatores responsáveis por ativar o epitélio e as células mesenquimais. Dentre estes fatores temos o fator de crescimento transformador- $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1), proteínas catiônicas e diferentes citocinas (KARIYAWASAM; ROBINSON, 2007). Entretanto, o infiltrado eosinofílico não é necessário para que ocorra o remodelamento, uma vez que esse processo pode ser provocado por

outros fatores. Em decorrência de uma lesão epitelial, a unidade trófica epitelial-mesenquimal pode ser formada entre as camadas de músculo liso e epitelial, permitindo a comunicação entre essas camadas (Figura 2). Nessa unidade há grande quantidade de fatores de crescimento, entre eles o TGF $\beta$  e fatores de crescimento epidérmico, que favorecem a metaplasia, além de neurotrofinas e fatores angiogênicos, propiciando a proliferação neuronal e microvascular, e citocinas que contribuem para a manutenção da inflamação crônica (HOLGATE et al., 2004).

**Figura 2: Unidade trófica epitelial-mesenquimal.** Após uma lesão no epitélio, forma-se uma comunicação entre esta camada e o músculo liso, com a produção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, favorecendo a inflamação crônica.



Fonte: HOLGATE et al., 2015.

A hiperresponsividade das vias aéreas é outro processo que ocorre nesses pacientes, e consiste em uma resposta broncoconstritora exagerada a um estímulo específico. Os receptores beta ( $\beta$ ) 2-adrenérgicos localizados no músculo liso das vias aéreas podem controlar essa situação, pois em resposta a agentes  $\beta$ 2-agonista promovem broncodilatação. Além disso, esse processo pode ser mediado pelas vias colinérgicas, que são alvo da terapia anticolinérgica, e então o grau de

hiperresponsividade pode ser medido por meio de desafios com metacolina (MCCRACKEN et al., 2017).

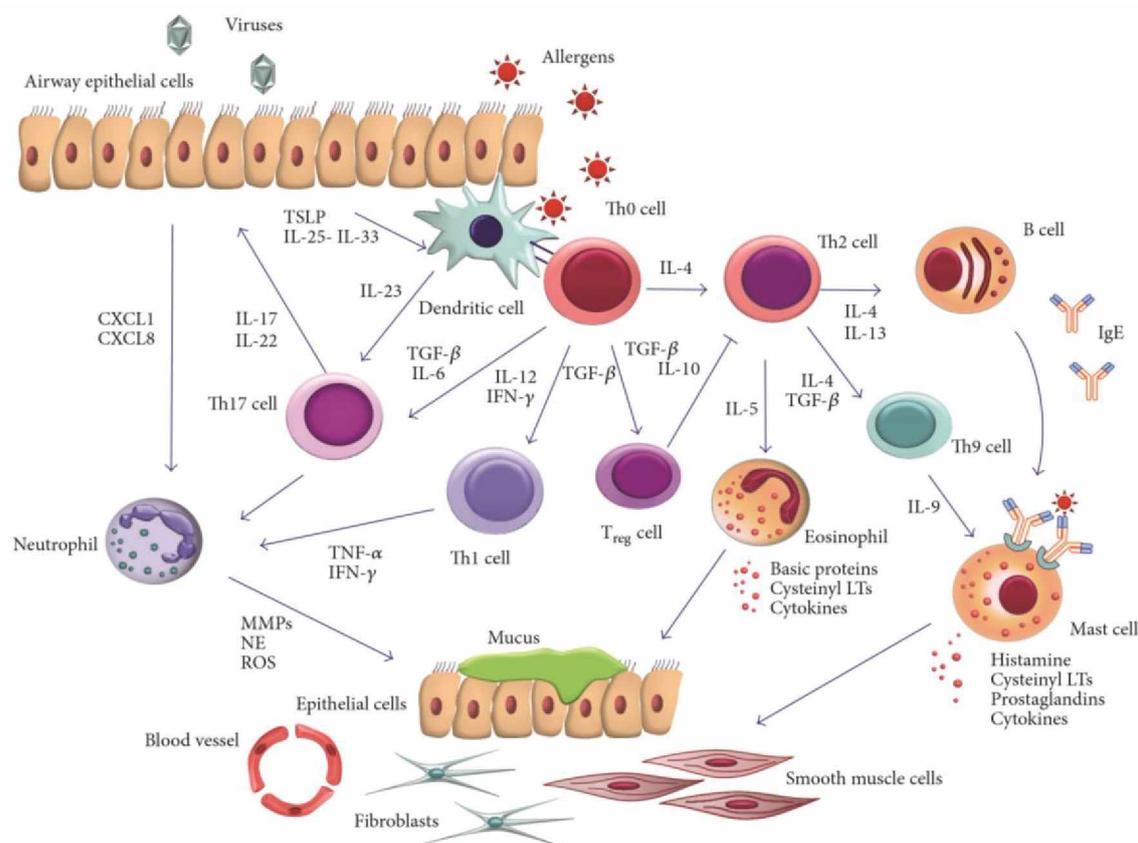
A inflamação das vias aéreas possui um papel importante na asma. Os linfócitos T são responsáveis por regular o perfil celular inflamatório, de forma que a resposta Th2 é presente principalmente na asma clássica do tipo alérgico, enquanto que os perfis Th1 e Th17 estão associadas com asma neutrofílica (Figura 1). A maioria dos pacientes com asma associada a sensibilização a alérgenos ambientais apresenta inflamação do tipo Th2. O tipo celular primordial do infiltrado inflamatório desse tipo de inflamação é o eosinófilo, entretanto mastócitos, basófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos também podem ser encontrados (HOLGATE et al., 2015).

Durante a sensibilização, as células epiteliais secretam as citocinas IL-25, IL-33 e linfopietina estromal do timo (TSLP), estimulando as células dendríticas apresentadoras de antígeno, que capturam e processam o alérgeno em peptídeos, e os apresenta por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) a receptores de células T *naive* (Figura 3). As células T *naive* podem então se diferenciar em um perfil Th2 sob influência da produção de IL-4. As células B iniciam a mudança de classe de IgM para IgE, enquanto que as células Th2 migram para a mucosa para iniciar a resposta Th2 e secretar citocinas pró-inflamatórias, como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que irão então amplificar a resposta alérgica inflamatória (KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013).

Uma vez sensibilizado, a posterior exposição ao alérgeno provocará resposta broncoconstritora imediata desencadeada por mastócitos, com liberação IgE-dependente de histamina, prostaglandina D2 e leucotrieno C4, que pode durar de 5 a 90 minutos. A etapa seguinte, resposta tardia, pode durar de 3 a 12 horas e envolve a infiltração e ativação de leucócitos, principalmente eosinófilos, produção de leucotrieno C4, secreção de citocinas do perfil Th2 e o aumento da resposta alérgica das vias aéreas (HOLGATE et al., 2015). Uma nova classe de células linfoides inatas tipo 2, os nuócitos, também pode contribuir para a resposta inflamatória, produzindo citocinas como IL-5, IL-9 e IL-13 (LIU et al., 2015). Além disso, as lipoxinas e resolvinas também parecem ter um papel importante na inflamação, uma vez que a lipoxina A4 pode induzir apoptose de eosinófilos e

diminuir a atividade de linfócitos *natural killers*, controlando a inflamação (BARNIG; LEVY, 2013).

**Figura 3: Mecanismos patológicos da inflamação das vias aéreas na asma.** A inflamação pode ser desencadeada pela migração de células dendríticas imaturas (CDs) para o epitélio em resposta a interação dos alérgenos com o epitélio das vias aéreas. Essas CDs sofrem maturação, detectam e processam o alérgeno, migram para o linfonodo e interagem com as células T *naive*, promovendo a diferenciação destas em células Th2. As células Th2 migram para a mucosa para dar início a resposta inflamatória, resultando na maturação dos eosinófilos. As células Th1 e Th17 também podem ser ativadas, promovendo o recrutamento de neutrófilos. Outras células também produzem outros mediadores, citocinas e fatores de crescimento que podem influenciar na proliferação de células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas e células vasculares endoteliais.



Fonte: PELAIA et al., 2015.

A resposta imune na asma eosinofílica não-alérgica ocorre um pouco diferente (Figura 1). Apesar de não ser bem esclarecida, a resposta parece ser mais complexa, uma vez que o processo não está envolvido com produção de IgE. Possivelmente a inflamação envolve a produção de alarminas IL -33, IL-25 e TSLP em resposta ao dano no epitelial, ativando células linfóides inatas que secretarão IL-5 e IL-13 (KIM et al., 2017; PAPI et al., 2018).

A asma não-eosinofílica ainda não é tão bem compreendida. A alta contagem de neutrófilos no escarro parece estar correlacionada com a resistência ao tratamento com corticosteróides e com a gravidade da asma. Além disso, pacientes com asma grave apresentaram resposta do tipo Th1, Th17 ou células linfóides inatas tipo 3 e presença de quimiocinas que estimulam a migração de neutrófilos, como a CXCL-8 (Figura 3) (PAPI et al., 2018). Essa quimiocina pode tanto ser liberada por leucócitos como os neutrófilos, bem como ser induzida por IL-17, citocina secretada por células Th17, estabelecendo uma colaboração entre os dois tipos celulares. Os neutrófilos também podem secretar CXCL 10, que atuam no recrutamento de células Th1, produtoras de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Por sua vez, IFN- $\gamma$  pode estimular a migração de neutrófilos, estabelecendo então a conexão entre células Th1, Th17 e neutrófilos. Ainda, a asma eosinofílica e não-eosinofílica podem ocorrer conjuntamente, como é o caso da inflamação mista granulocítica (RAY; KOLLS, 2017).

#### **1.4 Diagnóstico e biomarcadores promissores**

Atualmente, não há um padrão ouro para o diagnóstico de asma. O diagnóstico é realizado com base na avaliação clínica para investigação de histórico familiar e presença de sintomas, juntamente com testes para verificar a limitação variável do fluxo aéreo (hiperresponsividade brônquica) (PAPI et al., 2018).

A GINA preconiza que, para adultos, adolescentes e crianças maiores que 6 anos, dentre os sintomas respiratórios que devem ser avaliados, estão a falta de ar, tosse, aperto no peito e chiado. Entretanto, vários fatores aumentam ou diminuem a probabilidade desses sintomas serem desencadeados pela asma. A probabilidade do paciente ter asma aumenta quando mais de um desses sintomas está presente e quando esses sintomas são: piores a noite ou nas primeiras horas da manhã; variáveis de acordo com o tempo e intensidade; desencadeados por infecções virais, exercício, mudanças no tempo, exposição a alérgenos ou irritantes. Por outro lado, a produção de escarro crônica, tosses isoladas sem outros sintomas respiratórios, dor no peito, falta de ar associada a tonturas ou formigamento e dispneia induzida por exercício com inspiração com ruído, são

fatores que diminuem a chance dos sintomas respiratórios estarem relacionados com a asma (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

Outro fator que deve ser avaliado é a história familiar e a história do próprio paciente. Caso houver histórico de asma ou alergias na família e rinite ou eczema no paciente, também há aumento da probabilidade de os sintomas serem desencadeados pela asma. O exame físico é outra etapa que deve ser realizada. Deve ser avaliada a presença de chiado na ausculta respiratória, mas que nem sempre está presente, e também o nariz, para identificar sinais de rinite alérgica e polipose nasal (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

A espirometria é o exame de função pulmonar de escolha para detecção de limitação de fluxo variável. A limitação é caracterizada por uma razão do VEF<sub>1</sub> por capacidade vital forçada (CVF) (VEF<sub>1</sub> / CVF) menor que 75% para adultos e menor que 90% para crianças. Em seguida, deve-se avaliar a variação dessa limitação, ou seja, se há reversão na obstrução das vias aéreas. Na maioria das vezes é realizado o teste após inalação de broncodilatador beta-2 agonista de curta duração, de forma que a variação maior que 12% de VEF<sub>1</sub> e maior que 200 mL em valor absoluto em relação ao valor na avaliação pré-broncodilatador é característica de pacientes asmáticos (MCCRACKEN et al., 2017; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

Além dessas avaliações, outros testes podem ser utilizados para auxiliar o diagnóstico, como o teste de broncoprovocação para avaliar a hiperresponsividade, utilizando agentes inalantes como metacolina ou carbacol, bem como histamina, exercício e hiperventilação voluntária. Os testes de alergia podem ser úteis para complementar o diagnóstico de pacientes que apresentam sintomas respiratórios para determinados fenótipos de asma. O teste cutâneo de puntura (*skin prick test*) é mais confiável e sensível, porém a dosagem de IgE específica sérica também pode ser utilizada para avaliar a atopia (MCCRACKEN et al., 2017; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

Apesar de vários testes disponíveis, nenhum deles analisa diretamente a inflamação das vias aéreas. O lavado broncoalveolar e o escarro são as melhores amostras para essa análise, onde é realizada a contagem diferencial das células inflamatórias. Entretanto, a coleta dessas amostras não está disponível a fácil acesso, além de serem procedimentos invasivos, que demandam tempo e uma

equipe especializada. Dessa forma, são necessárias novas formas de diagnóstico menos invasivas e simples (ARRON; IZUHARA, 2015).

A fração de oxido nítrico exalado (*fractional exhaled nitric oxide* – FENO) é um biomarcador que tem sido utilizado para a fenotipagem da asma, mas que ainda há dúvidas sobre seu uso. Apesar de não ser exclusivo da asma, a FENO é encontrada em altos níveis no fenótipo eosinofílico de resposta Th2. Os eosinófilos, que podem ser contados tanto no sangue quanto no escarro, e os neutrófilos encontrados no escarro, são biomarcadores importantes para identificar os fenótipos inflamatórios. Apesar de não ser preconizado como uso de rotina, a contagem de eosinófilos no sangue tem sido utilizada no diagnóstico de fenótipos da asma (KIM et al., 2017).

A periostina, uma proteína da matriz extracelular, está envolvida com a resposta Th2 e o recrutamento de eosinófilos. Essa proteína foi proposta como um biomarcador de resposta imune Th2 para avaliar a resposta ao tratamento de moléculas alvo a IL-13 e IgE (IZUHARA; OHTA; ONO, 2016). Todos esses biomarcadores citados tem em comum diferenciar a asma de resposta Th2 e são os principais, com maior potencial de uso para diagnóstico e prognóstico, entretanto o uso dos mesmos ainda permanece controverso (TIOTIU, 2018).

## **1.5 Tratamento**

O tratamento da asma tem como principal objetivo a manutenção do controle das manifestações clínicas e evitar possíveis complicações, como mortalidade, exacerbações, limitação do fluxo do ar fixa e efeitos colaterais do medicamento. A eficácia do tratamento depende de vários fatores além dos medicamentos, como a educação do paciente, uso correto dos dispositivos inalatórios, tratamento de comorbidades e fatores de risco, além das intervenções não farmacológicas, como evitar exposição ao tabaco e exposição ocupacional, perda de peso, evitar o uso de medicamentos que piore a doença, entre outros (PAPI et al., 2018).

Os medicamentos utilizados para o controle da asma são basicamente os corticosteróides inalatórios, que podem ser associados com  $\beta$ 2-agonista de curta ou longa duração. A escolha do medicamento, a dose e a frequência devem ser ajustadas para cada paciente de acordo com a preferência do paciente e a resposta

quanto ao controle dos sintomas (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019). Uma grande mudança que ocorreu em 2019, quanto ao tratamento é que o  $\beta$ 2-agonista de curta duração, que era o medicamento de primeira escolha para pacientes com asma leve, não deve mais ser utilizado sozinho. A nova recomendação da GINA é que esse medicamento deve ser utilizado em conjunto com um corticosteróide inalatório, de uso diário ou quando os sintomas aparecerem, para evitar as exacerbações (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019; REDDEL et al., 2019).

Além desses medicamentos, pacientes que possuem asma grave e asma não controlada apresentando sintomas persistentes e exacerbações mesmo com o tratamento correto, necessitam de outros medicamentos para uso em conjunto com os já estabelecidos. Entre eles estão: tiotrópio, um antagonista muscarínico de longa duração que melhora a função pulmonar e o tempo entre as exacerbações; azitromicina, um macrolídeo com características imunomoduladoras, que pode ser utilizados em pacientes com exarcebações frequentes; anti-IgE, como o omalizumab é utilizado na asma alérgica grave mediada por IgE; anti-IL5 e anti-receptor de IL5 (anti-IL5R), como o mepolizumab, reslizumab e benralizumab, também uteis no tratamento de asma grave eosinofílica; anti-IL4R, o dupilumab, usado no tratamento de asma grave de resposta Th2; termoplastia brônquica, para asma grave, apesar de não se conhecer muito sobre os efeitos; corticosteróide oral, como prednisona, deve ser utilizado em último caso e na menor dose necessária para se alcançar o controle adequado (KIM et al., 2017; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019).

Dentre os medicamentos que ainda estão em fase de estudo estão o lebrikizumab e o tralokinumab, ambos anti IL-13, porém não foram muito eficientes quanto as exacerbações (STINSON; AMRANI; BRIGHTLING, 2015; HANANIA et al., 2016). O fevipirant, um anti- receptor tipo 2 de prostaglandina D2, teve resultados promissores em um estudo (GONEM et al., 2016). Já o tezepelumabe, um anti-TSLP, melhorou as exacerbações independentemente da quantidade de eosinófilos no sangue (CORREN et al., 2017). Todos esses medicamentos são úteis na asma de resposta Th2, entretanto as terapias que envolvem outro tipo de resposta não tem tido muito sucesso (PAPI et al., 2018). Na busca realizada no banco de dados Clinical Trials, que contem cadastros de estudos clínicos no mundo todo, 3671 estudos foram encontrados ao buscar pela palavra “asma”, dos quais

apenas 367 estão recrutando pacientes. Entre esses estudos, alguns estão testando novos medicamentos ou combinações de drogas.

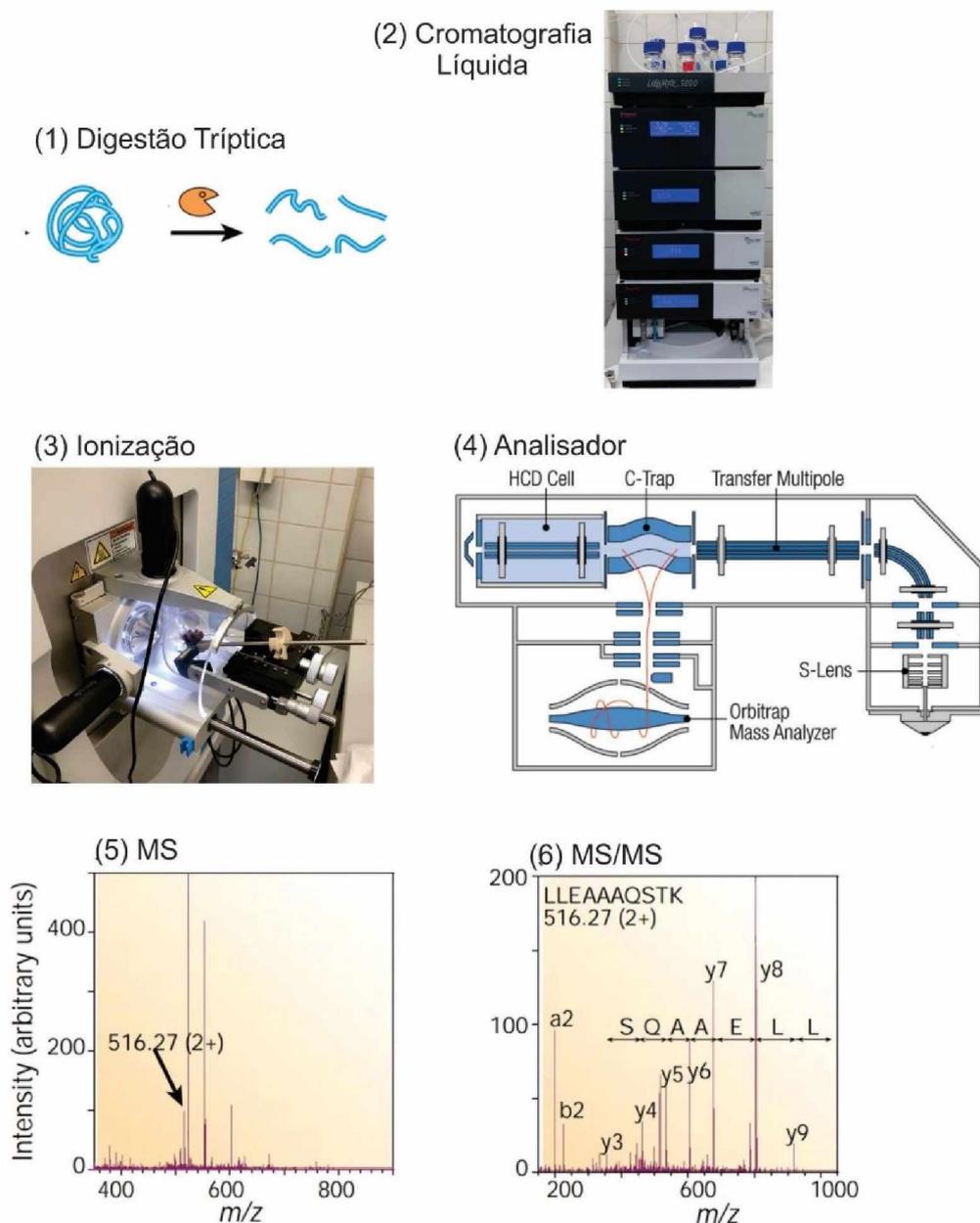
## 1.6 Proteômica e metabolômica por espectrometria de massas

O avanço de diversas áreas como a genômica, que conta com bancos de dados de sequências genica e genômica de vários organismos, e o desenvolvimento de métodos de ionização, tem contribuído para o crescimento da proteômica baseada em espectrometria de massas (MS – *mass spectrometry*). Devido à alta sensibilidade da técnica, em grande parte das vezes é o método de escolha para analisar amostras de grande complexidade proteômica, possibilitando a análise da sequência primária das proteínas, modificações pós-traducionais e interação proteína-proteína (AEBERSOLD; MANN, 2003).

A tecnologia mais utilizada é a MS em tandem (MS/MS) (Figura 4), e basicamente consiste na digestão enzimática das proteínas em peptídeos, que são separados por um sistema, comumente por cromatografia líquida (LC – *liquid chromatography*). Posteriormente, os peptídeos são ionizados, ou seja, convertidos em íons pela adição ou perda de um ou mais prótons e dessolvatados, para serem transferidos para o espectrômetro de massas. Os íons são selecionados, enviados para uma câmara de colisão e os fragmentos analisados para obtenção dos espectros baseados na relação massa / carga ( $m/z$ ) dos fragmentos peptídicos. Para identificação das proteínas, os dados são submetidos ao sequenciamento *de novo* e essas sequências peptídicas são buscadas em banco de dados de proteínas. Todas as etapas são extremamente importantes para obter um bom resultado (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

A estratégia de *shotgun* pode ser utilizada quando não há conhecimento da amostra e se deseja identificar um grande número de proteínas (BENSIMON; HECK; AEBERSOLD, 2012). Ainda, essa estratégia permite a quantificação relativa das proteínas por meio da mensuração da área dos picos cromatográficos de cada peptídeos, que são então comparados entre as amostras, mesmo quando livres de marcação, chamada de quantificação *label-free* (NEILSON et al., 2011).

**Figura 4: Análise proteômica baseada em espectrometria de massas.** Esquema de uma análise proteômica por espectrometria de massas. 1 - digestão enzimática das proteínas em peptídeos. 2 - separação dos peptídeos por cromatografia líquida. 3 - ionização. 4 – analisador dos peptídeos. 5 - obtenção dos espectros de massas. 6 - obtenção dos espectros de MS/MS.



Fonte: Adaptado de AEBERSOLD; MANN, 2003

Uma das aplicações da proteômica é a identificação de biomarcadores que podem ser utilizados para diagnóstico, prognóstico e avaliação do tratamento de uma determinada doença ou fenótipo (VITZTHUM et al., 2005). Para ser considerado como potencial biomarcador, a molécula deve se enquadrar em vários critérios. Entretanto, uma proteína tem potencial para se tornar biomarcador caso apresente uma mudança na expressão ou uma modificação relacionada a doença

(GUO; FU; VAN EYK, 2007). Posteriormente à identificação, os biomarcadores precisam ser validados em estudos independentes e apresentar alta sensibilidade e especificidade. Dentre as diversas amostras biológicas, o soro é bastante utilizado para esse propósito. Acredita-se que o soro possui um padrão de expressão de proteínas que forme uma assinatura específica de uma doença (AZAD et al., 2006). O escarro induzido é bastante utilizado para a caracterização fenotípica de pacientes com asma, entretanto, os estudos de proteômica utilizando o escarro não são tão comuns quanto de soro (TERRACCIANO et al., 2015).

Diversos estudos tem empregado técnicas de proteômica para buscar novos biomarcadores e melhor compreender algumas doenças respiratórias, como a asma (WU et al., 2005; O'NEIL et al., 2011), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (TU et al., 2014; TITZ et al., 2015), fibrose cística (SLOANE et al., 2005), bronquiectasia (GRAY et al., 2008), tuberculose (FU et al., 2012), câncer de pulmão (WU et al., 2015; FUJII; NAKAMURA; NISHIMURA, 2017) e fibrose pulmonar idiopática (LANDI et al., 2013; O'DWYER et al., 2017). Apesar do aumento relevante no número de publicações nos últimos anos utilizando técnicas de proteômica nessas doenças, a maior parte deles são estudos de câncer de pulmão (NORMAN et al., 2018).

Pesquisadores demonstraram por proteômica baseada em espectrometria de massas que 13 proteínas estavam diferencialmente expressas no escarro neutrofílico de pacientes com asma grave não controlada em relação a pacientes em que a doença estava controlada. Dessas proteínas, a S100A9 foi altamente expressa em pacientes com a condição não controlada, e também se mostrou mais expressa quando comparada com pacientes com asma eosinofílica não controlada, podendo assim, ser um possível biomarcador para asma grave neutrofílica não controlada (LEE et al., 2013). Essa mesma proteína também foi identificada em um outro estudo de proteômica em níveis elevados em pacientes com asma em relação a pacientes controle. Ainda nesse trabalho, as proteínas S100A8, inibidor de protease da serpina (SERPINA1), proteína 3B regulada por andrógeno da glândula submaxilar (SMR3B) e secretoglobina (SCGB1A1) também foram encontradas em altos níveis em pacientes com asma (GHARIB et al., 2011).

Recentemente, um estudo avaliou a expressão de proteínas por análise proteômica por espectrometria de massas em escarro induzido de pacientes com

asma clássica, asma tosse variante e asma aperto no peito variante. Das 1126 proteínas identificadas, 23 foram mais expressas nos grupos com asma em relação ao controle, e estão envolvidas com a imunidade, inflamação e citocinas. Entretanto, a maioria das proteínas foram similar entre os três grupos avaliados (CAO et al., 2017).

A metabolômica consiste na identificação de todos os metabólitos presentes em um organismo em um determinado momento, o metaboloma. Apesar de ser uma técnica recente, a metabolômica tem crescido amplamente devido a sua importância para a biologia de sistemas, uma vez que muitas vezes a alteração na expressão de um gene ou proteína não resulta em uma alteração no fluxo metabólico. Assim, a integração entre as “ômicas” é recomendada para alcançar uma resposta mais fiel do sistema biológico. (KUILE; WESTERHOFF, 2001; POWERS; RIEKEBERG, 2017).

Dentre as técnicas mais utilizadas para análise do metaboloma está a MS, por um processo semelhante a proteômica, porém mais simples devido aos metabólitos serem moléculas pequenas e menos complexas. Os metabólitos devem ser extraídos e injetados no analisador, como o LC-MS, para que ocorra as etapas de separação, ionização, fragmentação e aquisição dos espectros. A identificação dos metabólitos também é realizada pela busca em bancos de dados de metabólitos conhecidos, entretanto, é bastante complexa (POWERS; RIEKEBERG, 2017). Na metabolômica também é possível utilizar diversas amostras biológicas, e além de soro e urina, também é possível analisar os metabólitos no escarro, lavado broncoalveolar e condensado do ar exalado, que são importantes para doenças respiratórias (DEVILLIER et al., 2017).

Semelhante a estratégia de *shotgun*, por meio da metabolômica não-direcionada (*untargeted*) também é possível descobrir todos os metabólitos presentes quando não se tem conhecimento sobre a amostra. Essa estratégia permite informar mudanças provocadas por alterações nutricionais, genéticas, ambientais e da microbiota intestinal, podendo então estar relacionada a pesquisa clínica. Além disso, também é possível analisar moléculas envolvidas em processos metabólicos. Ainda, assim como a proteômica, a metabolômica também pode ser aplicada a busca de biomarcadores úteis no diagnóstico, prognóstico e no monitoramento da resposta medicamentosa (NAMBIAR et al., 2019).

Os estudos de metabolômica em pacientes com asma ainda não são numerosos. Em 2017 haviam apenas 39 trabalhos, dos quais 14 eram artigos de revisão, e dentre os artigos experimentais nenhum analisou metabólitos no escarro induzido (VILLASEÑOR et al., 2017). Dentre os estudos existentes, ao analisar o metaboloma do plasma de pacientes com asma, pesquisadores identificaram 10 metabólitos significativamente mais expressos (*fold change* > 2) em relação ao controle, relacionados com a inflamação e resposta imune Th2: maltotriose, maltose, esfingosina, glicodesoxicolato, taurocolato, cafeína, paraxantina, teofilina, nicotinamida e adenosina 5'-monofosfato (COMHAIR et al., 2015).

Um outro estudo identificou outros metabólitos no soro de pacientes com asma, sendo que a oleoetanolamina (OEA), 22R-hidroxicolesterol, ácido alfa-linolênico e esfingosina-1-fosfato (S1P) estavam presentes em níveis elevados significativamente em pacientes com asma. Ainda, em pacientes com asma grave e moderada, os metabólitos taurina, fenilalanina, xantina e arginina também estavam elevados (REINKE et al., 2017). Ainda no soro, outro trabalho mostrou que várias fosfatidilcolinas estavam em níveis elevados em pacientes asmáticos, enquanto que algumas liso-fosfatidilcolinas e acilcarnitinas foram encontradas em níveis menores na asma (RIED et al., 2013).

Além desses metabólitos, outro trabalho mostrou que a metionina, glutamina e histidina estavam aumentadas no soro de pacientes com asma, enquanto que o metanol, acetato, colina, O-fosfocolina, arginina e glicose estavam níveis reduzidos. Ainda, os metabólitos relacionados ao metabolismo lipídico puderam ser correlacionado com menor volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), estando então relacionados com a severidade da asma (JUNG et al., 2013).

A asma constitui uma doença crônica heterogênea que afeta uma grande parte da população brasileira e possui com grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos e também socioeconômico, devido aos elevados custos para a saúde pública com medicamentos, internações e consultas médicas. O tratamento é realizado por meio de medicamentos que controlam os sintomas e as exacerbações, já que a cura para a asma ainda não é conhecida. A identificação da asma eosinofílica e neutrofílica é extremamente importante, uma vez que esses pacientes não respondem satisfatoriamente a mesma terapia na maioria dos casos. A fenotipagem desses pacientes é realizada por meio da contagem dessas células

no escarro induzido, necessitando uma equipe treinada sendo que a contagem no sangue periférico não é precisa.

Os pacientes com asma eosinofílica e asma neutrofílica podem apresentar marcadores diferentes que podem ser identificados no escarro induzido, saliva e sangue periférico por meio da técnica de proteômica. Essas análises podem promover a identificação de importantes marcadores que possam ser úteis no diagnóstico desses pacientes, bem como auxiliar no tratamento e acompanhamento da doença, de forma menos invasiva, rápida e fácil, uma vez que essas moléculas podem ser incorporadas em plataformas de biossensor do tipo *point of care*. Ainda, esse estudo pode promover a melhor compreensão dessas doenças, essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos específicos para cada subtipo da doença.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Identificar biomoléculas específicas no soro e escarro induzido de pacientes com asma neutrofílica, eosinofílica, mista e paucigranulocítica por análise de proteômica e metabolômica, que possam ser utilizadas com biomarcadores para fenotipagem inflamatória da asma.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Classificar os pacientes de acordo com a contagem diferencial de células inflamatórias no escarro induzido, em: asma neutrofílica, eosinofílica, mista e paucigranulocítica;
- Investigar o perfil proteico do escarro induzido e soro dos pacientes selecionados;
- Analisar a função das proteínas diferencialmente expressas no escarro induzido e soro dos pacientes selecionados;
- Identificar as vias enriquecidas envolvidas nos fenótipos inflamatórios da asma;
- Identificar e caracterizar os metabólitos diferencialmente expressos no escarro induzido e soro dos pacientes selecionados;
- Estabelecer um modelo de diagnóstico aplicando algoritmos nos metabólitos identificados.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Desenho de estudo**

##### **3.1.1 População**

Os indivíduos participantes da pesquisa foram selecionados entre os pacientes que frequentavam o Ambulatório de Pesquisa em Asma da Disciplina de Pneumologia, do Departamento de Medicina da Universidade Federal do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil, no período de Janeiro de 2017 a Agosto de 2018. Durante a consulta, foram convidados a participar da pesquisa os asmáticos estáveis controlados com medicação inalatória de manutenção. Os critérios de inclusão e exclusão foram analisados e para os pacientes que preencheram todos os critérios foi solicitado o consentimento por meio de leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (CEP: 0932/2015) (ANEXO 1).

Todos os pacientes participantes foram concordantes com o TCLE, preconizado pelo Comitê de Ética e Pesquisa e capazes de responder aos questionários de controle da asma e sintomas de vias aéreas superiores, bem como para os procedimentos de coletas de escarro e de sangue. Todos esses procedimentos, juntamente com o teste de função pulmonar e o teste cutâneo foram todos realizados no mesmo dia, sempre no período da manhã.

##### **3.1.2 Critérios de inclusão**

Foram selecionados os pacientes:

- de ambos os gêneros;
- com idade igual ou superior a 18 anos;
- não fumantes ou ex-fumantes há mais que cinco anos e com história de tabagismo inferior a dez anos-maço;
- com diagnóstico clínico de asma, apresentando histórico de obstrução com reversibilidade em qualquer momento da vida, caracterizada por ganho de 200 mL e aumento de no mínimo 12% no volume expiratório forçado no

primeiro segundo (VEF1) após o uso de broncodilatador (BD) (400 µg) em relação ao VEF1 pré-BD;

- em tratamento regular para asma há pelo menos um ano, e se necessário, fazendo uso regular de corticosteroide nasal;
- sem histórico de exacerbação no último mês, e controlados segundo os critérios do GINA (Step 4/5-GINA), a saber, ausência ou menos do que duas vezes por semana de sintomas diurnos de asma e ausência de sintomas noturnos; ausência de uso de broncodilatador ou menos que duas vezes por semana; sem limitação às atividades diárias ou exercício, por no mínimo um mês antes do estudo;
- escore do Teste de controle da asma (TCA)  $\geq 20$  pontos.

### 3.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes:

- com diagnóstico de outras pneumopatias ou doenças graves dos demais órgãos e sistemas; com lesões sequelares graves ou com lesões outras importantes;
- com infecções do trato respiratório de padrão bem caracterizado no último mês;
- que já fizeram uso de imunossupressores ou imunomoduladores;
- com obesidade mórbida (IMC > 40);
- diagnosticados com asma ocupacional;
- diagnosticados com helmintíase.

### 3.1.4 Grupos de estudo

Os pacientes foram classificados de acordo com a contagem leucócitos no escarro e agrupados da seguinte forma:

- Eosinofílico: contagem diferencial de eosinófilos  $\geq 3\%$  e contagem diferencial de neutrófilos < 65 % (DE FARIAS et al., 2017).
- Neutrofílico: contagem diferencial de neutrófilos  $\geq 65\%$  e contagem diferencial de eosinófilos < 3 % (DE FARIAS et al., 2017).

- Misto: contagem diferencial de eosinófilos  $\geq 3\%$  e contagem diferencial de neutrófilos  $\geq 65\%$ .
- Paucigranulocítico: contagem diferencial de eosinófilos  $< 3\%$  e contagem diferencial de neutrófilos  $< 65\%$ .

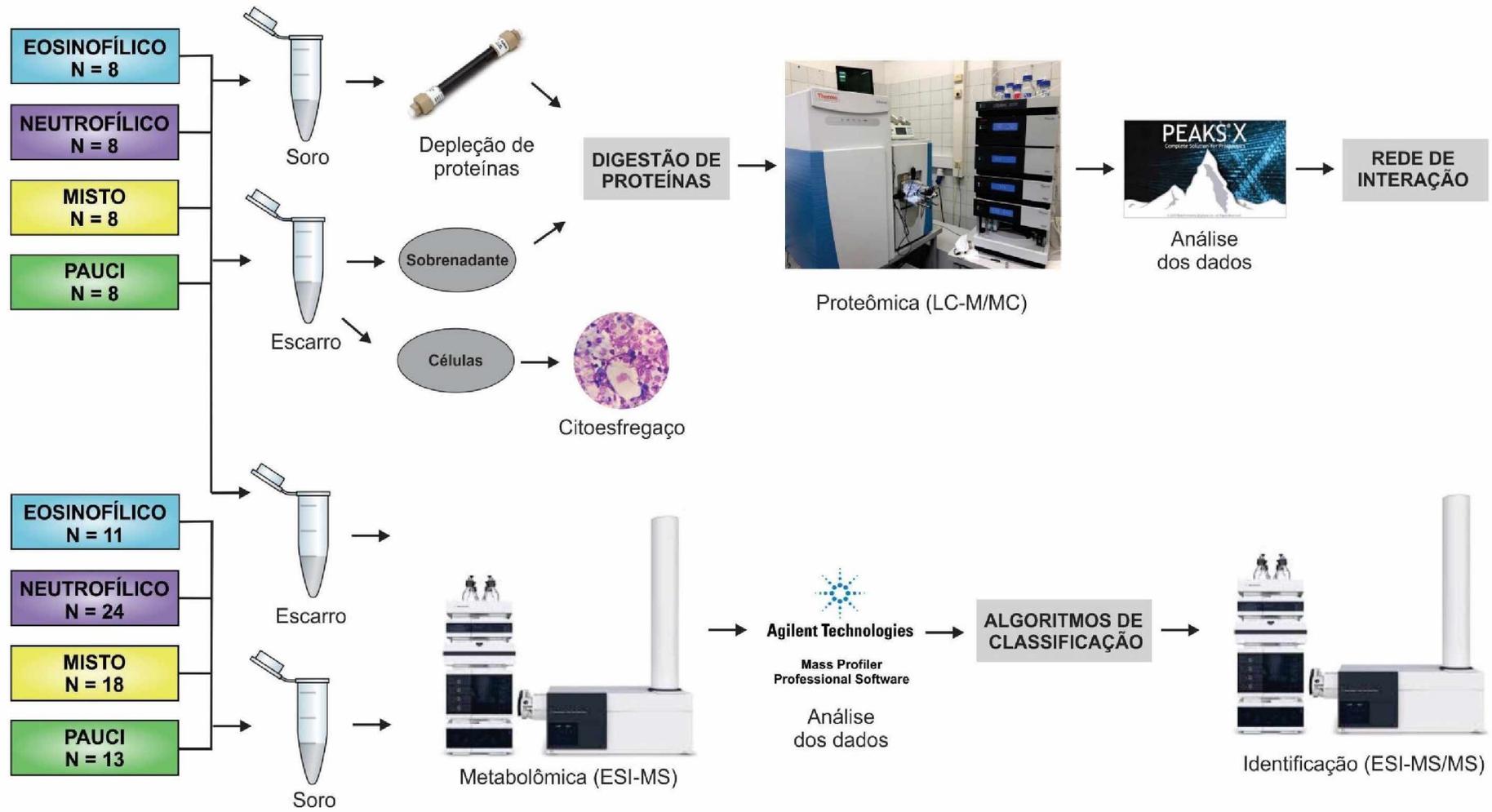
No total, 77 pacientes participaram da pesquisa. Porém, devido ao insucesso da coleta do escarro induzido ou presença de muitas células degeneradas e material de má qualidade para contagem diferencial 11 pacientes foram excluídos. Dos 66 pacientes, 11 foram classificados com asma eosinofílica, 24 com asma neutrofílica, 18 com asma mista e 13 com asma paucigranulocítica. Para a análise do proteoma foram utilizadas 8 amostras de cada grupo, sendo os mesmos para escarro e soro. Já para a análise de metabolômica de escarro foram utilizados os mesmos pacientes por grupo, enquanto que para a metabolômica do soro foram utilizadas todas as amostras colhidas. Uma representação esquemática do desenho experimental pode ser visualizada na Figura 5.

## **3.2 Coleta e processamento de amostras**

### **3.2.1 Escarro induzido**

A coleta e processamento do escarro induzido foi realizada pelo método desenvolvido por Pizzichini (PAVORD et al., 1997; PIZZICHINI et al., 1998). Para induzir a produção de escarro, os pacientes realizaram três inalações de solução salina hipertônica em concentrações crescentes (3 %, 4 % e 5 %) por sete minutos cada. O VEF<sub>1</sub> foi verificado após cada inalação e em caso de queda inferior a 10 % a inalação foi prosseguida em concentração superior à utilizada anteriormente. Quando a queda do VEF<sub>1</sub> foi de 10 a 20 %, a indução foi mantida com a última concentração de solução utilizada. A indução foi interrompida quando houve queda superior a 20 %.

Figura 5 Representação esquemática do desenho experimental.



Após a inalação, o paciente foi orientado a inspirar profundamente e tossir para liberar o escarro em um frasco de coleta descartável. O material foi analisado quanto à quantidade e qualidade, e se necessário o paciente era orientado a repetir o procedimento de inspiração e tosse. O escarro foi encaminhado imediatamente para o processamento, sendo realizado em no máximo duas horas. O material mais espesso e viscoso foi selecionado com auxílio de pinça, evitando assim a contaminação com saliva, e acondicionado em um tubo de poliestireno de 15 mL.

O peso das porções selecionadas foi registrado e, posteriormente, adicionado ditioneitol (DTT) 0,1 % em volume equivalente a quatro vezes o volume de escarro. A solução foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada por 10 min a temperatura ambiente (TA) em um homogeneizador de bancada. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de PBS e o tubo foi vertido para homogeneização. A suspensão foi filtrada utilizando um filtro de náilon de 48 µm a fim de se excluir o muco e debris celulares e o peso foi novamente registrado. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 800 G, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi separado, acrescido de inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail Set I – Calbiochem) e armazenado a -80 °C, enquanto que o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de PBS.

Foram utilizados 10 µL da solução do precipitado para contagem celular de leucócitos e análise da viabilidade pelo método de exclusão de *trypan blue* utilizando um hemocítmetro de Neubauer, no qual as células mortas são coradas de azul. As amostras que apresentaram contagem de células escamosas maior que 5 % foram excluídas. A concentração de células foi ajustada para obter  $1 \times 10^6$  células em 200 µL e o volume foi adicionado em um citocontêiner para citocentrífuga Cytospin 4 Shandon (Thermo Fisher Scientific) e centrifugado a 300 rpm, por 4 min, a TA, para obtenção das lâminas. As lâminas foram colocadas em um aparato para secagem a temperatura ambiente e, posteriormente, foram coradas com corante Panótico-Rápido® para contagem diferencial de leucócitos. A contagem diferencial foi considerada satisfatória quando foi possível contar ao menos 400 leucócitos, que poderiam ser eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos. A amostra foi considerada eosinofílica quando a contagem diferencial de eosinófilos foi  $\geq 3$  %, e neutrofílica quando a contagem diferencial de neutrófilos foi  $\geq 65$  %.

### 3.2.2 Soro

O sangue periférico foi coletado em tubos próprios que não continham anticoagulante. O soro foi separado por centrifugação a 4000 rpm, por 10 min, a 4 °C. Posteriormente, o soro foi aliquotado e armazenado a -80 °C.

### 3.3 Depleção de proteínas do soro

As proteínas mais abundantes do soro foram depletadas utilizando a Coluna de Remoção de Múltipla Afinidade Humana 14 (Agilent) por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (Akta Purifier, GE Amersham), removendo 14 proteínas: Albumina, Imunoglobulina G (IgG), Antitripsina, Imunoglobulina A (IgA), Transferrina, Haptoglobina, Fibrinogênio, Alfa-2-macroglobulina, Alfa-1-Glicoproteína Ácida, Imunoglobulina M (IgM), Apolipoproteína AI, Apolipoproteína AII, Complemento C3 e Transtirretina. O protocolo foi realizado de acordo com as normas do fabricante com modificações. Brevemente, foram diluídos 40 µL de soro quatro vezes em Tampão A (Agilent), seguido de filtração utilizando um filtro de seringa de 0,22 µm para remover as partículas maiores. O soro diluído foi então injetado em uma coluna de 100 mm x 4,6 mm sob pressão máxima de 60 bar a uma taxa de fluxo de 0,125 mL/min em Tampão A (Agilent) 100 % por 18 min. A fração *flow-through* (proteínas menos abundantes) foi coletada entre 11 a 15 min e armazenada a -20 °C. A coluna foi lavada com Tampão A (Agilent) 100 % por 2 min a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A fração que se ligou à coluna foi eluída com Tampão B (Agilent) 100 % por 7 min a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Por fim, a coluna foi regenerada com 100 % de Tampão A por 11 min a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. O ciclo completo teve duração de 38 min.

### 3.4 SDS-PAGE

A depleção das proteínas do soro foi verificada por SDS/PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate –Polyacrilamide Gel Electrophoresis) em gel 12,5 %. O sistema consistiu em gel de empilhamento constituído de acrilamida 3 %; Tris-HCL 100 mM

pH 6,8; SDS 10%; persulfato de amônio 10%; TEMED 0,05%, e gel de separação constituído de acrilamida 12,5 %; Tris-HCL 400 mM pH 8,8; SDS 10 %; persulfato de amônio 10 %; TEMED 0,05 %.

10 µg de amostra foram diluídos em 30 µL de água ultrapura e em cada amostra foram adicionados 10 µL de tampão de amostra 4x (Tris-HCL 125 mM pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 10 %; azul de bromofenol 0,2%; β-mercaptoetanol 4%). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 8 min e submetidas à eletroforese em um sistema MINI-PROTEAN® (Bio-Rad), utilizando um tampão de corrida constituído de Tris 0,1 M; SDS 0,1%; glicina 0,1M, a 80 V até atingir o gel de separação e, posteriormente, a 100 V até o fim da corrida. Foi utilizado como marcador de peso molecular o PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 a 250 kDa.

As proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram visualizadas por meio da coloração com Azul de Coomassie G-250. O gel foi fixado em uma solução de etanol 40 % e ácido acético 10 %, por 30 min. Em seguida, o gel foi incubado overnight com a Solução Corante que consiste em Coomassie Blue G-250 0,25 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %. Por fim, o gel foi lavado com a Solução Descorante de metanol 5% e ácido acético 10% até a remoção do excesso de corante e armazenado em água. Todas as etapas foram realizadas sob agitação.

### **3.5 Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas total foi feita pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) que se baseia na redução do cátion cobre (II) a cobre (I) pelas proteínas do meio e na reação dos cátions cobre (I) com o ácido bicinconínico, formando um complexo de cor púrpura. Dessa forma, a quantidade de cobre (II) reduzido é proporcional à concentração de proteína. O kit utilizado foi o Micro BCA (Thermo Fisher Scientific), capaz de detectar concentrações de proteínas que variam de 0,5 a 20 µg/mL. Após a reação, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro com absorvância determinada no comprimento de onda de 562 nm. A concentração das proteínas foi estimada baseando-se nos valores gerados pela curva padrão da albumina de soro bovino (BSA).

### 3.6 Redução, alquilação e digestão de proteínas

Após a quantificação, as proteínas do soro e escarro induzido foram concentradas em uma centrífuga concentradora a vácuo e ressuspensas em tampão *Extraction Buffer 2* (EB2) do *ProteoExtract® All-in-One Trypsin Digestion Kit* (Merk) na concentração de 1 µg/µL e incubadas em ultrassom de banho por 5 min. Em seguida, 5 µg de proteínas foram diluídas em 25 µL de EB2 e 30 µL de tampão bicarbonato de amônio 100 mM.

Para a reação de redução essa solução foi incubada com 1,5 µL de DTT 500 mM (Pierce, Thermo Fisher Scientific) por 25 min, a 60 °C, sob agitação em banho seco. Após a solução ser resfriada, a reação de alquilação foi realizada pela adição de 1,5 µL de iodoacetamida 500 mM (Pierce, Thermo Fisher Scientific), seguida de incubação por 25 min, a TA, protegido da luz. Por fim, para a digestão das proteínas foi adicionado 1,5 µg de tripsina (Pierce, Thermo Fisher Scientific) e a solução foi incubada em um banho seco a 37 °C, *overnight*, sob agitação de 1400 rpm por 20 seg a cada 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 450 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,5 % e incubação por 10 min a TA. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 10 min, a 14500 rpm, a TA, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

Para dessalinização dos peptídeos foi utilizada a ponteira de 100 µL ZipTip® C18 (Pierce, Thermo Fisher Scientific) seguindo as normas do fabricante. Brevemente, a ponteira foi umidificada com acetonitrila (ACN) 50 % e equilibrada com TFA 0,1 %. Em seguida, os peptídeos foram aspirados para ligação na resina, e a amostra foi transferida para um novo tubo e retornadas ao tubo de origem para aumentar a eficiência de ligação. A ponteira foi lavada com uma solução contendo TFA 0,1 % e ACN 5 % e as proteínas eluídas com uma solução de TFA 0,1 % e ACN 70 %, de forma que a amostra foi dispensada e aspirada 8 vezes. Os processos de umidificação, equilíbrio e lavagem foram repetidos 2 vezes. Por fim, os peptídeos foram secos em centrífuga a vácuo, ressuspensos em 15 µL de TFA 0,1 % e incubados em ultrassom de banho por 5 min.

### 3.7 Análise e sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas

Para a análise do proteoma de escarro e soro foram utilizadas 8 amostras biológicas de cada grupo, injetadas individualmente. Os peptídeos foram analisados em um sistema de ultra cromatografia líquida de alta performance (ultra-HPLC) de fase reversa (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) acoplado ao espectrômetro de massas quadupolo (Q) Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) (ULC-MS/MS). Os peptídeos foram separados pelo ultra-HPLC equipado com uma coluna Acclaim PepMap RSLC C18, 75 $\mu$ m x 15cm (Dionex). O volume de injeção de amostra foi de 5  $\mu$ L, e a eluição dos peptídeos foi realizada por gradiente de acetonitrila de 5 a 45 % por 157 min, sendo de 0 a 10 min, acetonitrila 5% e de 10 a 150 min, acetonitrila 45 % (Solvente A: ácido fórmico (FA) 0,1 %, dimetilsulfóxido (DMSO) 5 %; Solvente B: FA 0,1 %, ACN 80 %, DMSO 5 %). Os parâmetros foram: fluxo constante de 300 nL.min<sup>-1</sup>, a 55 °C. A calibração por *lock mass* foi utilizada para maior precisão.

Os peptídeos foram ionizados por nanoeletrospray com voltagem de 2.5 kV e temperatura do capilar de 300 °C. O espectrômetro de massas foi programado para alternar automaticamente entre MS padrão e MS/MS. O equipamento foi operado em modo de ionização positivo e a aquisição admitiu o intervalo de 300 – 2000 m/z para o LC-MS. Os íons sem carga, com carga +1 e carga maior que 8 foram excluídos. A fragmentação dos peptídeos foi realizada com o método top 12 e uma energia de fragmentação normalizada a 27%.

### **3.8 Identificação e quantificação *label-free* das proteínas**

Os espectros de massas gerados pelo Q Exactive Orbitrap foram analisados no PEAKS Studio X (Bioinformatics Solutions) para realizar o sequenciamento *de novo* afim de obter-se as sequências de aminoácidos, e então atribuí-las a uma determinada proteína pela busca no banco de dados de proteínas humanas (*Homo sapiens*) UniProtKB / Swiss-Prot e UniProtKB / TrEMBL (Janeiro de 2018). Os parâmetros utilizados foram: tolerância de erro 3 ppm para o íon precursor e de 0,1 Da para o íon fragmento; enzima tripsina; oxidação de metionina, deamidação de asparagina ou glutamina e carbamidometilação como modificação variável; máximo de três sítios de clivagens perdidos. Somente os peptídeos com taxa de falsa descoberta (FDR – *false discovery rate*) de 1 % e proteínas que apresentaram score

de confiança ( $-10\lg P$ )  $\geq 20$ , com pelo menos um peptídeo único foram considerados.

A quantificação *label-free* das proteínas foi realizada utilizando o módulo Peaks Q, incluído no Peaks Studio X. Os parâmetros utilizados foram: tolerância de erro 3 ppm; tolerância do tempo de retenção 10 min; FDR 1 %. A quantificação foi calculada utilizando a média da área sob a curva dos picos cromatográficos de até três peptídeos únicos mais intensos de cada proteína. Inicialmente, as proteínas foram investigadas para identificar proteínas exclusivas de cada grupo. Em seguida, para a análise de comparação entre os grupos, apenas as proteínas encontradas em 50% das amostras biológicas dentro de pelo menos um grupo foram consideradas. Os dados foram submetidos a normalização com corrente de íons totais (TIC – *total ion current*) no Peaks Q, e posteriormente foram transformados em escala de  $\log_2$ . A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.), utilizando o teste T múltiplos, com  $p < 0,05$  como critério de significância. Nesse software foi gerado o *volcano plot*, a partir do resultado de significância, e o *heatmap* das proteínas expressas significativamente, utilizando o valor de intensidade.

### **3.9 Análise funcional e rede de interação das proteínas**

As proteínas totais que foram encontradas no escarro e no soro foram submetidas a análise de ontologia genética para identificação de função molecular e processos biológicos, determinados por meio do sistema de classificação Panther 14.1 (<http://www.pantherdb.org/>). Ainda, as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de asma foram submetidas a plataforma STRING 11.0 (<http://string-db.org/>) para construção de uma rede de interação proteína-proteína, utilizando confiança média (score maior que 0,4), permitindo até 10 iteradores. O enriquecimento da interação pode ser medido pelo valor p, de forma que um menor valor indica que os nós não são aleatórios e que o número observado de associações (representadas por linhas) é significativo. Também foram verificadas as diversas vias que essas proteínas estão associadas, de acordo com o banco de dados Reactome 70 (<https://reactome.org/>).

### 3.10 Preparo dos metabólitos

Para a análise do metaboloma de escarro utilizadas 32 amostras biológicas, sendo 8 de cada grupo fenotípico, injetadas individualmente, enquanto que para o metaboloma do soro foram utilizadas 66 amostras, sendo 11 amostras do grupo asma eosinofílica, 24 de asma neutrofílica, 18 de asma mista e 13 de asma paucigranulocítica. Para a extração dos metabólitos foram adicionados 100 µL de amostra (escarro e soro) em 1000 µL de metanol grau espectroscópico e incubados por 4 h a -80 °C. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 min, a 13000 g, e o sobrenadante transferido para um microtubo, o qual foi submetido a concentração em uma centrífuga concentradora vácuo e, posteriormente, liofilização. O material foi armazenado a -80 °C até o momento das análises.

### 3.11 Metabolômica por MS

As análises metabolômicas foram realizadas em um sistema de HPLC (Infinity 1260, Agilent) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (Q-TOF - *quadrupole time-of-flight*) (6520 B, Agilent) com *elethroctrospray* (ESI) por injeção em fluxo. As amostras foram ressuspendidas em 500 µL de metanol grau espectroscópico e filtradas em filtro de ponta de seringa com poro de 0,22 µm. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL. Os parâmetros cromatográficos foram: 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de fluxo constante da fase móvel com a composição de 90 % metanol e 10 % de água acidificada com ácido fórmico (0,1 %). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L.min<sup>-1</sup>, temperatura de 220 °C e energia de 4,5 kVa aplicada no capilar. Os dados foram adquiridos nos modos de ionização positivo e negativo e cada amostra de escarro foi injetada 5 vezes e as amostras de soro 3 vezes.

### 3.12 Análise estatística do metaboloma

Os espectros de massas foram submetidos ao software Mass Profiler Professional (Agilent) para alinhamento, normalização, teste de significância, *fold change* e análise multivariada. Os metabólitos foram filtrados utilizando abundância

absoluta mínima de 5.000 contagens, frequência de 50% (apenas os compostos encontrados em 50% das amostras biológicas dentro de pelo menos um grupo foram considerados),  $p < 0,05$  e *fold change*  $> 2$ . Os dados foram transformados em escala de  $\log_2$  e a abundância dos metabólitos foi analisada usando o teste ANOVA, com  $p < 0,05$  como critério de significância. Para identificar a diferença significativa entre os grupos foi utilizado o teste *post hoc* Tukey. A clusterização hierárquica foi realizada utilizando a intensidade normalizada dos compostos diferencialmente expressos, sendo a distância métrica *Pearson's centered-absolute*, com ligação completa. A criação do modelo de Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) foi realizada utilizando os metabólitos que foram estatisticamente diferentes. As amostras foram divididas em três partes iguais (FOLD=3), de forma que duas partes foram usadas para o treinamento e uma parte para o teste. O processo foi repetido por 10 vezes, utilizando uma parte diferente como teste em cada vez.

### **3.13 Identificação e caracterização dos metabólitos**

Para identificação dos metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos, os metabólitos foram injetados por infusão direta no mesmo espectrômetro de massas citado anteriormente, Q-TOF 6520 B Agilent. As amostras foram solubilizadas em metanol/água (4:1) e introduzidas diretamente no espectrômetro de massas utilizando uma seringa (100,0  $\mu\text{L}$ ), adaptada a uma bomba de infusão direta, com fluxo de 200,0  $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , sob as mesmas condições de ionização citadas acima (subtópico 3.10).

A identificação dos compostos foi realizada utilizando a massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menores que 10 ppm), e os espectros de fragmentação (MS/MS), comparando com os bancos de dados *Human Metabolome Database* (HMDB) e *MassBank of North America* (MoNA).

### **3.14 Algoritmos de classificação**

Os metabólitos encontrados por LC-MS também foram analisados por meio de técnicas de Aprendizado de Máquina (AM), utilizando os algoritmos J48 ou C4.5 (SALZBERG, 1994) e Random Forest (BREIMAN, 2001). Ambos os

algoritmos são métodos baseados em árvores de decisão, que contém ramificações, nós e folhas. Nessas árvores, as amostras são distribuídas nos grupos fenotípicos por meio de um conjunto de regras de decisão, que nesse caso são os valores médios de m/z (os nós) e intensidade dos metabólitos. Enquanto o J48 gera apenas uma árvore, o RF gera randomicamente centenas de árvores variando os atributos (m/z) utilizados para dividir as árvores enquanto essas são construídas, resultando então em uma floresta de árvores de decisão. O consenso de classificação dessas várias árvores de decisão é utilizado para gerar médias estatísticas sobre o desempenho do preditor final. Geralmente são árvores extensas (muitas folhas e nós), difíceis de serem lidas por humanos, mas facilmente processadas por computador.

Foi utilizado o pacote de software Weka, uma biblioteca de algoritmos de aprendizado de máquina escrita na linguagem Java, com dezenas funções de aprendizado de máquina incluindo o J48 e o RF, bem como um algoritmo CfsSubsetEval para determinar quais metabólitos possuem maior correlação com a classificação dos dados de treinamento. Para a execução dos algoritmos do software Weka foram utilizados os parâmetros padronizados pela própria biblioteca. A validação cruzada (VC) com FOLD = 10 foi utilizada para estimar a taxa de erro esperado pelos preditores para dados não utilizados no treinamento. Com a VC, as observações foram divididas em 10 partes de tamanhos aproximadamente iguais para o treinamento, sendo uma parte reservada para teste e as outras nove como treinamento. O processo foi repetido 10 vezes, de forma que cada parte foi utilizada como teste uma vez. O valor médio dos erros obtidos nos 10 testes da VC foi computado como o erro médio do modelo treinado, ou seja, as quantias obtidas pela soma dos elementos fora da diagonal principal da matriz de confusão gerada ao término de cada treinamento.

### **3.15 Análise estatística**

A análise estatística dos dados de proteômica e metabolômica foram descritas separadamente devido à complexidade dos dados. A análise estatística dos dados referentes às características da população foi realizada no GraphPad

Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.), utilizando o teste Kruskal Wallis e teste *post hoc* Dunn's, com  $p < 0,05$  como critério de significância.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características da população de estudo

Foram avaliados 66 pacientes, sendo 11 classificados com asma eosinofílica, 24 com asma neutrofilia, 18 com asma mista e 13 com asma paucigranulocítica. As características gerais dos indivíduos estão listadas na Tabela 1, na qual os pacientes foram separados de acordo com o experimento realizado. O grupo 1 é composto pela população global do estudo, cujas amostras foram utilizadas para metabolômica do soro. O grupo 2 é composto por indivíduos selecionados dentre os participantes do grupo 1, para os demais experimentos, contendo 8 pacientes por grupo (Grupo 2).

Verificou-se que mediana da idade não foi diferente entre os grupos fenotípicos, nem na população geral nem no grupo selecionado. É possível observar que em todos os grupos fenotípicos do grupo 1 a maioria da dos participantes era do sexo feminino, e que não houve diferença significativa entre os grupos. Já no grupo 2, ao selecionar os indivíduos tentou-se manter o mesmo número de cada gênero. Entretanto, entre os mistos e paucigranulocíticos haviam menos que 4 indivíduos do gênero masculino, não sendo possível igualar o gênero nesses grupos.

O índice de massa corpórea (IMC) também foi avaliado, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum grupo avaliado. A data de início dos sintomas da asma também foi avaliada. A maioria dos indivíduos de todos os grupos fenotípicos da população geral (grupo 1) relataram que os sintomas começaram após os 12 anos e, novamente, não houve diferença significativa. O mesmo ocorreu com o resultado do teste cutâneo. Interessantemente, a maioria dos indivíduos de todos os grupos foram positivos para pelo menos um alérgeno testado, sem alteração estatística entre os grupos estudados.

**Tabela 1: Características da população de estudo.**

Variáveis	GRUPO 1				Valor de p	GRUPO 2				Valor de p
	E (n=11)	N (n=24)	M (n=18)	P (n=13)		E (n=8)	N (n=8)	M (n=8)	P (n=8)	
<b>Idade (anos)</b>	48,1 ± 19,1	59 ± 11,5	53,4 ± 12,7	54,2 ± 14,4	0,1565	48,6 ± 21,2	56,1 ± 13,7	55,5 ± 10,0	48,9 ± 14,8	0,428
<b>Gênero</b>										
Feminino	6 (54,5)	17 (70,8)	16 (88,9)	10 (76,9)	0,2234	4 (50)	4 (50)	6 (75)	5 (62,5)	0,7101
<b>IMC</b>	24,9 ± 5,4	26,8 ± 3,9	28,9 ± 4,7	26,6 ± 4,3	0,2571	25,1 ± 5,9	25,9 ± 2,3	28,9 ± 5,2	26,2 ± 5,3	0,5737
<b>Início dos sintomas</b>										
≥ 12 anos	7 (63,6)	14 (58,3)	14 (77,8)	9 (69,3)	0,6136	5 (62,5)	3 (37,5)	6 (75)	5 (62,5)	0,4965
<b>Teste cutâneo</b>										
Positivo	9 (81,8)	20 (83,3)	12 (66,7)	10 (76,9)	0,6241	6 (75)	8 (100)	5 (62,5)	5 (62,5)	0,2753
<b>Escarro</b>										
Eosinófilos (%)	13 (9,5-30,5)	1 (0-1,25)	10 (5,25-10)	0,5 (0-1)	<0,0001 <sub>a,b,c,e</sub>	25 (12,5-36,7)	0,5 (0-1,2)	10 (4,9-13,2)	0,5 (0-1)	<0,0001 <sub>a,b,c</sub>
Neutrófilos (%)	49 (39-60,5)	93,5 (88,7-92,2)	81,5 (74-81,5)	48 (24,5-54)	<0,0001 <sub>a,c,d,f</sub>	47 (40,5-60,2)	94,5 (89,7-95,7)	80,5 (76-84,5)	43 (20,2-60,7)	<0,0001 <sub>a,c,d</sub>
<b>Soro</b>										
Eosinófilos/μL	208 (147,5-436)	136 (71,5-281,5)	203,5 (144-356)	164 (82-357)	0,1620	303,5 (171,2-511,2)	144 (102,7-246,5)	137,5 (115-207,7)	286,5 (102,2-450)	0,2457
Neutrófilos/μL	5011 (2914,5-5819,5)	4045 (3412-4509,5)	4267 (3529,7-5539,5)	3484 (2471-5144)	0,5097	4232 (2948,7-7220,7)	4250 (3827,5-4596,5)	3831,5 (3303,5-4541,5)	3612 (2513,5-4513,7)	0,7951

O grupo 1 é composto pela população total, cujas amostras foram utilizadas para metabolômica do soro. O grupo 2 é composto por pacientes que foram selecionados para a análise de proteômica do escarro e soro, e metabolômica do escarro. Os dados estão apresentados em média (± DP), n (%) ou mediana (intervalo interquartil). E – eosinofílico, N – neutrofílico, M – misto, P – paucigranulocítico. <sup>a</sup> E vs N, <sup>b</sup> E vs P, <sup>c</sup> M vs P, <sup>d</sup> N vs P, <sup>e</sup> N vs M, <sup>f</sup> E vs M.

A título de informação os dados da contagem de eosinófilos e neutrófilos no escarro utilizados para a classificação dos pacientes também foram mostrados, lembrando que o valor utilizado para corte foi  $\geq 3\%$  de eosinófilos, e  $\geq 65\%$  de neutrófilos. Como era esperado, a contagem de eosinófilos apresentou diferença ao comparar os grupos eosinofílico e misto com os grupos neutrofílico e paucigranulocítico, uma vez que os indivíduos destes dois últimos grupos não possuem eosinofilia. De forma semelhante, ao analisar a contagem de neutrófilos no escarro, os grupos neutrofílicos e misto apresentaram diferença significativa ao serem comparados com os eosinofílicos e paucigranulocíticos.

A contagem de eosinófilos e neutrófilos também foi avaliada no sangue. De forma oposta ao encontrado no escarro, não houve diferença entre os grupos quanto ao número dessas células inflamatórias no sangue. Ao observar o intervalo interquartil, percebe-se que entre os indivíduos eosinofílicos do grupo 2, que também estão presentes no grupo 1, alguns apresentaram contagem  $> 500$  células/ $\mu\text{L}$ . Os demais valores se encontraram dentro dos valores de referência.

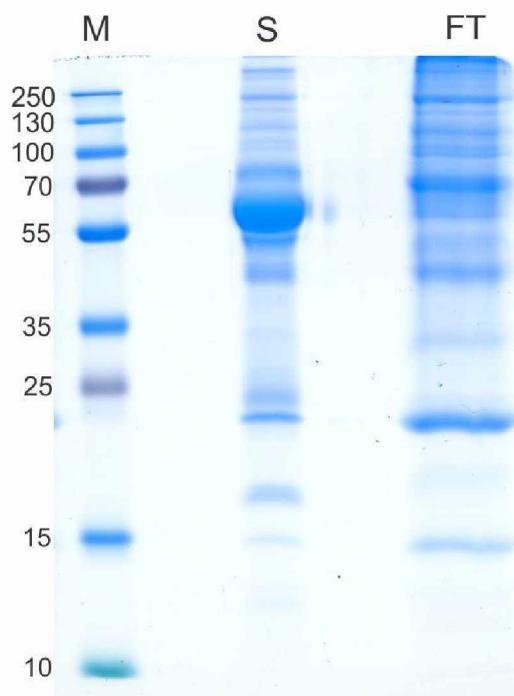
## **4.2 Análise do proteoma do soro e escarro de pacientes com asma**

### 4.2.1 Análise da depleção das proteínas do soro

Para que o soro dos pacientes pudesse ser utilizado para análise de proteômica, as amostras foram submetidas previamente a depleção das proteínas mais abundantes. Esse processo pode aumentar a eficiência da técnica de proteômica em identificar proteínas que poderiam ser mascaradas ao utilizar o soro bruto.

A figura 6 mostra a análise da eletroforese em gel de poliacrilamida do soro bruto e da fração *flow-through*, que corresponde às proteínas menos abundantes que não se ligaram à coluna. A imagem mostra claramente que as bandas correspondentes às proteínas mais abundantes não estão presentes na fração *flow-through*. Ainda, a presença de novas bandas nessa fração corresponde às proteínas menos abundantes que ficam mascaradas antes desse processo.

**Figura 6: Imagem representativa da eletroforese em gel das proteínas do soro após depleção das proteínas mais abundantes.** M- padrão de peso molecular; S- soro bruto; FT- fração flow-through (proteínas menos abundantes).



#### 4.2.2 Identificação e ontologia genética

O perfil proteico do soro e escarro dos pacientes foi obtido por meio da técnica de proteômica por espectrometria de massas. Após o processamento dos espectros de massas provenientes das amostras de escarro, foram identificadas 2266 proteínas, sendo que 1245 apresentavam 1 peptídeo único, 338 possuíam 2 peptídeos únicos e 683 proteínas possuíam mais que 2 peptídeos únicos Tabela 2). Os peptídeos únicos são aqueles presentes em apenas uma proteína em um proteoma.

**Tabela 2: Total de proteínas identificadas no escarro e soro de pacientes com asma.**

	Total	1 pep	2 pep	> 2 pep
<b>Escarro</b>	2266	1245	338	683
<b>Soro</b>	1373	830	253	273

Pep = peptídeo único

A maior parte das proteínas estavam presentes em todos os grupos, porém em apenas poucos indivíduos. Considerando que para ser considerada expressa

pelo grupo a proteína deveria estar presente em pelo menos metade dos indivíduos de um grupo e para ser considerada ausente não poderia ser expressa por nenhum indivíduo do grupo, nenhuma proteína exclusiva de apenas um grupo foi identificada. As proteínas que estavam ausentes em um grupo, presente em 4 ou mais indivíduos em um grupo e em menos indivíduos nos outros grupos também foram eliminadas. Do total de proteínas identificadas no escarro dos pacientes com asma, apenas 2 eram exclusivas de dois ou mais grupos, considerando os critérios acima (Tabela 3). A proteína miosina 9 (MYH9) estava expressa apenas em eosinofílicos e neutrofílicos. Já a secretoglobina família 1D membro 2 (SCGB1D2) estava ausente apenas no grupo paucigranulocítico.

**Tabela 3: Proteínas exclusivas de dois ou mais grupos identificadas no escarro de pacientes com asma.**

ID	Gene	Proteína	E	N	M	P
1	<i>MYH9</i>	Miosina 9	■	■		
2	<i>SCGB1D2</i>	Secretoglobina família 1D membro 2	■	■	■	

E = eosinofílico. N = neutrofílico. M = misto. P = paucigranulocítico.

No soro dos pacientes foi identificado um número menor de proteínas. No total, 1373 proteínas foram obtidas, das quais 830 apresentaram apenas 1 peptídeo único, 253 continham 2 peptídeos únicos e 273 apresentaram mais que 2 peptídeos únicos (Tabela 2). Considerando os mesmos critérios de presença e ausência adotados para o escarro, dentre as proteínas identificadas somente uma foi exclusiva de apenas um grupo (Tabela 4). A metaloproteinases de matriz 21 (MMP21) foi expressa somente pelos indivíduos do grupo eosinofílico. Já a apolipoproteína (a) (LPA) estava ausente somente no grupo neutrofílico. As informações adicionais dessas proteínas, como o número de acesso, número de peptídeos únicos, número de amostras que expressaram as proteínas, encontram-se no Apêndice A, tabela 1.A.

**Tabela 4: Proteínas exclusivas de um ou mais grupos identificadas no soro de pacientes com asma.**

ID	Gene	Proteína	E	N	M	P
3	MMP21	Metaloproteinases de matriz 21	■			
4	LPA	Apolipoproteína (a)	■		■	■

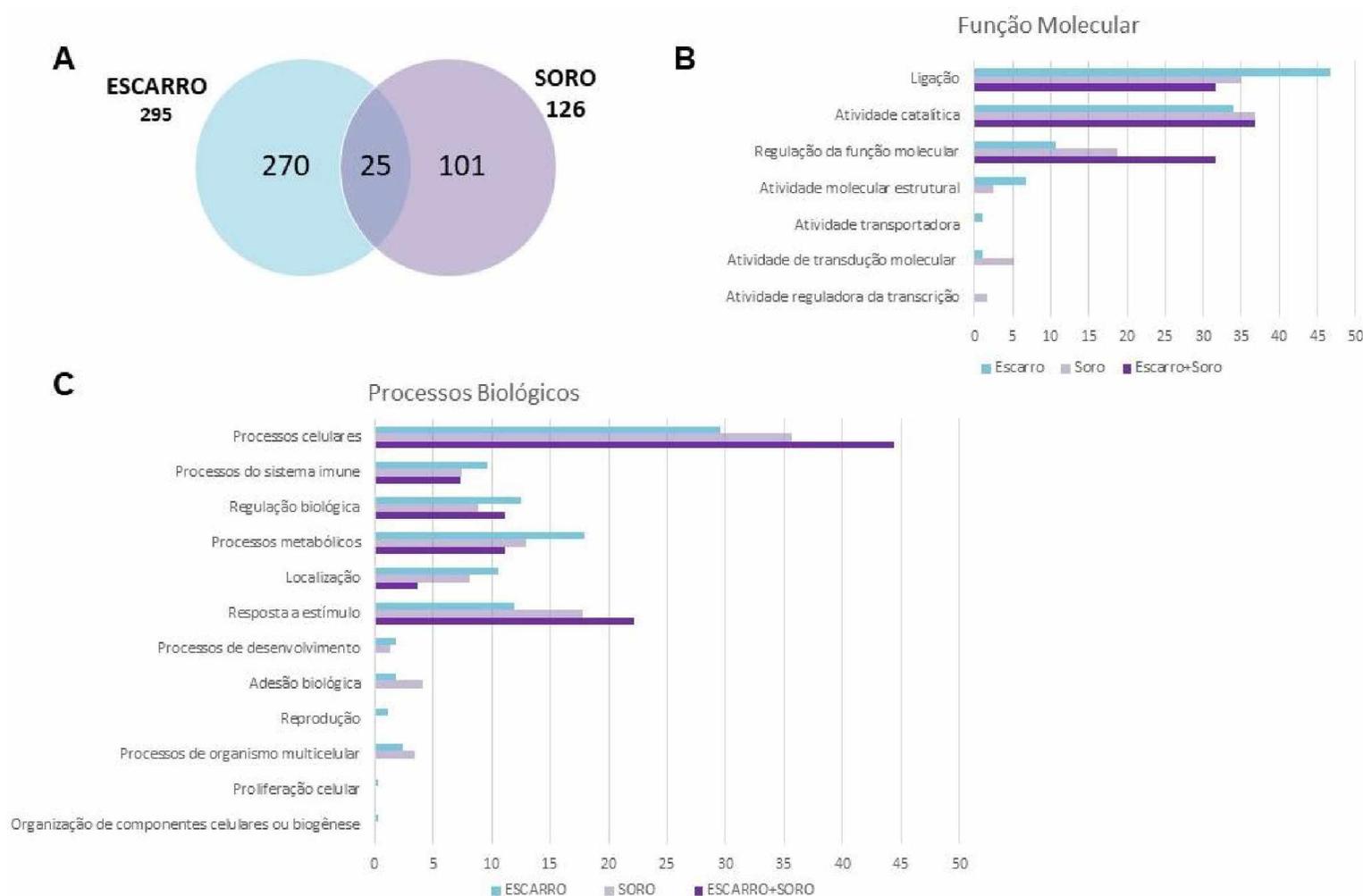
E = eosinofílico. N = neutrofílico. M = misto. P = paucigranulocítico.

Posteriormente à análise de proteínas exclusivas, os dados foram normalizados com TIC e transformados em escala Log<sub>2</sub>. Para a análise comparativa das proteínas entre os quatro grupos de estudo, foram consideradas apenas as proteínas que estavam presentes em todos os grupos, ou seja, pelo menos 4 indivíduos de cada grupo precisavam expressar a proteína. Além disso, foram excluídas as proteínas contaminantes provenientes da manipulação. Assim, de 2266 proteínas encontradas no escarro dos pacientes com asma, restaram apenas 295 proteínas após a limpeza dos dados, e das 1373 identificadas no soro restaram 126. Dessas proteínas, 25 estavam presentes tanto no escarro quanto no soro, como pode ser visto no Diagrama de Venn (Figura 7A).

A análise de ontologia genética dessas proteínas permitiu identificar 7 categorias em relação a função molecular (Figura 7B). Grande parte das proteínas encontradas no escarro possuem função de ligação (46,7 %), sendo a principal de ligação a proteínas, e atividade catalítica (33,9 %), de transferase e hidrolase. 10,6 % das proteínas do escarro estão envolvidas com a regulação da função molecular, principalmente regulação de enzimas, enquanto que 6,7 % possui atividade molecular estrutural e 1,1 % atuam na transdução molecular. Uma pequena parte (1,1 %) apresenta atividade transportadora, categoria identificada apenas nas proteínas do escarro.

As proteínas encontradas no soro desempenham funções semelhantes as do escarro, como atividade catalítica (36,8 %), sendo que nesse tipo amostral se destacam atividade de hidrolase e oxireductase, e ligação (35 %) entre as principais. Uma outra parte dessas proteínas possuem função de regulação da função molecular (18,8 %), seguida da atividade de transdução molecular (5,1 %) e atividade molecular estrutural (2,6 %). A menor parte das proteínas atuam na regulação da transcrição (1,7 %), função encontrada apenas nas proteínas identificadas no soro. Dentre as proteínas que estavam presentes em ambas amostras biológicas, somente 3 categorias foram encontradas: atividade catalítica (36,8 %), ligação (31,6 %) e regulação da função molecular (31,6 %).

**Figura 7: Proteínas identificadas no escarro e soro de pacientes com asma.** (A) Diagrama de Venn das proteínas identificadas no escarro e no soro de pacientes com asma após limpeza dos dados. (B) Função molecular das proteínas identificadas no escarro, soro e em ambas amostras biológicas apresentada em porcentagem. (C) Processos biológicos em que as proteínas identificadas no escarro, soro e em ambas amostras biológicas estão envolvidos, apresentados em porcentagem.



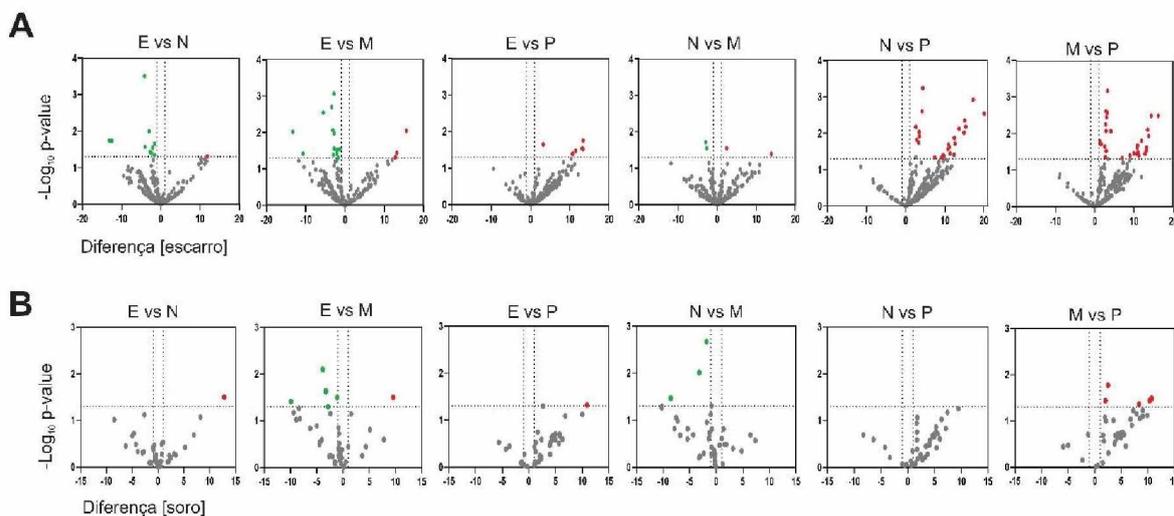
Dentre os processos biológicos desempenhados pelas proteínas identificadas no escarro estão os processos celulares (29,5 %), seguido dos processos metabólicos (17,9 %), regulação biológica (12,5 %), resposta a estímulo (11,9 %), localização (10,6 %) e processos do sistema imune (9,7 %) (Figura 7C). Uma pequena parte dessas proteínas estão envolvidas em processos de organismo multicelular (2,4 %), adesão biológica (1,8 %) e processos de desenvolvimento (1,8 %). Três processos biológicos foram identificados somente nas proteínas do escarro, sendo eles: reprodução (1,2 %), proliferação celular (0,3%) e organização de componentes celulares ou biogênese (0,3 %).

Assim como no escarro, a maior parte das proteínas identificadas no soro está envolvida em processos celulares (35,6 %), entretanto a segunda categoria mais frequente é a resposta a estímulo (17,8 %), seguida de processos metabólicos (13,0 %). Um número menor de proteínas também está envolvido com a regulação biológica (8,9 %), localização (8,2 %) e processos do sistema imune (7,5 %). Uma pequena parte das proteínas está envolvida com a adesão biológica (4,1 %), processos de organismo multicelular (3,4 %) e processos de desenvolvimento (1,4 %). As proteínas encontradas tanto no escarro quanto no soro estão relacionadas com os processos mais frequentes em ambos tipos amostrais, como os processos celulares (44,4 %), resposta a estímulo (22,2 %), processos metabólicos (11,1 %), regulação biológica (11,1 %), processos do sistema imune (7,4 %) e localização (3,7 %).

#### 4.2.3 Análise de significância

Para identificação das proteínas que estavam expressas diferencialmente entre os grupos fenotípicos, foram utilizadas somente as proteínas que restaram após a limpeza dos dados. Os valores de intensidade normalizada foram submetidos a testes t múltiplos comparando dois grupos por vez, obtendo 6 combinações diferentes para verificar quais grupos são mais distintos ou mais semelhantes. O resultado de significância do teste está expresso no volcano plot (Figura 8).

**Figura 8: Volcano plot mostrando a diferença e significância ( $-\log_{10}$  p-value) das proteínas diferencialmente expressas entre os fenótipos eosinofílico (E), neutrofílico (N), misto (M) e paucigranulocítico (P) no escarro (A) e soro (B). As proteínas superexpressas significativamente estão representadas em vermelho, as subexpressas significativamente estão representadas em verde e as que não tiveram alteração em cinza.**



No volcano plot é possível observar uma clara diferença no perfil proteico do escarro, principalmente entre os grupos neutrofílico e misto em relação ao paucigranulocítico (Figura 8A). Verificou-se também que o proteoma de pacientes eosinofílicos possui proteínas desreguladas em relação a neutrofílicos e mistos, mas não se difere muito de paucigranulocíticos. Ainda, não há muita distinção entre os grupos neutrofílico e misto. Já no soro, não foi observada uma diferença tão clara, de forma que a maior diferença ocorreu entre eosinofílicos e paucigranulocíticos em relação ao grupo misto (Figura 8B). É interessante observar que não houve proteínas alteradas entre o proteoma de pacientes neutrofílicos e paucigranulocíticos.

O resultado da análise de significância das proteínas identificadas no escarro está representado na Tabela 5, indicando as proteínas diferencialmente expressas e os valores da diferença entre os grupos. No total, 52 proteínas apresentaram diferença entre pelo menos dois grupos. As informações adicionais dessas proteínas encontram-se no Apêndice A, tabela 2.A. Dentre essas proteínas, a maioria está superexpressa nos fenótipos neutrofílico e misto, como a proteína S100-A8 (S100A8), proteína secretória rica em cisteína 3 (CRIS3) e cistatina-S (CST4), encontradas em níveis aumentados nesses dois grupos em relação ao grupo eosinofílico e paucigranulocítico.

Outras 10 proteínas também estavam superexpressas nesses dois grupos, porém a diferença ocorreu somente entre o grupo paucigranulocítico. Elas são: elastase de neutrófilos (ELANE), catepsina G (CTSG), proteína semelhante a calmodulina 5 (CALML5), defensina de neutrófilo 3 (DEFA3), mieloperoxidase (MPO), lactato desidrogenase cadeia A (LDHA), mieloblastina (PRTN3), proteína S100-A7 (S100A7), inibidor da dissociação de Rho GPD (ARHGDI3), metaloproteinases de matriz 9 (MMP9).

**Tabela 5: Lista de proteínas alteradas significativamente no escarro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P).**

ID	Gene	Proteína	Log Dif (E vs N)	Log Dif (E vs M)	Log Dif (E vs P)	Log Dif (N vs M)	Log Dif (N vs P)	Log Dif (M vs P)
1	<i>S100P</i>	Proteína S100-P	-4,18***	-3,42**	NS	NS	NS	NS
2	<i>S100A8</i>	Proteína S100-A8	-2,96*	-1,87*	NS	NS	4,38***	3,28***
3	<i>CAMP</i>	Peptídeo antimicrobiano do tipo catelicidina	-13,08*	NS	NS	NS	17,32**	13,25*
4	<i>PGLYRP1</i>	Proteína de reconhecimento de peptidoglicano 1	-12,46*	NS	NS	NS	14,92**	NS
5	<i>PIP</i>	Proteína indutível pela prolactina	-1,64*	-2,81***	NS	NS	NS	NS
6	<i>AMYA1</i>	Alfa-amilase	-4,046*	-5,55**	NS	NS	NS	2,93*
7	<i>CST4</i>	Cistatina-S	-2,10*	-2,76*	NS	NS	2,58**	3,23**
8	<i>KLK1</i>	Calicreína 1	-2,78*	-3,11**	NS	NS	NS	1,58*
9	<i>TMSB4X</i>	Timosina beta-4	-2,44*	NS	NS	NS	NS	NS
10	<i>CRISP3</i>	Proteína secretória rica em cisteína 3	-1,67*	-1,80*	NS	NS	2,616*	2,74*
11	<i>GSTA1</i>	Glutathione S-transferase A1	11,84*	NS	NS	NS	NS	NS
12	<i>DSG3</i>	Desmogleína 3	NS	-13,35**	NS	NS	NS	14,43**
13	<i>PRRL4</i>	Proteína rica em prolina 4	NS	-2,77*	NS	NS	NS	NS
14	<i>LPO</i>	Lactoperoxidase	NS	-1,29*	NS	NS	NS	NS
15	<i>BPIFA1</i>	Família A membro 1 contendo repetição BPI	NS	-10,70*	NS	-2,95*	NS	NS
16	<i>ZG16B</i>	Homólogo B de proteína de grânulos de zimogênio 16	NS	-2,04*	NS	NS	NS	NS
17	<i>CA6</i>	Anidrase carbônica 6	NS	-2,99*	NS	NS	NS	NS
18	<i>MIF</i>	Fator de inibição da migração de macrófagos	NS	12,84*	NS	13,86*	NS	NS
19	<i>MUC5AC</i>	Mucina 5AC	NS	NS	13,41*	NS	NS	NS
20	<i>SMR3B</i>	Proteína da glândula submaxilar regulada por andrógeno 3B	NS	NS	3,23*	NS	2,82*	4,13**
21	<i>H1-5</i>	Histona H1.5	NS	NS	13,12*	NS	NS	NS
22	<i>LACRT</i>	Glicoproteína lacritina extracelular	NS	NS	13,34*	NS	NS	NS
23	<i>BASP1</i>	Proteína solúvel em ácido cerebral 1	NS	NS	11,47*	NS	NS	NS

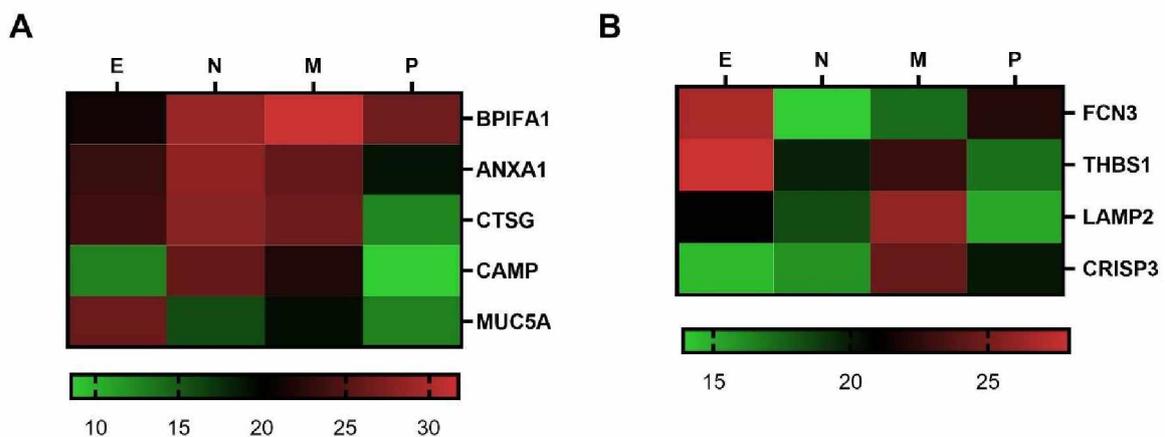
ID	Gene	Proteína	Log Dif (E vs N)	Log Dif (E vs M)	Log Dif (E vs P)	Log Dif (N vs M)	Log Dif (N vs P)	Log Dif (M vs P)
24	<i>H1-2</i>	Histona H1.2	NS	NS	10,68*	NS	11,33*	NS
25	<i>IGHV3-66</i>	Imunoglobulina de cadeia pesada 3-66	NS	NS	NS	-2,64*	NS	NS
26	<i>ANXA1</i>	Anexina A1	NS	NS	NS	2,47*	9,21*	NS
27	<i>ELANE</i>	Elastase de neutrófilos	NS	NS	NS	NS	4,23**	3,01**
28	<i>PRB1</i>	Proteína salivar básica rica em prolina 1	NS	NS	NS	NS	20,09**	NS
29	<i>APOA2</i>	Apolipoproteína A-II	NS	NS	NS	NS	15,08**	NS
30	<i>CTSG</i>	Catepsina G	NS	NS	NS	NS	15,33**	13,77*
31	<i>CALML5</i>	Proteína semelhante a calmodulina 5	NS	NS	NS	NS	13,58**	13,48**
32	<i>DEFA3</i>	Defensina de neutrófilo 3	NS	NS	NS	NS	3,44**	2,90**
33	<i>MPO</i>	Mieloperoxidase	NS	NS	NS	NS	3,52*	2,88**
34	<i>LDHA</i>	Lactato desidrogenase cadeia A	NS	NS	NS	NS	12,41*	11,97*
35	<i>PRTN3</i>	Mieloblastina	NS	NS	NS	NS	3,26*	2,80**
36	<i>HBB</i>	Hemoglobina subunidade beta	NS	NS	NS	NS	12,61*	NS
37	<i>ANXA2</i>	Anexina A2	NS	NS	NS	NS	10,96*	NS
38	<i>RETN</i>	Resistina	NS	NS	NS	NS	11,17*	NS
39	<i>S100A7</i>	Proteína S100-A7	NS	NS	NS	NS	10,73*	9,99*
40	<i>CD44</i>	Antígeno CD44	NS	NS	NS	NS	12,33*	NS
41	<i>ARHGDI B</i>	Inibidor da dissociação de Rho GPD	NS	NS	NS	NS	9,70*	9,04*
42	<i>SPRR3</i>	Proteína pequena rica em prolina	NS	NS	NS	NS	9,44*	NS
43	<i>MMP9</i>	Metaloproteinases de matriz 9	NS	NS	NS	NS	7,41*	7,04*
44	<i>DMBT1</i>	Proteína deletada em tumores cerebrais malignos 1	NS	NS	NS	NS	NS	1,32*
45	<i>CD14</i>	Antígeno de diferenciação de monócitos CD14	NS	NS	NS	NS	NS	10,93*
46	<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	NS	NS	NS	NS	NS	2,55*
47	<i>SH3BGR L3</i>	Proteína semelhante a domínio de ligação SH3 rico em ácido glutâmico 3	NS	NS	NS	NS	NS	10,85*
48	<i>PRB2</i>	Proteína salivar básica rica em prolina 2	NS	NS	NS	NS	NS	13,17*
49	<i>GPI</i>	Isomerase de glicose-6-fosfato	NS	NS	NS	NS	NS	11,04*
50	<i>HV64D</i>	Imunoglobulina de cadeia pesada 3-64D	NS	NS	NS	NS	NS	10,74*
51	<i>CAP1</i>	Proteína 1 associada a adenilil ciclase	NS	NS	NS	NS	NS	9,02*
52	<i>CSTA</i>	Cistatina A	NS	NS	NS	NS	NS	11,31*

ID = identificação. Dif = diferença. \* p < 0,05. \*\* p < 0,01. \*\*\* p < 0,001.

Poucas proteínas estavam alteradas entre neutrofílicos e mistos, sendo que duas estavam superexpressas nos neutrofílicos, como o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) e a anexina A1 (ANXA1), e duas estavam superexpressas nos mistos, a família A membro 1 contendo repetição BPI (BPIFA1) e a imunoglobulina de cadeia pesada 3-66 (IGHV3-66). De forma interessante, a proteína da glândula submaxilar regulada por andrógeno 3B (SMR3B) está aumentada em todos os grupos que possuem altos níveis de células inflamatórias, ou seja, está subexpressa somente no fenótipo paucigranulocítico. Dentre todas as proteínas diferencialmente expressas, apenas 7 estavam aumentadas nos eosinofílicos, sendo que a maioria (6) das proteínas só diferiu do grupo paucigranulocítico (Tabela 5).

Dentre as 52 proteínas que apresentaram diferença significativa entre os grupos, 5 foram selecionadas de acordo com a diferença apresentada (Figura 9A). Essas proteínas poderiam ser utilizadas para discriminar os grupos. A BPIFA1 é capaz de diferenciar eosinofílicos de mistos, a MUC5AC diferencia os eosinofílicos de paucigranulocíticos, já a CAMP além de diferenciar o grupo eosinofílico do neutrofílico, pode discriminar neutrofílicos e mistos de paucigranulocíticos, assim como a CTSG. Por fim, a ANXA1 seria capaz de diferenciar neutrofílicos em relação a mistos.

**Figura 9 Heatmap da intensidade normalizada das proteínas diferencialmente expressas no escarro (A) e soro (B) de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P).**



As proteínas diferencialmente expressas do soro estão representadas na Tabela 6. As informações adicionais dessas proteínas encontram-se no Apêndice A, tabela 3.A. No total, 12 proteínas apresentaram diferença entre pelo menos dois grupos. Dentre essas, destacam-se a ficolina-3 (FCN3), que está superexpressa em indivíduos eosinofílicos em relação a neutrofílicos e mistos, e a Trombospondina 1 (THBS1), também aumentada em eosinofílicos, porém em relação aos paucigranulocíticos.

**Tabela 6: Lista de proteínas alteradas significativamente no soro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P).**

ID	Gene	Proteína	Log Dif (E vs N)	Log Dif E vs M	Log Dif (E vs P)	Log Dif (N vs M)	Log Dif (N vs P)	Log Dif (M vs P)
1	<i>FCN3</i>	Ficolina-3	12,83*	9,55*	NS	NS	NS	NS
2	<i>CA1</i>	Anidrase carbônica 1	NS	-3,20*	NS	NS	NS	NS
3	<i>C1QA</i>	Subcomponente do complemento C1 subunidade A	NS	NS	NS	NS	NS	2,51*
4	<i>PF4</i>	Fator de plaquetas 4	NS	-3,86**	NS	-3,22**	NS	NS
5	<i>VTN</i>	Vitronectina	NS	-1,15*	NS	-1,80**	NS	NS
6	<i>SHBG</i>	Globulina ligadora de hormônios sexuais	NS	-2,88*	NS	NS	NS	NS
7	<i>THBS1</i>	Trombospondina 1	NS	NS	10,92*	NS	NS	NS
8	<i>LAMP2</i>	Glicoproteína de membrana associada a lisossomo 2	NS	NS	NS	NS	NS	10,70*
9	<i>BTD</i>	Biotinidase	NS	NS	NS	NS	NS	2,00*
10	<i>CRISP3</i>	Proteína secretória rica em cisteína 3	NS	-9,93*	NS	-8,58*	NS	NS
11	<i>TGFBI</i>	Proteína ig-h3 indutora de fator de crescimento transformador-β	NS	NS	NS	NS	NS	10,37*
12	<i>PRG4</i>	Proteoglicano 4	NS	NS	NS	NS	NS	8,32*

ID = identificação. Dif = diferença. \* p < 0,05. \*\* p < 0,01.

As demais proteínas alteradas estão superexpressas somente no grupo misto em relação a algum outro grupo, como o fator de plaquetas 4 (PF4), a vitronectina (VTN) e a CRISP3, que estão alterados em relação ao grupo eosinofílico e neutrofílico. Outras 5 proteínas estão alteradas somente em relação ao fenótipo paucigranulocítico: subcomponente do complemento C1 subunidade A (C1QA), glicoproteína de membrana associada a lisossomo 2 (LAMP2), biotinidase (BTD), proteína ig-h3 indutora de fator de crescimento transformador-β (TGFβ1) e proteoglicano 4 (PRG4).

A proteína CRISP3 foi a única presente tanto no soro quanto no escarro dentre todas as que apresentaram diferença significativa. Porém, enquanto no escarro essa proteína estava superexpressa nos grupos neutrofílico e misto em relação aos grupos eosinofílico e paucigranulocítico, no soro a diferença ocorreu entre o grupo misto em relação aos grupos eosinofílico e neutrofílico, estando subexpressas nesses últimos.

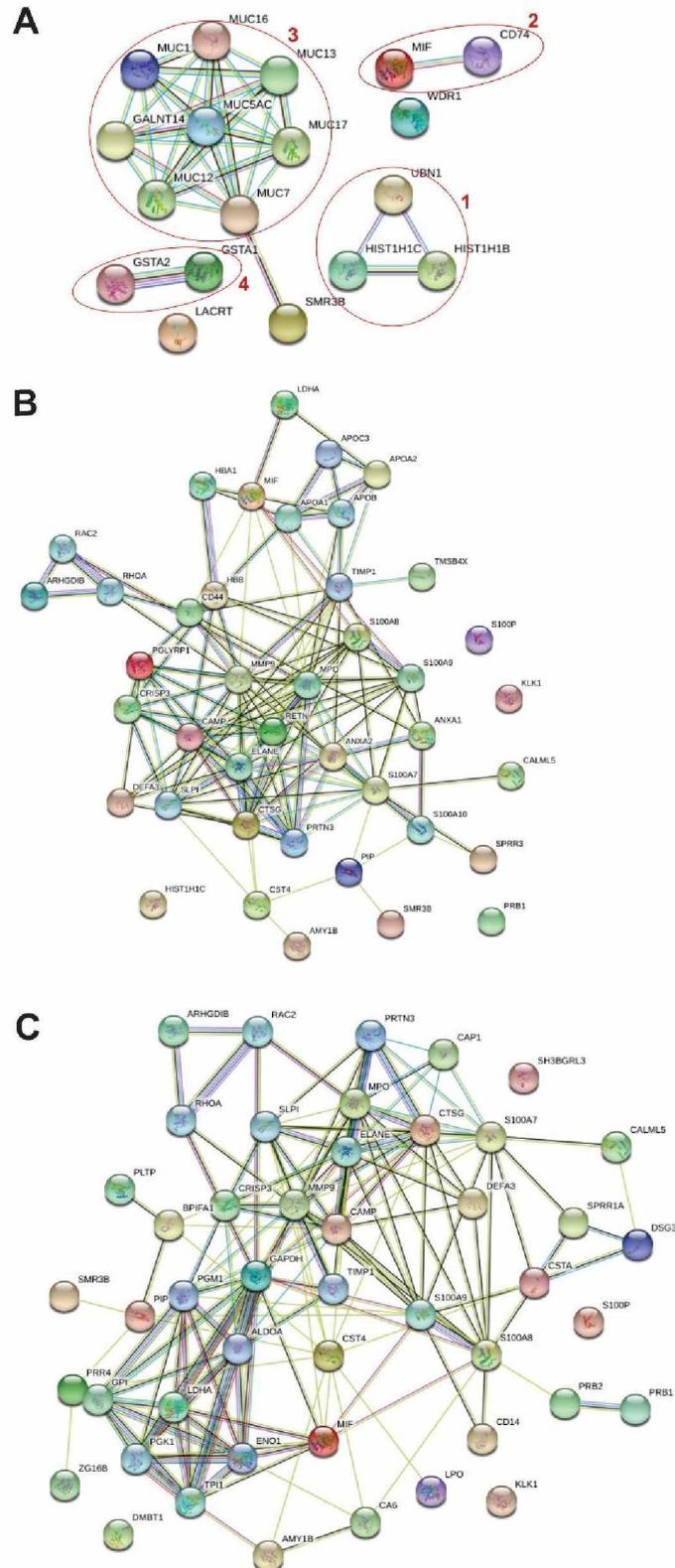
Dentre essas proteínas alteradas, foram selecionadas 4 proteínas capazes de discriminar quase todos os grupos (Figura 9B). Os únicos grupos que não são possíveis de serem diferenciados são os neutrofílicos de paucigranulocíticos. A proteína FCN3 é capaz de separar o grupo eosinofílico de neutrofílicos e mistos. Já a THBS1 pode separar eosinofílicos de paucigranulocíticos. Pelos níveis de LAMP2 é possível diferenciar mistos de paucigranulocíticos. Por fim, a CRISP3 consegue discriminar o grupo misto dos grupos eosinofílico e neutrofílico.

#### 4.2.4 Vias enriquecidas

As proteínas que apresentaram alguma alteração significativa entre um ou mais grupos fenotípicos foram utilizadas para criar uma rede de interação proteína-proteína. Para isso, foram separadas as proteínas alteradas em cada grupo. Dentre as proteínas alteradas no escarro de pacientes com asma eosinofílica, foram utilizadas 8 proteínas que foram associadas resultando em 4 clusters, com valor de p de enriquecimento  $1,67 \times 10^{-08}$ , indicando que as interações não ocorreram ao acaso e que as proteínas estão pelo menos parcialmente biologicamente conectadas.

Nesses 4 clusters, apenas duas possuem associação direta, as duas histonas H1-2 e H1-5, representadas no cluster 1, envolvidas em vias de formação de focus de heterocromatina associado a senescência e ativação do fator de fragmentação do DNA (Figura 10A). Já o cluster 2 está associado a vias do sistema imune, homeostasia e interação de superfície celular da parede vascular. Por sua vez, o cluster 3, formado basicamente por mucinas, está envolvido em vias do sistema imune inato, enquanto que o cluster 4 possui proteínas associadas à conjugação de glutatona.

**Figura 10: Rede de interação proteína-proteína das proteínas alteradas no escarro de pacientes com asma eosinofílica (A), neutrofílica (B) e mista (C).** As proteínas estão representadas pelos nós e as linhas representam as interações com interatores preditos. As cores das linhas rosa, azul claro, verde, vermelho, azul escuro, preto e amarelo representam evidências de associação, como banco de dados, experimental associação de bairro, fusão gênica, co-ocorrência, co-expressão, e mineração de texto, respectivamente.

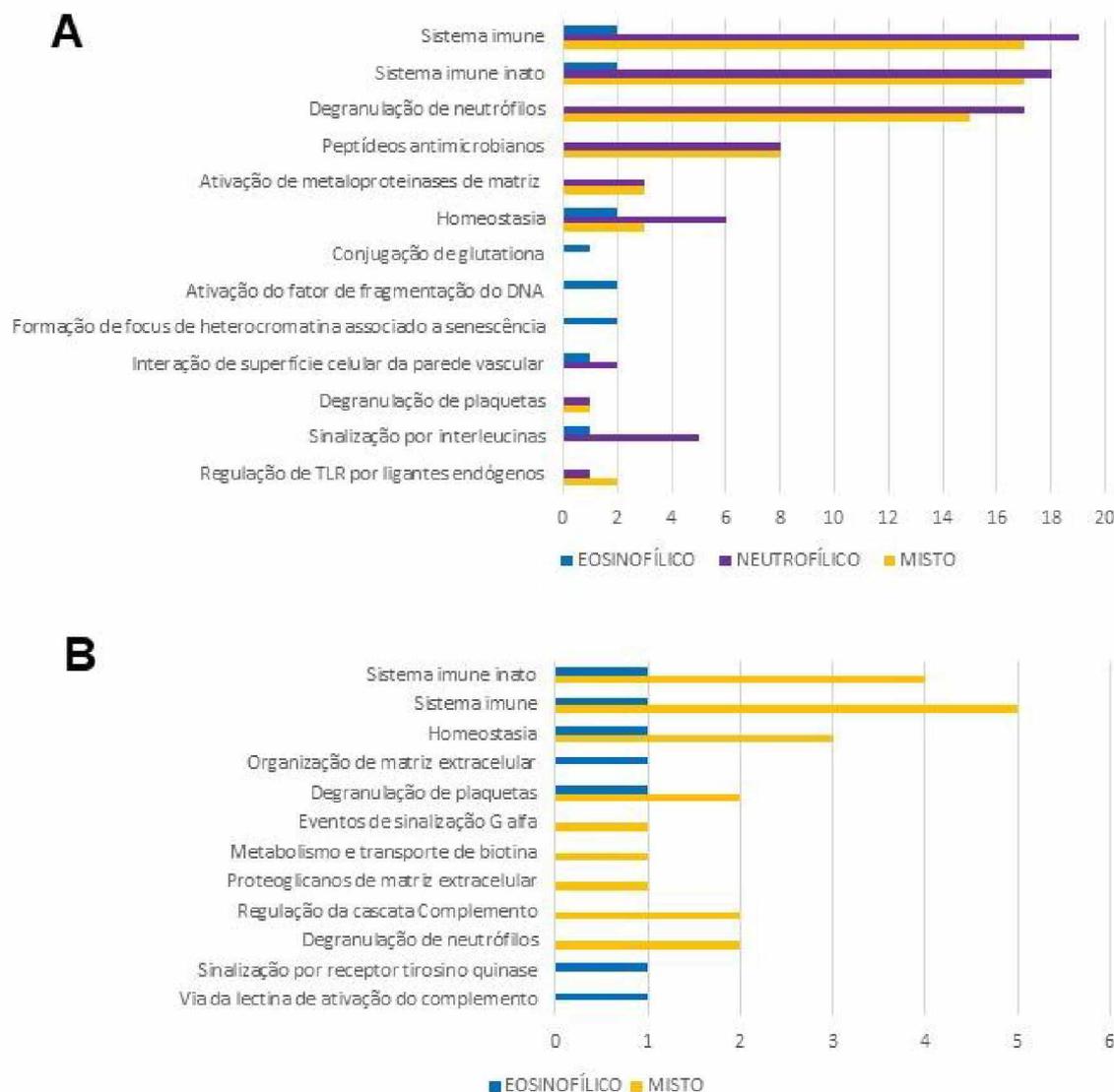


Para a construção do mapa de interações de proteínas alteradas no escarro de pacientes com asma neutrofílica, foram utilizadas 31 proteínas (Figura 10B). A maioria dessas proteínas estão associadas, agrupadas em um único cluster, com valor de  $p < 1 \times 10^{-16}$ . As principais vias que essas proteínas estão envolvidas são vias do sistema imune inato e de degranulação de neutrófilos. Algumas proteínas também estão envolvidas em vias de peptídeos antimicrobianos, sinalização por interleucinas e homeostasia.

Dentre as 37 proteínas utilizadas para criação do mapa de interações de proteínas alteradas no escarro de pacientes com asma mista, a maioria das proteínas se repetem do grupo neutrofílico, entretanto outras 16 são diferentes (Figura 10C). Novamente, a maioria das proteínas estão associadas, com valor de  $p < 1 \times 10^{-16}$ . De fato, a maioria das proteínas estão envolvidas com as vias do sistema imune inato, degranulação de neutrófilos e peptídeos antimicrobianos. Porém, outras vias também puderam ser identificadas, como ativação de metaloproteinases de matriz e regulação de TLR por ligantes endógenos. Para algumas proteínas não foi possível obter as vias associadas.

Como citado, as proteínas alteradas estão associadas a diversas vias, as quais foram identificadas pelo banco de dados Reactome. As principais vias enriquecidas comentadas anteriormente estão representadas na figura 11A, juntamente com a quantidade de proteínas associadas a cada via, separadas por grupo fenotípico. O conjunto de todas as vias enriquecidas associadas às proteínas estatisticamente alteradas entre os grupos que foram identificadas pelo banco de dados, encontra-se no Apêndice B, tabela 1.B.

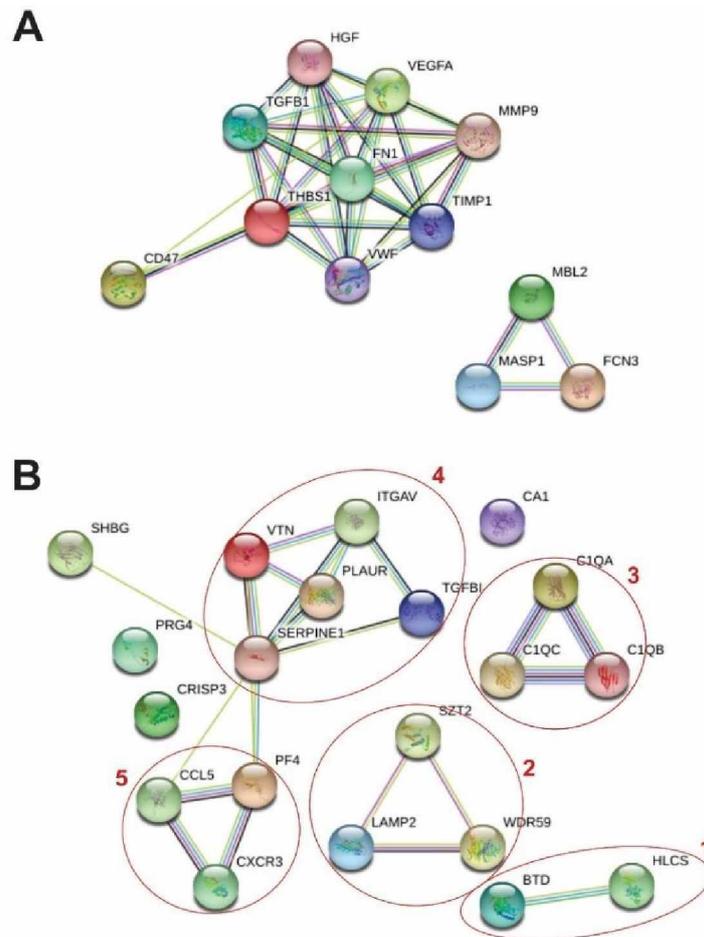
**Figura 11: Principais vias enriquecidas pelas proteínas alteradas no escarro (A) e soro (B) de pacientes com asma eosinofílica (azul), neutrofílica (roxo) e mista (amarelo).** O número de proteínas significativamente diferentes associadas a cada via identificada pelo banco de dados Reactome está demonstrado no gráfico de barras



As proteínas alteradas no soro foram divididas em duas partes, uma superexpressa nos eosinofílicos, composta por 2 proteínas, e outra composta por 10 proteínas que estão superexpressas no grupo misto em relação a algum outro grupo (Figura 12). Como pode ser visto no mapa de interações, as 2 proteínas do grupo eosinofílico, FCN3 e THBS1, não interagem entre si (Figura 12A), entretanto estão associadas a outras proteínas, com valor de p de enriquecimento  $5,64 \times 10^{-05}$ . A FCN3 interage com proteínas envolvidas na via da lectina de ativação do complemento e no sistema imune inato, de acordo com o banco de dados

Reactome. Já a THBS1 participa principalmente de vias como a degranulação de plaquetas, sinalização por receptor tirosina quinase e homeostase, entretanto, também interage com proteínas do sistema imune.

**Figura 12: Rede de interação proteína-proteína das proteínas alteradas no soro de pacientes com asma eosinofílica (A) e mista (B).** As proteínas estão representadas pelos nós e as linhas representam as interações com interatores preditos. As cores das linhas rosa, azul claro, verde, vermelho, azul escuro, preto e amarelo representam evidências de associação, como banco de dados, experimental associação de bairro, fusão gênica, co-ocorrência, co-expressão, e mineração de texto, respectivamente. Os clusters estão evidenciados em círculos vermelhos.



No mapa de interação das proteínas alteradas no grupo misto é possível identificar 5 clusters, com valor de  $p$   $1,5 \times 10^{-02}$  (Figura 12B). O cluster 1 está exclusivamente envolvido em vias de metabolismo e transporte de biotina, enquanto o cluster 2 está associado a vias do sistema imune, degranulação de neutrófilos e plaquetas. Já o cluster 3 participa de vias do sistema imune inato e ativação do complemento, o cluster 4 também está envolvido com vias do sistema imune, além de proteoglicanos de matriz extracelular. Por fim, o cluster 5 está

associado principalmente com eventos de sinalização G alfa. A Figura 11B mostra uma síntese sobre as principais vias envolvidas com essas proteínas encontradas alteradas no soro dos pacientes eosinofílicos e mistos. Mais informações sobre as vias envolvidas podem ser encontradas no Apêndice B, tabela 2.B.

### **4.3 Análise do metaboloma do soro e escarro de pacientes com asma**

#### **4.3.1 Análise de significância**

Os metabólitos do soro e escarro dos pacientes foram obtidos por meio de espectrometria de massas nos modos de ionização negativo e positivo. Após o processamento dos espectros de massas resultantes da técnica, foi verificado que a intensidade dos compostos obtidos por modo de ionização negativo era muito baixa, o que dificulta a posterior identificação e verificação dos metabólitos. Dessa forma, para as análises de significância e identificação dos compostos seguiu-se somente com os dados provenientes dos espectros de massas obtidos no modo de ionização positivo.

Após o processamento dos dados adquiridos, foram encontrados 1113 compostos no escarro de pacientes com asma. Posteriormente à aplicação do filtro de frequência e abundância, restaram 110 metabólitos, dos quais apenas um metabólito não estava presente nos pacientes com asma eosinofílica. O restante dos compostos estava presente em todos os grupos. Já nas amostras de soro, foram obtidos 920 metabólitos, e restaram apenas 59 após aplicação dos filtros, os quais estavam presentes em todos os grupos. Dos metabólitos resultantes, 22 compostos de mesma  $m/z$  foram identificados tanto no escarro quanto no soro. Entretanto, não se pode dizer que foram os mesmos metabólitos, uma vez que isso só se pode ser afirmado após a identificação dos mesmos, uma vez que existem vários metabólitos com a mesma  $m/z$ .

A análise de significância por teste ANOVA permitiu identificar que dos 110 metabólitos encontrados no escarro, 17 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$  e *fold change*  $> 2$ ) entre pelo menos dois grupos. O pós teste Tukey possibilitou identificar entre quais grupos esses metabólitos estavam alterados (Tabela 7). Dentre esses 17 metabólitos, 10 foram expressos diferentemente entre os

asmáticos eosinofílicos e neutrofílicos. A maior diferença ocorreu quando se comparou o grupo misto com o eosinofílico e com o paucigranulocítico, sendo que 13 e 11 metabólitos, respectivamente, foram responsáveis pela diferença. Já a maior semelhança entre grupos foi entre eosinofílicos e paucigranulocíticos, com 12 metabólitos em comum. O grupo neutrofílico apresentou semelhança entre 11 metabólitos quando comparado tanto com o grupo misto quanto com o grupo paucigranulocítico.

**Tabela 7: Matriz dos metabólitos do escarro gerada após o teste Tukey.**

Nome do grupo	Eosinofílico	Neutrofílico	Misto	Paucigranulocítico
Eosinofílico	17	10	13	5
Neutrofílico	7	17	6	6
Misto	4	11	17	11
Paucigranulocítico	12	11	6	17

Os metabólitos que foram significativamente diferentes estão apresentados nos retângulos brancos, enquanto que os que não foram diferentes estão apresentados nos retângulos cinza escuro. Em preto está o número total de metabólitos analisados.

Ao analisar o *fold change* da intensidade normalizada, alguns metabólitos se destacam pela presença ou ausência em alguns grupos. Verificou-se que o metabólito 1 estava superexpresso nos pacientes neutrofílicos e mistos em relação ao grupo eosinofílico e paucigranulocítico (Tabela 8). De forma oposta, o metabólito 10 foi encontrado superexpresso nos eosinofílicos e paucigranulocíticos em relação aos outros dois grupos. Já o 8 e o 15 está superexpresso apenas nos eosinofílicos, e não há diferença entre os paucigranulocíticos.

O metabólito 5 estava superexpresso nos pacientes com asma mista em relação aos demais grupos, mas também se encontra elevado nos eosinofílicos quando comparados com os neutrofílicos. Além disso, o metabólito 6 estava subexpresso no grupo paucigranulocítico em relação aos outros grupos, bem como o 7 quando comparado com o neutrofílico e misto. De modo interessante, os metabólitos 9 e 12 foram encontrados superexpressos somente nos eosinofílicos, enquanto que o 17 e 16 estavam superexpressos apenas no grupo misto.

**Tabela 8: Lista de metabólitos diferencialmente expressos no escarro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P).**

ID	Metabólito ou massa	Valor-p	Log FC (E vs N)	Log FC (E vs M)	Log FC (E vs P)	Log FC (N vs M)	Log FC (N vs P)	Log FC (M vs P)
1	960,5093	$2,51 \times 10^{-4}$	-77,17***	-6,25**	NS	NS	77.41***	6,28**
2	225,945	$8,46 \times 10^{-4}$	NS	8,56***	NS	6.81**	NS	-9,12***
3	720,5499	$7,60 \times 10^{-6}$	-71,60***	NS	-5,36*	NS	NS	58,97**
4	477,3153	$8,09 \times 10^{-4}$	NS	NS	NS	-16.96*	-756.21***	-5,87**
5	658,2808	$3,02 \times 10^{-6}$	5,55*	-504,85*	NS	-10.60***	NS	9,66***
6	521,5901	$3,84 \times 10^{-5}$	NS	NS	9,16***	NS	841.21***	871,78***
7	283,3247	$4,19 \times 10^{-7}$	NS	NS	NS	NS	5.78***	8,76***
8	777,6505	0,04	823,91*	5,79*	NS	NS	NS	NS
9	306,2549	$2,80 \times 10^{-11}$	13,25***	9,66***	10,13***	NS	NS	NS
10	671,7692	$9,67 \times 10^{-5}$	61,61**	6,94***	NS	NS	-8.10***	-8,88***
11	1387,1685	$1,47 \times 10^{-6}$	-44,28**	-76,44***	-8,04***	NS	-36.13*	NS
12	278,2227	$1,18 \times 10^{-10}$	91,84***	1,29***	10,01***	NS	NS	NS
13	378,2744	0,04	NS	-60,52*	NS	-78.06*	NS	NS
14	545,824	0,02	55,41*	7,41*	NS	NS	NS	-59,27*
15	477,8364	0,03	0,69**	7,56*	NS	NS	NS	NS
16	237,0443	0,004	NS	-75,68**	NS	-811.17**	NS	7,62**
17	712,6037	$4,07 \times 10^{-7}$	NS	-77,22***	NS	-64.61***	NS	67,64***

FC = fold change. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$ .

Dentre os 59 metabólitos selecionados no soro dos pacientes com asma, verificou-se que apenas 15 eram diferencialmente expressos entre pelo menos dois grupos (Tabela 9). A maior diferença ocorreu nos pacientes com asma eosinofílica em relação aos outros três grupos, sendo que 14 metabólitos foram responsáveis pelas diferenças em relação ao grupo neutrofílico, 11 os diferenciaram dos mistos e 13 dos paucigranulocíticos. Observou-se que dentre esses 17 metabólitos, a maioria eram semelhantes entre os grupos mistos, neutrofílico e paucigranulocítico.

A partir dos metabólitos selecionados no soro que foram significativamente diferentes, a maioria apresentou o mesmo perfil de diferença entre os grupos (Tabela 10). Dos 15 compostos, apenas um (1) estava superexpresso nos eosinofílicos, não havendo diferença entre neutrofílicos. Ainda, oito (3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 15) estavam subexpressos somente nos eosinofílicos em relação aos demais grupos. Além disso, verificou-se que o 7 estava superexpresso nos neutrofílicos e mistos, não havendo diferença entre esses dois grupos. Já o 2 foi encontrado superexpresso nos neutrofílicos, não havendo diferença entre mistos.

Os demais compostos não apresentaram um perfil claro de diferença entre os grupos.

**Tabela 9: Matriz dos metabólitos do soro gerada após o teste Tukey.**

Nome do grupo	Eosinofílico	Neutrofílico	Misto	Paucigranulocítico
Eosinofílico	15	14	11	13
Neutrofílico	1	15	3	2
Misto	4	12	15	3
Paucigranulocítico	2	13	12	15

Os metabólitos que foram significativamente diferentes estão apresentados nos retângulos brancos, enquanto que os que não foram diferentes estão apresentados nos retângulos cinza escuro. Em preto está o número total de metabólitos analisados.

**Tabela 10: Lista de metabólitos diferencialmente expressos no soro de pacientes com asma eosinofílica (E), neutrofílica (N), mista (M) e paucigranulocítica (P).**

ID	Metabólito ou m/z	Valor-p	Log FC (E vs N)	Log FC (E vs M)	Log FC (E vs P)	Log FC (N vs M)	Log FC (N vs P)	Log FC (M vs P)
1	757,5608	$3,88 \times 10^{-3}$	NS	94.77**	6.06*	6.39*	NS	NS
2	334,2475	$1,95 \times 10^{-2}$	-53.90*	NS	NS	NS	41.97*	NS
3	318,2523	$8,89 \times 10^{-29}$	-15.30***	-15.49***	-15.64***	NS	NS	NS
4	320,2698	$2,22 \times 10^{-16}$	-12.61***	-1.43***	-10.17***	NS	NS	40.98*
5	292,2377	$2,27 \times 10^{-32}$	-12.18***	-1.29***	-12.11***	NS	NS	NS
6	364,2373	$2,32 \times 10^{-11}$	-77.58***	-8.31***	-77.11***	NS	NS	NS
7	366,2524	$2,54 \times 10^{-8}$	-11.04***	-13.40***	-62.28*	NS	4.81*	71.71***
8	670,5653	$4,42 \times 10^{-5}$	-7.89***	NS	-8.68***	NS	NS	-5.22*
9	161,1047	$1,20 \times 10^{-4}$	-10.57***	NS	-8.10***	5.61*	NS	NS
10	810,5915	$1,81 \times 10^{-2}$	-76.83*	-6.60*	-78.12*	NS	NS	NS
11	340,2376	$2,00 \times 10^{-2}$	-68.54*	-8.39*	-7.34*	NS	NS	NS
12	139,0607	$2,42 \times 10^{-3}$	-89.22*	NS	NS	6.18**	NS	NS
13	161,1049	$8,94 \times 10^{-24}$	-16.81***	-15.61*	-14.96***	NS	NS	NS
14	225,944	$1,83 \times 10^{-2}$	-6.23*	-8.92*	-86.01*	NS	NS	NS
15	215,9151	$2,51 \times 10^{-2}$	-75.33*	-8.13*	-5.82*	NS	NS	NS

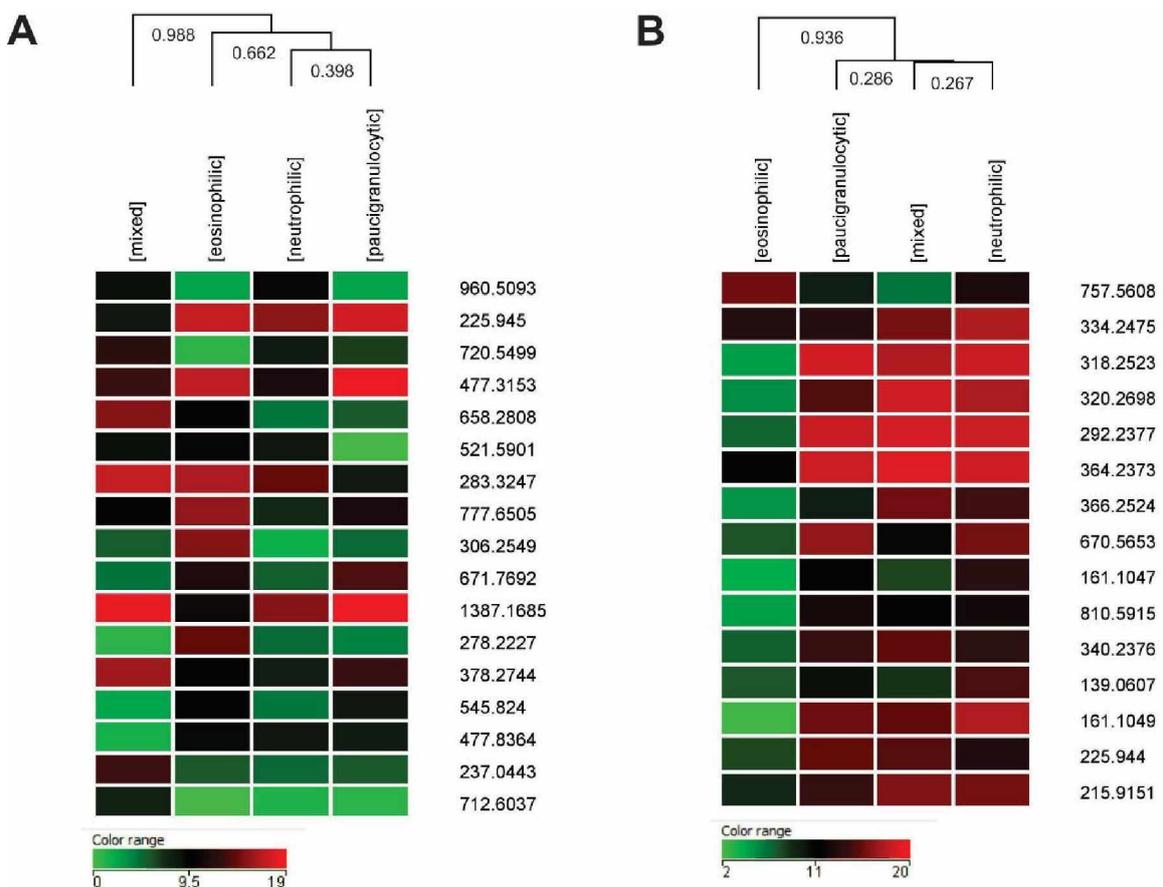
FC = fold change. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$ .

Dentre os metabólitos que apresentaram diferença significativa, apenas um (ID 14 na lista de metabólitos do soro) estava presente tanto no escarro quanto no soro. Entretanto, enquanto que no escarro esse metabólito estava subexpresso no grupo misto em relação aos outros três grupos, no soro ele estava subexpresso no grupo eosinofílico em relação aos outros três fenótipos.

### 4.3.2 Clusterização Hierárquica

A análise de cluster hierárquico possibilitou a organização dos grupos fenotípicos de acordo com a similaridade dos perfis. O grau de dissimilaridade entre os grupos é medido de acordo com o comprimento da linha vertical no dendograma, de forma que quanto maior a linha, mais diferente são os grupos. Para a criação do dendograma de amostras do escarro, foi utilizada a intensidade normalizada dos 17 metabólitos que apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 13A). Os quatro grupos foram clusterizados em três níveis.

**Figura 13: Dendograma mostrando a comparação entre os quatro grupos de pacientes (eosinofílico, neutrofílico, misto e paucigranulocítico), utilizando a intensidade normalizada dos metabólitos significantes. A – comparação em amostras de escarro utilizando 17 metabólitos significantes. B – comparação em amostras de soro utilizando 15 metabólitos significantes.**



O primeiro nível permitiu clusterizar os grupos neutrofílico e paucigranulocítico com menor grau de dissimilaridade, 0,398. A clusterização dos eosinofílicos, neutrofílicos e paucigranulocíticos resultou em um grau de

dissimilaridade de 0,662. Já os quatro grupos foram clusterizados com grau de dissimilaridade de 0,988, indicando que o grupo misto é mais diferente dos grupos.

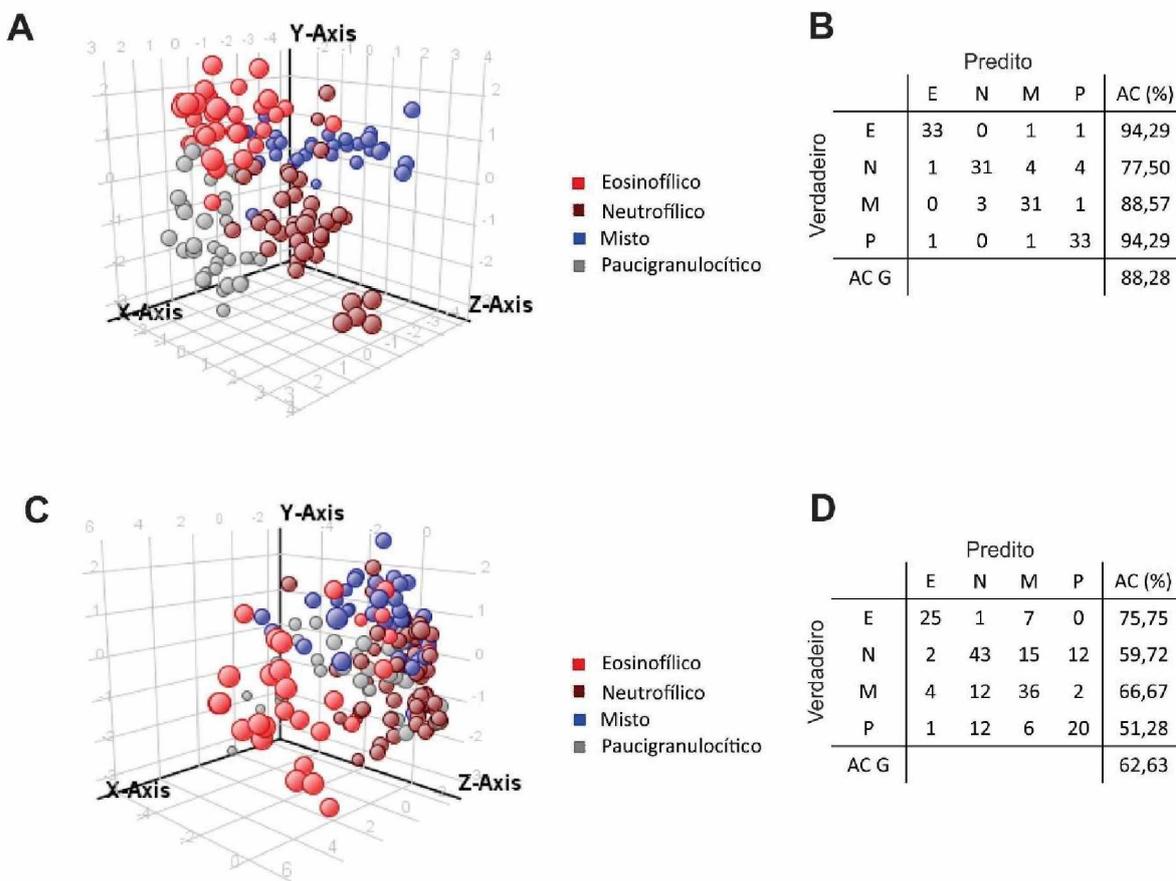
Para a clusterização hierárquica do soro, foi utilizada a intensidade normalizada dos 15 metabólitos que foram diferencialmente expressos entre os grupos (Figura 13B). Os quatro grupos foram clusterizados em três níveis. O primeiro nível permitiu a clusterização dos neutrofílicos e misto com um grau de dissimilaridade de 0,269. Os grupos neutrofílico, misto e paucigranulocítico foram clusterizados com um grau de dissimilaridade muito próximo ao nível 1 (0,286), mostrando que não houve uma grande diferença entre esses dois níveis. Por fim, os quatro grupos foram clusterizados com grau de dissimilaridade de 0,936, indicando que o grupo eosinofílico é o mais dissimilar entre os fenótipos analisados.

#### 4.3.3 Análise de classificação por algoritmos

A análise de dados multivariados por PLS-DA gera um modelo de predição para classificação discriminante entre os grupos. Para o escarro, foram utilizados os 17 metabólitos que foram significativamente diferentes para criação do modelo, utilizando todas as replicatas de cada paciente. O gráfico de escore da PLS-DA mostra uma clara separação dos quatro grupos analisados (Figura 14A), de forma que os grupos eosinofílico e o paucigranulocítico foram melhor agrupados, ambos com acurácia de 94,29 %, como é mostrado na matriz de confusão (Figura 14B).

No grupo eosinofílico, 1 dos casos foi classificado incorretamente como misto e outro como paucigranulocítico, enquanto que no grupo paucigranulocítico, uma instância foi classificada no fenótipo eosinofílico e outra como misto. Já no grupo misto, que apresentou acurácia de predição um pouco menor, 88,57 %, 3 casos foram classificados incorretamente como neutrofílico e 1 como paucigranulocítico. Os neutrofílicos, que ficaram mais dispersos com a presença de vários pequenos clusters, resultaram em uma acurácia de 77,50 %, apresentando 4 casos como misto, 4 como paucigranulocítico e 1 como eosinofílico. A acurácia geral do modelo criado foi de 88,28 %.

**Figura 14: Modelo de predição por PLS-DA.** (A) Gráfico de escores tridimensional da PLS-DA em amostras de escarro utilizando 17 metabólitos e (B) matriz de confusão do modelo da PLS-DA. (C) Gráfico de escores tridimensional da PLS-DA em amostras de soro utilizando 15 metabólitos e (D) matriz de confusão do modelo da PLS-DA do soro. E – eosinofílico, N – neutrofílico, M – misto, P – paucigranulocítico, AC – acurácia, AC G – acurácia geral.



Para a criação do modelo de predição por PLS-DA do soro, foram utilizados os 15 metabólitos diferencialmente expressos nas análises anteriores. Entretanto, o modelo não foi tão eficiente quanto no escarro para distinguir os grupos (Figura 14C). Novamente, a capacidade de predição do grupo eosinofílico foi maior, apresentando acurácia de 75,76 %. Nesse grupo, 8 casos foram classificados incorretamente. O grupo misto pôde ser diferenciado com uma acurácia de 66,67 %, com 18 instâncias erradas. Por fim, os neutrofílicos e paucigranulocíticos ficaram mais dispersos e obtiveram acurácia de discriminação de 59,72 % e 51,28 %, respectivamente, com quase metade dos casos classificados incorretamente (Figura 14D).

Os dados provenientes da análise do metaboloma também foram analisados por outros algoritmos de classificação, também utilizando todas as replicatas de

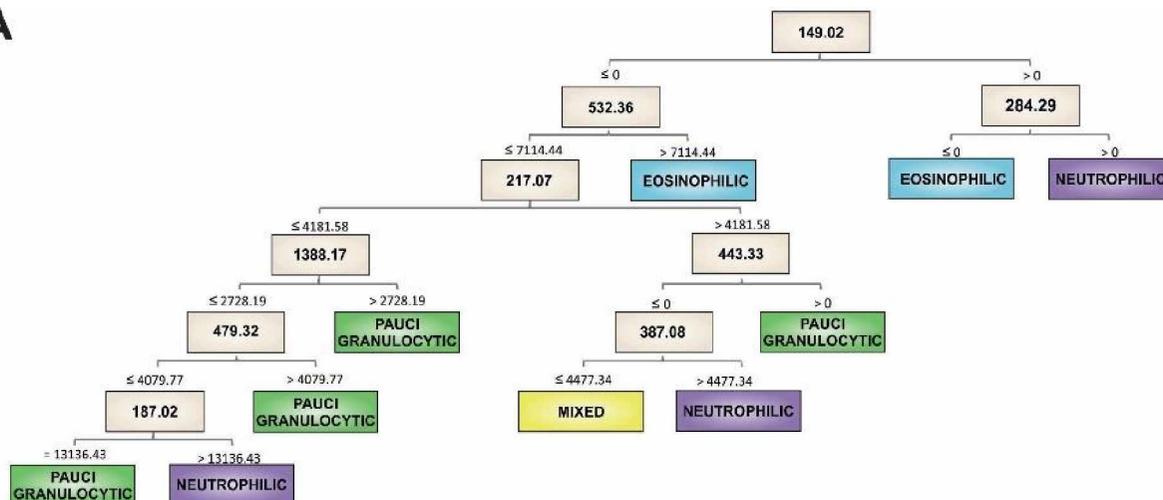
cada amostra. A aplicação do algoritmo J48 nos dados de metabolômica do escarro gerou uma árvore de decisão com 9 atributos, que nessa análise corresponde aos metabólitos, que foram testados quanto ao valor de intensidade, representado nos ramos (retângulos bege) (Figura 15A). Foram geradas 10 folhas, representadas por retângulos coloridos no final de cada ramo, que indicam os grupos fenotípicos. Ao analisar a árvore, o metabólito principal (149,02) tem maior poder de decisão, se a intensidade desse metabólito for  $\leq 0$ , um outro metabólito (532,36) será analisado quanto à sua intensidade, e assim por diante até chegar na classificação do fenótipo. A árvore de decisão obteve precisão de 82,76 %, com estatística kappa 0,7698, erro absoluto 0,0895 e raiz do erro médio quadrático 0,284, resultando na matriz de classificação representada na Figura 15B.

A matriz de confusão obtida mostra que de 35 instâncias provenientes do grupo eosinofílico, o algoritmo classificou apenas 1 incorretamente, como neutrofílico, sendo o grupo melhor classificado pelo algoritmo. Ao analisar o grupo neutrofílico, o algoritmo errou em 9 casos, classificando 3 como eosinofílico, 2 como misto e 4 como paucigranulocítico. Já a análise do grupo misto classificou 7 casos incorretamente, sendo 1 como eosinofílico, 2 como neutrofílico e 4 como paucigranulocítico. Por fim, o algoritmo errou ao classificar 6 instâncias como neutrofílico e 2 como misto, que na verdade eram do grupo paucigranulocítico (Figura 15B).

Já a árvore de decisão gerada a partir da aplicação do algoritmo J48 nos dados de metabolômica do soro é composta por 7 atributos e 8 folhas (Figura 15C). Essa árvore de decisão obteve uma boa precisão de 93,94 %, estatística kappa 0,9166, erro absoluto 0,0332 e raiz do erro médio quadrático 0,1728, como pode-se observar na matriz de classificação (Figura 15D). A matriz mostra que todos os casos de eosinofílicos foram classificados corretamente. Já entre os 72 casos de neutrofílicos, 1 foi classificado como eosinofílico, 1 como misto e 3 como paucigranulocítico. Entre o grupo misto, o algoritmo errou em apenas uma instância, classificando como paucigranulocítico. Nas instâncias de paucigranulocíticos, 5 foram classificadas como neutrofílico e 1 como misto.

**Figura 15: Modelo de predição por J48.** (A) Árvore de decisão gerada a partir da análise dos dados do escarro pelo algoritmo J48 e (B) matriz de confusão gerada a partir desta árvore. (C) Árvore de decisão gerada a partir da análise dos dados do soro pelo algoritmo J48 e (D) matriz de confusão gerada a partir da árvore de decisão do escarro. E – eosinofílico, N – neutrofílico, M – misto, P – paucigranulocítico.

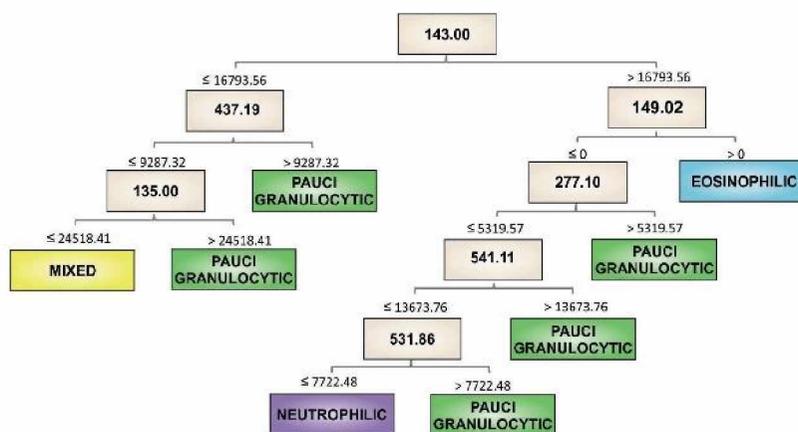
**A**



**B**

		Predito			
		E	N	M	P
Verdadeiro	E	34	1	0	0
	N	3	31	2	4
	M	1	2	28	4
	P	0	6	2	27

**C**



**D**

		Predito			
		E	N	M	P
Verdadeiro	E	33	0	0	0
	N	1	67	1	3
	M	0	0	53	1
	P	0	5	1	33

Ao utilizar o algoritmo CfsSubsetEval, foi possível selecionar os metabólitos que possuem alta relação com o resultado da classificação e fraca dependência entre os demais metabólitos. Assim, foram selecionados 46 metabólitos no escarro e 40 no soro. Esses metabólitos foram utilizados para construir as árvores de decisão do algoritmo Random Forest. Essas árvores de decisão são muito extensas, difíceis de serem analisadas e reproduzidas por humanos como as resultantes do algoritmo J48, mas são facilmente processadas por computador.

A partir dos 46 metabólitos selecionados no escarro, foram geradas as árvores de decisão utilizando o algoritmo Random Forest e a média dessas árvores é utilizada para o resultado. O algoritmo foi capaz de prever corretamente todos os casos eosinofílicos e mistos, e errou ao classificar apenas 1 caso do grupo neutrofílico como paucigranulocítico e 1 caso do grupo paucigranulocítico como misto (Tabela 11). Dessa forma, por meio desse algoritmo foi possível classificar os fenótipos com uma excelente precisão, de 98,62 %, estatística kappa 0,9816, erro absoluto 0,0913 e raiz do erro médio quadrático 0,1407.

**Tabela 11: Matriz de confusão gerada a partir da análise dos dados de escarro pelo algoritmo Random Forest.**

		Predito			
		Eosinofílico	Neutrofílico	Misto	Paucigranulocítico
Verdadeiro	Eosinofílico	35	0	0	0
	Neutrofílico	0	39	0	1
	Misto	0	0	35	0
	Paucigranulocítico	0	0	1	34

Os dados provenientes de 40 metabólitos das amostras de soro foram analisados no algoritmo Random Forest, também resultando uma ótima precisão para classificar os fenótipos, 97,98%, estatística kappa 0,9721, erro absoluto 0,0639 e raiz do erro médio quadrático 0,1275. Semelhante ao resultado no escarro, o algoritmo acertou 100 % dos casos ao classificar os fenótipos eosinofílicos e misto (Tabela 12). No grupo neutrofílico, o algoritmo classificou incorretamente apenas 1 caso, sendo considerado paucigranulocítico, enquanto que no grupo paucigranulocítico 3 casos foram classificados como neutrofílico.

**Tabela 12: Matriz de confusão gerada a partir da análise dos dados de soro pelo algoritmo Random Forest.**

		Predito			
		Eosinofílico	Neutrofílico	Misto	Paucigranulocítico
Verdadeiro	Eosinofílico	33	0	0	0
	Neutrofílico	0	71	0	1
	Misto	0	0	54	0
	Paucigranulocítico	0	3	0	36

Os valores de m/z dos metabólitos selecionados para a classificação utilizando o Random Forest foram incluídos em uma plataforma online, de fácil acesso, que será aprimorada para a validação do método. Dessa forma, após realizar o teste de metabolômica por espectrometria de massas para novas amostras, os dados extraídos serão submetidos a essa plataforma, sem necessidade de análise dos dados, e de acordo com os valores estabelecidos pelo algoritmo os pacientes serão classificados em eosinofílicos, neutrofílicos, mistos ou paucigranulocíticos. Os valores de m/z foram omitidos, pois se encontram em processo de patenteamento.

## 5. DISCUSSÃO

A asma é uma doença heterogênea crônica que acomete crianças e adultos, ainda não muito bem compreendida. A presença de células inflamatórias no microambiente das vias aéreas permite classificar os pacientes em diversos fenótipos, como os estudados nesse trabalho. Essas células produzem mediadores que irão influenciar no tipo de resposta inflamatória, e conseqüentemente, na resposta ao medicamento. Dessa forma, é essencial que esses indivíduos sejam bem caracterizados. Atualmente, a essa classificação é realizada pela contagem diferencial de leucócitos no escarro induzido, uma técnica que exige pessoas capacitadas para análise, além de ser lenta e invasiva.

Apesar da difícil obtenção do escarro, esse fluido é rico em moléculas secretadas tanto por células epiteliais quanto por células inflamatórias, sendo considerado uma fonte de mediadores importantes que refletem a situação local. As técnicas de proteômica e metabolômica têm sido bastante utilizadas para caracterização de doenças complexas. Juntas, essas técnicas podem se complementar, resultando em um maior poder de compreensão do tema estudado. Além de fornecer uma rica informação sobre o perfil proteico e metabólico, essas técnicas permitem identificar biomarcadores que podem ser aplicados no diagnóstico precoce e na resposta ao tratamento da doença.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a explorar como as proteínas e os metabólitos se alteram no escarro de pacientes com asma eosinofílica, neutrofílica, mista e paucigranulocítica. Dentre os indivíduos selecionados, percebeu-se uma predominância do gênero feminino em todos os grupos estudados. Sabe-se que a asma de início tardio acomete mais mulheres do que em homens (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2019), o que corrobora os nossos achados, uma vez que a maioria dos indivíduos do estudo relataram início dos sintomas após os 12 anos de idade. Estudos indicam que além da maior prevalência da asma em mulheres, esse gênero é mais suscetível a formas mais graves e a ocorrência está associada a mudanças hormonais (RAO et al., 2013).

O peso corporal está relacionado com as exacerbações, de forma que a obesidade favorece a ocorrência dos sintomas (SCHATZ et al., 2013). Ainda, a perda de peso por meio de uma dieta restritiva e exercícios físicos em indivíduos

asmáticos com sobrepeso ou obesos resultou no controle da asma com diminuição da inflamação das vias aéreas (SCOTT et al., 2013). Para tentar minimizar as diferenças entre os pacientes uma vez que a doença por si já é bastante heterogênea, foi estabelecido um valor de IMC ( $> 40$ ) como critério de exclusão da pesquisa. Dessa forma, esse valor se manteve estável em todos os grupos.

A contagem de eosinófilos no sangue tem sido proposta como um biomarcador para a eosinofilia das vias aéreas, devido a correlações entre a contagem desse tipo celular no escarro e no sangue (MCGRATH et al., 2012; SCHLEICH et al., 2013; COUMOU et al., 2018). Contudo, não há consenso entre o valor estabelecido como base. Enquanto dois desses estudos de grandes coortes estabeleceram o limiar de 220 células/ $\mu\text{L}$ , ambos com sensibilidade e especificidade de aproximadamente 70 % para identificar indivíduos com alta contagem de eosinófilos no escarro (MCGRATH et al., 2012; SCHLEICH et al., 2013), o outro estudo conseguiu melhor especificidade (91%) ao utilizar o limite de 270 células/ $\mu\text{L}$  (WAGENER et al., 2015). Esses estudos foram realizados com pacientes asmáticos em tratamento, sempre com corticosteroide inalatório. Ao contrário dos eosinófilos, a contagem de neutrófilos no sangue não pode ser utilizada para identificar indivíduos com alta contagem no escarro (SCHLEICH et al., 2013)

Entretanto, como os níveis de eosinófilos não são constantes, apenas uma mensuração pode levar a um diagnóstico incorreto, principalmente se o indivíduo estiver sob uso de corticosteroide sistêmico (KOSTIKAS; BRINDICCI; PATALANO, 2018). Apesar de não haver diferença entre os níveis de eosinófilos no sangue entre os grupos participantes do presente estudo, é possível observar pelo intervalo interquartil que em todos os grupos fenotípicos há indivíduos com mais que 270 eosinófilos/ $\mu\text{L}$ , apesar de o maior intervalo interquartil do grupo eosinofílico ser maior que os demais. Esse achado confirma que a contagem desse tipo celular no escarro nem sempre reflete a contagem no sangue.

Por meio das anotações depositadas no banco de dados Panther, foi possível classificar a maioria das 295 proteínas identificadas no escarro induzido e 126 proteínas identificadas no soro dos pacientes asmáticos, de acordo com as funções moleculares e processos biológicos desempenhados por elas. Essas proteínas de ambos tipos amostrais desempenham diversas funções, sobretudo a

atividade catalítica, em especial de transferase e hidrolase no escarro e oxireductase e hidrolase no soro, a função de ligação, com destaque para ligação de proteínas, e a regulação da função molecular, principalmente a regulação enzimática.

Logo, observa-se que apesar da maioria das proteínas identificadas nas vias aéreas serem diferentes das encontradas sistemicamente, as funções moleculares permanecem basicamente as mesmas nos dois compartimentos. De modo similar, ao analisar a ontologia genética do proteoma do escarro de pacientes asmáticos, um estudo identificou que as proteínas estavam associadas às mesmas funções moleculares que o nosso trabalho. Ainda, a análise não foi alterada em relação aos indivíduos saudáveis (GHARIB et al., 2011).

A análise de ontologia gênica mostrou que os principais processos celulares relacionados aos proteomas do escarro induzido e do soro também são os mesmos. Apesar das proteínas do escarro estarem relacionadas a outros 3 processos diferentes que não foram identificados no soro, apenas 1 ou 2 proteínas estavam associadas a esses processos, não sendo representativos de todo o proteoma. No presente trabalho foi identificado que o principal processo biológico associado tanto às proteínas do soro quanto de escarro foram os processos celulares, principalmente metabólicos.

Esses achados foram diferentes do estudo de Gharib e colaboradores (2011), que identificaram os processos de regulação biológica e resposta ao estímulo no escarro de pacientes com asma, processos também identificados no nosso estudo, mas os subtipos desses processos diferiram. Enquanto eles identificaram processo de regulação de apoptose, no nosso estudo identificamos a regulação da transdução de sinal. Ainda, a resposta ao estímulo encontrada nesse trabalho se deve à resposta ao estresse, assim como no deles, e também a químicos, diferente de estímulos bióticos identificados no estudo citado.

A MYH9, uma miosina não muscular, foi identificada de forma exclusiva no escarro de pacientes eosinofílicos e neutrofílicos. É uma proteína de ligação à actina associada a processos de adesão, migração e divisão celular (VICENTE-MANZANARES et al., 2009). Alguns estudos trazem sua associação com o câncer de pulmão (KATONO et al., 2015; KHAN et al., 2017), porém a sua atuação na asma ainda não foi relatada.

A proteína SCGB1D2, também conhecida como lipofilina B, estava ausente apenas no escarro de pacientes paucigranulocíticos. Sabe-se que essa proteína faz parte das secretoglobinas, pequenas proteínas secretadas, e pode ser encontrada nas glândulas salivares. Entretanto, as informações sobre a função dessa proteína são escassas (ZHAO et al., 1999). Interessantemente, um outro membro da superfamília secretoglobina, SCGB1A1, foi encontrada subexpressa no escarro induzido de pacientes com asma (GHARIB et al., 2011).

Já no soro, a MMP21 foi identificada somente no grupo eosinofílico, enquanto que a LPA estava ausente apenas no grupo neutrofílico. Várias metaloproteinases de matriz foram associadas com a asma, como a MMP2 e MMP9 (CATALDO et al., 2000), e a MMP8 (PRIKK et al., 2002). Porém, as funções sobre a MMP21 não estão bem esclarecidas. Possivelmente, ela está envolvida com a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, que regula processos de proliferação e diferenciação celular (MARCHENKO; MARCHENKO; STRONGIN, 2003). A LPA é o principal componente lipoproteína a, que é capaz de se ligar e clivar a fibronectina (SALONEN et al., 1989). Por sua vez, a deposição de fibronectina na matriz extracelular das vias aéreas esta correlacionada com a progressão da asma (HOCKING, 2002). Dessa forma, a LPA poderia estar atuando como fator protetor.

Em uma análise geral das proteínas alteradas no escarro dos pacientes asmáticos permitiu identificar que a maioria das proteínas estava superexpressa nos grupos neutrofílico e misto, e subexpressa em eosinofílicos e paucigranulocíticos. Ainda, observou-se que há pouca diferença entre neutrofílicos e mistos, sugerindo que o perfil inflamatório predominante no grupo misto é proveniente da neutrofilia. A análise de bioinformática sugere que as 52 proteínas alteradas no escarro estão associadas a diversas vias biológicas. Estas incluíram vias do sistema imune, sobretudo sistema imune inato, degranulação de neutrófilos e plaquetas, homeostasia, sinalização de citocinas, vias de formação de focus de heterocromatina associado a senescência, ativação do fator de fragmentação do DNA, entre outras. 24 proteínas associadas ao sistema imune estavam alteradas no escarro dos pacientes asmáticos, das quais 23 estão envolvidas com o sistema imune inato e 20 com a degranulação de neutrófilos.

Entre essas 20 proteínas estão a CTSG e CAMP, que foram selecionadas entre as proteínas alteradas significativamente, por juntamente com outras serem

capazes de diferenciar os grupos analisados. Ambas proteínas foram encontradas superexpressas em neutrofílicos e mistos. A CAMP é clivada gerando o peptídeo antimicrobiano LL-37, que é liberado por neutrófilos mediante inflamação e atua na defesa do hospedeiro (HIEMSTRA et al., 2016). Um estudo comparativo entre pacientes com asma, DPOC e fibrose cística verificou que os níveis dessa proteína estavam reduzidos no escarro de pacientes asmáticos em relação ao grupo controle. Entretanto, o perfil de células inflamatórias do escarro foi investigado somente em pacientes com fibrose cística, o grupo que apresentou maiores níveis de CAMP, revelando uma grande quantidade de neutrófilos (XIAO et al., 2005).

A ANXA1, também associada com vias do sistema imune, foi outra proteína selecionada, encontrada elevada nos neutrofílicos em relação aos paucigranulocíticos e mistos. Essa proteína tem ação anti-inflamatória, pois é induzida por glicocorticoides e atua na redução da migração de neutrófilos (RONCHETTI et al., 2018). Dessa forma, essa proteína poderia estar atuando para controlar a inflamação gerada pela quantidade elevada de neutrófilos. Em um estudo de proteômica avaliando o escarro de várias variantes da asma, essa proteína foi encontrada em níveis elevados na asma aperto no peito variante em relação ao controle e as demais variantes estudadas (CAO et al., 2017).

A BPIFA1 e MUC5AC também fazem parte das proteínas selecionadas. A BPIFA1 é secretada pelas células epiteliais das vias aéreas, e atua na defesa contra patógenos, além de controlar a contração do músculo liso das vias aéreas e por conseguinte, a hiperresponsividade. As citocinas da resposta inflamatória do tipo Th2 presentes na asma eosinofílica alérgica podem inibir essa proteína, promovendo aumento da contração e da hiperresponsividade (WU et al., 2017). Esses fatos condizem com o fato de essa proteína ter sido encontrada subexpressa no grupo eosinofílico. A MUC5AC é uma mucina normalmente encontrada em níveis elevados na asma, que pode causar prejuízos em uma lesão respiratória. Essa proteína é induzida por uma resposta inflamatória do tipo Th2, típica de resposta desencadeada pela asma eosinofílica alérgica (EVANS et al., 2015), corroborando o fato de que essa proteína foi encontrada em níveis elevados nos eosinofílicos.

Além das proteínas citadas, outras identificadas no escarro também podem contribuir para o melhor entendimento dos fenótipos inflamatórios da asma. Por

meio dos níveis de S100A8, foi possível diferenciar neutrófilos e mistos de eosinófilos e paucigranulocíticos. É uma proteína secretada por neutrófilos, atua na resposta inflamatória liberando citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (WANG et al., 2018). O efeito protetor dessa proteína foi demonstrado em ratos com asma induzida, ao inibir a contração dos músculos lisos das vias aéreas, o que resulta no controle da hiperresponsividade das vias aéreas (XU et al., 2017). A CST4 foi outra proteína identificada no presente estudo capaz de diferenciar os grupos citados. É uma proteína inibidora de cisteína protease com função defensiva, uma vez que se liga a bactérias e lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) (FÁBIÁN et al., 2012).

Outras duas proteínas associadas à degranulação de neutrófilos foram identificadas em níveis elevados nos grupos neutrofílico e misto em relação ao grupo paucigranulocítico, a LDHA e ELANE. Um estudo verificou que pacientes com asma aguda e infecção viral apresentaram maior número de neutrófilos e altos níveis dessas duas proteínas, em relação aos com asma não infecciosa, o que corrobora os nossos achados (WARK et al., 2002). Outro achado interessante foi a proteína SMR3B, encontrada em níveis mais baixos apenas em paucigranulocíticos. De maneira oposta, em um estudo anterior que analisou o proteoma de pacientes asmáticos e indivíduos saudáveis, essa proteína foi encontrada em níveis menores nos pacientes (GHARIB et al., 2011). Apesar de ter sido identificada na asma, seu papel na doença ainda não foi esclarecido.

A análise proteômica do soro dos pacientes do grupo misto identificou o aumento de proteínas associadas a vias semelhantes às encontradas no escarro, apesar das proteínas alteradas em cada tipo amostral serem diferentes. 5 proteínas estavam associadas a vias do sistema imune, das quais 4 estavam envolvidas em vias do sistema imune inato. Dentre elas, estão duas proteínas que foram selecionadas entre, a LAMP2 e CRISP3, por serem capazes de juntas diferenciar quase todos os grupos analisados. Com exceção da combinação neutrofílico e paucigranulocítico, todos os outros puderam ser discriminados utilizando os níveis de intensidade normalizada dessas proteínas.

A LAMP2 está envolvida com a degranulação de neutrófilos e plaquetas, presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (THAYSEN-ANDERSEN et al., 2015), bem como no plasma (CABY et al., 2005). Ainda, está relacionada com a

homeostase, atuando na autofagia (GUKOVSKAYA et al., 2017). Já a CRISP3 está presente nos grânulos secundários e terciários dos neutrófilos, e possivelmente desempenha um papel antimicrobiano (UDBY et al., 2002a). Também pode ser encontrada na saliva e no sangue, mas pouco se conhece sobre essa proteína (UDBY et al., 2002b). Essa foi a única proteína que apresentou níveis estatisticamente diferentes tanto no escarro quanto no soro.

As outras duas proteínas selecionadas no soro foram FCN3 e THBS1, ambas encontradas em níveis maiores no grupo eosinofílico. A FCN3 foi encontrada superexpressa apenas nos eosinófilos em relação aos grupos neutrofilico e misto. Essa proteína atua na ativação do sistema complemento pela via da lectina e em um outro estudo foi encontrada em níveis elevados no soro de pacientes com asma refrataria em relação à asma não refratária. Ainda, a deficiência de FCN3 pode estar associada ao aumento da infecção (ALAM et al., 2017), o que poderia explicar o motivo dessa proteína ter sido encontrada em níveis baixos no grupo neutrofilico. Sabe-se que o aumento de neutrófilos na asma pode estar associado a infecções respiratórias, pois essas células desempenham um papel extremamente importante na defesa contra patógenos (GAO; YING; DAI, 2017). Entretanto, nem sempre esse aumento está relacionado com desordens infecciosas na asma (RADERMECKER et al., 2018).

A THBS1, aumentada em eosinofílicos em relação ao grupo paucigranulocítico no presente estudo, está envolvida com a ativação plaquetária, processo importante que ocorre na asma alérgica grave. Também, pode estar associada a indução quimiotática de macrófagos e a promoção da resposta pró-inflamatória (SHI et al., 2018). Dessa forma, o aumento dessa proteína apenas no grupo eosinofílico poderia ser explicado devido à grande quantidade de eosinófilos presentes que e também porque grande parte dos pacientes que compõem esse grupo é atópico.

Além das proteínas citadas, outras associadas ao sistema imune inato também apresentaram relevância. A VTN atua na ativação do sistema complemento e interage com integrinas permitindo a adesão e migração de neutrófilos, além de possuir função antiapoptótica em neutrófilos (BAE et al., 2012). Ainda, está relacionada ao processo adesão de eosinófilos no sangue durante o recrutamento na asma (JOHANSSON; MOSHER, 2013). A C1QA, componente do

sistema complemento, atua na diferenciação de células T CD4 + naive em células T reguladoras (Treg), auxiliando no controle da inflamação (MASCARELL et al., 2017).

Outra proteína identificada no grupo misto associada ao sistema imune é a CA1, que está associada com a resposta inflamatória de mastócitos. Entretanto, há pouca informação disponível sobre sua função (HENRY et al., 2016). O PF4, mediador inflamatório liberado por plaquetas, atua na estimulação de basófilos para liberação de histamina, e na ativação de eosinófilos. Se encontra elevado na asma, tanto durante a exacerbação quanto na fase estável (TUTLUOGLU et al., 2005). A maioria dessas proteínas superexpressas no grupo misto estão relacionadas com alguma função associada aos neutrófilos, mostrando que possivelmente a resposta inflamatória desse tipo celular prevalece quanto a neutrofilia e a eosinofilia coexistem. Entretanto, não é possível explicar porque essas proteínas não estão superexpressas no grupo neutrofílico.

Como já citado anteriormente, a asma possui influência genética e ambiental. A metabolômica é uma ótima ferramenta para estudar essa doença, na busca de novos biomarcadores e no entendimento da patofisiologia da asma, uma vez que os metabólitos são extremamente sensíveis a alterações na resposta celular (KELLY et al., 2017). Além disso, pelo metaboloma é possível identificar respostas celulares a exposições anteriores, o que torna essas pequenas moléculas mais proximais dos processos da doença (MCGEACHIE et al., 2015). Devido a tamanha importância, essa técnica tem sido aplicada no estudo de fenótipos da asma, especialmente na asma refratária, identificando que ácidos graxos poli-insaturados estão relacionados com a resistência a corticoide (ZHU; CAMARGO; HASEGAWA, 2019).

A análise metabolômica dos pacientes com asma classificados de acordo com os fenótipos inflamatórios, permitiu identificar uma mudança no perfil metabólico do escarro e do soro desses pacientes. 17 metabólitos estavam alterados no escarro entre pelo menos dois grupos. Desses, vários foram encontrados superexpressos nos eosinofílicos e também no grupo misto, e subexpressos nos paucigranulocíticos. Esses metabólitos devem ser melhor estudados, uma vez que podem ser estabelecidos como biomarcadores não só

para definir o fenótipo da asma, mas também para avaliar a progressão da doença ou serem utilizados como alvos para tratamento (VILLASEÑOR et al., 2017).

O oposto foi identificado no soro dos pacientes, sendo que de 15 metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos, 8 estavam subexpressos nos eosinofílicos. Entretanto, os metabólitos identificados nos dois tipos amostrais foram diferentes, sendo que apenas 1 foi semelhante. É interessante observar que esse metabólito teve um perfil diferente em cada tipo amostral, de forma que no escarro estava subexpresso no grupo misto, e no soro estava subexpresso no grupo eosinofílico. Esse achado sugere que nem sempre uma molécula está expressa igualmente em dois microambientes diferentes, mesmo que sob mesma condição. Em um estudo comparativo de plasma e lavado broncoalveolar de camundongos com asma induzida, foi verificado que um determinado metabólito alterado em um momento no lavado não estava alterado no plasma (QUINN et al., 2017).

Uma grande dificuldade da metabolômica é a análise dos dados, que requiere modelos estatísticos diferentes dos convencionais. Dessa forma, a escolha dos métodos para analisar os dados é um passo fundamental. Na análise de quimiometria, que consiste em aplicar métodos estatísticos e matemáticos em dados de origem química, o PLS-DA é uma técnica que se destaca na discriminação dos grupos amostrais (GROMSKI et al., 2015). No presente estudo, o método de PLS-DA foi aplicado utilizando os metabólitos selecionados por análise de significância. O modelo foi capaz de separar os 4 grupos fenotípicos em amostras de escarro, com uma boa acurácia (88,28 %). Os grupos eosinofílico e paucigranulocítico foram os grupos preditos com maior acurácia.

Pesquisadores utilizaram ressonância magnética nuclear para analisar o metaboloma do condensado do exalado pulmonar de pacientes eosinofílicos e neutrofílicos. De forma oposta ao presente estudo, o estudo falhou em discriminar pacientes eosinofílicos de não eosinofílicos, utilizando outro modelo de quimiometria, a análise de componentes principais (PCA). Entretanto, pôde separar os neutrofílicos de não neutrofílicos com acurácia de 79% (IBRAHIM et al., 2013). Assim, observa-se que nosso estudo apresentou melhor resultado de discriminação dos grupos fenotípicos no escarro, apesar do método não ter obtido sucesso na separação dos grupos no soro dos pacientes.

Os dados de metabolômica também foram aplicados a métodos de árvore de decisão, como o J48 e o RF. O algoritmo RF é um modelo robusto para analisar dados discrepantes, pois ele produz uma estimativa imparcial da distribuição de erro generalizada. (GROMSKI et al., 2015). Outro ponto positivo é que esse modelo funciona bem se alguns dados estiverem ausentes, o que auxilia na análise já que normalmente não se sabe a origem da ausência devido à quantidade de dados (KOKLA et al., 2019). De fato, a aplicação do RF nos dados de metabolômica resultantes desse trabalho resultou em melhor acurácia para discriminação dos grupos analisados em relação ao J48. O RF foi capaz de separar os grupos com acurácia excelente de 98,62 % no escarro e 97,98% no soro, com erro absoluto extremamente baixo.

Dentre os algoritmos de classificação aplicados no estudo, o RF foi o mais efetivo para separar os grupos fenotípicos inflamatórios de asma. Entretanto, é interessante salientar que apesar dos algoritmos apresentarem resultados de acurácia diferentes, todos foram mais eficientes em diferenciar os pacientes eosinofílicos dos demais grupos.

## 6. CONCLUSÃO

Em virtude do que foi exposto, esse estudo mostrou que, por meio da análise proteômica e metabolômica de escarro induzido e soro, em conjunto com uma análise quimiométrica, foi possível identificar proteínas e metabólitos capazes de discriminar significativamente os 4 grupos fenotípicos inflamatórios de asma. Entre essas proteínas, algumas ainda não foram relatadas associadas à asma.

Ainda, esse estudo possibilitou identificar que o perfil proteômico dos fenótipos inflamatórios da asma se complementa com as modificações identificadas no perfil metabolômico desses pacientes. Em ambas análises foi verificado que, independentemente das moléculas encontradas, o grupo eosinofílico se diferencia dos grupos neutrofilico e misto, os quais possuem alterações similares principalmente quanto ao perfil de proteínas, sugerindo uma forte semelhança entre esses dois grupos. Tanto no escarro induzido quanto no soro de pacientes neutrofilicos e mistos, foi possível observar um aumento significativo na abundância de proteínas associadas a vias de degranulação de neutrófilos.

Por fim, as proteínas e metabólitos identificados devem ser melhor estudados para identificar a relação entre eles, elucidando o papel dessas moléculas na patogênese dos diferentes fenótipos inflamatórios da asma. Além disso, essas moléculas devem ser validadas para posteriormente serem usadas na fenotipagem dos pacientes asmáticos, contribuindo para o tratamento correto dessa doença.

## 7. PERSPECTIVAS

Devido à complexidade da técnica de proteômica por espectrometria de massas *shotgun*, um número reduzido de amostras bem caracterizadas foi utilizado. Dessa forma, nossos achados devem ser validados em uma população maior, utilizando uma metodologia mais simples, como Western Blot. Além disso, os achados no escarro devem ser verificados na saliva na tentativa de identificar as mesmas proteínas, que poderiam ser utilizadas para a fenotipagem inflamatória da asma de forma menos invasiva e simplificada. Como análise adicional, as proteínas identificadas tanto no soro quanto no escarro induzido serão comparadas em cada indivíduo separadamente, a fim de compreender a variação da resposta inflamatória desses dois ambientes mediante a mesma condição.

Além disso, a identificação dos metabólitos deve ser aprimorada, com o intuito de se identificar todos os compostos que apresentaram diferença significativa. Essas informações são extremamente importantes para complementar os dados de proteômica, auxiliando no melhor entendimento dos fenótipos inflamatórios da asma. Da mesma forma, os metabólitos serão validados em uma população maior. Por fim, o sistema de classificação por RF será aprimorado, para que a plataforma online seja didática, e por fim, uma população externa deve ser utilizada para validação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. March, p. 198–207, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01511>

ALAM, R. et al. Airway and serum biochemical correlates of refractory neutrophilic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 4, p. 1004-1014.e13, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.963>

ARRON, J. R.; IZUHARA, K. Asthma biomarkers: What constitutes a “gold standard”? **Thorax**, v. 70, n. 2, p. 105–107, 2015. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206069>

AZAD, N. S. et al. Proteomics in clinical trials and practice: Present uses and future promise. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 1819-1829, 2006. <https://doi.org/10.1074/mcp.R600008-MCP200>

BAE, H.-B. et al. Vitronectin Inhibits Neutrophil Apoptosis through Activation of Integrin-Associated Signaling Pathways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 790–796, 2012. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0187OC>

BAHADORI, K. et al. Economic burden of asthma: a systematic review. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 9, n. 1, p. 24, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-9-24>

BARNIG, C.; LEVY, B. D. Lipoxin A4: A new direction in asthma therapy? **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 9, n. 6, p. 491-493, 2013. <https://doi.org/10.1586/eci.13.36>

BEASLEY, R.; SEMPRINI, A.; MITCHELL, E. A. Risk factors for asthma: Is prevention possible? **The Lancet**, v. 386, n. 9998, p. 1075-85, 2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00156-7)

BENSIMON, A.; HECK, A. J. R.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry–Based Proteomics and Network Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 379–405, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-100424>

BOUSQUET, J. AND; KHALTAEV, N. **Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach**. Geneva: World Health Organization, 2007. Disponível em: <[https://www.who.int/gard/publications/GARD\\_Manual/en/](https://www.who.int/gard/publications/GARD_Manual/en/)>. Acesso em: 4 mar. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de informações hospitalares do SIH/SUS**. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet/epidemiologicas-e-morbidade>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

BREIMAN, L. Random Forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>

BROOKS, C.; PEARCE, N.; DOUWES, J. The hygiene hypothesis in allergy and asthma: An update. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 13, n. 1, p. 70-77, 2013. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32835ad0d2>

BURKE, W. et al. Family history as a predictor of asthma risk. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 24, n. 2, p. 160-169, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0749-3797\(02\)00589-5](https://doi.org/10.1016/S0749-3797(02)00589-5)

CABY, M.-P. et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International Immunology**, v. 17, n. 7, p. 879–887, 2005. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>

CAO, C. et al. Proteomic analysis of sputum reveals novel biomarkers for various presentations of asthma. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1264-y>

CATALDO, D. et al. MMP-2- and MMP-9-Linked Gelatinolytic Activity in the Sputum from Patients with Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, n. 3, p. 259–267, 2000. <https://doi.org/10.1159/000024452>

COMHAIR, S. A. A. et al. Metabolomic Endotype of Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 2, p. 643–650, 2015. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500736>

CORREN, J. et al. Tezepelumab in adults with uncontrolled asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 10, p. 936–946, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704064>

COUMO, H. et al. Diagnosing persistent blood eosinophilia in asthma with single blood eosinophil or exhaled nitric oxide level. **Respiratory Medicine**, v. 141, p. 81–86, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.06.025>

DE FARIAS, C. F. et al. Nasal lavage, blood or sputum: Which is best for phenotyping asthma? **Respirology**, v. 22, n. 4, p. 671-677, 2017. <https://doi.org/10.1111/resp.12958>

DEVILLIER, P. et al. Metabolomics in the Diagnosis and Pharmacotherapy of Lung Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 14, 23 fev. 2017. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170130155627>

EVANS, C. M. et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. **Nature Communications**, v. 6, n. 6281, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms7281>

FÁBIÁN, T. K. et al. Salivary defense proteins: Their network and role in innate and acquired oral immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 4295–4320, 2012. <https://doi.org/10.3390/ijms13044295>

FU, Y. R. et al. Proteomic analysis of sputum in patients with active pulmonary

tuberculosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 12, p. 1241–1247, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03824.x>

FUJII, K.; NAKAMURA, H.; NISHIMURA, T. Recent mass spectrometry-based proteomics for biomarker discovery in lung cancer, COPD, and asthma. **Expert review of proteomics**, v. 14, n. 4, p. 373–386, 2017. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1304215>

GAO, H.; YING, S.; DAI, Y. Pathological Roles of Neutrophil-Mediated Inflammation in Asthma and Its Potential for Therapy as a Target. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, n. 3743048, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3743048>

GHARIB, S. A. et al. Induced sputum proteome in healthy subjects and asthmatic patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.053>

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. **GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2019 Global Initiative for Asthma**. Disponível em: <<https://ginasthma.org/gina-reports/>>. Acesso em: 18 ago. 2019.

GONEM, S. et al. Fevipiprant, a prostaglandin D2 receptor 2 antagonist, in patients with persistent eosinophilic asthma: a single-centre, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 9, p. 699–707, 2016. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30179-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30179-5)

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39–63, 2002. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002>

GRAY, R. D. et al. Sputum proteomics in inflammatory and suppurative respiratory diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 178, n. 5, p. 444–452, 2008. <https://doi.org/10.1164/rccm.200703-409OC>

GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10-23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>

GUKOVSKAYA, A. S. et al. Autophagy, Inflammation, and Immune Dysfunction in the Pathogenesis of Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 153, n. 5, p. 1212-1226, 2017. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.071>

GUO, Y.; FU, Z.; VAN EYK, J. E. A proteomic primer for the clinician. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 4, n. 1, p. 9–17, 2007. <https://doi.org/10.1513/pats.200608-156JG>

HALLSTRAND, T. S. et al. Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 3, p. 586–593, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.04.035>

HANANIA, N. A. et al. Efficacy and safety of lebrikizumab in patients with

uncontrolled asthma (LAVOLTA I and LAVOLTA II): replicate, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 10, p. 781–796, 2016. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30265-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30265-X)

HASELKORN, T. et al. Asthma control and activity limitations: insights from the Real-world Evaluation of Asthma Control and Treatment (REACT) Study. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 104, n. 6, p. 471–477, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.04.006>

HENRY, E. K. et al. Carbonic anhydrase enzymes regulate mast cell-mediated inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 9, p. 1663–1673, 2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20151739>

HIEMSTRA, P. S. et al. Antimicrobial peptides and innate lung defenses: Role in infectious and noninfectious lung diseases and therapeutic applications. **Chest**, v. 149, n. 2, p. 545–551, 2016. <https://doi.org/10.1378/chest.15-1353>

HOCKING, D. C. Fibronectin matrix deposition and cell contractility: Implications for airway remodeling in asthma. **Chest**, v. 22, n. 6, p. 275S–278S, 2002. [https://doi.org/10.1378/chest.122.6\\_suppl.275S](https://doi.org/10.1378/chest.122.6_suppl.275S)

HOLGATE, S. T. et al. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, n. 2, p. 93–98, 2004. <https://doi.org/10.1513/pats.2306034>

HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, p. 15025, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.25>

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?=&t=downloads>> Acesso em: 14 mar. 2019.

IBRAHIM, B. et al. Breath metabolomic profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy in asthma. **Allergy**, v. 68, n. 8, p. 1050–1056, 2013. <https://doi.org/10.1111/all.12211>

IZUHARA, K.; OHTA, S.; ONO, J. Using periostin as a biomarker in the treatment of asthma. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, v. 8, n. 6, p. 491–498, 2016. <https://doi.org/10.4168/aair.2016.8.6.491>

JANSSON, S. A. et al. Subjects with well-controlled asthma have similar health-related quality of life as subjects without asthma. **Respiratory Medicine**, v. 120, p. 64–69, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2016.09.019>

JOHANSSON, M. W.; MOSHER, D. F. Integrin activation states and eosinophil recruitment in asthma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 33, 2013. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00033>

JUNG, J. et al. Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated

with asthma pathogenesis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 43, n. 4, p. 425–433, 2013. <https://doi.org/10.1111/cea.12089>

KARIYAWASAM, H. H.; ROBINSON, D. S. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 681–686, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.021>

KARJALAINEN, E. M. et al. Evidence of airway inflammation and remodeling in ski athletes with and without bronchial hyperresponsiveness to methacholine. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 6, p. 2086–2091, 2000. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.6.9907025>

KATONO, K. et al. Prognostic Significance of MYH9 Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121460, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121460>

KELLY, R. S. et al. Asthma Metabolomics and the Potential for Integrative Omics in Research and the Clinic. **Chest**, v. 151, n. 2, p. 262–277, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.008>

KHAN, G. J. et al. TGF- $\beta$ 1 Causes EMT by Regulating N-Acetyl Glucosaminyl Transferases via Downregulation of Non Muscle Myosin II-A through JNK/P38/PI3K Pathway in Lung Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 2, 2017. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170807120304>

KIM, H. et al. Asthma biomarkers in the age of biologics. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 13, n.1, p. 48, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13223-017-0219-4>

KOKLA, M. et al. Random forest-based imputation outperforms other methods for imputing LC-MS metabolomics data: a comparative study. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 492, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3110-0>

KOSTIKAS, K.; BRINDICCI, C.; PATALANO, F. Blood Eosinophils as Biomarkers to Drive Treatment Choices in Asthma and COPD. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 16, p. 1882–1896, 2018. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180212120012>

KUDO, M.; ISHIGATSUBO, Y.; AOKI, I. Pathology of asthma. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 263, 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00263>

KUILE, B. H.; WESTERHOFF, H. V. Transcriptome meets metabolome: Hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. **FEBS Letters**, v. 500, n. 3, p. 169–171, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02613-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02613-8)

LANDI, C. et al. Towards a functional proteomics approach to the comprehension of idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, systemic sclerosis and pulmonary Langerhans cell histiocytosis. **Journal of Proteomics**, v. 83, p. 60–75, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.006>

LEE, T.-H. et al. Elevation of S100 calcium binding protein A9 in sputum of

neutrophilic inflammation in severe uncontrolled asthma. **Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 111, n. 4, p. 268- 275.e1, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.06.028>

LIU, T. et al. Type 2 innate lymphoid cells: A novel biomarker of eosinophilic airway inflammation in patients with mild to moderate asthma. **Respiratory medicine**, v. 109, n. 11, p. 1391–6, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.09.016>

MARCHENKO, G. N.; MARCHENKO, N. D.; STRONGIN, A. Y. The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 2, p. 503–515, 2003. <https://doi.org/10.1042/bj20030174>

MASCARELL, L. et al. The regulatory dendritic cell marker C1q is a potent inhibitor of allergic inflammation. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 3, p. 695–704, 2017. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.87>

MASOLI, M. et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 469–478, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x>

MCCRACKEN, J. L. et al. Diagnosis and management of asthma in adults a review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 318, n. 3, p. 279-290, 2017. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.8372>

MCGEACHIE, M. J. et al. The metabolomics of asthma control: a promising link between genetics and disease. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 3, n. 3, p. 224–238, 2015. <https://doi.org/10.1002/iid3.61>

MCGRATH, K. W. et al. A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 6, p. 612–619, 2012. <https://doi.org/10.1164/rccm.201109-1640OC>

MIRANDA, C. et al. Distinguishing severe asthma phenotypes: Role of age at onset and eosinophilic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 1, p. 101–108, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.10.041>

NAMBIAR, S. et al. Metabolomics in chronic lung diseases. **Respirology**, p. 13530, 2019. <https://doi.org/10.1111/resp.13530>

NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma–Summary Report 2007. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 5, p. S94–S138, nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.09.029>

NEILSON, K. A. et al. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 535-53, 2011. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000553>

NORMAN, K. C. et al. Proteomics: Clinical and research applications in respiratory diseases. **Respirology**, v. 23, n. 11, p. 993-1003, 2018. <https://doi.org/10.1111/resp.13383>

NUNES, C.; PEREIRA, A. M.; MORAIS-ALMEIDA, M. Asthma costs and social impact. **Asthma Research and Practice**, v. 3, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40733-016-0029-3>

O'DWYER, D. N. et al. The peripheral blood proteome signature of idiopathic pulmonary fibrosis is distinct from normal and is associated with novel immunological processes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 46560, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep46560>

O'NEIL, S. E. et al. Network analysis of quantitative proteomics on asthmatic bronchi: Effects of inhaled glucocorticoid treatment. **Respiratory Research**, v. 12, n. 1, p. 124, 2011. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-124>

PAKHALE, S. et al. A comparison of obese and nonobese people with asthma: Exploring an asthma-obesity interaction. **Chest**, v. 137, n. 6, p. 1316–1323, 2010. <https://doi.org/10.1378/chest.09-2491>

PAPI, A. et al. Asthma. **The Lancet**, v. 391, n. 10122, p. 783–800, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33311-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33311-1)

PAVORD, I. D. et al. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. **Pneumologie**, v. 52, n. 6, p. 498–501, 1997. <https://doi.org/10.1136/thx.52.6.498>

PELAIA, G. et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, n. 879783, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/879783>

PIZZICHINI, E. et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: Inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. **European Respiratory Journal**, v. 11, n. 4, p. 828-34, 1998. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.11040828>

POWERS, R.; RIEKEBERG, E. New frontiers in metabolomics: From measurement to insight. **F1000Research**, v. 6, p. 1148, 2017. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11495.1>

PRIKK, K. et al. Airway obstruction correlates with collagenase-2 (MMP-8) expression and activation in bronchial asthma. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 11, p. 1535–1545, 2002. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000035023.53893.B6>

QUINN, K. D. et al. Dysregulation of metabolic pathways in a mouse model of allergic asthma. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 9, p. 1327–1337, 2017. <https://doi.org/10.1111/all.13144>

RADERMECKER, C. et al. Role of neutrophils in allergic asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 54, p. 28-34, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.05.006>

RAO, C. K. et al. Characteristics of perimenstrual asthma and its relation to asthma severity and control: Data from the Severe Asthma Research Program. **Chest**, v. 143, n. 4, p. 984–992, 2013. <https://doi.org/10.1378/chest.12-0973>

RAY, A.; KOLLS, J. K. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. **Trends in Immunology**, v. 38, n.12, p. 942–954, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.003>

REDDEL, H. K. et al. GINA 2019: a fundamental change in asthma management: Treatment of asthma with short-acting bronchodilators alone is no longer recommended for adults and adolescents. **The European respiratory journal**, v. 53, n.6, 2019. <https://doi.org/10.1183/13993003.01046-2019>

REINKE, S. N. et al. Metabolomics analysis identifies different metabolotypes of asthma severity. **Eur Respir J**, v. 49, p. 1601740, 2017. <https://doi.org/10.1183/13993003.01740-2016>

RIED, J. S. et al. Integrative genetic and metabolite profiling analysis suggests altered phosphatidylcholine metabolism in asthma. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 68, n. 5, p. 629–636, 2013. <https://doi.org/10.1111/all.12110>

RONCHETTI, S. et al. How glucocorticoids affect the neutrophil life. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 4090, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19124090>

SALONEN, E. M. et al. Lipoprotein(a) binds to fibronectin and has serine proteinase activity capable of cleaving it. **The EMBO journal**, v. 8, n. 13, p. 4035–40, 1989. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08586.x>

SALZBERG, S. L. C4.5: Programs for Machine Learning by J. Ross Quinlan. Morgan Kaufmann Publishers, Inc., 1993. **Machine Learning**, v. 16, n. 3, p. 235–240, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF00993309>

SCHATZ, M. et al. Overweight/obesity and risk of seasonal asthma exacerbations. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 6, p. 618–622, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2013.07.009>

SCHLEICH, F. N. et al. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: Predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 13, n. 1, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-13-11>

SCOTT, H. A. et al. Dietary restriction and exercise improve airway inflammation and clinical outcomes in overweight and obese asthma: a randomized trial. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, n. 1, p. 36–49, 2013. <https://doi.org/10.1111/cea.12004>

SHI, G. et al. TIPE2 is negatively correlated with tissue factor and thrombospondin-1 expression in patients with bronchial asthma. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 4, p. 3449–3454, 2018. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5870>

SIMPSON, J. L. et al. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. **Respirology**, v. 11, n. 1, p. 54–61, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00784.x>

SLOANE, A. J. et al. Proteomic analysis of sputum from adults and children with cystic fibrosis and from control subjects. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 172, n. 11, p. 1416–26, 2005. <https://doi.org/10.1164/rccm.200409-1215OC>

STERN, D. A. et al. Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study. **The Lancet**, v. 372, n. 9643, p. 1058–1064, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61447-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61447-6)

STINSON, S. E.; AMRANI, Y.; BRIGHTLING, C. E. D prostanoid receptor 2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells) protein expression in asthmatic patients and its effects on bronchial epithelial cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 395- 406.e7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.027>

SUBBARAO, P.; MANDHANE, P. J.; SEARS, M. R. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. **Canadian Medical Association Journal**, v. 181, n. 9, p. E181–E190, 2009. <https://doi.org/10.1503/cmaj.080612>

TERRACCIANO, R. et al. Asthma and COPD proteomics: Current approaches and future directions. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 9, n. 1-2m p. 203-220, 2015. <https://doi.org/10.1002/prca.201400099>

THAYSEN-ANDERSEN, M. et al. Human neutrophils secrete bioactive paucimannosidic proteins from azurophilic granules into pathogen-infected sputum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 14, p. 8789–8802, 2015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.631622>

THE GLOBAL ASTHMA REPORT 2018. Auckland, New Zealand: **Global Asthma Network**, 2018. Disponível em: < <http://www.globalasthmareport.org/>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

TIOTIU, A. Biomarkers in asthma: state of the art. **Asthma Research and Practice**, v. 4, n. 2018. <https://doi.org/10.1186/s40733-018-0047-4>

TITZ, B. et al. Alterations in the sputum proteome and transcriptome in smokers and early-stage COPD subjects. **Journal of proteomics**, v. 128, p. 306–20, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.009>

TU, C. et al. Large-scale, ion-current-based proteomics investigation of bronchoalveolar lavage fluid in chronic obstructive pulmonary disease patients. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 2, p. 627–639, 2014. <https://doi.org/10.1021/pr4007602>

TUTLUOGLU, B. et al. Platelet Function and Fibrinolytic Activity in Patients with Bronchial Asthma. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 11, n. 1, p. 77–81, 2005. <https://doi.org/10.1177/107602960501100109>

UDBY, L. et al. Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, n. 3, p. 462–469, 2002a.

UDBY, L. et al. An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. **Journal of Immunological Methods**, v. 263, n. 1–2, p. 43–55, 2002b. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00033-9)

VAN TILBURG BERNARDES, E.; ARRIETA, M.-C. Hygiene Hypothesis in Asthma Development: Is Hygiene to Blame? **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 8, p. 717–726, nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.009>

VICENTE-MANZANARES, M. et al. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 11, 778-90, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrm2786>

VILLASEÑOR, A. et al. Allergic asthma: an overview of metabolomic strategies leading to the identification of biomarkers in the field. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 47, n. 4, p. 442–456, 2017. <https://doi.org/10.1111/cea.12902>

VITZTHUM, F. et al. Proteomics: From Basic Research to Diagnostic Application. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 4, p. 1086–1097, 2005. <https://doi.org/10.1021/pr050080b>

WAGENER, A. H. et al. External validation of blood eosinophils, FE NO and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. **Thorax**, v. 70, p. 115–120, 2015. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205634>

WANG, S. et al. S100A8/A9 in inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 1298, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01298>

WARK, P. A. B. et al. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. **European Respiratory Journal**, v. 19, n. 1, p. 68–75, 2002. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00226302>

WENZEL, S. E. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716–725, 2012. <https://doi.org/10.1038/nm.2678>

WOODRUFF, P. G. et al. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. 753–758, 2001. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.119411>

WOODRUFF, P. G. et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major

subphenotypes of asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 180, n. 5, p. 388–95, 2009. <https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0392OC>

WU, H.-Y. et al. Qualification and Verification of Serological Biomarker Candidates for Lung Adenocarcinoma by Targeted Mass Spectrometry. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 8, p. 3039–50, 2015. <https://doi.org/10.1021/pr501195t>

WU, J. et al. Differential proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in asthmatics following segmental antigen challenge. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 4, n. 9, p. 1251–64, 2005. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500041-MCP200>

WU, T. et al. Identification of BPIFA1/SPLUNC1 as an epithelium-derived smooth muscle relaxing factor. **Nature Communications**, v. 8, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms14118>

XIAO, W. et al. Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. **Chest**, v. 128, n. 4, p. 2316–2326, 2005. <https://doi.org/10.1378/chest.128.4.2316>

XU, Y. D. et al. S100A8 protein attenuates airway hyperresponsiveness by suppressing the contraction of airway smooth muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 484, n. 1, p. 184–188, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.033>

ZHAO, C. et al. Lipophilins: Human peptides homologous to rat prostatein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, n. 1, p. 147–155, 1999. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0274>

ZHU, Z.; CAMARGO, C. A.; HASEGAWA, K. Metabolomics in the prevention and management of asthma. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1135–1138, 2019. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1674650>

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

**Tabela 13: Proteínas identificadas no escarro (E) e soro (S) de pacientes com asma, exclusivas de um ou mais grupos fenotípicos.**

E/S	ID	N de acesso (UniProt)	Gene	Proteína	N pep únicos	Classe	N amostras			
							E	N	M	P
E	1	P35579	<i>MYH9</i>	Miosina 9	12		5	5	0	0
E	2	O95969	<i>SCGB1D2</i>	Secretoglobina família 1D membro 2	3		7	4	0	4
S	3	Q8N119	<i>MMP21</i>	Metaloproteinases de matriz 21	1	Metaloprotease	4	0	0	0
S	4	P08519	LPA	Apolipoproteína (a)	23	Serina protease	6	0	5	6

E = eosinofílico. N = neutrofílico. M = misto. P = paucigranulocítico. Na tabela está evidenciado o número de acesso no banco de dados UniProt, o nome do gene, o nome da proteína, a quantidade de peptídeos únicos identificados no sequenciamento, a classe identificada pelo Panther e número de amostras que expressam a proteína em cada grupo.

**Tabela 14A: Proteínas significativamente alteradas no escarro de pacientes com asma.**

ID	N de acesso (UniProt)	Gene	Proteína	N pep únicos	Classe	N amostras			
						E	N	M	P
1	P25815	S100P	Proteína S100-P	2	Calmodulina; molécula de sinalização	8	8	8	6
2	P05109	<i>S100A8</i>	Proteína S100-A8	9	Calmodulina; molécula de sinalização	8	8	8	8
3	P49913	<i>CAMP</i>	Peptídeo antimicrobiano do tipo catelicidina	1		4	8	7	4
4	O75594	<i>PGLYRP1</i>	Proteína de reconhecimento de peptidoglicano 1	2		5	8	7	4
5	P12273	<i>PIP</i>	Proteína indutível pela prolactina	10		8	8	8	8
6	P04745	<i>AMYA1</i>	Alfa-amilase	6		8	8	8	8
7	P01036	<i>CST4</i>	Cistatina-S	5		8	8	8	8
8	P06870	<i>KLK1</i>	Calicreína 1	3	Serina protease	8	8	8	8

9	P62328	<i>TMSB4X</i>	Timosina beta-4	3		8	8	8	6
10	P54108	<i>CRISP3</i>	Proteína secretória rica em cisteína 3	4	Defesa / proteína da imunidade	8	8	8	8
11	P08263	<i>GSTA1</i>	Glutathione S-transferase A1	4		8	4	7	6
12	P32926	<i>DSG3</i>	Desmogleína 3	1	Caderina; proteína de junção celular	4	6	8	4
13	Q16378	<i>PRRL4</i>	Proteína rica em prolina 4	16		8	8	8	8
14	P22079	<i>LPO</i>	Lactoperoxidase	16	Peroxidase	8	8	8	8
15	Q9NP55	<i>BPIFA1</i>	Familia A membro 1 contendo repetição BPI	5		7	8	8	7
16	Q96DA0	<i>ZG16B</i>	Homólogo B de proteína de grânulos de zimogênio 16	8		8	8	8	7
17	P23280	<i>CA6</i>	Anidrase carbônica 6	6		8	8	8	8
18	P14174	<i>MIF</i>	Fator de inibição da migração de macrófagos	1		6	6	4	4
19	P98088	<i>MUC5AC</i>	Mucina 5AC	10	Inibidor de protease	8	7	7	7
20	P02814	<i>SMR3B</i>	Proteína da glandula submaxilar regulada por andrógeno 3B	26		8	8	8	8
21	P16401	<i>H1-5</i>	Histona H1.5	1	Histona	7	6	4	4
22	Q9GZZ8	<i>LACRT</i>	Glicoproteína lacritina extracelular	3		8	5	6	4
23	P80723	<i>BASP1</i>	Proteína solúvel em ácido cerebral 1	4		8	8	7	4
24	P16403	<i>H1-2</i>	Histona H1.2	1	Histona	8	8	6	5
25	A0A0C4DH42	<i>IGHV3-66</i>	Imunoglobulina de cadeia pesada 3-66	1		7	8	8	7
26	P04083	<i>ANXA1</i>	Anexina A1	5		7	8	8	7
27	P08246	<i>ELANE</i>	Elastase de neutrófilos	3		7	8	8	8
28	P04280	<i>PRB1</i>	Proteína salivar básica rica em prolina 1	6		6	8	6	4
29	P02652	<i>APOA2</i>	Apolipoproteína A-II	1	Apolipoproteína; transportador	5	8	6	4
30	P08311	<i>CTSG</i>	Catepsina G	2	Serina protease	7	8	8	4
31	Q9NZT1	<i>CALML5</i>	Proteína semelhante a calmodulina 5	2	Calmodulina	7	8	8	4
32	P59666	<i>DEFA3</i>	Defensina de neutrófilo 3	3		8	8	8	8
33	P05164	<i>MPO</i>	Mieloperoxidase	11	Peroxidase	8	8	8	8
34	P00338	<i>LDHA</i>	Lactato desidrogenase cadeia A	1	Desidrogenase	7	8	8	5
35	P24158	<i>PRTN3</i>	Mieloblastina	3	Serina protease	8	8	8	8
36	P68871	<i>HBB</i>	Hemoglobina subunidade beta	1		7	8	7	5

37	P07355	<i>ANXA2</i>	Anexina A2	2		6	8	7	5
38	Q9HD89	<i>RETN</i>	Resistina	2		6	8	7	5
39	P31151	<i>S100A7</i>	Proteína S100-A7	4	Calmodulina; molécula de sinalização	8	8	8	6
40	P16070	<i>CD44</i>	Antígeno CD44	1		5	7	6	4
41	P52566	<i>ARHGDIB</i>	Inibidor da dissociação de Rho GPD	2	Molécula de sinalização; modulador de proteína G	7	8	8	6
42	Q9UBC9	<i>SPRR3</i>	Proteína pequena rica em prolina	7		7	8	8	7
43	P14780	<i>MMP9</i>	Metaloproteinases de matriz 9	6	Metaloprotease	7	8	8	8
44	Q9UGM3	<i>DMBT1</i>	Proteína deletada em tumores cerebrais malignos 1	25	Oxidase; receptor; serina protease	8	8	8	8
45	P08571	<i>CD14</i>	Antígeno de diferenciação de monócitos CD14	2		7	7	8	5
46	P04406	<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	7	Desidrogenase	8	8	8	8
47	Q9H299	<i>SH3BGRL3</i>	Proteína semelhante a domínio de ligação SH3 rico em ácido glutâmico 3	2		6	7	8	5
48	P02812	<i>PRB2</i>	Proteína salivar básica rica em prolina 2	3		5	8	8	8
49	P06744	<i>GPI</i>	Isomerase de glicose-6-fosfato	4	Isomerase	7	8	8	5
50	A0A0J9YX35	<i>HV64D</i>	Imunoglobulina de cadeia pesada 3-64D	2		7	8	8	5
51	Q01518	<i>CAP1</i>	Proteína 1 associada a adenilil ciclase	3	Proteína do citoesqueleto da família actina	6	7	8	6
52	P01040	<i>CSTA</i>	Cistatina A	3	Inibidor de protease de cisteína	7	8	8	5

E = eosinofílico. N = neutrofilico. M = misto. P = paucigranulocítico. Na tabela está evidenciado o número de acesso no banco de dados UniProt, o nome do gene, o nome da proteína, a quantidade de peptídeos únicos identificados no sequenciamento, a classe identificada pelo Panther e número de amostras que expressam a proteína em cada grupo.

**Tabela 15: Proteínas significativamente alteradas no soro de pacientes com asma.**

ID	N de acesso (UniProt)	Gene	Proteína	N pep únicos	Classe	N amostras			
						E	N	M	P
1	O75636	<i>FCN3</i>	Ficolina-3	1	Molécula de sinalização	8	4	6	7
2	P00915	<i>CA1</i>	Anidrase carbônica 1	3		8	7	8	6

3	P02745	<i>C1QA</i>	Subcomponente do complemento C1Q subunidade A	1		8	8	8	8
4	P02776	<i>PF4</i>	Fator de plaquetas 4	3	Quimiocina	8	8	8	7
5	P04004	<i>VTN</i>	Vitronectina	14		8	8	8	8
6	P04278	<i>SHBG</i>	Globulina ligadora de hormônios sexuais	3		8	8	8	7
7	P07996	<i>THBS1</i>	Trombospondina 1	2		8	6	5	7
8	P13473	<i>LAMP2</i>	Glicoproteína de membrana associada a lisossomo 2	1	Proteína reguladora do tráfego de membrana	7	6	5	8
9	P43251	<i>BTD</i>	Biotinidase	3	hidrolase	8	8	8	8
10	P54108	<i>CRISP3</i>	Proteína secretória rica em cisteína 3	1	Defesa/ proteína da imunidade	5	6	7	8
11	Q15582	<i>TGFBI</i>	Proteína ig-h3 indutora de fator de crescimento transformador- $\beta$	1	Molécula de adesão celular e sinalização	5	8	5	8
12	Q92954	<i>PRG4</i>	Proteoglicano 4	2		6	7	6	8

E = eosinofílico. N = neutrofilico. M = misto. P = paucigranulocítico. Na tabela está evidenciado o número de acesso no banco de dados UniProt, o nome do gene, o nome da proteína, a quantidade de peptídeos únicos identificados no sequenciamento, a classe identificada pelo Panther e número de amostras que expressam a proteína em cada grupo.

## APÊNDICE B

**Tabela 16B: Vias enriquecidas identificadas pelo Reactome associadas a proteínas diferencialmente expressas no escarro de grupos fenotípicos da asma.**

Via (Reactome)	N de proteínas	Proteínas
Sistema imune	24	ANXA1, ANXA2, CALML5, CAMP, CD44, CRISP3, CTSG, DEFA3, ELANE, HBB, MIF, MMP9, MPO, PGLYRP1, PRTN3, RETN, S100A7, S100A8, S100P, BPIFA1, CAP1, CD14, GPI, MUC5AC
Sistema imune inato	23	ANXA2, CALML5, CAMP, CD44, CRISP3, CTSG, DEFA3, ELANE, HBB, MIF, MMP9, MPO, PGLYRP1, PRTN3, RETN, S100A7, S100A8, S100P, BPIFA1, CAP1, CD14, GPI, MUC5AC
Degranulação de neutrófilos	20	ANXA2, CALML5, CAMP, CD44, CRISP3, CTSG, ELANE, HBB, MIF, MMP9, MPO, PGLYRP1, PRTN3, RETN, S100A7, S100A8, S100P, CAP1, CD14, GPI
Degranulação de plaquetas	2	TMSB4X, CAP1
Homeostasia	7	ANXA2, CD44, HBB, MIF, PRTN3, TMSB4X, CAP1
Peptídeos antimicrobianos	9	CAMP, CTSG, DEFA3, ELANE, PGLYRP1, PRTN3, S100A7, S100A8, BPIFA1
Ativação de metaloproteinases de matriz	3	CTSG, ELANE, MMP9
Sinalização de citocinas no sistema imune	6	ANXA1, ANXA2, CD44, MIF, MMP9, PRTN3
Interação de superfície celular da parede vascular	2	CD44, MIF
Degradação de colágeno	2	ELANE, MMP9
Degradação de matriz extracelular	4	CD44, CTSG, ELANE, MMP9
Sinalização de IL-4 e IL-13	2	ANXA1, MMP9
Sinalização por interleucinas	5	ANXA1, ANXA2, MIF, MMP9, PRTN3
Regulação de TLR por ligantes endógenos	2	S100A8, CD14
Ligação e captação de ligantes pelos receptores sequestradores	1	HBB
Dissolução do coágulo de fibrina	1	ANXA2
Eritrócitos absorvem dióxido de carbono e liberam oxigênio	1	HBB
Eritrócitos absorvem oxigênio e liberam dióxido de carbono	1	HBB
Eventos de sinalização G alfa (i)	2	ANXA1, APOA2
Expressão de genes e proteínas por sinalização JAK-STAT após estimulação com interleucina-12	2	ANXA2, MIF
Sequestro de metais por proteínas antimicrobianas	2	S100A7, S100A8
Ativação, sinalização e agregação plaquetária	2	TMSB4X, CAP1

Regulação do transporte e absorção de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) pelas proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs)	3	APOA2, CTSG, KLK1
Gluconeogênese	2	GAPDH, GPI
Glicólise	2	GAPDH, GPI
Metabolismo de carboidratos	2	GAPDH, GPI
Contração do músculo liso	2	ANXA1, ANXA2
Transporte de pequenas moléculas	3	APOA2, HBB, PIP
Ativação do fator de fragmentação do DNA	2	HIST1H1B, HIST1H1C
Família Dectin-2	1	MUC5AC
C1GALT1C1 defeituoso causa síndrome de poliaglutinação Tn (TNPS)	1	MUC5AC
Formação de heterocromatina focada associada à senescência	2	HIST1H1B, HIST1H1C
Conjugação de glutatona	1	GSTA1
Terminação da biossíntese de O-glicano	1	MUC5AC

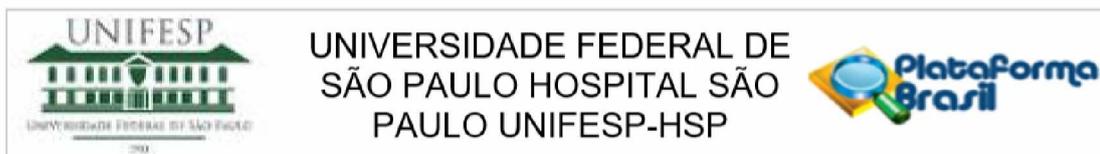
**Tabela 17 Vias enriquecidas identificadas pelo Reactome associadas a proteínas diferencialmente expressas no soro de grupos fenotípicos da asma.**

Via enriquecida (Reactome)	N de proteínas	Proteínas
Via da lectina de ativação do complemento	1	FCN3
Sinalização por receptor tirosina quinase	1	THBS1
Degranulação de neutrófilos	2	CRISP3, LAMP2
Regulação da cascata Complemento	2	C1QA, VTN
Proteoglicanos de matriz extracelular	1	VTN
Metabolismo e transporte de biotina	1	BTD
Eventos de sinalização G alfa	1	PF4
Degranulação de plaquetas	3	THBS1, LAMP2, PF4
Organização de matriz extracelular	1	THBS1
Homeostasia	3	THBS1, LAMP2, PF4
Sistema imune	6	FCN3, C1QA, CA1, CRISP3, LAMP2, VTN
Sistema imune inato	5	FCN3, C1QA, CRISP3, LAMP2, VTN
Interações de superfície celular na parede vascular	1	PF4
Doença	1	THBS1
Organização da matriz extracelular	1	THBS1

Interações de integrinas da superfície celular	2	THBS1, VTN
Transdução de sinal	1	THBS1
Receptores de quimiocina se ligam a quimiocina	1	PF4
Defeitos no metabolismo da biotina	1	BTD
Ativação clássica do complemento mediada por anticorpo	1	C1QA

## ANEXOS

### ANEXO 1



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Protocolo de investigação de asmáticos tratados e sua relação clínico funcional com a biologia molecular do sistema imune

**Pesquisador:** Ana Luisa Godoy Fernandes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47579915.5.0000.5505

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de São Paulo

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.325.850

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta de pendência apontada no parecer 1;242;708 de 24/9/2015

Nº CEP: 0932/2015 - Asma é uma doença caracterizada por uma inflamação localizada nos pulmões diagnosticada pela presença de sintomas clínicos que incluem a reversibilidade da limitação do fluxo de ar, hiperresponsividade das vias aéreas e a presença de células inflamatórias, estas características levam à bronquiocronstricção recorrente nos pacientes que sofrem desta doença. O tratamento tradicionalmente usado é baseado em anti-inflamatórios (corticoides e antagonistas de receptores de leucotrienos) e broncodilatadores (agonistas 2) porém a resposta ao tratamento é insuficiente em muitos casos. Imunobiológicos específicos têm sido usados com resultados variáveis e custos elevados. A asma é uma doença heterogênea, diferentes fenótipos já foram descritos e classificados de várias formas dependendo dos fatores indutores, presença de atopia, gravidade da doença, padrão de obstrução de vias aéreas, padrão inflamatório e sinais clínicos. Cada fenótipo responde ao tratamento de uma forma diferente caracterizando a complexidade da asma com relação às interações entre genes e o ambiente. A fenotipagem da asma é importante para a elaboração de estudos sobre sua

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

fisiopatologia, predição de prognósticos, seleção de pacientes em ensaios clínicos e escolhas de terapias personalizadas. Estudos recentes vêm identificando novos marcadores moleculares, no plasma e escarro, além de demonstrar as diferentes respostas às terapias direcionadas e convencionais.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Caracterização do perfil inflamatório de pacientes asmáticos adultos acompanhados no ambulatório de asma da Disciplina de Pneumologia do Hospital São Paulo, através da fenotipagem com questionários clínicos, de controle, de avaliação de qualidade de vida, medidas espirométricas e testes imunológicos.

Objetivo Secundário:

Avaliar o papel do APT na avaliação do asmático adulto.

Caracterização do perfil inflamatório destes pacientes conforme medidas realizadas no sangue, lavado nasal e escarro induzido.

Descrever fenótipos com base nos dados coletados e associá-los à evolução quanto ao declínio acelerado de função pulmonar, frequência de exacerbações, instabilidade da asma e ocorrência de efeitos adversos relacionados ao tratamento de manutenção da asma

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

conforme descrito no parecer CEP. 1.242.708 de 24/9/2015

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

conforme descrito no parecer CEP. 1.242.708 de 24/9/2015

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

conforme descrito no parecer CEP. 1.242.708 de 24/9/2015

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências apontadas no parecer inicial:

- 1) Adequar o TCLE: a)- descrever os riscos dos procedimentos; b)-é necessário informar que o termo está sendo disponibilizado em 2 vias originais (e não 2 cópias), uma para ficar com o participante e outra para ficar com o pesquisador.; c)- todas as folhas devem ser numeradas (ex: 1/4, 2/4, etc.) e rubricadas pelo pesquisador e pelo participante da pesquisa no momento da aplicação do TCLE.
- 2) Toda pesquisa a ser realizada no Hospital Universitário - Hospital São Paulo (HU/HSP), ou em

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.325.850

qualquer um de seus ambulatórios,deverá vir acompanhada de carta de autorização da Coordenadoria de Ensino e Pesquisa do HU/HSP (que pode ser conseguida na Diretoria Clínica do HSP, no 1º andar do Hospital São Paulo).

3) - Em relação ao orçamento: foi informado que o custo do projeto será de R\$ 180.000,00. Como este custo é relativamente alto, favor informar quem irá arcar com este custo. Se for solicitado auxilio FAPESP, apresentar carta de aprovação (a qual pode ser apresentada posteriormente, na forma de "notificação")

resposta: todas as alterações foram realizadas de forma adequada. Foi apresentada a carta da CoEP.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

parecer liberado ad referendum - trata-se de respostas de pendencias ao parecer inicial.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

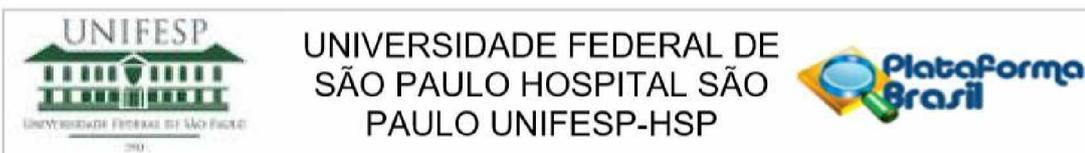
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_557252.pdf	12/11/2015 11:58:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEv2_061115.pdf	12/11/2015 11:58:00	Ana Luisa Godoy Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEv2_com_alteracoes_marcadas_061115.pdf	12/11/2015 11:57:46	Ana Luisa Godoy Fernandes	Aceito
Outros	Resposta_pendencia_CEP_121115.pdf	12/11/2015 11:55:07	Ana Luisa Godoy Fernandes	Aceito
Outros	cartadeautorizacao.pdf	22/10/2015 09:07:17	Ana Luisa Godoy Fernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Newrepita 200715.pdf	22/07/2015 10:21:05		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto - Plataforma Brasil.pdf	22/07/2015 10:17:12		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.325.850

Não

SAO PAULO, 17 de Novembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Miguel Roberto Jorge**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO      **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP      **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062      **Fax:** (11)5539-7162      **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

# LICENÇA PARA USO DA FIGURA 1

06/01/2020

RightsLink Printable License

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 16, 2019

---

---

This Agreement between Federal University of Uberlândia -- Larissa Maia ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4730781112147
License date	Dec 16, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	The Lancet
Licensed Content Title	Asthma
Licensed Content Author	Alberto Papi,Christopher Brightling,Søren E Pedersen,Helen K Reddel
Licensed Content Date	24 February–2 March 2018
Licensed Content Volume	391
Licensed Content Issue	10122
Licensed Content Pages	18
Start Page	783
End Page	800
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Classificação dos fenótipos da asma por análise proteômica e metabolômica
Institution name	Federal University of Uberlândia
Expected presentation date	Dec 2019
Portions	Figure 2
Requestor Location	Federal University of Uberlândia São Paulo, n 899, apt 101
Publisher Tax ID	Uberlandia, MG 38400656 Brazil Attn: Federal University of Uberlândia
Customer VAT ID	BR991136548
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

## LICENÇA PARA USO DA FIGURA 2

06/01/2020

RightsLink Printable License

### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 06, 2020

---

This Agreement between Federal University of Uberlândia -- Larissa Maia ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4743180080378
License date	Jan 06, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Disease Primers
Licensed Content Title	Asthma
Licensed Content Author	Stephen T. Holgate et al
Licensed Content Date	Sep 10, 2015
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no

Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Classificação dos fenótipos da asma por análise proteômica e metabolômica
Institution name	Federal University of Uberlândia
Expected presentation date	Dec 2019
Portions	Figure 6
Requestor Location	Federal University of Uberlândia São Paulo, n 899, apt 101  Uberlandia, MG 38400656 Brazil Attn: Federal University of Uberlândia
Customer VAT ID	BR991136548
Total	0.00 USD

## Terms and Conditions

**Springer Nature Customer Service Centre GmbH  
Terms and Conditions**

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

**1. Grant of License**

**1. 1.** The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

**1. 2.** The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).