



Cláudia Catarina Ferreira Chaves Loureiro Barbosa e Silva

FENÓTIPOS DE ASMA E NOVOS BIOMARCADORES DA DOENÇA NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, especialidade de Medicina Interna (Pneumologia) conduzida sob orientação do Prof. Doutor Manuel Fontes Baganha, do Prof. Doutor Jean Bousquet e da Prof^a. Doutora Ana Todo-Bom, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Capa: Magnólia, Tondela

***Fenótipos de asma e novos biomarcadores da doença
numa população portuguesa***

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, especialidade de Medicina Interna (Pneumologia), conduzida sob orientação do Prof. Doutor Manuel Fontes Baganha, do Prof. Doutor Jean Bousquet e da Prof^a. Doutora Ana Todo-Bom, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

O trabalho que conduziu à Dissertação desta Tese foi realizado nas seguintes instituições:

- Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra- Hospitais da Universidade de Coimbra



- Centro de Pneumologia Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



CENTRO DE PNEUMOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

- Departamento de Química da Universidade de Aveiro



O trabalho dirigido à metabolómica foi suportado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, sob o projecto PTDC/QUI-QUI/117803/2010 (*Future asthma management helped by non-invasive ampling: contributes for the definition of a rapid and noninvasive diagnostic tool*), PEst-C/QUI/UI0062/2013 atribuído à Unidade de Investigação 62/94 QOPNA.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

“A arte da perseverança...tem a ver com as dificuldades internas, inerentes ao próprio caminho ou à decisão tomada. A arte da perseverança não é um combate de certos dias ou de certas estações: é sim, um combate de todas as horas e de todas as etapas do que percorremos. É um combate interno (consigo, contra si e por si) para manter, no tempo, quer a duração, quer a intensidade do que prometemos: uma tarefa, um desejo, um compromisso, uma palavra, uma amizade ou um amor”.

José Tolentino Mendonça in Elogio da Perseverança, Revista Expresso, 5 de Julho de 2014

Dedicatória

Aos meus pais, cujas pegadas seguiram sempre atrás de mim, e nos momentos críticos seguem
à minha frente;

Ao meu marido, cujas pegadas se paralelam com as minhas, e nos momentos críticos se
confundem nelas;

À minha filha Carmo, e aos que estão por vir, a quem procuro deixar pegadas que um dia
possam seguir.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

NOTA PRÉVIA

ABREVIATURAS

RESUMO/SUMMARY

I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II. INVESTIGAÇÃO REALIZADA FACE AOS OBJECTIVOS

III. DISCUSSÃO GLOBAL DOS RESULTADOS

IV. CONCLUSÕES

V. PUBLICAÇÕES

VI. BIBLIOGRAFIA

VII. INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

VIII. ÍNDICE

AGRADECIMENTOS

Sr. Prof. Doutor Manuel Fontes Baganha

Sr. Prof. Doutor Jean Bousquet

Sra. Prof^a. Doutora Ana Todo-Bom

Sr. Dr. Mário Chaves Loureiro

Sra. Prof^a. Doutora Sílvia Rocha

Sr. Prof. Doutor Pedro Sá-Couto

Sr. Prof. Doutor Artur Paiva

Sra. Dra. Ana Gomes

Sra. Enfermeira Margarida Santos

NOTA PRÉVIA

Desde cedo na minha formação pneumológica se foi adensando o gosto pela compreensão da patologia asmática. Considerando a complexidade dos mecanismos biológicos envolvidos e a diversidade da sua apresentação, a asma surge naturalmente como afecção rainha da área respiratória, para alimentar a curiosidade e a investigação de espíritos mais inquietos.

No meu estágio hospitalar de Alergologia Respiratória, encontrei como orientadora de formação a Sra. Prof^ª. Doutora Ana Todo-Bom que, apercebendo-se da minha apetência pela asma e da minha vontade em conhecer e contactar com outros ambientes profissionais, me sugeriu efectuar um estágio com o Sr. Prof. Doutor Jean Bousquet, Professor de Pneumologia na Universidade de Montpellier e figura incontornável e internacionalmente reconhecida na área da asma. O bom relacionamento entre ambos e as suas ligações ao projecto GA²LEN, nessa data em representação de Portugal e de França, facilitaram a minha saída para o Serviço de Doenças Respiratórias do Hospital Universitário de Montpellier.

Aí tive o privilégio de assistir à actividade clínica do Sr. Prof. Doutor Jean Bousquet e de beneficiar da sua orientação científica. No decorrer desse estágio surgiu a sua proposta para desenvolver um projecto de investigação que, de acordo com a filosofia GA²LEN, “ligasse” os Hospitais e Universidades de Montpellier e Coimbra.

Motivada pelo desafio do Sr. Prof. Doutor Bousquet, apoiada pela Sra. Prof^ª. Doutora Ana Todo-Bom, e confortada pela confiança do Sr. Prof. Doutor Manuel Fontes Baganha, à época Regente da Cátedra de Pneumologia e Director do Departamento de Pneumologia do meu Hospital, considereei estarem reunidas as premissas mínimas para me candidatar a concretizar tal desiderato. Aos três, devo a orientação científica, a disponibilidade pessoal e a estima com que sempre me distinguiram.

Mas outras áreas se entrecruzaram, resultando esta investigação do trabalho de uma equipa multidisciplinar, que integrou também saberes da química e da matemática.

No decorrer deste caminho, pude contactar e enriquecer-me com outras ciências até há pouco para mim colaterais. Foi com a Sra. Prof^ª. Doutora Sílvia Rocha (Professora Auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coordenadora do projecto *Asthma - Gestão futura da asma apoiada por amostragem não invasiva: contributos para a definição de um meio diagnóstico rápido e não invasivo*, PTDC/QUI-QUI/117803/2010) que me aventurei em áreas paralelas da minha investigação. Com o seu apoio e disponibilidade, e o da sua equipa, tornou-se possível o desenvolvimento de parte importante deste trabalho, nomeadamente o estudo da metabolómica dirigida à patologia asmática, realizado na Universidade de Aveiro.

Imprescindível foi também a colaboração do Sr. Prof. Doutor Pedro Sá-Couto, que sempre mostrou prontidão na resposta às dificuldades estatísticas que me foram surgindo.

Com a colaboração do Sr. Prof. Doutor Artur Paiva, concretizou-se o trabalho laboratorial realizado no antigo Centro de Histocompatibilidade de Coimbra.

Foi, com o contributo de todos, que reuni os saberes indispensáveis à realização da minha investigação.

Ao Sr. Dr. Mário Chaves Loureiro, na qualidade de Director de Serviço de Pneumologia, devo o incentivo e a confiança profissional, necessárias à concretização deste e de outros projectos.

Aos colegas do Serviço de Pneumologia, agradeço o companheirismo; aos restantes elementos (enfermeiros, administrativos e técnicos), em especial à Sra. Enf. Margarida Santos, o meu reconhecimento pelas ajudas recebidas.

À Sra. Dra. Ana Gomes, do Serviço de Anatomia Patológica, o meu obrigada pelo facilitismo no armazenamento e conservação das amostras.

Para além daqueles que estiveram directamente envolvidos neste projecto, outros menos visíveis foram igualmente importantes. Aos meus pais devo o aconselhamento amigo, o inculcar do espírito de perseverança e do querer ir mais além, concedendo sempre o apoio necessário e seguro para ultrapassar os momentos menos entusiasmantes; ao meu marido devo a tolerância, os momentos que nos roubei e o paralelismo da sua com a minha vida; à minha filha Carmo, que ainda em mim e nos primeiros meses da sua vida me acompanhou no culminar deste esforço, devo mostrar um dia que todo o trabalho gratifica e é compensador.

Finalmente, o agradecimento sincero a todos os pacientes que voluntária e conscientemente participaram nesta investigação. Se eles vierem a beneficiar de tratamento mais específico e atempado da sua doença, ter-se-á cumprido o objectivo primário deste projecto, que procurou ser translacional.

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
ACQ	<i>Asthma Control Questionnaire</i> (Questionário de controlo da asma)
ACT	<i>Asthma Control Test</i> (Teste de controlo da asma)
ADAM	<i>A desintegrin and metalloprotease domain</i> (Domínio desintegrina e metalloprotease)
ADMA	<i>Asymmetric dimethyl arginine</i> (Arginina dimetil assimétrica)
AG	Asma grave
AINE's	Anti-inflamatórios não esteróides
AirPROM	<i>Airway Disease Predicting Outcomes through Patient Specific Computational Modelling</i> (Predição de <i>outcomes</i> para a doença da via aérea através da modulação computacional específica do doente)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ATS	<i>American Thoracic Society</i> (Sociedade Torácica Americana)
BACA	Beta-adrenérgicos de curta acção
BALA	Beta-adrenérgicos de longa acção
BIOAIR	<i>Longitudinal Assesment of Clinical Course and Biomarkers in Severe and Chronic Airway Disease</i> (Avaliação longitudinal do curso clínico e biomarcadores na doença crónica e grave da via aérea)
BQ	Bronquiectasias
C	<i>Cluster</i>
CARAT	<i>Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test</i> (Teste de controlo da asma e rinite alérgica)
CD cells	<i>Clusters of differentiation cells</i> (<i>Clusters</i> de células de diferenciação)
CCR	<i>Chemokine Receptor</i> (Receptores da quimiocina)
CRF	Capacidade Residual Funcional
COX-1	Ciclooxigenase-1
CS	Corticóides
CSI	Corticóides inalados
CSs	Corticóides sistémicos
DCV	Disfunção das cordas vocais
DCs	<i>Dendritic cells</i> (Células dendríticas)
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
DPI	<i>Dry powder inhaler</i> (Inalador pó seco)
EMTU	<i>Epithelial-mesenchymal trofic unit</i> (Unidade trófica epitélio-mesenquimatosa)
ENFUMOSA	<i>European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma</i> (Rede europeia para o entendimento dos mecanismos da asma grave)
ERS	<i>European Respiratory Society</i> (Sociedade Europeia Respiratória)
EC-SOD	<i>Enzyme extra cellular superoxide dismutase</i> (Enzima superóxido dismutase extracelular)
FcεRI	Receptor celular de alta afinidade para a fracção cristalizável de IgE

FeNO	<i>Fraction of exhaled nitric oxide</i> (Fracção exalada de óxido nítrico)
FEV ₁	<i>Forced expiratory volume in the first second</i> (Volume forçado expiratório no 1º segundo)
FEV ₂₅₋₇₅	<i>Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of forced vital capacity</i> (Volume forçado expiratório entre 25-75% da capacidade vital forçada)
FVC	<i>Forced vital capacity</i> (Capacidade vital forçada)
GA	<i>Genetic algorithm</i> (Algoritmo genético)
GA ² LEN	<i>Global Allergy and Asthma European Network</i> (Rede europeia global de alergia e asma)
GCxGC-ToFMS	<i>Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry</i> (Cromatografia gasosa bidimensional associada a espectrometria de massa por tempo de voo)
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i> (Iniciativa global para a asma)
GST	Glutathione-S-transferase
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Factor estimulante de colónia granulócito-macrófago)
HDAC2	Histona deacetilase2
HRB	Hiperreatividade brônquica
HS	Hipersensibilidade
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
IECA's	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IFN-γ	Interferão gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMI	<i>Innovative Medicine Initiative</i> (Iniciativa de medicina inovadora)
LBA	Lavado broncoalveolar
LTs	Leucotrienos
LTC4	Leucotrienos C4
LV1	<i>First latent variable</i> (Primeira variável latente)
LV2	<i>Second latent variable</i> (Segunda variável latente)
MDI	<i>Metered dose inhaler</i> (Inalador de dose calibrada)
MIP-1a	<i>Macrophage inflammatory protein 1a</i> (Proteína inflamatória macrofágica 1a)
MMP	Metaloproteinases
NAEPP	<i>National Asthma Education and Prevention Program</i> (Programa nacional de educação e prevenção da asma (USA))
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Ressonância magnética nuclear)
NK T	<i>Natural killer T</i> (Células natural killer)
ONDR	Observatório Nacional das Doenças Respiratórias
OR	<i>Odds ratio</i> (Rácio dos produtos cruzados)
ORadj	<i>Odds ratio adjusted</i> (Rácio dos produtos cruzados ajustados)
PE	<i>Poor Estimate</i> (Pobre estimativa)
PLS-DA	<i>Partial least squares discriminant analysis</i> (Análise discriminante pelo método dos mínimos quadrados parciais)
PGD2	Prostaglandina D2
PGI2	Prostaciclina
PQN	<i>Probabilistic quotient normalization</i> (Normalização probabilística do quociente)
PF	Propionato de fluticasona

RA	Rinite alérgica
RGE	Refluxo gastro-esofágico
RI	<i>Retention Index</i> (Índice de retenção)
RMSE	<i>Root mean square error</i> (Erro da raiz mínima quadrada)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reactivas de oxigénio)
SD	<i>Standard deviation</i> (desvio-padrão)
SAOS	Síndrome de apneia obstrutiva do sono
SARP	<i>Severe Asthma Research Program</i> (Programa de investigação de asma grave)
SEPAR	<i>Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Torácica</i> (Sociedade Espanhola de Pneumologia e Cirurgia Torácica)
SOA	<i>Severity of Asthma Score</i> (Pontuação de gravidade da asma)
SOD	Superóxido dismutase
SPME	<i>Solid phase microextraction</i> (Microextracção de fase sólida)
T	Teste t
TAC-AR	Tomografia axial computadorizada de alta resolução
TCA	Testes cutâneos de alergia
CAC	Ciclo do ácido cítrico
TENOR	<i>The Epidemiology and Natural History of Asthma Outcomes and Treatment Regimens</i> (Estudo da epidemiologia e história natural da asma e regimes de tratamento)
TGF	<i>Transforming growth factor</i> (Factor de transformação de crescimento)
Th	Células T <i>helper</i> (Células T auxiliaadoras)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Factor de necrose tumoral)
TLR	<i>Toll like receptor</i> (Receptor molecular associado a patogénio)
Treg	Células T reguladoras
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> (Linfopoetina do estroma tímico)
U	Teste <i>Mann-Whitney</i>
U-BIOPRED	<i>Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Diseases outcome</i> (Biomarcadores para predição do <i>outcome</i> das doenças respiratórias)
UCI	Unidade de cuidados intensivos
UV	Unidade de variância
VIP	<i>Variable importance in the projection</i> (Importância da variável na projecção)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Factor de crescimento endotelial vascular)
VRE	Volume de reserva expiratório
WPAI-A	<i>Work Productivity and Activity Impairment-Asthma</i> (Produtividade laboral e limitação de actividade – asma)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

Introdução

A asma é uma doença heterogénea, expressando-se por vários fenótipos, que novos métodos de análise, tipo *cluster*, têm tentado distinguir. Contudo, biomarcadores, nomeadamente identificadores de gravidade, são escassos.

O conhecimento dos seus endótipos através de técnicas avançadas como a metabolómica pode ser útil, como já demonstrámos com a identificação de marcadores de exacerbação pelo estudo do perfil metabolómico urinário de asmáticos. No entanto, a translação de resultados da metabolómica para a clínica necessita validação.

Objectivos

1. Caracterizar clinicamente uma população portuguesa de asmáticos, com enfoque nos doentes graves, com suporte em parâmetros funcionais respiratórios e laboratoriais imunoinflamatórios e suas correlações.
2. Identificar fenótipos celulares da expectoração e correlacioná-los com os parâmetros determinados.
3. Identificar factores preditores para a ocorrência dos diferentes fenótipos clínicos.
4. Distinguir *clusters* de asmáticos.
5. Determinar a relevância da metabolómica na identificação de biomarcadores de gravidade e na distinção de *clusters*.
6. Correlacionar características clínicas de gravidade e *clusters* identificados com biomarcadores urinários de peroxidação lipídica.

Métodos

A amostra foi recrutada nos Serviços de Pneumologia e Alergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, até se obterem cem doentes com asma.

Dos procedimentos realizados destacam-se: a avaliação clínica, o estudo funcional respiratório e as colheitas de sangue, expectoração e urina para estudo analítico.

O tratamento estatístico foi feito com o programa SPSS, versão 20.0[®], usando métodos como a regressão logística. Os *clusters* foram identificados pelo método Ward. A análise metabolómica foi feita pela técnica de microextração de fase sólida seguida de cromatografia gasosa bidimensional, a análise desses dados foi multivariada e as correlações estabelecidas usaram o método de regressão dos mínimos quadrados parciais. Em todos os testes foram considerados significativos valores inferiores a 0.05.

Resultados e Conclusões

Os resultados dos parâmetros avaliados foram amplamente coincidentes com os de outros estudos, tendo-se identificado como mais inovador, no grupo grave, a maior frequência de história de pneumonia e o carácter discriminativo do questionário de gravidade utilizado. Nas

correlações estabelecidas destacaram-se: as negativas da função respiratória com o questionário de gravidade da asma e a do FeNO com os valores basais de FEV₁ (nos graves); as positivas da eosinofilia periférica com a gravidade da doença, o seu início tardio e a pior qualidade de vida.

Nos fenótipos da expectoração, o eosinofílico foi mais prevalente, observando-se correlação negativa entre a percentagem de neutrófilos e o FEV₁ basal.

Nos fenótipos clínicos estudados destacamos:

- *Atópicos*, têm idade de início de doença mais precoce, menor ocorrência de história de pneumonia e melhor qualidade de vida;
- *Asmáticos com início após 12 anos*, são mais obesos, menos atópicos, com pior controlo e qualidade de vida e maior gravidade da doença;
- Nos com *hipersensibilidade a AINE's* é maior a prevalência de polipose nasal e pior a qualidade de vida;
- Os com *excesso de peso*, apresentam menor controlo da doença, pior qualidade de vida e maior gravidade;
- Os *obstrutivos persistentes* têm menor controlo da doença e maior coexistência de outras doenças obstrutivas;
- Os *graves*, maior ocorrência de pneumonia e de outra doença obstrutiva, pior controlo da doença, de qualidade de vida, de função respiratória e maior uso de terapêutica e grau de eosinofilia periférica.

Foram factores favoráveis à ocorrência dos fenótipos:

- *Atópico* – início precoce da doença, melhor controlo da doença, menor grau de terapêutica.
- *Asma após 12 anos* – género masculino, obstrução fixa da via aérea, maior percentagem de eosinófilos no sangue e da pontuação SOA.
- *Hipersensibilidade a AINE's* – polipose nasal e maior gravidade da doença.
- *Obstrução persistente da via aérea* – género masculino, maior intensidade de terapêutica, pior função respiratória, maior gravidade da doença e inflamação neutrofílica da via aérea.
- *Grave* – eosinofilia no sangue periférico.

Foram desfavoráveis para essa ocorrência:

- *Atópico* – história de pneumonia, presença de outra doença obstrutiva, doença grave.
- *Asma com início após 12 anos* – atopia.
- *Obstrução persistente da via aérea* – início da doença antes dos 12 anos.

Nos 5 *clusters* foi evidente a sobreposição de C1, C2 e C5 com outros estudos. C3 correspondeu a asmáticos intermitentes, cuja gravidade dependeu da ocorrência de exacerbações graves; C4, a um grupo com provável alteração de fenótipo inicial (eosinofílico) pela presença de obesidade.

Algumas das características com significado na separação dos *clusters* (idade, excesso de peso, gravidade e eosinofilia periférica) foram relevantes por permitirem a adaptação dos resultados aos endótipos actualmente descritos na literatura.

A análise metabolómica do perfil de peroxidação lipídica mostrou relevância, quer na separação dos doentes por gravidade, quer na distinção dos diferentes *clusters*, tendo sido identificado o grupo de metabolitos responsáveis pelas separações. Em relação à gravidade, a separação foi clara entre grupos, consoante a faixa etária. Em relação aos *clusters*, a distinção foi clara para os grupos C1, C3 e C5, passíveis de serem organizados pela extensão da peroxidação lipídica (C1>C3>C5).

Demonstramos ainda que os níveis de peroxidação lipídica presentes nos perfis metabolómicos urinários destes doentes podem prever a função respiratória (FEV₁), o tipo de inflamação Th2 (FeNO) e o grau de gravidade (SOA).

Assim, endótipos obtidos pela metabolómica urinária mostraram que alguns *clusters* e características da asma podem ser associados com metabolitos específicos da peroxidação lipídica.

Palavras chave: Asma, fenótipos, endótipos, biomarcadores, metabolómica.

SUMMARY

Introduction

Asthma is a heterogeneous disease, expressed by several phenotypes, for which new analysis methods like cluster approaches have been trying to establish a distinction. Nevertheless, biomarkers, namely those of severity, are scarce.

Understanding its endotypes, particularly through advanced techniques such as metabolomics, can be useful, as we have already shown with the identification of asthma exacerbation biomarkers by the urinary metabolomics profile study of asthmatics. However, the translation of metabolomics results into clinical practice still needs validation.

Objectives

1. Clinically characterize a Portuguese asthmatic population, with particular attention to severe patients, supported in lung function, immune-inflammatory parameters and their correlations.
2. Identify the sputum cellular phenotypes and correlate them with evaluated parameters.
3. Identify predictors for the different clinical phenotypes.
4. Cluster the asthmatic population.
5. Evaluate the importance of metabolomics in the identification of severity urinary biomarkers and in cluster distinction.
6. Correlate severity's clinical characteristics and identified clusters with urinary biomarkers of lipidic peroxidation.

Methods

The sample was recruited from outpatient clinic of Pulmonology and Allergology Unit of Hospitais da Universidade de Coimbra, consecutively, until reaching one hundred patients with asthma.

From the procedures, we point out the clinical and lung function evaluation, the immunophenotypic analysis of sputum cells and the urinary metabolomics analysis.

Statistics was performed using SPSS, version 20.0[®] and data were analysed by methods such as logistic regression. Clusters were identified using Ward's clustering method. Metabolomics was carried out using solid phase microextraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, multivariate data analysis was applied and correlations were studied using partial least squares regression.

In all statistical tests, p values were significant when <0.05.

Results and Conclusions:

The evaluated parameters were largely in accordance with other studies results. As most innovative we found: in the severe group, a more frequent pneumonia history and a discriminative value for the Severity of Asthma Score (SOA); the negative correlations of lung function with SOA and, in the severe group, of FeNO with basal FEV₁; the positive correlations of blood eosinophilia with disease severity, late disease onset and worst quality of life.

Regarding cellular sputum phenotypes, the eosinophilic was the most prevalent and there was a negative correlation of neutrophils percentage with FEV₁.

Regarding the studied clinical phenotypes, when compared to the other patients, we stand out:

- *Allergic* patients have earlier disease onset, less frequent history of pneumonia and better life quality;
- Asthmatics with *disease onset after age of 12* are more obese, less allergic, have worse disease control and life quality and higher disease severity;
- Those with *NSAID hypersensitivity* have higher prevalence of nasal polyposis and worse life quality;
- *Overweight* asthmatics have less disease control, worse life quality and higher severity;
- Those with fixed obstruction have less disease control and higher co-existence of other obstructive disease;
- *Severe* patients have more frequent history of pneumonia and other obstructive disease, worse disease control, life quality, lung function, higher use of therapeutics and of blood eosinophilia.

For the existence of each phenotype were favourable predictors:

- *Allergic* - early disease onset, better disease control lower grade of therapeutics.
- *Asthma onset after age of 12* – male gender, fixed airway obstruction, higher eosinophils percentage and SOA score.
- *NSAID hypersensitivity* – nasal poliposis and more severe disease.
- *Fixed airflow obstruction* – male gender, higher grade of therapeutics, worst lung function, more severe disease and neutrophilic airway inflammation.
- *Severe* - higher percentage of blood eosinophilia.

Were against:

- *Allergic* - pneumonia history, presence of other obstructive disease, severe disease.
- *Asthma onset after age of 12* – atopy.
- *Fixed airflow obstruction* - early disease onset.

In all 5 *clusters* the overlap of C1, C2 and C5 was evident with other studies. C3 corresponded to brittle asthma, whose severity was related with severe exacerbations; C4 corresponded to a group whose initial phenotype was potentially modified by the presence of obesity.

Some of the characteristics that showed significance for clusters separation (as age, excess weight, severity and blood eosinophilia) were relevant as they allowed us to confront our results to the known endotypes described in the literature.

The metabolomics analysis of lipidic peroxidation urinary profile of asthmatics has showed relevance either in the evaluation of severity, as in the distinction of different clusters, being identified the metabolites responsible for the separations. Regarding severity, the separation between severity groups was clear, according to age. Regarding clusters, the distinction was clear for groups C1, C3 and C5, which can be organized by lipidic peroxidation extension (C1<C3<C5).

We have also demonstrated that lipidic peroxidation levels expressed on metabolomics urinary profiles of these patients could predict lung function (FEV₁), eosinophilic inflammation (FeNO) and asthma severity (SOA).

Accordingly, endotypes obtained by urinary metabolomics showed that clusters and phenotypical characteristics of asthma severity can be related with specific metabolites of lipidic peroxidation.

Key words: Asthma, phenotypes, endotypes, biomarkers, metabolomics.

I.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS
ASMA EM ADULTOS



I.1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença de prevalência crescente e elevada em todo o Mundo, afectando 200 - 300 milhões de pessoas¹, contribuindo de forma significativa para o impacto socioeconómico, em especial nos 7 a 10% dos asmáticos que se apresentam com doença de difícil controlo².

Dados mais concretos sobre a prevalência da asma grave/de difícil controlo não são fáceis de precisar, considerando a panóplia de definições actualmente existentes, entre as quais se contam as da *Global Initiative for Asthma (GINA)*³, da *American Thoracic Society (ATS)*⁴ e da *World Health Organization (WHO)*⁵.

Apesar da crescente prevalência, o conhecimento do seu padrão inflamatório, aliado à abordagem fenotípica e endotípica dos doentes, permitiu atingir melhor controlo da doença.

Em Portugal, estudos epidemiológicos apontam para evidência clínica de asma em cerca de 10% da população nacional, sendo que 5-8% das crianças apresentam doença grave. A taxa de mortalidade (em 2005 de 1.06/100000 habitantes) aproxima-se da dos países com melhores indicadores de saúde e a taxa de internamentos, que tem vindo a estabilizar nos últimos anos, rondava em 2007 os 28/100 000 habitantes⁶. Este número poderá ser melhorado se combatida a falta de controlo da doença, como confirma a informação recolhida do questionário de controlo da asma - *Asthma Control Test (ACT)* - preenchido por 5551 asmáticos e realizado em Portugal em 2006. Esses dados reportam o não controlo da doença em 61% dos inquiridos.

Vários factores contribuirão para tal, sendo importante a fraca adesão terapêutica, reconhecida globalmente em 50% dos asmáticos⁷. O problema da adesão terapêutica, aliado aos efeitos confundidores das comorbilidades, a ausência de um racional biológico para a definição da asma grave e a heterogénea apresentação clínica, fisiopatológica e molecular dos doentes não facilitam o trabalho do clínico.

Não se devendo abandonar o conceito da asma como doença, fazê-lo de forma dirigida aos vários fenótipos, endótipos e genótipos, pode melhorar a abordagem terapêutica.

Nas últimas décadas têm-se feito enormes progressos na investigação médica, com um cunho clínico translacional, sendo que o estudo da asma não é excepção. Consórcios como o U-BIOPRED (*Unbiased biomarkers for the prediction of respiratory diseases outcome*) organizaram-se para integrar dados recolhidos em vários centros internacionais, fazendo uso de técnicas inovadoras onde se inclui a metabolómica, de forma a melhor definir os fenótipos asmáticos, facilitando o desenvolvimento de novas intervenções diagnósticas e terapêuticas.

I.2 DEFINIÇÃO e EPIDEMIOLOGIA DA ASMA

I.2.1 Definição da asma enquanto doença

As definições de asma têm-se mantido inalteradas desde há alguns anos e a última, editada pela GINA, datada de Maio de 2014³, descreve-a como doença heterogénea caracterizada por inflamação crónica da via aérea, associada a limitação variável do fluxo aéreo e a sintomas respiratórios como sibilância, dispneia, aperto torácico e tosse, que podem ser variáveis no tempo e em intensidade.

No entanto, a asma é um processo heterogéneo nas formas de apresentação clínica, na evolução e na fisiopatologia da doença⁸, que por vezes se confunde com outras entidades como a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). Se os extremos da asma e da DPOC se diferenciam com facilidade, os 30% de asmáticos com obstrução persistente da via aérea⁹, os crónicos com declínio funcional progressivo¹⁰ ou os de padrão celular neutrofílico, tornam necessária uma nova classificação nosológica, tendo-se nos últimos anos assistido a uma tentativa, ainda não conseguida, de reclassificação das doenças da via aérea.

I.2.2 Epidemiologia em Portugal

Prevalência

A prevalência da asma em Portugal é considerável e o custo total dos cuidados de saúde nesta população, que se calculam superiores a 117 milhões de euros anuais, 20% dos quais atribuíveis à medicação, é 4 vezes superior ao da população em geral^{6,11}.

A medição correcta da prevalência da asma não é fácil dada a multiplicidade de definições usadas mas, da análise dos estudos epidemiológicos mais recentes é possível apurar que:

- nas crianças, a prevalência dos sintomas de asma no grupo etário dos 6/7 anos é de 12.9% e no dos 13/14 anos de 11.8%¹².
- entre os 18-64 anos, segundo rastreio epidemiológico realizado em 2003, a prevalência nos homens é de 6.3%, nas mulheres de 9.1% e no global de 7.8%¹³;
- no grupo com >65 anos, diagnosticou-se asma em 10.9%, tendo o grupo estudado média de idades de 74 anos e prevalência feminina de 58%⁶.

Considerando a análise de prevalência realizada pela *Global Allergy and Asthma European Network* (GA²LEN) entre 2008/2009, num estudo que abrangeu 15 países Europeus, a prevalência foi de 16.8%¹⁴. (Nesse estudo foram inquiridos indivíduos dos 15-74 anos em relação à existência de asma em qualquer altura da vida ou reportando a existência de pelo menos um dos seguintes sintomas nos últimos 12 meses: sibilância nocturna, aperto torácico, dispneia nocturna e despertar com tosse).

O único estudo abrangendo a totalidade da população (infantil e adulta) realizado em Portugal, direccionado à prevalência da asma, foi realizado em 2010¹⁵, abrangendo 6003 indivíduos,

com média de idades de 39 anos (IC95%: 38.2-39.6) sendo 57% do género feminino. A prevalência detectada de “asma actual” (reportada pelo próprio e na presença de pelo menos 1 sintoma de entre vários, a saber: sibilância, despertares nocturnos por dispneia ou por ataque de asma, nos últimos 12 meses) foi de 6.8% (IC95%: 6.0-7.7), correspondendo a 695 000 indivíduos, sendo superior nas áreas rurais (7.7% Vs 6.5%) e nas mulheres (7.2 Vs 6.3%). Quanto aos grupos etários, a prevalência foi de 8% no grupo com mais de 65 anos, de 6.3% nos adultos entre os 18 e 65 anos e de 7.2% nos jovens com menos de 18 anos. A prevalência da asma “em alguma altura da vida” foi reportada em 10.5% (IC95%: 9.5-11.6) da população inquirida.

Globalmente, com base nos estudos epidemiológicos nacionais, podemos apontar para detecção da asma em cerca de 7-10% da população.

Mortalidade

O número de mortes por asma/ano em todo o mundo estima-se em 250.000, não se relacionando com a prevalência³. Em Portugal era em 2011 de 0.6/100 000 habitantes¹⁶. Os principais factores de risco reconhecidos são: gravidade intrínseca da doença, crises graves prévias, internamentos no último ano, corticoterapia oral e uso excessivo de broncodilatadores sem corticoterapia inalada (CSI) associada.

As taxas mais elevadas encontram-se no grupo etário dos idosos, com mais de 50% dos óbitos por asma, sendo rara na idade pediátrica. Apesar de vir a diminuir em ambos os sexos, houve uma inversão da mortalidade por género, sendo no presente mais prevalente no sexo feminino¹⁷. Segundo o Observatório Nacional das Doenças Respiratórias (ONDR), a mortalidade em Portugal é residual mas, em 2012, registou-se aumento de 18% em relação a 2011, atingindo 144 óbitos¹⁸.

Exacerbações e Internamento

O recurso ao serviço de urgência é mais frequente nas idades pediátricas, com maiores taxas de internamentos nos adolescentes masculinos na pré-puberdade, atribuíveis provavelmente à maior prevalência da patologia nesta faixa etária. Na idade adulta, as exacerbações são mais frequentes em mulheres, com um *cluster* significativo de mulheres obesas e asma de início tardio.

Globalmente, entre 2003-2010, a taxa de internamentos por asma diminuiu em todos os grupos etários¹⁹. Em Portugal, no ano de 2007, foi de 28/100 000 habitantes. Entre os anos 2002-2007, a duração média dos internamentos foi maior acima dos 19 anos (5.5 Vs 3.5 dias dos 0-18 anos). Em termos globais, são superiores no sexo feminino, com excepção do grupo etário com menos de 15 anos, onde a predominância dos internamentos é no sexo masculino¹¹.

Em relação a outros países, o número é relativamente baixo e, segundo dados recentes do ONDR, entre 2006 e 2011 assitiu-se à sua progressiva diminuição. Apesar disso, houve em 2012 aumento de 12%, relativamente a 2011¹⁸.

I.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA ASMA

Sendo vários os elementos celulares implicados nos mecanismos fisiopatológicos da doença, interessa lembrar que a asma é uma doença que resulta da interacção gene-ambiente, tendo por base uma resposta imunoinflamatória e de remodelação da via aérea.

I.3.1 Células envolvidas nos diferentes mecanismos fisiopatológicos da asma

As várias células implicadas nesses mecanismos de resposta revêm-se de seguida:

Mastócitos

São células residentes nos tecidos, presentes quer no epitélio da via aérea, quer mais profundamente na sua parede, com importância para o mecanismo da asma, sendo os da mucosa altamente reactivos aos alérgenos inalados²⁰, levando à desgranulação e libertação de mediadores pró-inflamatórios, vasoactivos e neuromediadores, como o ácido araquidónico (AA), histamina, citocinas e enzimas proteolíticas²¹. Podem também ser activados por estímulos alérgicos, imunológicos e outros ambientais, sendo sensores do dano celular pela interleucina (IL)-33, que por sua vez regula a inflamação alérgica²².

Depois de activados, para além de secretarem histamina, prostaglandina D₂ (PGD₂) e leucotrienos C₄ (LTC₄), responsáveis pela broncoconstrição, produção de muco e edema da mucosa, também secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, e factor de necrose tumoral (TNF - *Tumor necrosis factor*) α , aumentam a hipereactividade do músculo liso, induzem a síntese de imunoglobulina (Ig)E, recrutam outras células imunitárias²³ e interagem com receptores celulares dos eosinófilos, macrófagos, basófilos, servindo assim como *primers*. Também suprimem as células T reguladoras (Treg - *T regulator*) e promovem as células T *helper* (Th) 17²⁴. Juntamente com os eosinófilos são fontes importantes de metaloproteinases (MMP) zinco-dependentes (MMP-3 e MMP-9), implicadas na remodelação da via aérea²⁵. Além disso, os mastócitos alveolares de doentes alérgicos asmáticos têm maior expressão de receptores celulares de alta afinidade para a fracção cristalizável de IgE (FceRI) do que os apenas riníticos, ressaltando o seu potencial como alvo terapêutico²⁶.

Estudos recentes têm relacionado diferentes fenótipos mastocitários, nomeadamente os que têm positividade para triptase e quimase, com a gravidade da asma²⁷, mas também com diferente sensibilidade de activação destas células efectoras inflamatórias entre indivíduos atópicos e não atópicos²⁸.

Eosinófilos

São granulócitos circulantes cuja maturação e diferenciação depende de IL-5²⁹. São ricos em proteínas básicas granulares, peroxidase eosinofílica e proteína eosinofílica catiónica, capazes de gerar eicosanóides como a prostaciclina (PGI₂) e os cis-LTs³⁰, estando presentes não só na via aérea dos asmáticos mas também, quando não controlados, na expectoração e no sangue dos mesmos. São recrutados da medula óssea pelas *clusters differentiation cells* (CD)34,

envolvendo múltiplos elementos como a IL-5, IL-13, eotaxinas, células de Clara e receptores de quimiocina (CCR- *Chemokine receptor*)³. Participam depois na modulação da resposta imunológica da asma, com libertação de mediadores como PGD₂, cis-LTs, citocinas e quimiocinas, para além de espécies reactivas de oxigénio (ROS - *Reactive oxygen species*) e neuropeptídeos³¹. Esta libertação de mediadores confere papel quer na resposta imunoinflamatória, quer na manutenção da função de barreira do epitélio, com repercussões na remodelação, fazendo ponte entre a resposta inata e adaptativa³². De facto, a eosinofilia periférica relaciona-se não apenas com a resposta inflamatória mas também com a hiperreactividade da via aérea³³. Estudos recentes, dirigidos ao efeito da administração de anti-IL-5³⁴, têm questionado a primazia dos eosinófilos na componente inflamatória da asma. Sendo a IL-5 responsável pelo processo de maturação e recrutamento de eosinófilos na via aérea, a sua persistência mesmo após bloqueio, sugere também papel na remodelação da via aérea, suportada pela capacidade de produzir factor de crescimento de transformação β (TGF- β - *Transforming growth factor β*), que serve de estímulo à produção de matriz extracelular³⁵ e contribui para a proliferação fibroblástica. Para além de muitos destes factores poderem activar directamente as células epiteliais e mesenquimatosas, com implicação na remodelação da via aérea³⁶, podem também contribuir para esta pelo acentuar da proliferação do músculo liso³⁷.

Monócitos e macrófagos

Produzidos na medula óssea são capazes de se diferenciarem em macrófagos e em células dendríticas na presença de factor estimulante de colónia granulócito-macrófago (GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) e IL-3, sendo fonte importante de cis-LTs, ROS e enzimas lisossómicas³⁸. Alcançam os tecidos inflamados através do sangue e, apesar de não terem papel estabelecido na patologia asmática ou no paradigma da resposta Th2, são importantes na cronicidade da doença, associando-se a infiltração preferencial na parede da via aérea em doentes resistentes à corticoterapia³⁹.

O monócito tem capacidade de libertação de citocinas, TNF- α e INF- γ , sendo a IL-15 uma citocina importante na modulação da célula T por monócitos.

O macrófago, nomeadamente o alveolar, tem grande capacidade de síntese de citocinas e quimiocinas com interferência na limitação da resposta Th2⁴⁰. O seu papel regulador permanece controverso mas dados recentes sugerem que possa participar activamente na asma, produzindo mediadores pró e anti-inflamatórios, incluindo citocinas Th1, Th2, Th17 e IL-33, dependendo das diferentes condições do meio envolvente⁴¹. Se a IL-33 amplifica a polarização dos macrófagos, contribuindo para a inflamação da via aérea⁴¹, a depleção dos macrófagos inibe o desenvolvimento da hipereactividade brônquica (HRB), enfatizando a sua importância no desenvolvimento da asma, podendo vir a ser alvo terapêutico⁴². No entanto, estudos realizados, em animais com asma experimental mostraram que a depleção pode aumentar a inflamação⁴³.

Portanto, estudos dirigidos ao esclarecimento do papel regulador dos macrófagos são necessários.

Basófilos

Têm origem na medula óssea e diferenciam-se na presença de IL-3. Não sendo claro o seu papel na asma, partilham muitos dos mecanismos de recrutamento dos eosinófilos e parecem ser células acompanhantes da infiltração eosinofílica. São importantes no mecanismo de hipersensibilidade (HS) tipo I e partilham semelhanças funcionais com os mastócitos⁴⁴. São a principal fonte de IL-4 e foram identificados na resposta alérgica tardia pulmonar, estando presentes no pulmão de doentes que morreram por asma⁴⁵.

Neutrófilos

Presentes no sangue periférico, expressam receptores de moléculas quimiotácticas e proteínas de adesão, cujo recrutamento pulmonar depende de mediadores como os leucotrienos, anafilotoxinas e quimiocinas como a IL-8. Desde há muito tempo são considerados fagócitos com função principal de degradar microorganismos mas, recentemente, o seu papel na modulação da resposta imunitária tem-se tornado evidente⁴⁶.

Fenótipos de asma grave e moderada, particularmente o de fumadores ou doentes com exacerbações desencadeadas por vírus, têm sido associados ao aumento destas células⁴⁷ e das citocinas Th17, IL-17A, IL-17F e IL-22. As Th17 são recrutadas pelos neutrófilos induzindo metaplasia, com efeitos pleotrópicos no músculo liso da via aérea resultando no estreitamento da mesma.

I.3.2 Resposta imuno-inflamatória

O mecanismo mais conhecido e bem estudado da resposta imunoinflamatória é o alérgico mas outros, não alérgicos, que se associam a diferentes fenótipos de apresentação, têm vindo a estabelecer-se.

Quando associada a sensibilização alérgica, a resposta primordial é do tipo Th2. Os alérgenos inalados são apresentados pela célula dendrítica à superfície da via aérea, processo facilitado pela ligação da IgE aos FcεRI, que depois são processados e, após migração, apresentados aos linfócitos T como antígenos. A capacidade das células dendríticas gerarem IL-12 é determinante para o balanço Th1 e Th2, favorecendo a polarização para Th1⁴⁸. Este é um processo multicelular envolvendo eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T CD4+, mastócitos e infiltração eosinofílica, esta última a mais relevante. A resposta tipo Th2 é comum às respostas alérgicas inflamatórias crónicas e, pelo menos na asma leve a moderada, a evidência é a favor do domínio deste tipo de resposta que, após recrutamento de células efectoras secundárias como os macrófagos, basófilos e eosinófilos para o local da inflamação, as activam para secretar mediadores⁴⁹.

Se a resposta Th2 é importante na asma leve a moderada, com o agravamento e a cronicidade da doença, são recrutadas células Th1. A sua capacidade de secretar TNF-α e IFN-γ poderá explicar, em parte, o dano tecidual associado às formas mais graves⁵⁰.

Quanto à asma desencadeada pela infecção viral, ela parece estar relacionada com a activação de células T *natural killer* (NK T)⁵¹, em que a hipereactividade intrínseca é independente da resposta Th2 ou imune adaptativa e se associa ao gene de susceptibilidade asmática, ADAM-33 (*A desintegrin and metalloprotease domain-33*), expresso nas células do músculo liso brônquico⁵².

As citocinas da imunidade inata que se têm relacionado com a asma são: a IL-7, que demonstrou correlacionar-se com a gravidade da doença⁵³; a IL-25, membro da família da IL-17 e encontrada na submucosa brônquica de asmáticos⁵⁴; e a IL-33, que actua em sinergia com o receptor de IgE, activa os mastócitos e basófilos, e aumenta a sobrevivência dos eosinófilos e a sua desgranulação⁵⁵. As citocinas da família das IL-17 (IL-17A – IL-17F) produzem células Th17 e a sua concentração, na expectoração dos asmáticos, correlaciona-se com a gravidade da HRB⁵⁶ e com a presença de neutrófilos. Vários estudos têm apontado para o seu importante papel como reguladores na asma não alérgica, mas também na alérgica, e tem vindo a ser sugerido a sua implicação no endótipo *Th2-lo* que se associa a má resposta à corticoterapia.

Existem ainda outros fenótipos resultantes de diferentes vias patogénicas, dos quais são exemplos a asma induzida por poluição ambiental, fumo do tabaco, obesidade, aspirina ou exercício. Todos os referidos respondem à corticoterapia de forma pior do que o fenótipo alérgico.

Globalmente, a resposta imunoinflamatória implica também outras alterações fisiopatológicas, nomeadamente as do epitélio brônquico. Nos asmáticos, o destacamento de células epiteliais, o espessamento da lâmina basal, o aumento do número de miofibroblastos e a alteração dos componentes da matriz extracelular, vão condicionar a incapacidade de reparação apropriada quando submetidos a um desafio, explicando de alguma forma o aumento da sensibilidade dos asmáticos a poluentes ambientais, ao tabaco e a outras partículas³⁰. Factores que reforçam a importância do epitélio na patogenia da asma são: os polimorfismos genéticos localizados ao cromossoma 1q13, relacionados com a manutenção da integridade do epitélio⁵⁷; a diminuição das defesas antioxidantes que contribui para a asma desencadeada pela exposição ao ozono e a partículas ambientais⁵⁸; e a metaplasia das células caliciformes que ocorre na asma crónica e leva à secreção da mucina 5AC, conferindo características viscoelásticas ao muco produzido⁵⁹.

Remodelação da via aérea

A remodelação da via aérea resulta de uma combinação de alterações estruturais e celulares, sendo de primordial importância a hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, à qual se junta a acumulação de proteínas colagénicas na matriz extracelular, com consequente neovascularização, e que resulta no agravamento da HRB. Hoje é possível relacionar o espessamento brônquico, medido por imagiologia, com a gravidade da doença⁶⁰. No entanto, a HRB é inversamente proporcional ao espessamento da sua parede (doentes com asma *brittle* são muito reactivos mas têm mínima remodelação; doentes crónicos, com grau de obstrução persistente, apresentam processo de remodelação de forma mais proeminente).

Em termos genéticos foi identificada a molécula ADAM 33, uma metaloproteinase que, tendo expressão preferencial nas células mesenquimatosas, se relaciona com a patogénese da HRB,

com o declínio da função pulmonar e com a remodelação da via aérea. Doentes asmáticos mostraram 46% de risco para polimorfismos da ADAM 33⁶¹. Para além deste gene, outros têm sido alvo de estudos genéticos, particularmente os que se relacionam com o sistema anti-oxidativo (glutathione-S-transferase (GST)M1 e P1), a resposta anti-inflamatória (TNF- α) e a imunidade inata (*Toll like receptor* (TLR 2 e TLR4))⁶².

A persistente inflamação da via aérea pode ser outro factor importante para a remodelação, dada a contribuição dos eosinófilos na produção de mediadores como o TGF- β 1. Essa infiltração eosinofílica não é, contudo, necessária para que se verifiquem estas alterações – os factores de crescimento e mediadores inflamatórios, expressos após dano epitelial por desafio inalatório, levam à desregulação das adesões celulares epiteliais, promovendo a expressão de células mesenquimatosas e contribuindo para a remodelação da via aérea. É actualmente designado como a unidade trófica epitélio-mesenquimatosa (EMTU - *Epithelial-mesenchymal trofic unit*)⁶³. Alguns estudos recentes têm ressaltado a importância da sinalização mesenquimatosa epitelial na patogénese da asma, uma vez que o tratamento preventivo e atempado dirigido à resposta Th2, não tem mostrado alterar de forma sistemática o curso da doença asmática⁶⁴.

Remodelação vascular e neuronal

Para além da remodelação da via aérea, a acompanhante remodelação vascular adquire importância na patogénese da asma. A produção de mediadores como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF - *Vascular endothelial growth factor*)⁶⁵ e o potente vasodilatador calcitonina⁶⁶, aliada à remodelação neuronal, com produção de neutrofinas que promovem o crescimento de factores mastocitários, aumentam a sobrevivência dos eosinófilos e a HRB³⁰.

Stress oxidativo

A relação do *stress* oxidativo com a asma está bem estabelecida, sabendo-se fazer parte dos mecanismos moleculares da doença. Apesar da produção de ROS fazer parte do metabolismo celular, a sua sobreprodução pode levar ao compromisso funcional celular, com aumento da inflamação e dano lipídico, proteico e mitocondrial⁶⁷. Quer os mecanismos alérgicos, pela produção de IL-5 e subsequente recrutamento eosinofílico, quer os mecanismos inatos, pela produção de IL-8 e recrutamento neutrofilico, podem levar à produção destas ROS, catalisada na primeira via pela peroxidase eosinofílica e na segunda pela mieloperoxidase⁶⁸.

Na asma, a formação de ROS activa citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que facilitam a supra-regulação de moléculas de adesão e a libertação de mediadores pro-inflamatórios⁶⁹, com efeitos provados na contracção do músculo liso⁷⁰, na hiperreactividade da via aérea e na hipersecreção mucosa⁷¹.

A peroxidação da membrana lipídica leva à produção de isoprostanos (uma prostraglandina bioactiva e produzida independentemente da via da ciclooxygenase pela peroxidação do ácido araquidónico catalisada pelas ROS), que têm sido associados ao estreitamento da via aérea⁷².

O grau de gravidade da asma também tem sido relacionado com esta peroxidação⁷³ sendo apontados outros marcadores como os aldeídos e alcanos^{74,75}.

A superóxido dismutase extracelular (EC-SOD - *Enzyme extracellular superoxide dismutase*), enzima encontrada na matriz circundante aos vasos pulmonares e vias aéreas, parece ter

função no mecanismo da asma, estando o aumento da sua função directamente associado à diminuição do *stress* oxidativo e à redução dos sintomas da asma⁷⁶.

Os diferentes processos abordados e envolvidos na resposta imunoinflamatória poderão relacionar-se, em maior ou menor extensão, com a heterogeneidade dos fenótipos conhecidos de asma sendo que, se de um lado podemos ter um fenótipo alérgico, mediado pela resposta Th2, habitualmente responsiva à corticoterapia, do outro temos doença com envolvimento da EMU, mostrando susceptibilidade a desafios ambientais e/ou infecciosos que, quando adquire carácter de cronicidade, evolui com obstrução persistente e refractariedade à terapêutica.

Talvez o maior desafio actual seja o entendimento dos diferentes tipos de asma e da sua gravidade, percebendo se a asma grave representa uma forma diferente da doença.

I.3.3 Particularidades da patogénese da asma grave (AG)

A heterogeneidade de apresentação dos doentes graves, à semelhança da encontrada nos outros graus, é reconhecida e pode variar no decurso da doença.

Recentemente tem sido sugerido que a asma grave pode ser uma doença distinta da de grau moderado, nomeadamente com diferenças na desregulação da produção citocínica Th1/Th2. Não só o aumento dos eosinófilos, mas também dos neutrófilos e, mais recentemente, dos mastócitos⁷⁷, têm sido implicados nessa gravidade. A neutrofilia, que se associa à ausência de atopia, à obesidade e à pior função pulmonar, pode resultar do aumento do recrutamento dos neutrófilos e da corticoterapia, que interfere com a apoptose e prolonga a sobrevivência dos mesmos⁷⁷.

Os perfis citocínicos dos doentes graves também têm sido úteis na sua classificação, havendo aumento de expressão de citocinas que não apenas as relacionadas com a inflamação eosinofílica (IL-4,5,9, 13 e 33). Algumas dessas incluem o INF- γ , IL-8, IL-18 e IL-17⁷⁸⁻⁸¹.

Num recente artigo de revisão⁸², estas alterações estão bem explanadas (*Figura 1*). Resumidamente:

- A via de sinalização IL-4/IL-13, relaciona-se com doentes graves e sintomas alérgico-associados com níveis elevados de IgE sérica, habitualmente responsivos ao omalizumabe. A IL-13 estará mais relacionada com as manifestações da doença e os seus efeitos nas células do músculo liso, enquanto a IL-4 estará mais envolvida na diferenciação das células Th2, síntese de IgE e activação de macrófagos. Alguns potenciais biomarcadores relacionados com esta via são a quitinase e a periostina, este último já com evidência confirmada⁸³;
- A via IL-5/IL-33 contribui para a patogénese de asmáticos graves não atópicos, com início tardio da doença, muitas vezes com sinusite e polipose nasal associadas. Estudos em humanos já demonstraram correlação do aumento da IL-5 na expectoração com

exacerbações mais frequentes⁸⁴ e também com a presença de polipose nasal e rinosinusite crónica. Estes doentes são frequentemente refractários a altas doses de CSI mas responsivos a corticóides sistémicos (CSs) e a anti-IL-5. A IL-33 parece estar envolvida na activação das Th2, com produção de IL-5, e tem sido associada à inflamação crónica e remodelação da via aérea⁸⁵;

- A IL-17 associa-se ao fenótipo de asmáticos graves com neutrofilia na expectoração, particularmente a IL-17A e IL-17F⁸⁶;
- Por fim, na via IL-8/INF- γ , o INF- γ , induzido pela IL-18, correlaciona-se com a gravidade da asma, a contagem de eosinófilos e a HRB. Depois de se ligar aos seus receptores nas células Th1, a IL-8 activa factores de transcrição com conseqüente produção de Th1 e Th2. Variantes dos receptores da IL-18 têm sido associados à gravidade da HRB, contagem de IgE total e eosinófilos séricos⁸⁷.

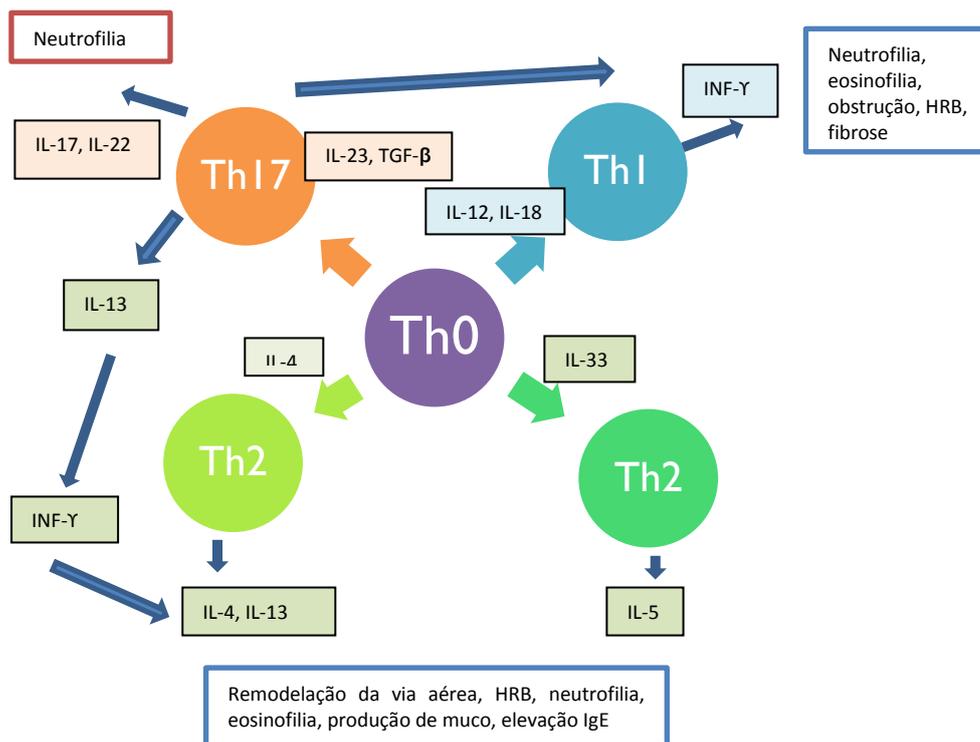


Figura 1 – Interações da vias citocínicas na asma grave. As células Th1, Th2 e Th17 podem ser condicionadas pelo ambiente citocínico (indicadas antes da seta) para produzir padrões não-clássicos de citocinas (indicadas depois da seta) e contribuir para a patologia da asma grave. verde- Th2; azul – Th1; laranja – Th17. Adaptado de Poon AH⁸².

Em relação à corticoidesistência muitas vezes encontrada nos doentes graves, estão implicados factores como a disfunção dos receptores dos glucocorticóides, em provável relação com a

presença de IL-2 e IL-4 e com a redução da histona deacetilase 2 (HDAC2), com evidência a apontar para a importância do *stress* oxidativo nessa redução⁸⁸.

Globalmente, na patogénese da asma grave, a produção citocínica é maleável e influenciável pelo meio circundante.

Para além dos mecanismos imunoinflamatórios contribuintes para a sua patogénese, mecanismos específicos de dano da via aérea e da remodelação estarão envolvidos na complexidade deste tipo de doentes.

Quanto ao dano pulmonar, as principais alterações estruturais e funcionais nestes doentes são a diminuição generalizada do lúmen da árvore brônquica, a alteração dos mecanismos de distensão da parede com aumento do seu encerramento, existência de bronquiectasias e, em contraste com a DPOC, enfisema mínimo ou ausente⁸⁹.

O desenvolvimento de novas técnicas imagiológicas tem evidenciado a importância do atingimento das pequenas vias aéreas e do aumento do volume residual nesta forma de doença⁹⁰.

Outro aspecto importante para o dano celular é a alteração do microambiente com maior diversidade microbótica e maiores níveis bacterianos, sendo a colonização fúngica (em particular por *Aspergillus fumigatus*) um factor desencadeador de obstrução da via aérea e a presença de *Chlamydia pneumoniae* um factor para existência de obstrução persistente. Estes dados apontam para alterações da resposta imunitária nos doentes graves, estando também diminuída a *clearance* mucociliar⁹¹.

Acresce que, nos asmáticos graves, o processo de resolução da inflamação está comprometido pela menor capacidade de gerar mediadores anti-inflamatórios como as lipoxinas⁹², tendo também o *stress* oxidativo papel importante: o impacto oxidativo do fumo de tabaco mostrou relação com a menor sensibilidade à corticoterapia⁹³; biomarcadores como o FeNO (*Fraction of exhaled nitric oxide*), arginase, superóxido dismutase (SOD) e a bromotirosina urinária foram associados a asma grave, obstrução da via aérea e risco de exacerbações; e produtos finais da peroxidação lipídica à ocorrência de exacerbações⁷⁴.

Actualmente, como medidor objectivo de gravidade, e à semelhança do que acontece para a avaliação do controlo da asma e da qualidade de vida, temos disponível o *Severity of Asthma Score* (SOA) que mostrou ser o mais poderoso preditor dos eventos clínicos adversos⁹⁴. Contudo, até ao momento, não são conhecidos biomarcadores específicos de gravidade da doença.

I.4 DEFINIÇÃO DE CONTROLO DA ASMA E DE EXACERBAÇÕES

Nos últimos anos tem-se assistido a uma nova taxonomia em relação ao controlo da asma, tendo a GINA modificado a sua classificação de gravidade, orientando-a segundo a intensidade de terapêutica necessária à obtenção do controlo sintomático e funcional da doença³.

Em 2009, tinham sido estabelecidos pela *task force* ERS/ATS conceitos uniformizadores relativos à avaliação do controlo, das exacerbações e da gravidade da doença⁹⁵.

Segundo este consórcio:

- O controlo da doença assume quatro dimensões, englobando: sintomas, grau de obstrução variável da via aérea, HRB e inflamação da via aérea. Considera também aspectos relativos ao risco de eventos adversos futuros, onde se incluem: a perda de controlo de sintomas, a ocorrência de exacerbações, a velocidade do declínio funcional e os efeitos adversos do tratamento. Uma vez que, na avaliação do controlo, os sintomas e a função respiratória não se correlacionam, ambos necessitam de monitorização.
- O valor de FEV₁ pré-broncodilatação (BD) é tido como medida objectiva do controlo da asma e deve ser considerado como preditor de risco de exacerbação. O limite para a normal variabilidade do *peak flow* passa a ser de 8% (com medições bi-diárias), em detrimento dos 15-20% previamente utilizados.
- Os biomarcadores, quando possível, devem ser utilizados – a contagem diferencial de células na expectoração é útil na titulação terapêutica e o FeNO na sinalização da inflamação eosinofílica.
- O número de consultas não programadas deve ser avaliado, bem como o número de exacerbações com uso de corticoterapia sistémica. O impacto da doença na qualidade de vida deve também ser tido em conta.

Portanto, em doentes com idade ≥ 5 anos, o controlo da doença define-se pela extensão destas dimensões e de acordo com o *Quadro I*:

Quadro I - Níveis de controlo da asma⁹⁶

Considerar últimas 2-4 semanas	Controlado (todos presentes)	Parcialmente controlado (qualquer um de)	Não controlado (qualquer um de)
Sintomas diurnos	≤ 2d/semana e ≤ 1/dia	>2d/semana ou >1/dia mas ≤ 2d/semana	Ao longo do dia
Limitação de actividades	Nenhuma	Moderada	Acentuada
Sintomas nocturnos	Nenhum	≤ 2/semana	>2/semana
Uso de terapêutica de alívio	≤ 2d/semana	>2d/semana	Várias/dia
Função pulmonar (FEV₁)	≥ 80% Previsto	60-79% Previsto	<60% Previsto
Crise com uso de CSs	0-1/ano	1-2/ano	>2/ano
Considerar gravidade e intervalo de tempo entre crises			

FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; CSs: corticoesteróides sistémicos

Quanto às exacerbações, são reconhecidas pela alteração de sintomas do doente que obriguem a incremento terapêutico, podendo variar na instalação, duração e gravidade intrínseca. A quantificação da gravidade não é fácil, particularmente nas exacerbações leves que habitualmente não chegam aos cuidados de saúde diferenciados, que se podem traduzir apenas por perda transitória de controlo. Podem considerar-se de grau moderado quando há deterioração sintomática ou funcional que obrigue ao aumento do uso do broncodilatador por um período mínimo de 2 dias, não sendo suficientemente grave que obrigue o doente a recorrer a terapêutica sistémica ou a hospitalização. Consideram-se graves as exacerbações que obriguem a uma intervenção urgente e que impliquem uso de corticoterapia sistémica por pelo menos 3 dias e/ou a hospitalização ou visita ao serviço de urgência.

I.5 FACTORES DE RISCO

Genéticos

Sendo a asma uma doença complexa, com várias apresentações fenotípicas, os diferentes mecanismos biológicos têm envolvimento poligenético, podendo variar o grau de afecção quando se combinam várias alterações e quando estas interagem com os diferentes ambientes.

A resposta à terapêutica também pode ser influenciada por polimorfismos genéticos, nomeadamente a resposta aos β₂-adrenérgicos (gene ADRB2), aos anti-LTs (gene ALOX5 e LTC4S), às aminofilinas (CYP1A2) e aos corticóides (CRHR1 ou GLCCI1)⁹⁷.

March et al.⁹⁸ agruparam de forma muito didáctica os diferentes polimorfismos genéticos segundo a categoria funcional, resumidos no *Quadro II*:

Quadro II – Categorias funcionais dos genes associados à asma

Categorias funcionais dos genes associados à asma	
Resposta celular Th2 mediada	GATA3, IL-4, STAT6, IL-13, TBX21, IL-4RA, IL-12B, FcεR1
Inflamação	IL-18, TNFα, IL-18R1, ALOX-5, LT-C4 sintase
Resposta imunitária inata	CD14, TLR-4, TLR-10, HLA classe II, TLR-2, TLR-6, NOD1/CARD4
Remodelação da via aérea	ADAM33, DPP10, COL6A5, GPRA
Broncoconstrição	CHRNA3/5, NOS1, PDE4D
Disfunção da barreira epitelial	Filagrina, CC16, DEFB1, CCL-5,11,24,26

Adaptado de March et al.⁹⁸

Ambientais

Agentes ambientais *indoor* e *outdoor* podem ser responsáveis pelo desenvolvimento, agravamento e exacerbações da asma. Agentes *indoor* típicos incluem aeroalergenos (ácaros domésticos, barata, fâneros de animais e fungos), fumo de tabaco ambiental, químicos e fumos irritantes e produtos de combustão. Entre os agentes *outdoor* contam-se aeroalergenos (pólenes, esporos fúngicos) e poluentes do ar (gases voláteis industriais e isocianatos). A variação extrema do clima (trovoadas, ventos fortes, humidade e variações de pressão atmosférica) é outro factor ambiental importante para a ocorrência de exacerbações⁹⁹.

Os agentes ocupacionais são causa comum de asma grave, estando identificados mais de 300. Os mais importantes são os isocianatos, o pó de farinha e de grão de cereais, o látex, aldeídos e poeira de madeiras¹⁰⁰.

As infecções respiratórias por vírus e algumas bactérias são causa frequente de exacerbações e hospitalizações. Nas crianças, as bronquiolites víricas e as infecções por bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, aumentam o risco para asma. Bactérias atípicas como a *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* também aumentam o risco de asma por mecanismos relacionados com: o dano da mucosa da via aérea; o aumento da resposta inata e das respostas pro-alérgicas pelas células epiteliais e fibroblastos; o aumento da remodelação aérea; e o atraso na resolução da inflamação¹⁰¹.

O fumo de cigarro, um dos factores mais importantes neste capítulo, aumenta a morbimortalidade da asma, com menor resposta à terapêutica e modificação da resposta imunoinflamatória.

I.6 COMORBILIDADES

As merecedoras de destaque são:

Rinite alérgica

Como é sabido, 80% dos asmáticos têm rinite alérgica (RA) e 10 a 40% dos doentes com RA têm asma, sendo que a gravidade da primeira pode contribuir para o mau controlo da segunda¹⁰². Não sendo necessariamente alérgica, a relação entre as duas pode também ser explicada pela exposição fúngica ou pela colonização nasal por *Staphylococcus aureus*¹⁰³. A rinite coexiste com a sinusite, podendo ser agravada pela presença de polipose nasal, que se associa ao aumento da obstrução aérea e do número de células inflamatórias, levando à diminuição do controlo da asma¹⁰⁴.

Disfunção das cordas vocais (DCV)

Caracteriza-se por episódios paradoxais de aducção das cordas vocais, inspiratórios e/ou expiratórios, podendo ser confirmado por exame laringoscópico, (por vezes falsamente negativo dada a normalidade intercrise). Pode coexistir com a asma ou fazer diagnóstico diferencial com ela. Um estudo recente realizado em doentes com asma difícil detectou DCV em 50% deles¹⁰⁵.

Distúrbio de depressão/ansiedade

Factores psicológicos também se relacionam com a asma, de forma bidireccional, podendo prender-se com a desregulação de resposta neuro-endócrina. A depressão e a ansiedade podem gerar um ciclo vicioso em que, diminuindo a capacidade de controlo dos sintomas, é menor a adesão terapêutica e maior o atraso em procurar ajuda médica, com aumento de exacerbações, agravamento do declínio funcional, diminuição de qualidade de vida, e consequente impacto socio-familiar¹⁰⁶.

Refluxo gastro-esofágico (RGE)

É uma das causas mais frequentes de tosse e pode funcionar como desencadeante de asma, por mecanismos relacionados com a acidez gástrica (que têm reflexo no sistema nervoso parassimpático) e por fenómenos de microaspiração, sendo que o seu tratamento pode melhorar os sintomas respiratórios. Uma metanálise recente reportou prevalência de RGE nos asmáticos de 59%¹⁰⁷. No entanto, por poder ser assintomático, perante uma asma de difícil tratamento deve ser investigado com pHmetria. O RGE pode, por sua vez, ser agravado pela asma, quer pelo uso de corticoterapia e teofilinas, quer por factores mecânicos de hiperinsuflação. Dada a relação da melhoria dos sintomas asmáticos após tratamento com inibidores de prótons, eles devem ser usados nos doentes sintomáticos (em doentes graves com RGE assintomático o seu uso não parece trazer melhorias)¹⁰⁸.

Síndrome de apneia obstrutiva do sono (SAOS)

Tem prevalência aumentada nos doentes asmáticos, com correlação com pior controlo da asma, por mecanismos como o desequilíbrio de adipocinas e o aumento da inflamação sistémica, do *stress* oxidativo, do RGE e da rinite. O efeito confundidor da obesidade não deve, no entanto, ser descurado¹⁰⁹.

Obesidade

Estudos recentes têm associado a obesidade com os sintomas asmáticos e a gravidade dos mesmos¹¹⁰, tendo já sido sugerido um mecanismo imunopatogénico para esta relação. A obesidade modifica a apresentação clínica da asma, de tal forma que se distingue o fenótipo de asma-obesidade. O mecanismo subjacente tem dimensão mecânica, funcional e inflamatória. Do ponto de vista mecânico e funcional, alterações decorrentes da acumulação de gordura abdominal e torácica levam à restrição da capacidade vital e à diminuição do volume de reserva expiratório, com encerramento alveolar precoce em volume corrente¹¹¹. Relativamente aos mecanismos inflamatórios, sendo a obesidade uma doença crónica de baixo grau inflamatório, associada a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, tem sido proposta a modulação do sistema imunológico e adaptativo pelas adipocinas, por um mecanismo independente da IgE. Esta teoria é suportada pela ausência de inflamação eosinofílica verificada nestes doentes em diversos estudos^{2,112,113}. As alterações imunoinflamatórias abordam-se em maior detalhe na rúbrica direccionada aos fenótipos clínicos da asma (III.4.4). O fenótipo caracteriza-se pela maior prevalência no sexo feminino¹¹⁴ e pelo pior controlo da doença asmática, dada a diminuída resposta à medicação de controlo e à presença de comorbilidades relacionadas com a obesidade (como o RGE)¹¹⁵.

A perda de peso tem mostrado impacto na redução dos sintomas, das exacerbações e no uso de terapêutica, não havendo, apesar de tudo, melhoria da HRB¹¹⁶.

Fármacos e variações hormonais

O uso de fármacos como aspirina, outros anti-inflamatórios não esteróides (AINE's), inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA's) e β -bloqueantes podem associar-se a um mau controlo da doença. Em 5 a 10% dos doentes com asma coexiste uma síndrome que combina a rinosinusite crónica, a polipose nasal e a exacerbação dos sintomas respiratórios superiores e inferiores com a exposição à aspirina e outros AINE's. Isto sucede por um mecanismo relacionado com a inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) (enzima conversora do AA em prostaglandinas) que, diminuindo a prostaglandina E2, leva à activação de mastócitos e eosinófilos com consequente libertação de mediadores, inclusive de cis-LTs. Esta síndrome associa-se ao maior risco para asma grave e exacerbações frequentes¹¹⁷.

Não sendo comorbilidade mas interferindo com o mecanismo da asma, a relação com o ciclo hormonal das mulheres também pode influenciar o controlo da doença, sendo os períodos mais críticos a fase lútea final, provavelmente em relação com a queda da progesterona.

Outras comorbilidades confundem-se com estilos de vida, como é o caso do tabagismo acima mencionado.

I.7 CONCEITO DE GRAVIDADE

I.7.1 Definição de Asma de difícil tratamento e de Asma Grave

A asma, que atinge actualmente 300 milhões de pessoas em todo o mundo¹¹⁸, é um importante problema de saúde que, na grande maioria dos doentes, pode ser facilmente controlada com uso de medicação¹¹⁹. A falta de adesão terapêutica nos doentes com asma é um factor importante a ter em conta, estimando-se que apenas 50% deles cumpram os planos terapêuticos⁷. No entanto, em 5 a 10 % a asma pode ser grave e de enorme impacto económico e social.

A heterogeneidade da doença tem vários componentes contribuintes para o seu difícil entendimento, procurado com esforço crescente nos últimos dez anos pelas várias redes de trabalho⁹³, nomeadamente pelas europeias ENFUMOSA (*European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma*), BIOAIR (*Longitudinal Assessment of Clinical Course and Biomarkers in Severe and Chronic Airway Disease*) e U-BIOPRED e pela americana SARP (*Severe Research Asthma Program*).

Existem inúmeras classificações de gravidade¹²⁰ como as propostas pela ERS/ATS em 2000⁴ e pela World Health Organization (WHO) em 2010⁵. Em 2011, a Innovative Medicine Initiative (IMI) propôs o termo “asma problemática” abrangendo doentes com asma difícil e asma grave refractária¹²¹, servindo como base para a nova definição recentemente proposta pela ERS/ATS (finais de 2013)¹²².

A classificação mais antiga⁴ e que serve de base a alguns estudos de grande escala, como o SARP¹²³, baseia-se em critérios bem definidos, (*Quadro III*) sendo necessária a presença de pelo menos um *major* e dois *minor*.

Quadro III – Critérios de classificação de asma refractária, segundo ATS⁴

Critérios <i>major</i>	Critérios <i>minor</i>
Tratamento com corticoterapia oral em mais de 50% do ano	Necessidade de mais do que 1 fármaco de controlo diariamente
Necessidade de CSI de altas doses (>1200µg beclometasona ou equivalente)	Sintomas que requerem uso de BACA de forma quase diária
	Obstrução persistente da via aérea (FEV ₁ <80% previsto)
	Mais do que uma ida ao SU/ano
	Mais do que 3 ciclos de CSO/ano
	Deterioração com a redução de CSO ou de CSI <25%
	História de evento quase fatal

BACA: beta-adrenérgico de curta acção; CSI: corticóide inalado; CSO: corticóide oral; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; SU: serviço de urgência

Quanto à classificação WHO⁵, ela sublinha a relação de três conceitos: gravidade, controlo e resposta à terapêutica.

Nesta classificação, a asma grave associa-se aquela não controlada, com aumento de risco de desenvolver exacerbações graves e co-morbilidades secundárias ao tratamento e à evolução da doença (como o declínio funcional). A avaliação da gravidade pode ser feita: antes de se iniciar tratamento (o controlo da doença é avaliado nos últimos 6-12 meses, considerando-se como asma grave se o mesmo não for atingido por um período razoável); durante o tratamento (a gravidade é determinada segundo a correlação do menor nível de medicação requerido para manter o controlo da doença, assegurando-se a adesão terapêutica).

Na componente controlo, engloba não só o nível actual de controlo da doença (em que se avaliam sintomas diários, limitação da actividade de vida, sintomas nocturnos, função respiratória e exacerbações), mas também o risco (relacionado com as exacerbações frequentes, risco de efeitos adversos de terapêutica e comorbilidades) (*Quadro IV*). A avaliação do risco futuro é feita considerando a perda de controlo, o número de exacerbações no último ano, o número de ciclos de corticóide oral (CSO) no último ano, o declínio da função pulmonar, tendo em conta o valor de FEV₁ pré-BD e a ausência de reversibilidade, e os efeitos secundários do tratamento. Esta componente pretende captar as probabilidades de ocorrerem exacerbações e de se desenvolverem co-morbilidades relacionadas com a doença ou com o tratamento.

Nesta classificação a asma grave subdivide-se em 3 grupos de gravidade: asma grave não tratada, asma de difícil tratamento e asma resistente ao tratamento, sendo por isso aplicável a uma escala mundial e em diferentes estratos socio-económicos.

Quadro IV – Critérios de classificação de asma grave/difícil, segundo a WHO⁵

Asma grave ou de difícil tratamento (qualquer um dos seguintes)
Não controlo da doença (ACQ consistentemente > 1.5 ou “não controlado pelas NAEPP guidelines”)
Exacerbações frequentes: 2 ou mais ciclos de CSO (> 3d cada) no último ano
Exacerbações graves: pelo menos uma hospitalização ou internamento em UCI no último ano
Obstrução permanente do fluxo aéreo (FEV ₁ pré- BACA e BALA <80% previsto com diminuição de FEV ₁ /FVC)
Asma controlada com altas doses de CSI ou CSO (ou omalizumabe) (coloca o doente em grande risco futuro de efeitos secundários)

ACQ: *Asthma Control Questionnaire*; BACA: beta-adrenérgico de curta acção; BALA: beta-adrenérgico de longa acção; CSI: corticóide inalado; CSO: corticóide oral; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FVC: forced vital capacity; NAEPP: *National Asthma Education and Prevention Program*; UCI: unidade de cuidados intensivos.

Na classificação proposta pela IMI¹²¹, clarificam-se os conceitos “asma problemática”, “asma difícil” e “asma grave refractária”. Na primeira, incluem-se as asmas cujos sintomas permanecem não controlados apesar da prescrição de tratamento de alta intensidade (nos adultos definida como dose de CSI >1000 µg/ propionato de fluticasona (PF) ou equivalente e/ou CSO diário, combinados com β-adrenérgicos de longa acção (BALA) ou outro fármaco de controlo), abrangendo os doentes com “asma difícil” e “asma grave refractária”.

A “asma difícil” classifica os doentes que apesar dessa prescrição permanecem não controlados por má *compliance*; exposição persistente a alérgenos ou substâncias tóxicas; presença de comorbilidades subtratadas como rinosinusite crónica, RGE ou SAOS; factores psicológicos; respiração disfuncional ou DCV.

A “asma grave refractária” reserva-se para os doentes que, após confirmação de adesão à terapêutica de alta intensidade, exclusão de outros diagnósticos, tratamento das comorbilidades e evicção de factores desencadeantes, mantêm o não controlo da doença (definido pelas *guidelines* existentes ou um dos seguintes critérios: score ACQ>1,5; duas ou mais exacerbações graves por ano; uso crónico de CSs ou tratamento biológico dada a possibilidade dos efeitos secundários).

Finalmente, em Dezembro de 2013, no documento emitido pela ERS/ATS¹²², a asma grave define-se como aquela que para evitar descontrolo da doença, requer tratamento com doses elevadas de CSI (> 500 µg de PF ou equivalente (meter dose inhaler (MDI) ou dry powder inhaler (DPI)) e outro fármaco de controlo (e/ou CSs), ou que não apresenta controlo apesar dessa terapêutica. O não controlo é definido por mau controlo sintomático de forma persistente (pelo menos 3 meses) com pontuações nos questionário ACT<20 ou ACQ>1.5; exacerbações frequentes (que necessitem de 2 ou mais ciclos de CSs no último ano); exacerbação grave que implique pelo menos uma hospitalização no último ano, UCI ou ventilação mecânica; limitação do fluxo aéreo definido por FEV₁<80% do previsto (basal, após medicação suspensa) e redução de FEV₁/FVC.

Em todas elas estão implícitas a confirmação do diagnóstico de asma e da adesão terapêutica, o tratamento das comorbilidades e a exclusão de outros diagnósticos que não a asma.

É importante reconhecer que não existe actualmente nenhum biomarcador nem característica fisiológica que defina a gravidade da asma, ou os seus fenótipos, sendo os factores de risco conhecidos para o seu desenvolvimento o baixo FEV₁ pré-BD, a história de pneumonia e a exposição tabágica activa ou passiva¹²³.

Clinicamente, e segundo os estudos multicêntricos actuais, parecem distinguir-se três grupos de doentes graves⁹³:

- 1) asmáticos com exacerbações graves intercaladas por períodos de estabilidade de doença, responsáveis por 40% dos doentes graves no estudo SARP;
- 2) asmáticos com obstrução aérea irreversível, com menos predisposição a exacerbações, responsáveis por 60% dos doentes graves no estudo TENOR;
- 3) asmáticos com necessidade de corticoterapia oral diária.

Patobiologicamente evidenciam-se dois fenótipos: aqueles com eosinofilia persistente, que se associa aos grupos de asmáticos com exacerbações graves, doença sinusal e obstrução persistente da via aérea com remodelação; e aqueles sem eosinofilia mas com aumento de neutrófilos na via aérea¹²¹.

Não sendo evidente a correlação clínica e patológica destes fenótipos (com excepção para a asma alérgica de início precoce com inflamação eosinofílica), é clara a necessidade de investigação multidisciplinar para o entendimento da asma grave.

Posto isto, neste trabalho de investigação tem-se como definição de asma grave a fornecida pela WHO em 2010⁵, tendo presente o conceito abrangente e heterogéneo da síndrome em causa. Como já explanado, a sua caracterização é baseada na avaliação sucessiva do controlo (sintomas diários, limitação da actividade de vida, sintomas nocturnos, função respiratória e exacerbações) e define-se sumariamente como “asma não controlada que pode resultar em risco de exacerbações frequentes e/ou reacções adversas a medicação e/ou morbilidades crónicas (incluindo limitação da função respiratória ou diminuição do crescimento pulmonar nas crianças).

I.8 FENÓTIPOS E ENDÓTIPOS DA ASMA – O que se conhece

O conceito de fenótipo define as características observáveis de um organismo desenvolvidas na interacção do mesmo com o meio envolvente. Na asma, várias características têm sido utilizadas para os identificar, quer de ordem patobiológica, quer clínica, quer laboratorial.

Sendo a asma uma doença heterogénea, com variabilidade das componentes clínica, fisiológica e patológica, a eficácia da abordagem clínica dos doentes está dificultada.

Nas *Recomendações Nacionais para o Diagnóstico e Terapêutica de Asma Grave em Portugal*¹²⁴ são reconhecidos 5 fenótipos clínicos e três biológicos.

De entre os clínicos contam-se os seguintes:

- **Asma com tendência a exacerbações**, que representa cerca de 40% dos asmáticos graves. Pode associar-se a função respiratória normal em intercrise, a redução moderada a grave, ou a flutuações marcadas, habitualmente com inflamação eosinofílica;
- **Asma instável**, que pode ser devida a marcadas flutuações funcionais diárias ou a exacerbações graves intercaladas por períodos de estabilidade da doença. No primeiro caso, associa-se a sensibilização a aeroalergenos, a morbilidade psicológica, a maior prevalência do género feminino e ao desencadeamento de sintomas pelo período menstrual; o segundo sub-fenótipo pode ser associado a polimorfismos do gene IL-4¹²⁵;
- **Asma associada a obstrução crónica**, com prevalência elevada (cerca de 49%¹²⁶) e que se associa ao declínio acentuado da função e a exacerbações frequentes. Quando comparados com doentes com DPOC apresentam, para o mesmo grau de obstrução, maior infiltração eosinofílica, níveis de FeNO mais elevados, melhor difusão alveolocapilar e maior reversibilidade com o tratamento. Têm sido propostas algumas associações com polimorfismos genéticos, nomeadamente nos genes relacionados com ADAM 33, IL-4, IL-4R¹²⁵ e TGF- β 1¹²⁷;

- **Asma resistente ao tratamento**, que se associa a factores como a disfunção dos receptores dos glucocorticóides, em provável relação com a presença de IL-2 e IL-4 e com a redução da HDAC¹²⁸, agravada quando existe tabagismo associado. Por outro lado, o tipo de inflamação presente também já mostrou relação com a resposta terapêutica, sendo tanto menor quanto menor a eosinofilia e maior a neutrofilia¹²⁹.
- **Asma com sensibilidade a AINE's**, fenótipo associado a polipose nasal, rinosinusite grave, início tardio da doença e menor resposta à corticoterapia, com remodelação extensa e inflamação eosinofílica persistente.

Quanto aos três fenótipos biológicos¹²⁴ distinguem-se:

- **Asma eosinofílica**, que pode estar presente em cerca de 50% dos asmáticos graves e tem sido associada ao espessamento da membrana basal sub-epitelial com expressão de TGF- β , estando portanto mais relacionada com a remodelação¹³⁰;
- **Asma neutrofílica**, que pode ter na sua origem factores como o tabagismo, a exposição ocupacional e as infecções virais, parecendo associar-se ao aumento da expressão de IL-8, elastase neutrofílica e metaloproteinasas (MMP-9), e é menos respondedor à corticoterapia que o fenótipo eosinofílico;
- **Asma paucigranulocítica**, que se caracteriza pela ausência de inflamação eosinofílica ou neutrofílica, podendo estar implicada uma inflamação granulocítica, com pouca resposta à corticoterapia.

Agache et al.¹³¹, num recente artigo de revisão, resumiu os fenótipos da asma equacionando-os segundo várias vertentes:

- clínica (idade de início; presença de tabagismo; relação com profissão, variação hormonal, ou esforço; existência de co-morbilidades como obesidade, hipersensibilidade a aspirina e outras);
- patológica (inflamação eosinofílica, neutrofílica ou mista);
- fisiológica (obstrução persistente, baixo FEV₁);
- resposta ao tratamento;
- factores prognósticos (segundo o risco vital - asma quase fatal, asma *brittle* ou asma benigna; segundo o prognóstico a longo prazo - exacerbador frequente, DPOC, remissão da doença).

É importante ter em mente que algumas comorbilidades e agentes confundidores podem alterar a patobiologia pré-existente e dos fenótipos asmáticos. Neles se incluem: história de tabagismo, influências hormonais (gravidez, menopausa), infecções víricas e bacterianas, bem como exposições ocupacionais¹³².

Uma vez que cada fenótipo surge de diferenças nos mecanismos fisiopatológicos, e que na asma se baseia nas diferentes características celulares e moleculares, urge encontrar os diferentes endótipos implicados¹³³.

Um ponto de partida para essa definição é a identificação de biomarcadores para o respectivo mecanismo patogénico. Na revisão de Anderson¹³³, alguns fenótipos poderão traduzir endótipos específicos:

- *fenótipo alérgico* com inflamação Th2, eosinofílica, respondedora às terapêuticas com corticóides, imunoterapia, anti-IgE, anti-IL5, anti-IL-4/13;
- *fenótipo da asma intrínseca* com inflamação eosinofílica ou neutrofílica, podendo ser cortico-sensível ou resistente;
- *fenótipo da asma neutrofílica*, que se pode associar a activação da resposta imunitária inata, com recrutamento anormal de HDAC2 ou sobrevida aumentada de neutrófilos, podendo responder a terapêutica antioxidante/antibiótica, anti-TNF α , reguladores da HDAC2, com resistência à corticoterapia;
- *fenótipo de hipersensibilidade à aspirina*, com inflamação eosinofílica e alteração do metabolismo dos eicosanóides, respondendo à corticoterapia e à administração de anti-LTs;
- *fenótipo com remodelação extensa*, que exhibe pouca inflamação, podendo existir activação anormal da EMTU, anormalidades do músculo liso ou mecanismos de reparação defeituosos. Pode responder à terapêutica dirigida ao músculo liso, às metaloproteinases ou à terapêutica antiangiogénica.

Na abordagem de Wenzel¹³⁴, os três factores mais importantes para a identificação de endótipos são a identificação dos fenótipos por abordagem *cluster*, a aplicação da *'-ómica* e a avaliação da eficácia da terapêutica direccionada.

Em relação ao primeiro factor, destacam-se dois estudos, o de Moore et al.¹²³ e o de Haldar et al.²

No primeiro, que utilizou o *coorte* de doentes do estudo SARP foram identificados cinco *clusters*, três deles associados a asma grave, diferenciados principalmente pela função respiratória, uso de β -agonistas e idade de instalação da doença, com identificação de alguns novos biomarcadores de doença como a relação do FeNO com a inflamação Th2.

Os cinco *clusters* (C) de asmáticos identificados foram os seguintes:

- C1: asma alérgica ligeira, com início de doença precoce, atopia, função pulmonar normal, pouco recurso a cuidados de saúde e mínima inflamação eosinofílica;
- C2: asma leve a moderada, alérgica, caracterizado por início precoce da doença, atopia, função pulmonar no limiar da normalidade, pouco recurso a cuidados de saúde e utilização rara de CSO, com mínima inflamação eosinofílica;
- C3: asma grave de início tardio, caracterizada por doentes mais velhos, IMC mais elevado, menor grau de atopia e limitação discreta da função pulmonar (mas alguma reversibilidade), com inflamação eosinofílica, fazendo uso frequente de CSO apesar de tratamento crónico com CSI de altas doses;
- C4: asma alérgica grave, com início precoce da doença, compromisso marcado do FEV₁, mas com boa reversibilidade a valores normais, muito sintomáticos, fazendo uso variável de CSO e de cuidados de saúde, com inflamação eosinofílica;

- C5: asma grave com obstrução persistente ao fluxo aéreo, caracterizada por maior duração da doença, em doentes mais velhos, menos atópicos, com compromisso marcado da função respiratória e pouca reversibilidade, uso frequente de broncodilatadores e de recursos de cuidados de saúde, apesar de CSO, com muitas co-morbilidades, mostrando inflamação mista da via aérea.

Da análise dos cinco *clusters* identificados, destaca-se que a asma de início tardio engloba dois grupos de doentes, um deles mostrando discordância entre sintomas e obstrução da via aérea (C3) e o outro entre sintomas e inflamação eosinofílica (C5).

Relativamente ao estudo de Haldar et al.², foram analisados dois grupos de população asmática consoante o tipo de cuidados de saúde. Um grupo tratado nos cuidados de saúde primários, o outro, dada a refractariedade da doença, em cuidados diferenciados. Para o primeiro grupo foram identificados 3 *clusters* e para o segundo 4.

No grupo de doentes tratados nos cuidados de saúde primários foram definidos três *clusters* de asmáticos:

- C1: asma de início precoce, com sintomas concordantes com as alterações da função respiratória e inflamação eosinofílica, associando-se a uso frequente de cuidados de saúde e de CSO, quando comparado com os outros dois;
- C2: asma de início mais tardio, caracterizado por IMC elevado e preponderância de sintomas na ausência de inflamação eosinofílica;
- C3: asma benigna, com pouca evidência sintomática ou inflamatória da doença e pouco uso de cuidados de saúde.

No grupo de doentes tratados nos cuidados de saúde secundários (por asma refractária) identificaram-se 4 *clusters*, sendo o 1 e o 2 sobreponíveis aos C1 e C2 do grupo anterior. No entanto, os do C1 com asma refractária apresentavam maior grau de disfunção da via aérea, de sintomas e de inflamação eosinofílica.

Os *clusters* 3 e 4 foram específicos deste grupo e apresentaram marcada dissociação entre sintomas e inflamação:

- C3 foi relativo a asma de início precoce, com inflamação mínima mas muitos sintomas;
- C4, relativo a asma de início tardio, com maior prevalência do género feminino, poucos sintomas mas inflamação eosinofílica activa.

A mais-valia desta análise prende-se com a abordagem dos doentes já que, se na maioria dos doentes de cuidados de saúde primários ela pode ser orientada pelos sintomas, na população com asma refractária outras variáveis têm de ser tidas em conta.

Quanto aos endótipos, apesar de não existir ainda nenhum completamente caracterizado, foi criado o conceito de fenótipo molecular *Th2-Hi* e *Th2-Lo*, com base na diferente resposta à corticoterapia (Figura 2)¹³²:

- O *Th2-Hi* relaciona-se com atopia, reacções de HS tipo I e inflamação eosinofílica, com reposta à corticoterapia e a anti-IL5, tendo como marcador molecular a periostina. Associa-se a alguns sub-grupos: o da asma de início precoce, em crianças alérgicas e respondedoras a corticoterapia; o da asma induzida pelo esforço; o da asma de início tardio, com elevada inflamação eosinofílica a requerer elevadas doses de corticoterapia para tratamento, em que frequentemente coexiste polipose nasal e/ou sinusite, muitas vezes com elevação do FeNO.
- O *Th2-Lo*, de caracterização molecular mais deficiente, tem vários subgrupos estando melhor definido o dos obesos. Este caracteriza-se pela menor probabilidade de atopia, predomínio do sexo feminino e melhoria sintomática com perda de peso. Alguns mecanismos fisiopatológicos apontados prendem-se com o balanço adiponectina/leptina, com a síndrome metabólica e com o aumento do *stress* oxidativo, tendo-se recentemente identificado um possível biomarcador, a dimetilarginina assimétrica (ADMA- *Asymmetric dimethyl arginine*).

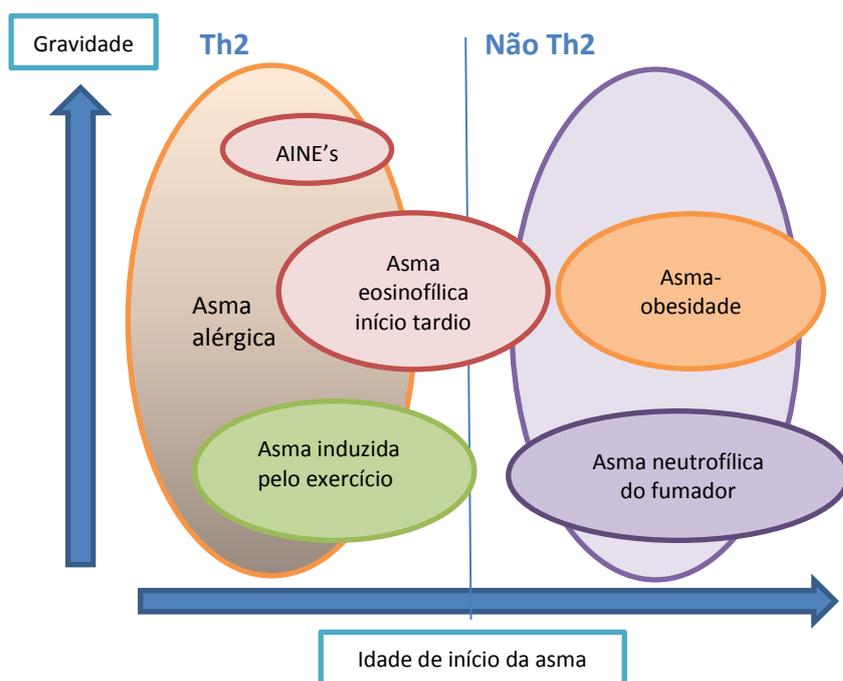


Figura 2 – Agrupamento teórico de fenótipos asmáticos emergentes, baseados na distinção Th2.
Adaptado de Wenzel¹³²

1.8.1 Endótipo asma grave. Existe?

A heterogeneidade de apresentação dos doentes graves é reconhecida, parecendo não haver estabilidade dessa gravidade, que pode variar no decurso da doença.

Três grandes estudos são de particular interesse para o conhecimento do fenótipo de asma grave: o ENFUMOSA¹³⁵, o TENOR¹³⁶ e o SARP⁹⁰:

- O estudo europeu ENFUMOSA, que incluiu 163 asmáticos graves e 152 ligeiros a moderados¹³⁵, encontrou associação da asma grave ou de difícil tratamento com maior prevalência do género feminino (4:1) (que tinham IMC mais elevado), menor grau de atopia e de reversibilidade brônquica, FEV₁ inferior, maior *air trapping* e neutrofilia da expectoração. Identificou como factor de risco para a gravidade a sensibilidade à aspirina.
- O estudo TENOR (estudo multicêntrico norte-americano que incluiu 4756 doentes)¹³⁶, destacou o achado da correlação positiva da IgE com a gravidade da asma (que se verificou apenas nas crianças e adolescentes, mas não nos adultos, apesar do seu papel na maioria dos doentes com asma de difícil tratamento).
- O estudo SARP (estudo americano que incluiu 204 doentes, provindos de centros dos EUA e de um centro do RU)⁹⁰, verificou que os doentes graves tinham maior duração da doença, eram mais velhos, mais sintomáticos e faziam maior uso de cuidados de saúde urgentes. Eram também menos atópicos mas tinham maior prevalência de RGE, sensibilidade à aspirina e doença sinopulmonar. Apresentavam menor reversibilidade da obstrução brônquica tendo sido identificados como factores de risco para gravidade o baixo FEV₁, a história de pneumonia, a menor percentagem de eosinófilos no sangue e a menor positividade nos testes de alergia. Na sub-análise que usou como discriminador a idade de início da doença (12 anos como *cut-off*), os com asma grave de início tardio mostraram ter pior função respiratória com menor resposta à BD, história mais frequente de doença sinusal e de pneumonia. Em relação ao uso de CSO, 54% reportaram uso de pelo menos 3 ciclos por ano e pelo menos uma visita ao SU por asma.

Prolongando dados do estudo ENFUMOSA, a rede de trabalho BIOAIR classificou criticamente um *coorte* de doentes graves com o objectivo de os comparar com não graves. Constatou que os graves eram mais velhos, com início de doença mais tardio, IMC mais elevado, pior função pulmonar, pior controlo dos sintomas e pior qualidade de vida⁹³.

A importância dos trabalhos deste consórcio vem dos projectos ainda em desenvolvimento, nomeadamente no que diz respeito à identificação de biomarcadores como a periostina e os mediadores lipídicos.

Dependendo desses e doutros trabalhos, a questão ainda não respondida sobre a existência do endótipo da asma grave, poderá então ficar definida.

I.9 NOVOS MÉTODOS PARA IDENTIFICAR FENÓTIPOS

Actualmente, os procedimentos não invasivos para avaliar a inflamação na asma incluem a colheita de expectoração induzida, de ar exalado, de sangue periférico e de urina. Os biomarcadores de inflamação podem ser usados como indicadores de gravidade da doença ou como marcador de determinado fenótipo. Actualmente, os mais bem estudados e utilizados na

prática clínica são o FeNO e as características da expectoração induzida. Em relação às características da expectoração, a eosinofilia tem sido proposta como marcador de resposta à corticoterapia na asma moderada. Quando combinada com neutrofilia, relaciona-se, nos asmáticos graves, com pior função respiratória, pior controlo da doença e aumento do consumo de cuidados de saúde¹³⁷. O estudo da expectoração permite a fenotipagem celular em doentes com perfil celular eosinofílico, neutrofílico, paucigranulocítico e granulocítico misto¹³⁸. Apesar de não ser clara a associação de qualquer um deles com a gravidade, vários estudos têm reportado um padrão granulocítico misto nessa forma de doença^{137, 139}. Outros biomarcadores da asma grave já identificados estão relacionados com o *stress* oxidativo de nitrosaminas¹⁴⁰ e com a peroxidação lipídica, como por exemplo o 8-isoprostano, que se encontra aumentado na expectoração dos asmáticos graves¹⁴¹, e os aldeídos e alcanos alifáticos, aumentados na urina de doentes asmáticos em estado de exacerbação⁷⁴.

Em relação aos métodos mais invasivos, no estudo do infiltrado inflamatório de biópsias brônquicas de asmáticos graves e não graves, apesar de não se terem encontrado diferenças significativas, notou-se aumento da fibrose subepitelial e do músculo liso nos graves, que se relacionou com a HRB e com a menor resposta broncodilatadora. O estudo do lavado broncoalveolar (LBA) desses graves identificou aumento dos neutrófilos¹⁴².

Apesar de alguns avanços, as dificuldades clínicas em avaliar de forma concreta a inflamação na asma, têm levado ao desenvolvimento de novos sistemas biológicos de abordagem, com o objectivo de adquirir informação em larga-escala, fazendo uso de técnicas complexas de processamento e análise de dados recolhidos de vários tipos de amostras. De forma geral, a comunidade científica tem-se focado na investigação de biomarcadores não invasivos. As iniciativas actuais, no que diz respeito ao estudo da asma grave, resultaram em consórcios, nomeadamente o U-BIOPRED, com o objectivo de integrar dados da 'ómica. Este consórcio insere-se noutro projecto mais alargado, o AirPROM (*Airway Disease Predicting Outcomes through Patient Specific Computational Modelling*), que integra dados provenientes da fisiologia, radiologia, bioengenharia, harmonização de dados e modelação computacional.

Assim, para compreender a complexidade dos endótipos da asma, estão actualmente propostos novos métodos sofisticados utilizando diferentes amostras, como a metabolómica (estudo das moléculas de baixo peso molecular (<1500 amu) presentes num compartimento biológico, num estado fisiológico específico e em determinadas circunstâncias)¹⁴³.

Das diversas técnicas de abordagem usadas por estas novas ciências, destaca-se a espectrometria de massa, técnica mais sensível de abordagem metabolómica, utilizando diferentes métodos de separação e ionização. Tem como vantagem a grande sensibilidade mas é muito dispendiosa em tempo e em experiência. Foi já utilizada na asma fazendo uso da análise do condensado do ar exalado¹⁴⁴ e da urina^{74,75}.

Sumariamos no *Quadro V* as vantagens e desvantagens das várias matrizes utilizadas para o estudo da asma, segundo Wheelock et al.¹⁴³

Quadro V – Vantagens e desvantagens das matrizes utilizadas para o estudo da asma. Adaptado de Wheelock et al¹⁴³.

Amostra	Vantagens	Desvantagens
Condensado do ar exalado	Não invasivo e seguro. Podem estudar-se compostos não-voláteis e a espectroscopia por NMR já foi validada.	Potencial variabilidade, com difícil normalização das amostras, sendo a amostra representativa de toda a via aérea. Poucas proteínas presentes.
Expectoração induzida	Fluido natural com matriz complexa.	Difícil normalização das amostras podendo o uso de substâncias redutoras afectar a análise; possível contaminação por saliva; grandes quantidades de mucina afectam resultados da proteómica.
Urina	Não invasivo, barato, fácil colheita e uso em estudos longitudinais. Ideal para eicosanóides.	Pode haver <i>bias</i> sistémicos dada a distância ao órgão alvo; pode ser afectada por doença renal ou hepática.
Sangue	Minimamente invasivo, fácil colheita, muito usado em proteómica e lipidómica. Contem muitos alvos potenciais.	Distante do órgão de interesse podendo traduzir alterações sistémicas. Grande amplitude de conteúdo protéico (10 ordens de magnitude). Composição lipídica dominada por lipoproteínas pode mascarar resultados.
LBA	Colectado de local específico com matriz complexa.	Elevado conteúdo salino com dificuldade na normalização. Pouco tolerado. Possível <i>bias</i> em doentes com doença inflamatória.
Biópsia pulmonar	Reflecte alterações locais, essencial para análise transcriptómica. Proteoma complexo. Pode ser combinada com análise imunohistoquímica.	Difícil obtenção, contém muitos tipos celulares. Homogeneização do tecido pode ser difícil.

LBA: Lavado broncoalveolar; NMR: Nuclear Magnetic Resonance

Quanto aos resultados até agora obtidos com o uso destas ciências¹⁴³, resumem-se os seguintes:

- **Transcriptómica:** confirmaram a presença de diferentes subtipos de asmáticos com base na expressão de citocinas Th2, podendo ser útil na previsão de resposta à corticoterapia, sendo que o fenótipo *Th2-Hi* responde melhor e se relaciona com alguns marcadores de remodelação⁸³. Níveis elevados de periostina em doentes com *Th2-Hi* mostraram distinguir asmáticos graves que respondem a terapêutica com anti-IL-13¹⁴⁵.
- **Proteómica:** mais utilizada para a DPOC, não forneceu até ao momento dados na asma.
- **Lipidómica:** os lípidos constituem 90% do surfactante pulmonar, podendo ter grande papel na doença respiratória. Em relação à patologia asmática demonstrou-se: aumento da esfingosina-1-fosfato em doentes asmáticos após desafio alérgico; polimorfismos do regulador da síntese dos esfingolípido associados à asma grave da criança¹⁴⁶; aumento dos eicosanóides, produzidos nos processos auto-oxidativos do ácido araquidónico e facilmente doseáveis na urina, com reprodução para os níveis pulmonares, relacionados com as exacerbações asmáticas¹⁴⁷; aumento da concentração urinária das prostaglandinas após

exposição alérgica nos asmáticos¹⁴⁸; aumento dos LTs, usados como biomarcadores de gravidade da doença¹⁴⁹.

- **Metabolómica:** foram identificados 70 metabolitos urinários discriminantes de asmáticos¹⁵⁰ e 23 metabolitos derivados do ciclo de ácido cítrico (CAC) discriminantes de asmáticos Vs controlos¹⁵¹. Como biomarcadores de exacerbação foram recentemente encontrados níveis elevados de vários aldeídos e alcanos (produtos de peroxidação de ácidos gordos relacionados com o *stress* oxidativo), bem como outros compostos não voláteis (citrato e alanina, relacionados com o CAC)⁷⁴.
- **Breathomica:** o perfil dos compostos voláteis no ar exalado foi associado com a inflamação eosinofílica e neutrofílica na asma, podendo ser útil na subfenotipagem não invasiva destes doentes. A determinação do pH, da adenosina e dos eicosanóides, no condensado do ar exalado, pode fornecer informação para o entendimento da patobiologia da asma, havendo já identificação de sinais discriminatórios entre asma e DPOC¹⁵².

Apesar do recente e exponencial crescimento no uso da *‘-ómica* para compreender os mecanismos da asma, a integração na prática clínica destes resultados ainda necessita de validação.

II.

INVESTIGAÇÃO REALIZADA
FACE AOS OBJECTIVOS



II.1 OBJECTIVOS GERAIS

A asma ligeira a moderada é um problema de saúde global que, na grande maioria dos casos, pode ser controlada com uso de medicação. No entanto, em 7 a 10% dos asmáticos a situação pode ser grave² e responsável por grande impacto socio-económico, sendo de difícil abordagem.

Dada a falta de uniformidade na sua classificação, torna-se notória a insuficiência da actual metodologia de abordagem diagnóstica *perfil-orientada*, não sendo conhecido até ao momento qualquer biomarcador fidedigno de gravidade.

A abordagem aos diferentes fenótipos tem sido feita por várias metodologias, nomeadamente pela análise *cluster* reportada na literatura internacional, faltando, no entanto, informação que suporte os mecanismos patológicos subjacentes. Assim, encontrar biomarcadores capazes de ajudar na caracterização dos respectivos endótipos poderá fornecer informação valiosa na abordagem diagnóstica e terapêutica.

Até ao momento, não foram realizados estudos dirigidos à nosologia portuguesa da asma na população portuguesa, estando carente a caracterização fenotípica/endotípica dos nossos doentes asmáticos.

Para além da metodologia *cluster*, terá com certeza importância para esse estudo o uso de técnicas diferenciadas como a análise da expectoração induzida e outras mais inovadoras como a metabolómica.

A contagem de células na expectoração tem sido usada para encontrar biomarcadores celulares dos fenótipos da asma, podendo ser capaz de discriminar inflamação eosinofílica da não eosinofílica localizada à via aérea, com valor na monitorização terapêutica dos doentes. O uso associado da citometria de fluxo pode identificar outras células discriminativas¹⁵³.

Tecnologias como a metabolómica têm surgido na investigação de potenciais biomarcadores, com aplicação nos vários tipos de amostras colectáveis, sendo a urina um dos biofluidos mais informativos¹⁵⁴, colhida de forma não invasiva, tornando-se particularmente útil em situações de instabilidade clínica ou em doentes pouco colaborantes.

Vários estudos de metabolómica conduzidos para melhor perceber a asma têm reportado o seu papel nesta vertente, nomeadamente direccionado ao *stress oxidativo*, com uso de técnicas como a microextração em fase sólida (SPME- *solid phase microextraction*) combinada com análise bidimensional por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa por tempo de voo (GC × GC-ToFMS)^{74,75, 144}.

Neste contexto, a presente investigação foi desenhada com os seguintes objectivos:

1. Caracterizar clinicamente uma população portuguesa de asmáticos, com enfoque nos graves, suportada em parâmetros funcionais respiratórios e laboratoriais imunoinflamatórios, correlacionando-os.
2. Identificar fenótipos celulares da expectoração e correlacioná-los com os parâmetros avaliados.
3. Identificar factores de risco/protecção para a ocorrência de fenótipos clínicos.
4. Distinguir *clusters* de asmáticos.
5. Determinar a relevância da metabolómica na identificação de biomarcadores urinários de gravidade e na distinção de *clusters*.
6. Correlacionar características clínicas de gravidade e *clusters* identificados com biomarcadores urinários de peroxidação lipídica.

II.2 MÉTODOS

II.2.1 Sujeitos e critérios de selecção

O cálculo da dimensão da amostra foi feito com base numa amostragem simples para a proporção de asmáticos graves (variando entre 5% e 10 %) ¹⁵⁵ e não graves ¹⁵⁶. Foi obtido o intervalo de valores [292; 552] para um erro amostral de 2.5% e para um erro tipo 1 de 5% (alfa=0.05). Perante este intervalo, tivemos em conta o Teorema do Limite Central ¹⁵⁷, que, como regra prática, determina que para constituir uma amostra são necessárias pelo menos 10 observações se a distribuição de probabilidade original for simétrica e, pelo menos 50, se a distribuição original for muito assimétrica. O valor de 30 observações surge como um valor empírico de compromisso entre os dois anteriores ¹⁵⁸.

Assim, foram recrutados consecutivamente e até se obterem 100 doentes com asma, da Consulta Externa dos Serviços de Pneumologia (Consulta de Pneumologia Geral e Asma grave) e de Alergologia, do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra - Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC).

O recrutamento foi feito em privado, com disponibilização de material informativo e os doentes foram incluídos após fornecimento de consentimento informado, aprovado pelo Conselho de Ética do mesmo hospital.

Foram seleccionados se preenchessem os seguintes dois critérios:

- Género feminino ou masculino com idade ≥ 18 e < 80 anos;
- Diagnóstico clínico de asma.

Foram excluídos na presença de um dos seguintes critérios:

- História de fibrose quística, doença intersticial ou neoplásica do pulmão conhecida, doença auto-imune, insuficiência cardíaca não tratada, insuficiência renal ou hepática;
- Incapacidade mental ou legal.

II.2.2 Desenho do estudo

O estudo foi prospectivo e de *coorte*, tendo-se estabelecido um protocolo com pelo menos 3 visitas médicas (V0, V1 e V2), com um intervalo mínimo de 2 meses entre cada uma delas. A colheita de dados foi feita, pelo investigador principal, usando uma folha de registo no momento das visitas programadas, tendo-os depois introduzido numa base de dados, usando um programa estatístico devidamente bloqueado com uma palavra-passe.

II.2.2.1 Protocolo de visitas

O protocolo esquematiza-se no *Quadro VI* onde constam as visitas e os procedimentos preconizados (realizados no decorrer do ano de 2012):

- **Visita 0 (V0), *pre-screening*:** teve como objectivo obter o consentimento informado do doente, instruí-lo para a visita de *screening* com educação sobre a natureza da doença, otimizar a técnica inalatória e confirmar a adesão terapêutica. Serviu ainda para a colheita de história clínica detalhada com preenchimento de inquéritos, para a realização do exame físico e para a primeira avaliação da função respiratória com espirometria e prova de BD. A folha de registo de dados incluía: dados demográficos, anos de doença, idade de início de doença, história de pneumonia, factores de agravamento da doença (gravidez, menopausa, e exposição tabágica), medicação habitual (respiratória e outra, nomeadamente IECA's, β -bloqueantes, terapêutica hormonal) e presença de comorbilidades conhecidas (atopia, obesidade, rinossinusite, polipose nasal, sensibilização a fungos, alergia alimentar, hipersensibilidade a AINE's, depressão/ansiedade, SAOS, DPOC, RGE, DCV). As exacerbações graves foram definidas como eventos que requereram acção urgente, incluindo pelo menos um dos seguintes: uso de CSO ou aumento da dose de manutenção por pelo menos 3 dias consecutivos, hospitalização ou visita ao SU por asma requerendo CSs para tratamento⁹⁵. O risco de eventos futuros foi avaliado com base na perda de controlo, no número de exacerbações no último ano, no número de ciclos de CSO no último ano, no declínio da função pulmonar (tendo em conta o valor de FEV₁ pré-BD e a ausência de reversibilidade brônquica) e nos efeitos secundários do tratamento^{159, 95}.

- **Visita 1 (V1), screening:** teve como objectivo estabelecer a elegibilidade dos doentes a prosseguir o estudo e, novamente, otimizar a técnica inalatória e confirmar a adesão terapêutica. O diagnóstico de asma foi confirmado por história clínica com sintomatologia relevante e um dos seguintes: reversibilidade da via aérea com salbutamol, de acordo com os critérios GINA¹⁶⁰ ou teste de hipereactividade brônquica positivo, definido com base na diminuição de 20% do FEV₁ com dose provocatória de metacolina < 8 µmol¹⁶¹.
A visita serviu ainda para realizar testes cutâneos de alergia (TCA) por picada, avaliar a função respiratória com espirometria e pletismografia, medir o FeNO e programar procedimentos seguintes como a avaliação analítica e as colheitas de expectoração induzida e de urina.
- **Visita 2 (V2):** teve como objectivo colher os dados/amostras dos procedimentos efectuados que, com excepção da colheita da urina para análise metabólica, não diferiram da abordagem *standard* dos doentes asmáticos da nossa consulta de Asma grave. Incluíram-se a colheita de dados analíticos e da avaliação funcional com pletismografia e da medição do FeNO, e recolha da expectoração induzida e de urina.
- **Visita 3 (V3):** apenas realizada havendo necessidade de realizar outros exames complementares de diagnóstico, como os dirigidos à investigação de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), bronquiectasias (BQ) ou enfisema (realização de tomografia axial computadorizada de alta resolução- (TAC-AR)) e DCV (laringoscopia).

Quadro VI – Folha protocolar – visitas e procedimentos (para o tratamento de dados utilizaram-se os colhidos em V2)

Procedimentos	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses ¹
	Visita 0	Visita 1	Visita 2	Visita 3
Consentimento informado escrito	X			
História clínica	X			
Avaliação clínica	X	X	X	X
Questionários de controlo e gravidade de asma e qualidade de vida (ACT, CARAT, SOA, ALQ)	X	X	X	X
Espirometria	X	X	X	X
Prova de BD	X	X	X	X
Prova de provocação brônquica com metacolina (quando necessário)		X		
Pletismografia		X	X	X
Medição de FeNO		X	X	X
TCA		X		
Hemograma, leucograma, IgE total/específica, bioquímica, α1-AT)			X	
Colheita de expectoração induzida			X	
Colheita de amostra de urina			X	

Quadro VI (continuação) – Folha protocolar – visitas e procedimentos

Procedimentos	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses
	Visita 0	Visita 1	Visita 2	Visita 3
TAC ¹				X
Broncofibroscopia LBA; biópsia brônquica) ¹				X

¹Em situações de asma de difícil controlo ou com apresentação atípica (produção excessiva de muco, declínio rápido da função, diminuição da DLCO). α 1-AT: α 1-antitripsina; BD: broncodilatação; ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide* LBA: lavado broncoalveolar; SOA: *Severity of Asthma Score*; TCA: testes cutâneos de alergia

II.2.2.2. Questionários

O controlo da asma foi avaliado após tratamento otimizado segundo as *guidelines* GINA³, utilizando questionários de auto-preenchimento validados em versão portuguesa: o ACT e o *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test* (CARAT).

A qualidade de vida foi avaliada com o questionário *Asthma Life Quality Questionnaire* (ALQ)¹⁶². Este questionário compreende 20 questões de resposta dicotómica sim/não e avalia seis dimensões do impacto da asma na vida do doente: actividade diária e sono, sintomas, desencadeantes, recurso a cuidados de saúde não programados, medicação e impacto psicológico. Pontua-se de 0 a 20, sendo tanto pior quanto maior a soma atingida.

Para avaliação da gravidade, optou-se pela utilização do questionário *Severity of Asthma Score* (SOA)⁹⁴. Este questionário foi desenhado para avaliar o risco de eventos adversos em doentes com asma moderada a grave, incluindo 13 questões que abrangem os seguintes pontos: frequência dos sintomas de asma, uso de corticóides sistémicos, uso de outros fármacos anti-asmáticos, história de hospitalização/entubação por asma.

II.2.2.3. Procedimentos

Com excepção das análises das amostras de urina e da expectoração induzida, todos os procedimentos foram realizados no nosso Hospital.

- A atopia foi avaliada com uso de TCA realizados para os aeroalergenos comuns, usando a bateria GA²LEN¹⁶³ e/ou o doseamento de IgE específicas (ImmunoCAP, Phadia®, Uppsala, Sweden), em combinação com os sintomas alérgicos.
- Foram realizadas no sangue periférico, e de acordo com as normas dos Laboratórios de Patologia Clínica e de Imunologia, as seguintes análises sanguíneas: hemograma com leucograma, bioquímica com função renal e hepática; doseamento de IgE total; doseamento de α -1 antitripsina (AT); doseamento de IgE específicas (ImmunoCAP, Phadia®, Uppsala, Sweden) aos alergenos positivos detectados nos testes cutâneos, ou a outros se

cl clinicamente justificável; IgE e IgG *para Aspergillus fumigatus* se IgE total >500 UI/ml ou se clinicamente justificável.

- A espirometria foi realizada de acordo com os critérios ATS¹⁶⁴.
- A função respiratória alargada foi avaliada por pletismografia segundo os critérios ATS¹⁶⁵. Os valores pré-BD foram medidos após suspensão de LABA por mais de 12 horas e de BACA por mais de 6 horas. Definiu-se obstrução persistente quando a relação FEV₁/FVC pós BD ≤70%, mantida após tratamento de pelo menos 4 semanas, com CSI em dose de 1000 µg de PF ou equivalente, durante fase de estabilidade¹⁵⁹.
- O FeNO foi medido usando um analisador CLD 88 SP (EcoMedics®) antes de qualquer manobra de expiração forçada, de acordo com as *guidelines* existentes¹⁶⁶.
- A colheita da expectoração foi induzida nos doentes estáveis, por uma enfermeira treinada, usando solução salina hipertónica de 4,5% de acordo com o procedimento descrito na literatura¹⁶⁷.

A análise da amostra foi realizada de acordo com os procedimentos do laboratório do Centro de Histocompatibilidade de Coimbra: para o processamento da expectoração induzida, as amostras foram colhidas para um frasco estéril e armazenadas em gelo até ao processamento, que se realizou num prazo de 2 horas após a colheita. O estudo imunofenotípico das células da expectoração foi realizado por citometria de fluxo de forma a identificar as subpopulações leucocitárias de acordo com a *Figura 3*.

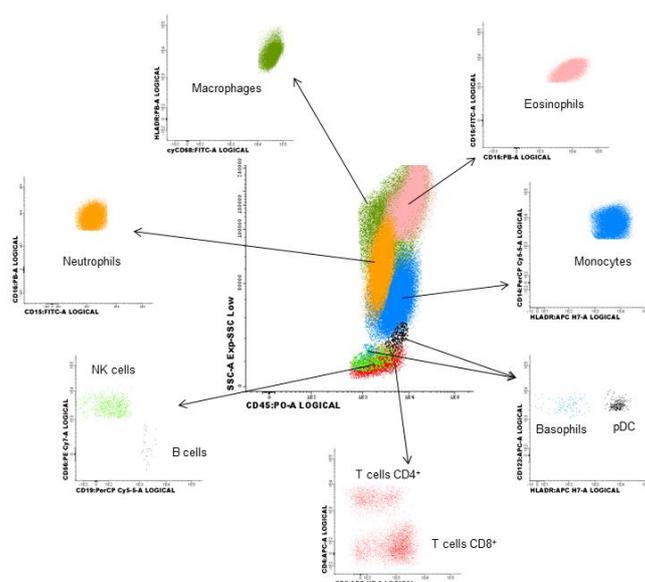


Figura 3 – Estudo imunofenotípico das células da expectoração. Estratégia de citometria de fluxo para identificar as subpopulações leucocitárias presentes nas amostras de expectoração induzida.

Para a categorização do fenótipo da expectoração, considerámos os seguintes valores de *cut-off*: para fenótipo celular eosinófilico, eosinófilos $\geq 2\%$; para fenótipo celular neutrofílico, $\geq 60\%$ de neutrófilos. O fenótipo misto foi definido quando essas duas condições ocorreram em conjunto, e o paucigranulocítico, quando nenhuma delas estava presente^{168, 169}.

- A colheita de urina foi feita por cada um dos doentes, para um recipiente estéril, e colocada em congelador a -20°C , por um período máximo de 2 horas, com posterior armazenamento em arca de congelação a -80°C . O tempo de armazenamento antes de análise espectral, não ultrapassou os 3 meses.
A colheita foi feita a hora variável do dia, não tendo havido restrições dietéticas ou farmacológicas (por estas condições serem mais representativas da situação de vida real).
- A TAC torácica de alta resolução (TAC-AR) foi realizada na Clínica Universitária de Radiologia dos HUC, de acordo com a justificação clínica: sempre que foi necessário avaliar o compromisso da via aérea, comorbilidades como bronquiectasias e enfisema pulmonar, ou para exclusão de outros diagnósticos diferenciais.
- A laringoscopia foi realizada no Serviço de Otorrinolaringologia dos HUC onde os doentes foram enviados quando se suspeitou clinicamente de DCV.
- A broncofibroscopia, apenas nos casos em que houve necessidade de excluir outros diagnósticos, nomeadamente patologia intersticial, foi realizada no Serviço de Pneumologia dos HUC.
- A análise metabolómica da urina foi realizada no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, sob a supervisão da Sra. Prof^a. Doutora Sílvia Rocha, coordenadora do projecto ASMA - Gestão futura da asma apoiada por amostragem não invasiva: contributos para a definição de um meio diagnóstico rápido e não invasivo (PTDC/QUI-QUI/117803/2010).
A técnica usada foi a de microextração em fase sólida, combinada com a cromatografia gasosa bidimensional associada a espectrometria de massa por tempo de voo.
Antes da análise cromatográfica, cada amostra foi descongelada e o pH ajustado para 2.0, com HCl 6M (J. T. Baker, Phillipsburg, USA, 95-98%), para aumentar a eficiência da extração dos metabolitos. Procedeu-se então à análise por SPME seguida de GC \times GC-ToFMS. Os parâmetros experimentais da SPME, usados para extrair os metabolitos, e as condições da GC \times GC – ToFMS foram previamente reportadas por Rocha et al.¹⁷⁰ Cada amostra foi analisada em triplicado.

II.2.2.4 Metodologia para a construção de modelos de predição de risco para fenótipos clínicos asmáticos

Foram escolhidos para análise os seguintes fenótipos: atopia, idade de início da doença após os 12 anos de idade, HS a AINE's, obesidade ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$), obstrução persistente da via aérea e grave (segundo a classificação WHO⁵).

De forma a identificar as características clínicas, funcionais e laboratoriais que mais contribuíram para a sua distinção, e com o objectivo de encontrar factores de risco/protecção específicos de cada fenótipo, foram construídos modelos de regressão logística.

Nesses modelos, definiram-se como covariantes as variáveis demográficas género e idade. Incluíram-se como variáveis independentes: as relacionadas com a gravidade; as características da doença; o controlo, a qualidade de vida e o risco de eventos futuros; a função respiratória; terapêutica usada e os biomarcadores. (*Quadro VII*).

Foram tidos como significativos valores com $p < 0.05$.

Quadro VII – Variáveis independentes usadas nos modelos de regressão

Variáveis independentes usadas nos modelos de regressão	
Classificação de gravidade	WHO ⁵ ; ATS/ERS, 2000 ⁴
Características da doença	<ul style="list-style-type: none"> • início da doença antes dos 12 anos de idade; • anos de evolução da doença; • presença de comorbilidades; • história de pneumonia; • tipo de comorbilidades (atopia, tipo de alergia, $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$, rinite, polipose nasal, sinusite, exposição tabágica, depressão, ansiedade, SAOS, RGE, déficite de $\alpha 1\text{-AT}$, bronquiectasias, DPOC, sensibilização a <i>Aspergillus fumigattus</i>.
Controlo e qualidade de vida, risco de eventos futuros	<ul style="list-style-type: none"> • controlo da doença (sim/não); • doente em risco; • scores de controlo da asma (ACT, CARAT (Rinite), CARAT (Asma), ALQ, SOA); • exacerbação grave no último ano; hospitalização no último ano.
Função respiratória	<ul style="list-style-type: none"> • Reversibilidade brônquica • Obstrução persistente • FEV₁ basal; (Δ) FEV₁ pós-BD • FEV₁/FVC basal; (Δ) FEV₁/FVC pós-BD; • FEV₂₅₋₇₅ basal; (Δ) FEV₂₅₋₇₅ pós-BD; • VR basal; (Δ) VR pós-BD; • DLCO.

Quadro VII (continuação) – Variáveis independentes usadas nos modelos de regressão

Variáveis independentes usadas nos modelos de regressão	
Terapêutica usada	<ul style="list-style-type: none"> dose de CSI (> 750 µg de PF ou equivalente, ≤ 750 µg de PF ou equivalente); grau GINA de tratamento (<i>step</i> ≥ 4, < 4).
Biomarcadores	<ul style="list-style-type: none"> FeNO (≥ 35; < 35 ppb); eosinofilia sangue periférico (%) e unidades Log; IgE sérica (mmol/L) e unidades Log; percentagens de eosinófilos e de neutrófilos na expectoração; categoria de fenótipo inflamatório da expectoração.

α1-AT: α1-antitripsina; ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; CSI: corticóide inalada; FVC: forced vital capacity; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crónica; DLCO: difusão livre de monóxido de carbono; ERS: *European Respiratory Society*; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced Vital Capacity*; GINA: *Global Initiative for Asthma*; IMC: Índice de massa corporal; PF: propionato de fluticasona; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: Síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score*; TCA: testes cutâneos de alergia; VR: Volume Residual; WHO: *World Health Organization*

II.2.2.5 Metodologia para análise *cluster*

A nossa abordagem para identificação dos diferentes grupos da amostra em estudo foi feita de forma não supervisionada, utilizando a análise *cluster*, não sendo conhecidos estudos semelhantes na população portuguesa.

A escolha das variáveis teve como base as utilizadas nos modelos de regressão atrás referidos, (descritas no *Quadro VII*), e as dos estudos de Haldar et al.² e de Moore et al.¹²³.

Estão discriminadas no *Quadro VIII*.

Quadro VIII – Variáveis contínuas, binárias e compostas, seleccionadas para a análise *cluster*¹⁷¹ (baseada em Haldar et al.² Moore et al.¹²³).

Número	Variável	Tipo de variável	Chave
Demografia e comorbilidades - Dados de questionário			
1	Género	Binária	Feminino/Masculino
2	Idade	Contínua	
3	IMC	Contínua	
4	Início antes 12 A	Binária	Sim/não
5	Anos de doença	Contínua	
6	Comorbilidades	Composta: Atopia; Rinite; Polipose; Sinusite; Qualquer exposição tabágica; História de pneumonia; HS AINE's; RGE; Defice α1-AT; Bronquiectasias; DPOC; Outra doença obstrutiva; Aspergillus (IgE positiva)	Presença:1 Ausência:0 Mínimo: 0 Maximo: 13

Quadro VIII (continuação) – Variáveis contínuas, binárias e compostas, seleccionadas para a análise cluster¹⁷¹ (baseada em Haldar et al.² Moore et al.¹²³).

Número	Variável	Tipo de variável	Chave
Controlo e gravidade da doença, risco de eventos adversos, qualidade de vida			
7	Controlo da doença e doente em risco	Composta: Hospitalização (último ano); Exacerbação grave (último ano); Controlo da doença; percentagem de doentes em risco; uso de CSO	Presença:1 Ausência:0 Mínimo: 0 Maximo: 5
8	Medicação usada	Composta: Imunoterapia; Dose CSI; BALA; Tiotropio; Montelukaste; Omalizumabe; Aminofilina; CS nasal	Presença:1 Ausência:0 Mínimo: 0 Maximo: 8
9	Alergias	Composta: Ácaros; Pólenes; Fungos; Barata; Fâneros	Presença:1 Ausência:0 Mínimo: 0 Maximo: 5
10	Risco de eventos adversos	Ordinal/contínua: Nº de hospitalizações>0; Nº de CSO ≥2; FEV ₁ pré BD <80%; ΔFEV1 pós BD <200 ml ou <12% do previsto; Efeitos adversos da medicação (1 se CSI de altas doses ou omalizumabe=sim)	Mínimo: 0 Maximo:5
11	SOA	Contínua	
12	ACT	Contínua	
13	CARAT (Rinite)	Contínua	
14	CARAT (Asma)	Contínua	
15	ALQ	Contínua	
Função pulmonary			
16	Labilidade brônquica	Composta: Obstrução persistente; Reversibilidade brônquica; Obstrução persistente apesar de BD positiva	Presença:1 Ausência:0 Mínimo: 0 Maximo: 3
17	FEV₁ basal (%)	Contínua	
18	FEV₁/FVC basal (%)	Contínua	
19	FEV₂₅₋₇₅ basal (%)	Contínua	
20	VR basal (%)	Contínua	
Biomarcadores			
21	Eosinófilos no sangue (%)	Contínua	Escala log
22	IgE sérica (mmol/L)	Contínua	Escala log

α1-AT: α1-antitripsina; ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; BALA: broncodilatadores de longa acção; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticóide inalado; CS: corticóide; CSO: corticóide oral; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crónica; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced Vital Capacity*; HS AINE's: hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteróides; Ig: Immunoglobulina; Log: logarítmica; RGE: refluxo gastro-esofágico; SOA: *Severity of Asthma Score*; TCA: testes cutâneos de alergia; VR: volume residual

As variáveis compostas foram construídas através da soma das características presentes (codificadas com o valor 1) para cada indivíduo. As variáveis redundantes que apresentavam

grande dependência entre si (com valores de correlação acima dos 0.9 em módulo), foram excluídas usando-se, para isso, análise de correlação pelo Teste de Spearman, como descrito na metodologia usada por Moore et al.¹²³.

Foram também excluídos os indivíduos que tinham valores em falta nas variáveis consideradas.

O método de *clusters* utilizado para a análise das variáveis apresentadas no *Quadro VIII* foi o método de Ward, que minimiza a variância entre os diferentes *clusters*. A medida de distância entre os elementos dos *clusters* foi o quadrado da distância Euclidiana (*Squared Euclidean distance*) e os valores das diferentes variáveis utilizadas foram estandardizados em scores *z* (*standardize z scores*) de forma a garantir que todas as escalas tivessem um peso semelhante na análise dos *clusters*. O mesmo procedimento foi utilizado por Haldar et al.² e Moore et al.¹²³ Como as variáveis quantitativas devem obedecer a distribuição normal, os biomarcadores IgE sérica e percentagem de eosinófilos no sangue foram transformados na forma logarítmica para se aproximarem dessa distribuição, como descrito por Haldar et al.²

Para estimar o número óptimo de *clusters* utilizámos o dendograma e o gráfico de aglomeração. Para além disso, comparámos as soluções obtidas pelo método Ward com as obtidas por um outro método de análise *cluster*, o método em dois-passos (*two-step cluster*), mais apropriado para variáveis quantitativas e qualitativas em simultâneo. Soluções com 4, 5 e 6 *clusters* foram analisadas, por ambos os métodos.

II.2.2.6 Análise estatística

Tratamento de dados da amostra global

A análise estatística foi feita com uso do programa de Software SPSS®, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Em todos os testes estatísticos foram considerados estatisticamente significativos os valores com *p* inferiores a 0.05.

As variáveis categóricas foram descritas com as frequências relativas e absolutas; as variáveis contínuas (quantitativas) foram reportadas segundo as suas médias e desvio padrão (SD – *standard deviation*), incluindo o número total dos valores válidos.

A comparação das variáveis quantitativas entre grupos foi baseada no uso do teste independente t-teste (t) e no teste de Mann-Whitney (U), quando o pressuposto da normalidade não foi validado ou quando a amostra foi de pequena dimensão.

Para a comparação de variáveis qualitativas foi usado o teste Chi-quadrado (χ^2) para tabelas de contingência e o teste exacto de Fisher, quando os pressupostos do teste do χ^2 não foram validados (se 20% ou mais células da tabela de contingência tinham frequência esperada inferior a 5).

Verificação de concordância entre escalas de gravidade

Para verificar a concordância entre as escalas de gravidade ATS/ERS, 2000⁴ e WHO⁵, na atribuição do grau de gravidade (grave ou não grave), foi utilizado o valor do Kappa de Cohen (com valores no intervalo [0;1], sendo que para 0 não há concordância e para 1 a concordância é perfeita) e a percentagem de concordância (através do número de casos favoráveis sobre os casos totais).

Tratamento de dados resultantes do estudo da expectoração induzida

Na análise estatística dos resultados da expectoração induzida, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA- *Analysis of variance*) de um fator de amostras independentes (quando os pressupostos da normalidade dos resíduos e da homogeneidade da variância foram validados) ou o de Kruskal-Wallis, quando as premissas para o primeiro não foram alcançadas. Algumas variáveis sofreram transformação logarítmica, de forma a obter-se a normalidade da amostra, estando nesse caso indicadas as unidades log. Sempre que se rejeitou a hipótese nula, de não haver diferenças entre os grupos considerados, realizaram-se comparações múltiplas através do teste de Tukey.

Estabelecimento de correlações

Para estabelecer correlações entre variáveis quantitativas utilizou-se a correlação de Pearson (quando os pressupostos da normalidade e da linearidade foram validados) ou a correlação de Spearman (quando esses pressupostos não foram validados); entre variáveis quantitativas e variáveis dicotómicas o teste utilizado foi a correlação *point-biserial*.

A intensidade da correlação foi avaliada pelo coeficiente de correlação (r), sendo forte quando $|r| > 0.7$, moderada quando $|r|$ entre 0.3- 0.7 e fraca quando $|r| < 0.3$.

Estudo dos fenótipos obtidos pelos modelos de regressão

Nos modelos de regressão logística, para mostrar relações de dependência entre a variável dependente e as variáveis independentes consideradas, foi utilizado o rácio dos produtos cruzados (OR – *Odds ratio*) e os seus respetivos intervalos de confiança de 95%. Os valores foram ajustados às covariantes género e idade, indicadas como ORadj (*Odds ratio adjusted*). Valores superiores a 1 são considerados fatores de risco, e, os inferiores a 1, fatores de proteção.

Análise dos *clusters* identificados

Na análise dos *clusters* identificados foram usados, para as variáveis quantitativas, os testes de ANOVA de um fator de amostras independentes (no caso paramétrico) e o teste de Kruskal-Wallis (no caso não-paramétrico). Para as variáveis qualitativas usou-se o teste do χ^2 .

Análise metabolómica aplicada aos grupos de gravidade e aos *clusters* identificados

De forma a extrair a informação metabólica relevante, que explicasse a distinção entre grupos de gravidade e entre *clusters*, aplicou-se, às áreas de pico obtidas por GCxGC, a análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA - *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) no SIMCA-P11.5 (Umetrics, Umeå, Sweden). Os gráficos das

coordenadas factoriais foram usados para visualizar e explorar as relações entre as amostras, enquanto os gráficos de contribuições factoriais foram usados para inspecionar as variáveis (metabolitos) que mais contribuíram para a distribuição de grupos observada.

- *Para análise dos grupos de gravidade:* a base de dados consistiu em 216 observações (3 análises replicadas de 72 amostras de urina) e 34 variáveis (áreas cromatográficas de aldeídos e alcanos alifáticos) especificados no *Quadro I-5* em informação suplementar (*Informação suplementar - 1*) juntamente com os tempos de retenção correspondentes e com o índice de retenção (RI- *Retention Index*) obtidos por cromatografia abrangente e pelo RI reportado na literatura para a primeira componente de GC (para colunas do tipo 5%-fenil-metilpolisiloxano ou equivalente.) Aplicámos a PLS-DA às unidades de variância (UV) das áreas dos 34 metabolitos, dando assim o mesmo peso a todas as variáveis.
- *Para identificação de clusters:* a base de dados consistiu em 171 observações (3 réplicas de 57 amostras urinárias) e 34 variáveis (áreas cromatográficas de aldeídos e alcanos alifáticos) especificados no *Quadro I-5* em informação suplementar (*Informação suplementar - 1*). As áreas dos 34 metabolitos foram normalizadas por unidade de variância (UV) por forma a dar o mesmo peso a todas as variáveis. Num segundo passo, depois de interpretar a análise PLS-DA, e de maneira a melhorar a distinção de *clusters*, foi feita selecção de variáveis com base nos valores de importância da variável na projecção (VIP - *Variable importance in the projection*) e nos respectivos erros.
- *Para correlacionar os metabolitos urinários e os parâmetros clínicos, incluindo a gravidade:* o estudo foi feito com uso de modelos de regressão PLS para correlacionar o FEV₁ (% do previsto), o FeNO e as pontuações dos questionários ACT, CARAT, ALQ e SOA. Os modelos de calibração foram calculados usando um grupo de metabolitos urinários para a predição de cada parâmetro individualmente. Os doentes com dados em falta foram excluídos. Estes modelos foram validados usando a validação *leave-one-out*. Antes do cálculo desses modelos, a selecção do conjunto de metabolitos que mais se correlacionou com cada parâmetro foi feita usando o algoritmo genético (GA-*Genetic algorithm*) e a PLS^{172, 173}. Na validação *leave-one-out validation*, calculada por PLS, foi usado o erro da raiz mínima quadrada (RMSE-*Root mean square error*) como função objectiva na optimização do GA. Todos os cálculos foram feitos em MATLAB 7.3.0. O GA foi implementado usando *GA toolbox v. 1.2*, disponível pelo *Department of Automatic Control and Systems Engineering of The University of Sheffield, UK*¹⁷⁴.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Considerações prévias

Durante o trabalho de investigação foram tidas em conta duas classificações de gravidade, WHO⁵ e ATS/ERS, 2000⁴, em função das quais se apresentam os resultados. Nos últimos anos, a classificação ATS de 2000 tem caído em desuso, tendo sido revista muito recentemente e

estando em processo de actualização¹²². No entanto, alguns estudos de grande escala na Asma grave utilizam a classificação ATS/ERS de 2000⁴, podendo tornar-se útil para a discussão global dos resultados aqui obtidos.

Depois de avaliada a concordância entre estas duas classificações (*Quadro IX*), cuja percentagem de concordância foi de 86%, com Cohen's Kappa=0.725, $p < 0.001$, optámos por utilizar a classificação WHO⁵ no estudo da metabóloma urinária e na descrição dos resultados.

Quadro IX- Classificação de concordância entre as escalas ATS⁴ e WHO⁵

WHO	ATS/ERS, 2000		Total
	Grave	Não grave	
Grave	33	9	42
Não grave	1	29	30
Total	34	38	72

Cohen's Kappa=0.725 (boa concordância); $p < 0.001$; percentagem de concordância =86.1%

II.3.2 Caracterização da população global com enfoque nos doentes graves, suportada em parâmetros funcionais respiratórios e laboratoriais imunoinflamatórios

Dos 100 doentes incluídos em V0 prosseguiram o estudo até ao final 72 doentes:

- 17 não prosseguiram para além de V0
 - 7 por terem fraca adesão terapêutica com noção pelo investigador de dificuldades na futura colaboração;
 - 4 por diagnóstico prévio incorrecto;
 - 4 por desistência por parte do doente;
 - 2 por IC descompensada.

- Dos 83 doentes que prosseguiram para V1, foram excluídos 10:
 - 5 por terem fraca adesão terapêutica com noção pelo investigador de dificuldades na futura colaboração;
 - 3 por abandono;
 - 1 por diagnóstico de neoplasia do cólon com metastização pulmonar;
 - 1 por falecimento.

- Dos 73 que prosseguiram para V2 e V3, excluiu-se 1 doente em V3 por diagnóstico concomitante de pneumonite de hipersensibilidade.

Todos os resultados relativos às variáveis quantitativas são apresentados na forma média (desvio-padrão (DP)).

II.3.2.1 Caracterização demográfica e clínica

As características demográficas e clínicas da amostra que prosseguiu no estudo até V3 encontram-se descritas nos *Quadros X e XI*. Os resultados são apresentados para a população total e segundo o grupo de gravidade da doença, pelas duas classificações utilizadas, WHO⁵ e ATS⁴. Dos 72 asmáticos que completaram o estudo, consideraram-se, pela escala WHO⁵, 42 graves e 30 não graves.

Para a população total, a média de idades foi de 46 anos (17.7), sendo o género feminino mais prevalente (78%), de forma mais evidente no grupo dos doentes não-graves (83% Vs 74%).

Apresentaram pelo menos uma comorbilidade 94% dos doentes, sendo as mais prevalentes a rinite (83%), o excesso de peso (72%), com 29 % de obesos, a atopia (68%), a sinusite (46%), o distúrbio psicológico (43%), a exposição tabágica em alguma altura da vida (33%) e o RGE (28%).

Em relação à história da doença, 53% da população indicou início de asma antes dos 12 anos de idade, com duração média de doença de 23 anos (14.4), e 50% referiram no último ano história de pelo menos uma exacerbação grave, 35% dos quais com hospitalização. O valor médio do FEV₁ basal foi de 93% (26.4).

Aqueles com **história de hospitalização no último ano** (*Informação Suplementar 2, Quadro II-S*) eram maioritariamente do sexo feminino (84%) e apresentavam como co-morbilidades importantes a atopia (72%), a elevada prevalência de exposição tabágica (40%) e o excesso de peso (80%), sendo que 56% referia início de asma após os 12 anos e 35% história de pneumonia. A ocorrência de exacerbações graves no último ano (92% do grupo) era significativamente superior em relação aos restantes ($p < 0.001$). Quanto ao controlo da doença, a percentagem de doentes em risco para eventos futuros foi significativamente superior ($p = 0.003$) e as pontuações obtidas nos questionários ACT e CARATasma mostraram piores valores (18.0(5.7) Vs 19.5(4.6) e 10.6(4.9) Vs 12.3(4.5), respectivamente). Cerca de 3/4 dos doentes fazia tratamento crónico nos graus 4 ou 5 da GINA, e 48% deles, doses elevadas de CSI. Quanto à função respiratória, nem os valores médios de FEV₁ ou VR basais, nem a labilidade brônquica, se mostraram afastados dos outros doentes.

A percentagem de graves neste grupo foi bastante superior (72% Vs 51%).

Na **análise por género** (*Informação suplementar 2, Quadro III-S*), os anos de evolução da doença, a história de pneumonia no decurso da mesma e a taxa de exacerbações graves não diferiram de forma significativa. O IMC médio (kg/m²) foi superior no sexo feminino (29 (6.1) Vs 26 (3.9)) e a idade de início de doença após os 12 anos significativamente superior no masculino, $p = 0.047$. Igualmente superior neste género foi a prevalência de atopia (75% Vs 51%), de polipose nasal (23% Vs 9%), de exposição tabágica (44% Vs 30%), e de co-existência de outra doença obstrutiva que não a asma (25 Vs 12%) bem como o tratamento com CSI em altas doses (56% Vs 36%).

Na comparação entre **grupos de gravidade** (*Quadros X e XI*), o dos graves era mais velho, com média de idades de 49 anos (15.3) Vs 41 anos (20.1) e mais obeso, com IMC médio de 29 Kg/m² (4.9).

Houve tendência marcada, no grupo dos graves, para média de idades superior (49 anos Vs 41 anos), idade de início da doença mais tardio (57% Vs 33%) e história mais frequente de exacerbações graves no último ano (60% Vs 37%).

Em relação às comorbilidades, os doentes graves mostraram, de forma significativa, maior prevalência de história de pneumonia (48% Vs 17%, p=0.001) e de co-existência de outra doença obstrutiva (como DPOC, défice de α 1-AT ou bronquiectasias (BQ)) para além da asma (24% Vs 3%, p=0.021), com tendência para maior prevalência de polipose nasal (11% Vs 6.7%) e de exposição tabágica (38% Vs 27%), mas menor prevalência de atopia (60% Vs 80 %).

Quadro X – Caracterização da população asmática (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	Total	ATS			WHO		
	(n=72)	Grave (n=34)	Não grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não grave (n=30)	Valor estatístico de p
Idade (anos)	45.7±17.7	48.3±14.9	43.4±19.8	t(72)=-1.2 p=0.234	49.0±15.3	41,2±20,1	<u>t(72)=-1.9</u> <u>p=0.081</u>
Género							
Feminino	56(77.8)	26(76.5)	30(78.9)	$\chi^2(1)=0.06$ p=0.999	31(73.8)	25(83,3)	$\chi^2(1)=0.92$ p=0.399
Masculino	16(22.2)	8(23.5)	8(21.1)		11(26.2)	5(16,7)	
IMC (Kg/m²)	28.0±5.8	29.7±5.5	26.6±5.7	U=438.0 p=0.018	29.1±4.9	26,5±6,6	<u>U=415,0</u> <u>p=0.013</u>
Início de doença antes dos 12 A							
Sim	38(52.8)	14(41.2)	24(63.2)	$\chi^2(1)=3.48$ p=0.097	18(42.9)	20(66,7)	<u>$\chi^2(1)=3.98$</u> <u>p=0.058</u>
Não	34(47.2)	20(58.8)	14(36.6)		24(57.1)	10(33,3)	
Anos de doença (anos)	23.3±14.4	23.9±13.1	22.8±15.7	t(70)=-0.3 p=0.744	24.5±14.1	21,7±24,5	t(70)=-0.8 p=0.417
Comorbilidades							
Sim	68(94.4)	33(97.1)	35(92.1)	n.a.	39(92.9)	29(96,7)	n.a.
Não	16(5.6)	1(2.9)	3(7.9)		3(7.1)	1(3,3)	
Hospitalização (último ano)							
Sim	25(34.7)	14(41.2)	11(28.9)	$\chi^2(1)=1.18$ p=0.327	18(41.9)	7(23,3)	$\chi^2(1)=2.94$ p=0.132
Não	47(65.3)	20(58.8)	27(71.1)		24(57.1)	23(76,7)	
Exacerbação grave (último ano)							
Sim	36(50.0)	21(61.8)	15(39.5)	$\chi^2(1)=3.57$ p=0.098	25(59.5)	11(36,7)	<u>$\chi^2(1)=3.57$</u> <u>p=0.094</u>
Não	36(50.0)	13(38.2)	23(60.5)		17(40.5)	19(63,3)	
Achados TAC							
Normal	10(32.3)	5(50.0)	5(50.0)	n.a.	5(50.0)	5(50,0)	n.a.
Air trapping (AT)	10(32.3)	7(70.0)	3(30.0)		7(70.0)	3(30,0)	
Enfisema (E)	4(12.9)	3(75.0)	1(25.0)		3(75.0)	1(25,0)	
Bronquiectasias(B)	11(35.5)	6(54.5)	5(45.5)		8(72.7)	5(27,3)	
AT+E	1(3.2)	1(100.0)	0(0.0)		1(100.0)	0(0,0)	
AT+B	3(9.7)	2(66.7)	1(33.3)		2(66.7)	1(33,3)	
E+B	1(3.2)	1(100.0)	0(0.0)		1(100.0)	0(0,0)	
AT+E+B	1(3.2)	1(100.0)	0(0.0)		1(100.0)	0(0,0)	

ATS: American Thoracic Society; IMC: índice de massa corporal; WHO: World Health Organization

A sublinhado: p<0.1; A negrito: p<0.05

Quadro XI – Distribuição de comorbilidades (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

	Total	ATS			WHO		
Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	(n=72)	Grave (n=34)	Não grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não grave (n=30)	Valor estatístico de p
Atopia							
Sim	49(68.1)	22(64.7)	27(71.1)	$\chi^2(1)=0.33$ $p=0.619$	25(59.5)	24(80.0)	$\chi^2(1)=3.38$ $p=0.078$
Não	23(31.9)	12(35.3)	11(28.9)		17(40.5)	6(20.0)	
Rinite							
Não	12(16.7)	6(17.6)	6(15.8)	$\chi^2(1)=1.74$ $p=0.650$	10(23.8)	2(6.7)	$\chi^2(1)=4.89$ $p=0.190$
Leve	28(38.9)	11(32.4)	17(44.7)		13(31.0)	15(50.0)	
Intermitente	6(8.3)	4(11.8)	2(5.5)		4(9.5)	2(6.7)	
Persistente	26(36.1)	13(38.2)	13(34.2)		15(36.1)	11(36.7)	
Polipose							
Sim	8(11.1)	5(14.7)	3(7.9)	n.a.	8(11.1)	2(6.7)	n.a.
Não	64(88.9)	29(85.3)	35(92.1)		64(88.9)	28(93.3)	
Sinusite							
Sim	33(45.8)	18(52.9)	15(39.5)	$\chi^2(1)=1.31$ $p=0.344$	19(45.2)	14(41.7)	$\chi^2(1)=0.01$ $p=0.999$
Não	39(54.2)	16(47.1)	23(60.5)		23(54.8)	16(53.3)	
Exposição tabágica							
Sim	24(33.3)	14(41.2)	10(26.3)	$\chi^2(1)=1.78$ $p=0.216$	16(38.1)	8(26.7)	$\chi^2(1)=1.03$ $p=0.447$
Não	48(66.7)	20(58.8)	28(73.7)		26(61.9)	22(73.3)	
História de pneumonia							
Sim	25(34.7)	17(50.0)	8(21.1)	$\chi^2(1)=6.63$ $p=0.014$	20(47.6)	5(16.7)	$\chi^2(1)=7.40$ $p=0.011$
Não	47(65.3)	17(50.0)	30(78.9)		22(52.4)	25(83.3)	
HS AINE's +							
Sim	12(16.9)	7(21.2)	5(13.2)	$\chi^2(1)=0.82$ $p=0.527$	7(17.1)	5(16.7)	$\chi^2(1)=0.82$ $p=0.527$
Não	59(83.1)	26(78.8)	33(86.8)		34(82.9)	25(83.3)	
Categorização IMC (Kg/m²):							
<25	20(27.8)	6(17.6)	14(36.8)	$\chi^2(2)=3.45$ $p=0.186$	8(19.0)	12(40.0)	$\chi^2(2)=3.85$ $p=0.163$
[25;30 [31(43.1)	16(47.1)	15(39.5)		20(47.6)	11(36.7)	
≥ 30	21(29.9)	12(35.3)	9(27.7)		14(33.3)	7(23.3)	
Categorização IMC:							
< 25 Kg/m2	20(27.8)	6(17.6)	14(36.8)	$\chi^2(1)=3.30$ $p=0.113$	8(19.0)	12(40.0)	$\chi^2(1)=3.83$ $p=0.064$
≥ 25 Kg/m2	52(72.2)	28(82.4)	24(63.2)		34(81.0)	18(60.0)	
Categorização IMC:							
< 30 Kg/m2	51(70.8)	22(64.7)	29(76.3)	$\chi^2(1)=1.17$ $p=0.310$	28(66.7)	23(76.7)	$\chi^2(1)=0.85$ $p=0.436$
≥ 30 Kg/m2	21(29.2)	12(35.3)	9(23.7)		14(33.3)	7(23.3)	
Ansiedade/depressão							
Ansiedade (sim)	20(28.2)	10(30.3)	10(26.3)	n.a.	12(28.6)	8(27.6)	n.a.
Depressão (sim)	8(11.3)	2(6.1)	6(15.8)		4(9.5)	4(13.8)	
Ambas (sim)	3(4.2)	1(3.0)	2(5.3)		2(4.8)	1(3.4)	

Quadro XI (continuação) – Distribuição de comorbilidades (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	Total	ATS			WHO		
	(n=72)	Grave (n=34)	Não grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não grave (n=30)	Valor estatístico de p
SAOS							
Sim	3(4.2)	2(5.9)	1(2.6)	n.a.	1(2.4)	2(6.7)	n.a.
Não	69(95.8)	32(94.1)	37(97.4)		41(97.6)	28(93.3)	
RGE							
Sim	20(27.8)	10(29.4)	10(26.3)	$\chi^2(1)=0.90$	10(23.8)	10(33.3)	$\chi^2(1)=0.79$
Não	52(72.2)	24(70.6)	28(73.7)	p=0.798	32(76.2)	20(66.7)	p=0.430
Déficite de α1-AT							
Sim	4(5.6)	3(8.8)	1(2.6)	n.a.	3(7.1)	1(3.3)	n.a.
Não	68(94.4)	31(91.2)	37(97.4)		39(92.9)	29(96.7)	
Bronquiectasias							
Sim	6(8.3)	4(11.8)	2(5.3)	n.a.	5(11.9)	1(3.3)	n.a.
Não	66(91.7)	30(88.2)	36(94.7)		37(88.1)	29(96.7)	
DPOC							
Sim	5(6.9)	3(8.8)	2(5.3)	n.a.	5(11.9)	0(0.0)	n.a.
Não	67(93.1)	31(91.2)	36(94.7)		37(88.1)	30(100.0)	
Outra doença obstrutiva*							
Sim	11(15.3)	7(20.6)	4(10.5)	$\chi^2(1)=1.40$	10(23.8)	1(3.3)	$\chi^2(1)=5.67$
Não	61(84.7)	27(79.4)	34(89.5)	p=0.329	32(76.2)	29(96.7)	p=0.021
Aspergillus (IgE positiva)							
Sim	2(2.8)	3(8.8)	2(5.3)	n.a.	5(11.9)	0(0.0)	n.a.
Não	70(97.2)	31(91.2)	36(94.7)		37(88.1)	30(100.0)	
Disfunção cordas vocais							
Sim	1(1.4)	1(2.9)	0(0.0)	n.a.	1(2.4)	0(0.0)	n.a.
Não	71(98.6)	33(97.1)	38(100.0)		41(97.6)	30(100.0)	
Agrava com menopausa*							
Sim	7(29.2)	2(18.2)	5(38.5)	n.a.	3(21.4)	4(40.0)	n.a.
Não	27(70.8)	9(81.8)	8(61.5)		11(78.6)	6(60.0)	
Agrava com gravidez*							
Sem alt	13(26.5)	8(23.5)	5(13.2)	n.a.	11(26.2)	2(6.7)	n.a.
Piorou	4(8.2)	2(5.9)	2(5.3)		2(4.8)	2(6.7)	
Melhorou	32(65.3)	11(32.4)	21(55.3)		14(33.3)	18(60.0)	

AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; IMC: índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono WHO: *World Health Organization* + excepto para as variáveis: HS AINE's (Total n=71); Agrav. menopausa (Total n=34), e Agrav. Gravidez (Total n=49)

* Outra doença obstrutiva: sim se déficite de α 1-AT=sim ou bronquiectasia=sim ou DPOC=sim

A sublinhado: p<0.1; A negrito: p<0.05

Relativamente ao controlo da doença, à qualidade de vida e ao risco futuro, cuja descrição mais detalhada se encontra resumida nos *Quadros XII, XIII e XIV*, destacamos:

- O controlo total da doença foi atingido apenas em 20% da população, com os seguintes valores médios de pontuação nos questionários: ACT 19.0 (5.0); CARAT 18.5 (6.7); ALQ 12.0 (3.8); e SOA 10.3 (3.8). Apresentavam a componente de risco 82% dos doentes e, tinham pelo menos dois factores de risco para eventos futuros 53% deles. Em 40% registámos uso de doses elevadas de CSI, tendo 53% necessidade de curso de CSs no último ano. O valor médio de FEV₁ basal foi de 93% (26.4) e o do FeNO 32 ppb (23.8).
- Na comparação por género (*Informação suplementar 2, Quadro II-S*), o controlo global da doença revelou ser superior no masculino (25% Vs 18%), apesar da maior percentagem de doentes graves quando comparado com o género feminino (69% Vs 55%), com significativo inferior valor médio de FEV₁ basal (80.8% (23.5) Vs 97.3% (26.3), p= 0.028). Por sua vez, a taxa de hospitalização no género feminino foi superior (38% Vs 25%). As pontuações nos questionários ACT, SOA e ALQ não diferiram significativamente entre sexos.
- Os doentes graves (*Quadros XII, XIII e XIV*) apresentaram diferenças significativas em relação aos não graves no pior controlo da doença, com os seguintes valores médios nos questionários utilizados: ACT 17.8 (5.7); CARAT (sintomas brônquicos) 10.4 (4.5); ALQ 13.0 (3.9); e SOA 12.2 (3.2) (p=0.010; 0.005; 0.009 e <0.001, respectivamente). Simultaneamente, a percentagem de doentes em risco para eventos futuros foi também significativamente mais elevada, (p <0.001). Considerando a terapêutica habitual, o grupo dos doentes graves fazia maior uso de CSI em altas doses (67% dos graves Vs 3% dos não graves, p <0.001), de montelucaste (69% Vs 33%, p=0.004) e de tiotrópio (26% Vs 3%, p=0.022). O FEV₁ basal foi significativamente mais baixo em relação aos não graves (82% (24.5) Vs 110% (19.9), p <0.001), assim como a relação FEV₁/FVC (70% (16.4) Vs 85% (12.2), p <0.001) com maior prevalência de obstrução persistente (52% Vs 0%, p <0.001). A labilidade brônquica mostrou clara tendência para ser superior nos doentes graves (8% (8.3) Vs 5% (5.0), p=0.050).

Quadro XII – Controlo da doença, Qualidade de vida, Risco de eventos adversos (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

	Total [†]	ATS			WHO		
Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	(n=72)	Grave (n=34)	Não grave (n=38)	Valor de p estatístico	Grave (n=42)	Não grave (n=30)	Valor de p estatístico
Controlo da doença[†]							
Sim	14(19.7)	0(0.0)	14(36.8)	$\chi^2(1)=15.14$ p<0.001	0(0.0)	14(46.7)	$\chi^2(1)=23.83$ p<0.001
Não	57(80.3)	33(100.0)	24(63.2)		41(100.0)	16(53.3)	
Doentes em risco** (≥1 ponto)							
Sim	59(81.9)	33(97.1)	26(68.4)	$\chi^2(1)=9.95$ p=0.002	41(97.6)	18(60.0)	$\chi^2(1)=16.73$ p<0.001
Não	13(18.1)	1(2.9)	12(31.6)		1(2.4)	12(40.0)	
Risco de eventos futuros **							
1	21(29.2)	6	15	n.a.	10(23.8)	11(0.4)	n.a.
2	22(30.6)	11	11		15(35.7)	7(23.3)	
3	9(12.5)	9	0		9(21.4)	0(0.0)	
4	7(9.7)	7	0		7(16.7)	0(0.0)	
5	0(0.0)	0	0		0(0.0)	0(0.0)	
Curso de CSO (no último ano):							
0	34(47.2)	10(29.4)	24(63.2)	n.a.	13(38.2)	21(70.0)	n.a.
1	21(29.2)	9(26.5)	12(31.6)		12(28.6)	9(30.0)	
2	8(11.1)	7(20.6)	1(2.6)		8(19.0)	0(0.0)	
≥3	9(12.5)	8(23.5)	1(2.6)		9(21.4)	0(0.0)	
ACT	19.0±5.0 (n=71)	16.7±5.7 (n=33)	21.0±3.3 (n=38)	t(69)=3.9 p<0.001	17.8±5.7 (n=41)	20.7±3.4 (n=30)	t(69)=2.5 p=0.01
CARAT (Sintomas rinite)	6.6±3.3 (n=69)	6.5±3.4 (n=32)	6.8±3.2 (n=37)	t(67)=0.3 p=0.748	6.8±3.5 (n=40)	6.5±3.0 (n=29)	t(67)=-0.4 p=0.686
CARAT (sintomas asma)	11.7±4.7 (n=69)	9.6±4.3 (n=32)	13.5±4.2 (n=37)	t(67)=3.8 p<0.001	10.4±4.5 (n=40)	13.5±4.3 (n=29)	t(67)=2.9 p=0.005
CARAT (Total)	18.5±6.7 (n=69)	16.3±6.6 (n=32)	20.3±6.3 (n=37)	t(67)=3.9 p<0.011	17.3±6.9 (n=40)	20.0±6.1 (n=29)	t(67)=1.7 p=0.09

Quadro XII (continuação) – Controlo da doença, Qualidade de vida, Risco de eventos adversos (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

	Total [†]	ATS			WHO		
Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	(n=72)	Grave (n=34)	Não grave (n=38)	Valor de p estatístico	Grave (n=42)	Não grave (n=30)	Valor de p estatístico
ALQ	12.0±3.8 (n=64)	13.7±3.7 (n=31)	10.5±3.1 (n=33)	t(62)=-3.7 p<0.001	13.0±3.9 (n=38)	10.6±3.1 (n=26)	t(62)=-2.7 p=0.009
SOA	10.3±3.8 (n=70)	12.7±2.9 (n=33)	8.2±3.3 (n=37)	t(68)=-6.2 p<0.001	12.2±3.2 (n=41)	7.7±3.0 (n=29)	t(68)=-5.9 p<0.001

*Controlo da asma: não controlado se ACT<20 ou CARATb<16 ou ALQ>10 ou FEV₁ pre-BD<80%

** Risco de eventos futuros: 1 ponto para cada evento: n^o de hospitalizações>0; n^o de CSO ≥2; FEV₁ pré BD <80%; ΔFEV₁ pós-pré BD <200 ml ou <12% do previsto; Efeitos adversos da medicação (1 se CSI de altas doses ou omalizumabe=sim), não controlo de sintomas

[†] excepto para a variável controlo da doença (n Total =71)

ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; SOA: *Severity of Asthma Score* WHO: *World Health Organization*

A sublinhado: p<0.1; A negrito: p<0.05

Quadro XIII – Terapêutica (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Variáveis qualitativas (n, %)	Total	ATS			WHO		
	(n=72)	Grave (n=34)	Não grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não grave (n=30)	Valor estatístico de p
Imunoterapia							
Sim	13(18.1)	4(11.8)	9(23.7)	$\chi^2(2)=3.73$ p=0.154	5(11.9)	8(26.7)	$\chi^2(2)=3.76$ p=0.160
Não	57(79.2)	28(82.4)	29(76.3)		35(83.3)	22(73.3)	
No passado	2(2.8)	2(5.9)	0(0.0)		2(4.8)	0(0.0)	
Terapêutica:							
SOS	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	n.a.	0(0.0)	0(0.0)	n.a.
até step3	3(4.2)	0(0.0)	3(7.9)		0(0.0)	3(10.0)	
step3	18(25.0)	1(2.9)	17(44.7)		3(7.1)	15(50.0)	
step4	47(65.3)	29(85.3)	18(47.4)		35(83.3)	12(40.0)	
step5	4(5.6)	4(11.8)	0(0.0)		4(9.5)	0(0.0)	
CSI:							
≤ 750 µ gr PF ou equivalente	43(59.7)	7(20.6)	36(94.7)	$\chi^2(1)=41.01$ p<0.001	14(33.3)	29(96.7)	$\chi^2(1)=29.18$ p<0.001
>750 µ gr PF ou equivalente	29(40.3)	27(79.4)	2(5.3)		28(66.7)	1(3.3)	
BALA							
Sim	69(95.8)	34(100.0)	35(92.1)	n.a.	42(100.0)	27(90.0)	n.a.
Não	3(4.2)	0(0.0)	3(7.9)		0(0.0)	3(10.0)	
Tiotrópio							
Sim	12(16.7)	8(23.5)	4(10.5)	$\chi^2(1)=2.18$ p=0.206	11(26.2)	1(3.3)	$\chi^2(1)=6.58$ p=0.022
Não	60(83.3)	26(76.5)	34(89.5)		31(73.8)	29(96.7)	
Montelucaste							
Sim	39(54.2)	26(76.5)	13(34.2)	$\chi^2(1)=12.91$ p<0.001	29(69.0)	10(33.3)	$\chi^2(1)=8.99$ p=0.004
Não	33(45.8)	8(23.5)	25(65.8)		13(31.0)	20(66.7)	

Quadro XIII (continuação) – Terapêutica (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

	Total	ATS			WHO		
Variáveis qualitativas (n, %)	(n=72)	Grave (n=34)	Não grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não grave (n=30)	Valor estatístico de p
Omalizumabe							
Sim	4(5.6)	4(11.8)	0(0.0)	n.a.	4(9.5)	0(0.0)	n.a.
Não	68(94.4)	30(88.2)	38(100.0)		38(90.5)	30(100.0)	
Aminofilina⁺							
Sim	7(9.9)	6(17.6)	1(2.7)	n.a.	7(16.7)	0(0.0)	n.a.
Não	64(90.1)	28(82.4)	36(97.3)		35(83.3)	29(100.0)	
Azitromicina crónica							
Sim	1(1.4)	0(0.0)	1(2.6)	n.a.	1(2.4)	0(0.0)	n.a.
Não	71(98.6)	34(100.0)	37(97.4)		41(97.6)	30(100.0)	
CS nasal							
Sim	49(68.1)	21(61.8)	28(73.7)	$\chi^2(1)=1.17$	25(59.5)	24(80.0)	$\chi^2(1)=3.38$
Não	23(31.9)	13(38.2)	10(26.3)	p=0.319	17(40.5)	6(20.0)	<u>p=0.078</u>
B bloqueantes							
Sim	3(4.2)	2(5.9)	1(2.6)	n.a.	2(4.8)	1(3.3)	n.a.
Não	69(95.8)	32(94.1)	37(97.4)		40(95.2)	29(96.7)	

⁺ Excepto para a variável: Aminofilina (Total n=71)

ATS: American Thoracic Society; BALA: beta-adrenérgico de longa acção; CSI: corticoterapia inalada; CS: corticoesteróide; PF: propionato de fluticasona; WHO: World Health Organization

A sublinhado: p<0.1; A negrito: p<0.05

Quadro XIV – Função pulmonar (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

	Total	ATS			WHO		
Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	(n=72)	Grave (n=34)	Não-grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não-grave (n=30)	Valor estatístico de p
Obstrução persistente							
Sim	22(30.6)	17(50.0)	5(13.2)	$\chi^2(1)=11.48$ $p=0.001$	22(52.4)	0(0.0)	$\chi^2(1)=17.96$; $p<0.001$
Não	50(69.4)	17(50.0)	33(86.8)		20(47.6)	30(100.0)	
Reversibilidade brônquica[†]							
Sim	39(54.9)	21(63.6)	18(47.4)	$\chi^2(1)=1.89$; $p=0.233$	27(65.9)	18(60.0)	$\chi^2(1)=4.68$; $p=0.053$
Não	32(45.1)	12(36.4)	20(52.6)		14(34.1)	12(40.0)	
Prova de metacolina[‡]:							
Não realizada	63(88.7)	32(97.0)	31(81.6)	n.a.	39(95.1)	24(80.0)	n.a.
Positiva	7(9.9)	1(3.0)	6(15.8)		2(4.9)	5(16.7)	
Negativa	1(1.4)	0(0.0)	1(2.6)		0(0.0)	1(3.3)	
FEV₁ (%):							
Basal	93.4±26.4 (n=69)	83.4±25.5 (n=32)	102.0±24.4 (n=37)	$t(67)=3.1$; $p=0.003$	81.8±24.5 (n=40)	109.5±19.9 (n=29)	$t(67)=5.0$; $p<0.001$
Após BD	99.9±25.5 (n=72)	90.2±24.6 (n=34)	108.6±23.3 (n=38)	$t(70)=3.3$; $p=0.002$	88.8±23.9 (n=42)	115.4±18.8 (n=30)	$t(70)=5.1$; $p<0.001$
Δ variação	7.0±7.3 (n=69)	8.5±8.9 (n=32)	5.6±5.2 (n=37)	$t(67)=1.7$; $p=0.097$	8.4±8.3 (n=40)	5.0±5.0 (n=29)	$t(67)=-2.0$; $p=0.05$
FEV₁/FVC (%):							
Basal	76.2±16.5 (n=69)	70.7±18.1 (n=32)	81.0±13.4 (n=37)	$t(67)=2.7$; $p=0.009$	69.8±16.4 (n=40)	85.0±12.2 (n=29)	$t(67)=4.2$; $p<0.001$
Após BD	77.5±14.4 (n=72)	72.4±15.0 (n=34)	82.1±12.3 (n=38)	$t(70)=3.0$; $p=0.004$	71.3±13.4 (n=42)	86.3±11.0 (n=30)	$t(70)=5.1$; $p<0.001$
Δ variação	1.4±6.7 (n=69)	1.4±8.7 (n=32)	1.3±4.3 (n=37)	$t(67)=-0.1$; $p=0.931$	1.2±7.8 (n=40)	1.6±4.8 (n=29)	$t(67)=0.2$; $p=0.814$

Quadro XIV (continuação) – Função pulmonar (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

	Total	ATS			WHO		
Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	(n=72)	Grave (n=34)	Não-grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não-grave (n=30)	Valor estatístico de p
FEV₂₅₋₇₅ (%) :							
Basal	55.5±34.6 (n=68)	37.8±25.1 (n=31)	70.4±34.7 (n=37)	t(66)=4.4; p<0.001	37.2±25.1 (n=39)	80.2±30.2 (n=29)	t(66)=6.4; p<0.001
Após BD	72.1±42.6 (n=71)	55.7±15.0 (n=33)	86.5±38.2 (n=38)	t(69)=3.2; p=0.002	55.3±41.1 (n=41)	95.2±33.1 (n=30)	t(69)=4.4; p<0.001
Δ variação	18.0±28.7 (n=68)	20.1±33.8 (n=31)	16.2±23.9 (n=38)	t(66)=-0.5; p=0.585	19.8±32.4 (n=39)	15.5±23.2 (n=29)	t(66)=-0.6; p=0.542
Volume Residual (%) :							
Basal	123.0±32.7 (n=71)	128.2±36.0 (n=34)	118.1±28.5 (n=37)	t(69)=-1.3; p=0.193	127.0±34.2 (n=42)	117.2±29.5 (n=29)	t(69)=-1.3; p=0.214
Após BD	118.8±32.7 (n=60)	123.4±35.6 (n=29)	114.5±29.7 (n=31)	t(58)=-1.1; p=0.297	124.4±34.2 (n=34)	111.5±29.8 (n=26)	t(58)=-1.5; p=0.129
Δ variação	-4.5±10.6 (n=59)	-4.7±11.2 (n=29)	-4.3±10.2 (n=30)	t(57)=0.1; p=0.889	-3.9±11.1 (n=34)	-5.4±10.1 (n=25)	t(57)=-0.5; p=0.592
DLCO(%) :							
	104.0±21.4 (n=55)	103.7±18.4 (n=26)	104.2±24.1 (n=29)	t(53)=0.1; p=0.931	99.5±19.2 (n=32)	110.2±23.2 (n=23)	t(40)=0.8; p=0.425

* Excepto para as variáveis reversibilidade brônquica (Total n=71) e metacolina (Total n=71).

ATS: *American Thoracic Society*; BALA: beta-adrenérgico de longa acção; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FVC: *forced vital capacity*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced Vital Capacity*; WHO: *World Health Organization*

A sublinhado: p<0.1; A negrito: p<0.05

Para além dos biomarcadores funcionais respiratórios, outros foram analisados e os resultados estão patentes no *Quadro XV*. Ressalta-se a tendência verificada para o valor mais elevado do FeNO no grupo dos não graves, mas com desvio padrão superior (35ppb (30.2) Vs 29ppb (17.8), $p=0.068$). No entanto, a eosinofilia periférica foi maior no grupo dos graves, com diferença estatisticamente significativa (4.0% (3.7) Vs 2.4% (2.1), $p=0.035$).

Quadro XV – Biomarcadores no sangue periférico e ar exalado (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	Total	ATS			WHO		
	(n=72)	Grave (n=34)	Não-grave (n=38)	Valor estatístico de p	Grave (n=42)	Não-grave (n=30)	Valor estatístico de p
FeNO (ppb)							
<35	29(69.0)	14(48.3)	15(51.7)	$\chi^2(1)=0.3$; $p=0.739$	18(62.1)	11(37.9)	$\chi^2(1)=0.9$; $p=0.501$
≥35	13(31.0)	5(38.5)	8(61.5)		6(46.2)	7(53.8)	
FeNO(ppb)	31,8±23,8 (n=42)	30,0±17,4 (n=19)	33,2±28,3 (n=23)	t(40)=0.4; $p=0.674$	29,2±17,8 (n=24)	35,2±30,2 (n=18)	<u>t(53)=1.9</u> ; <u>p=0.068</u>
Eosinófilos sg (%)	3,3±3,3 (72)	4,4±3,9 (n=34)	2,4±2,1 (n=38)	t(70)=-2.8 ; p=0.007	4,0±3,7 (n=42)	2,4±2,1 (n=30)	t(70)=-2.1 ; p=0.035
IgE sérica LOG ((mmol/L)+1)	2.2±0.6 (n=71)	2.2±0.6 (n=33)	2.2±0.7 (n=38)	t(69)=0.2; $p=0.847$	2.2±0.7 (n=41)	2.2±0.6 (n=30)	t(69)=0.3; $p=0.749$
IgE total sérica (mmol/L)	391,8±665,3 (n=71)	324,4±386,5 (n=33)	450,4±837,0 (n=38)	t(69)=0.8; $p=0.430$	316,0±372,2 (n=41)	495,5±926,4 (n=30)	t(69)=1.1; $p=0.264$

ATS: American Thoracic Society; FeNO: Fraction of exhaled nitric oxide WHO: World Health Organization

A negrito: $p<0.05$; A sublinhado: $p<0.1$

II.3.2.2 Classificação de gravidade

Considerando a classificação de gravidade WHO⁵, alguns doentes apresentavam mais do que um dos critérios necessários para serem classificados como graves. *Quadro XVI*.

Nenhum desses 42 apresentou controlo da doença pelas normas NAEPP¹⁵⁹, onde se incluem as componentes controlo e risco.

A componente controlo foi avaliada pelos sintomas (ACT consistentemente <20) e pela presença de obstrução da via aérea (FEV₁ pré-BD<80%). A componente risco foi avaliada pela história de pelo menos uma hospitalização no último ano; pelo uso de altas doses de CSI, CSO crónico ou omalizumabe; e pelo recurso a CSO por exacerbação (pelo menos dois ciclos/ano).

A totalidade dos doentes graves apresentou-se não controlado (considerando as componentes controlo e risco), sendo que 52% apresentava FEV₁ pré-BD<80% e 45% mantinha essa obstrução apesar de prova de broncodilatação positiva.

O valor médio ACT foi de 18 (5.7), com 50% a evidenciar ACT<20.

Em 34 doentes (81%) manifestava-se pelo menos outra componente de risco.

Destes, 67% fazia doses elevadas de CSI, 43% tinha história de pelo menos uma hospitalização no último ano e 40% tinha tido necessidade de pelo menos 2 ciclos de CSO em ambulatório para controlo de exacerbação no último ano.

Quadro XVI – Distribuição dos doentes graves pelos critérios WHO⁵

Asma grave ou de difícil tratamento	N= 42 doentes
Não controlo da doença (ACQ consistentemente > 1.5 ou “não controlado pelas NAEPP guidelines”)	N=42 34 (81%), apresentaram pelo menos um item da componente de risco
ACT<20	N= 21 (50%)
Obstrução persistente do fluxo aéreo	N= 22 (52%) Mantida em 19 deles apesar de BD positiva
Exacerbações frequentes: 2 ou mais ciclos de CSO (> 3d cada) no último ano	N=17 (40%)
Exacerbações graves: pelo menos uma hospitalização ou internamento em UCI no último ano	N= 18 (43%)
Asma medicada com altas doses de CSI ou CSO (ou omalizumabe) (coloca o doente em grande risco futuro de efeitos secundários)	CSI> 750 µg PF ou equivalente: N=28 (67%); Omalizumabe: N=4 (9,5%)

ACQ: *Asthma Control Questionnaire*; CSO : corticoterapia oral; CSI : corticoterapia inalada; NAEPP: *National Asthma Education and Prevention Program* ; PF: propionato de fluticasona; UCI : unidade de cuidados intensivos

II.3.2.3 Correlações entre os parâmetros avaliados na caracterização da população

Parecendo-nos clinicamente relevante a possibilidade de correlação entre os parâmetros avaliados, procedeu-se à análise dos mais importantes.

As variáveis consideradas foram as demográficas (género, idade, IMC), a da história da doença (comorbilidades, idade de início de doença, história de pneumonia, história de hospitalizações e exacerbações graves no último ano), o controlo da doença e qualidade de vida (pontuações dos vários questionários), os graus de terapêutica e de gravidade (classificação WHO⁵ e ATS/ERS, 2000⁴), a função respiratória, os biomarcadores no sangue periférico e na expectoração.

Correlações de variáveis considerando a população total

As correlações estabelecidas estão descritas na *Quadro XVII*, onde se apresentam os valores de coeficiente de Pearson (r) que mostraram significado estatístico. Na *Informação suplementar 3.1*, para melhor percepção dos resultados relativos às correlações obtidas para as variáveis qualitativas, figuram os respectivos gráficos.

Da totalidade das correlações, destacamos as seguintes:

- Os valores basais de FEV₁, FEV₁/FVC e FEV₂₅₋₇₅ (% do previsto) correlacionaram-se de forma negativa com a idade dos doentes, os anos de evolução da doença, a gravidade da doença (classificação WHO⁵, ATS⁴ e questionário SOA), a ausência de controlo da doença, a obstrução persistente da via aérea e a reversibilidade brônquica. (Em conjunto, as variáveis qualitativas referidas, apresentaram valores inferiores nos parâmetros funcionais referidos).
- A labilidade brônquica, medida pelo Δ FEV₁ após BD, correlacionou-se positivamente com a gravidade da doença ($r=0.23$, $p<0.05$) e com os anos de evolução da doença ($r=0.37$, $p<0.05$).
- O valor basal de FEV₁, para além das correlações acima referidas, estabeleceu outras correlações negativas importantes: com o género masculino ($r=-0.27$, $p<0.05$); com a história de pneumonia na evolução da doença ($r=-0.26$, $p<0.05$), apresentando valores mais baixos de FEV₁.
- O VR basal correlacionou-se positivamente com a presença de obstrução persistente ($r=0.30$, $p<0.05$), tendo esses doentes valores de VR superiores.

Em relação aos biomarcadores analisados, destacamos que:

- O FeNO se correlacionou positivamente com número de anos de doença ($r=0.30$, $p<0.05$);
- A eosinofilia no sangue periférico se correlacionou positivamente com: a idade de início da doença após os 12 anos; a terapêutica com CSI > 750 ug de PF ou equivalente; a classificação de grave pela WHO⁵ e pela ATS/ERS⁴, 2000 ($r=0.27$; 0.38 ; 0.31 ; 0.38 , $p<0.05$, respectivamente), apresentando estes doentes valores superiores de eosinófilos, e com a pontuação no questionário ALQ, e naturalmente com a pior qualidade de vida reportada ($r=0.30$, $p<0.05$). Detectou-se ainda correlação negativa deste parâmetro com a pontuação no questionário CARAT ($r=0.25$, $p<0.05$);
- O valor sérico de IgE total se correlacionou positivamente com a atopia ($r=0.53$, $p<0.05$) e negativamente com o ALQ ($r=-0.38$, $p<0.05$).

- Dos biomarcadores da expectoração induzida, avaliados num subgrupo de doentes (n=37), a percentagem de eosinófilos se correlacionou positivamente com a idade de início de doença após os 12 anos ($r= 0.34$, $p<0.05$) e negativamente com a percentagem de neutrófilos ($r= -0.60$, $p<0.05$), significando que os doentes com início tardio de asma tiveram valores superiores de eosinófilos e menor percentagem de neutrófilos na expectoração. A percentagem de neutrófilos correlacionou-se de forma negativa com os valores basais de FEV₁ ($r= -0.34$, $p<0.05$), com a percentagem de eosinófilos no sangue periférico ($r= -0.60$, $p<0.05$), e com a percentagem de eosinófilos na expectoração ($r= -0.43$, $p<0.05$) e com a história de exacerbação grave no último ano ($r= -0.33$, $p<0.05$), tendo estes valores mais baixos de neutrófilos.

Quadro XVII – Correlações com significado estatístico* estabelecidas entre os parâmetros avaliados na população estudada

	Parâmetros basais da função respiratória					Biomarcadores no sangue e expectoração				
	FEV ₁ (%) (n=69)	ΔFEV ₁ (n=69)	FEV ₁ / FVC (%) (n=69)	FEV ₂₅₋₇₅ (%) (n=69)	VR (n=69)	FeNO (n=42)	Eos sg (%) (n=72)	IgE sérica (mmol/L) (n=71)	Eosinófilos expectoração (%) (n=37)	Neutrófilos expectoração (%) (n=37)
Variáveis Qualitativas										
Género (masculino)	-0.27*							0.25*+		
Idade início antes 12 anos (não)							0.27*		0.34*	
Comorbilidades (sim)		-0.29*								
Hospitalização no último ano (sim)										
Exacerbação grave no último ano (sim)										-0.33*
Controlo da doença (não)	-0.33*		-0.29*	-0.44*						
Doentes em risco (sim)	-0.26*			-0.33*						
Atopia (sim)								0.53*+		
História de pneumonia (sim)	-0.26*									
HS AINE's (sim)										
Dose CSI (>750 µg PF ou equivalente)				-0.30*			0.38*+			
Obstrução persistente (sim)	-0.69*		-0.76*	-0.62*						
Reversibilidade brônquica (Sim)	-0.32*	0.38*	-0.30*	-0.35*			0.26*+			
WHO (grave)	-0.52*	0.23*	-0.46*	-0.62*			0.31*+			
ATS (grave)	-0.35*		-0.31*	-0.47*			0.38*+			

Quadro XVII (continuação) – Correlações com significado estatístico* estabelecidas entre os parâmetros avaliados na população estudada

	Parâmetros basais da função respiratória					Biomarcadores no sangue e expectoração				
	FEV ₁ (%) (n=69)	ΔFEV ₁ (n=69)	FEV ₁ / FVC (%) (n=69)	FEV ₂₅₋₇₅ (%) (n=69)	VR (n=69)	FeNO (n=42)	Eos sg (%) (n=72)	IgE sérica (mmol/L) (n=71)	Eosinófilos expectoração (%) (n=37)	Neutrófilos expectoração (%) (n=37)
Variáveis quantitativas										
Idade (anos)	-0.32*		-0.52*	-0.54*		0.30*		-0.31*		
Anos de doença (anos)	-0.48*	0.37*	-0.49*	-0.55*		0.30*				
IMC (Kg/m ²)										
ACT								0.31*		
CARAT (Rinite)			-0.24*	-0.27*		0.32*	-0.25*			
CARAT (Asma)							-0.25*	0.36*		
CARAT (Total)										
ALQ							0.30*	-0.38*		
SOA			-0.33*	-0.41*						
FeNO	-0.34*			-0.31*						
Eosinófilos sg (%):										
IgE sérica (mmol/L):										
Eosinófilos exp (%)										-0.60*
Neutrófilos exp (%)	-0.34*						-0.60*		-0.43*	

* em unidades LOG (+0.2) ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced Vital Capacity*; HS AINE's: hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteróides; IMC: Índice de massa corporal; PF: propionato de fluticasona; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*

* Significado estatística p<0.05

Correlações de variáveis considerando a população grave

As correlações analisadas no grupo de doentes graves está descrita na *Quadro XVIII* onde se apresentam os valores de correlação com significado estatístico. Na *Informação suplementar 3.II* figuram os gráficos relativos às correlações obtidas para as variáveis qualitativas, para melhor percepção desses resultados.

Da totalidade das correlações obtidas, destacamos as seguintes:

- Os valores basais de FEV₁, FEV₁/FVC e FEV₂₅₋₇₅ correlacionaram-se de forma negativa com a idade dos doentes, os anos de evolução da doença e a reversibilidade brônquica (os valores dos parâmetros referidos foram inferiores na presença de reversibilidade brônquica). Para o parâmetro IMC encontrou-se correlação positiva (quanto menor o IMC, piores os valores da função respiratória basal).
- A labilidade brônquica, medida pelo Δ FEV₁, correlacionou-se positivamente com os anos de evolução da doença ($r = 0.31$, $p < 0.05$) e negativamente com o IMC ($r = -0.37$, $p < 0.05$), significando que os doentes com maior duração da doença e os com menor valor de IMC mostraram valores superiores de variação do FEV₁ após BD.
- O valor basal de FEV₁, de forma isolada dos outros parâmetros funcionais, estabeleceu outras correlações importantes: naturalmente de forma negativa com a obstrução persistente ($r = -0.68$, $p < 0.05$), mas também com a história de reversibilidade brônquica ($r = -0.34$, $p < 0.05$), com a idade ($r = -0.36$, $p < 0.05$) e com os anos de evolução da doença ($r = -0.49$, $p < 0.05$). Portanto, os doentes obstrutivos persistentes e aqueles com história de BD positiva tiveram menores valores de FEV₁ basal, também menores quanto maior a idade e maior o número de anos de evolução da doença.
- O VR basal não se correlacionou com significado estatístico com nenhum dos parâmetros analisados.

Em relação aos biomarcadores, destacamos que:

- o FeNO se correlacionou positivamente com a presença de obstrução persistente ($r = 0.45$, $p < 0.05$) (doentes obstruídos apresentaram valores superiores), mas também de forma negativa com os valores basais de FEV₁ ($r = -0.43$, $p < 0.05$);
- a eosinofilia no sangue periférico correlacionou-se, à semelhança do que aconteceu na amostra global, positivamente com a idade da doença após os 12 anos ($r = 0.42$, $p < 0.05$), e com a terapêutica com CSI > 750 ug de PF ou equivalente ($r = 0.39$, $p < 0.05$), apresentando estes doentes valores superiores de eosinófilos;
- o valor sérico de IgE total, também à semelhança do que aconteceu para a amostra global, correlacionou-se positivamente com a atopia ($r = 0.50$, $p < 0.05$);
- dos biomarcadores da expectoração induzida, avaliada num subgrupo de doentes ($n = 24$), as percentagens de eosinófilos e de neutrófilos correlacionaram-se negativamente ($r = -0.69$, $p < 0.05$) de forma muito marcada.

Quadro XVIII – Correlações com significado estatístico* estabelecidas na população grave (WHO⁵)

	Parâmetros basais da função respiratória					Biomarcadores no sangue e expectoração				
	FEV ₁ (%) (n=69)	ΔFEV ₁ (n=69)	FEV ₁ / FVC (%) (n=69)	FEV ₂₅₋₇₅ (%) (n=69)	VR (n=69)	FeNO (n=42)	Eos sg (%) (n=72)	IgE sérica (mmol/L) (n=71)	Eosinófilos expectoração (%) (n=37)	Neutrófilos expectoração (%) (n=37)
Variáveis Qualitativas										
Género (masculino)			-0.34*			0.44*				
Idade início antes 12 anos (não)							0.42*+		0.42*	
Comorbilidades (sim)										
Hospitalização no último ano (sim)										
Exacerbação grave no último ano (sim)	0.35*									-0.56*
Controlo da doença (não)										
Doentes em risco (sim)										
Atopia (sim)								0.50*+		
História de pneumonia (sim)										
HS AINE's (sim)										
Dose CSI (>750)							0.39*+			
Obstrução persistente (sim)	-0.68*		-0.78*	-0.62*		0.45*				
Reversibilidade brônquica (Sim)	-0.34*			-0.44*						

Quadro XVIII (continuação) – Correlações com significado estatístico* estabelecidas na população grave (WHO⁵)

	Parâmetros basais da função respiratória					Biomarcadores no sangue e expectoração				
	FEV ₁ (%) (n=69)	ΔFEV ₁ (n=69)	FEV ₁ / FVC (%) (n=69)	FEV ₂₅₋₇₅ (%) (n=69)	VR (n=69)	FeNO (n=42)	Eos sg (%) (n=72)	IgE sérica (mmol/L) (n=71)	Eosinófilos expectoração (%) (n=37)	Neutrófilos expectoração (%) (n=37)
Variáveis quantitativas										
Idade (anos)	-0.36*		-0.38*	-0.48*						-0.47*+
Anos de doença (anos)	-0.49*	0.31*	-0.50*	-0.64*						
IMC (Kg/m ²)	0.32*	-0.37*	0.32*	0.46*						
ACT										
CARAT (Rinite)										
CARAT (Asma)								0.44*		
CARAT (Total)										
ALQ	0.34*									
SOA									0.45*	
FeNO	-0.43*			-0.47*						
Eosinófilos no sangue (%):										
IgE sérica (mmol/L):										
Eosinófilos exp (%)										-0.69*
Neutrófilos exp (%)									-0.69*	

ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced Vital Capacity*; HS AINE's: hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteróides; IMC: Índice de massa corporal; PF: proprionato de fluticasona; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*

* Significado estatístico se p<0.05

+ em unidades LOG (+0.2)

II.3.3. Identificação de fenótipos celulares da expectoração numa população de asmáticos e suas correlações com parâmetros clínicos, funcionais e laboratoriais

II.3.3.1 Considerações prévias

Da totalidade da população estudada conseguiram-se obter amostras de expectoração induzida em 37 doentes, maioritariamente classificados como graves (24 Vs 13, pela classificação WHO⁵).

Aplicando o mesmo racional utilizado para a descrição dos resultados da amostra total do estudo, também nesta rúbrica analisamos os resultados para a população global, com enfoque na população grave.

A concordância das classificações WHO⁵ e ATS/ERS, 2000⁴ foi novamente avaliada e obteve-se um Cohen's Kappa=0.778, $p < 0.001$, com percentagem de concordância de 89.2%, *Quadro XIX*.

Quadro XIX - Classificação de concordância entre as classificações WHO⁵ e ATS⁴ baseada nos resultados da expectoração induzida

WHO	ATS/ERS, 2000		Total
	Grave	Não-grave	
Grave	20	4	24
Não grave	0	13	13
Total	20	17	37

Cohen's Kappa=0.778 (boa concordância), $p < 0.001$; % de concordância =89,2%
 ATS: American Thoracic Society; ERS European Respiratory Society; WHO: World Health Organization

Para informação mais detalhada, descrevem-se as características demográficas, clínicas, funcionais e laboratoriais dos doentes estudados na *Informação suplementar 5*.

II.3.3.2 Contagem diferencial de células da expectoração

As amostras analisadas distribuíram-se pelos vários fenótipos celulares definidos na literatura: eosinofílico, neutrofilico, misto e paucicelular. Globalmente, o fenótipo eosinofílico foi o mais frequente (em 49% da população), seguindo-se o misto (em 32%), o neutrofilico (em 11%) e o paucigranulocítico em 8% (*Quadro XX*). Os fenótipos misto e neutrofilico classificaram 75% dos casos do grupo grave. Na comparação entre grupos de gravidade, verificou-se que na categorização do fenótipo celular da expectoração, o padrão eosinofílico foi o mais prevalente nos dois grupos, seguindo-se do misto (*Figura 4*).

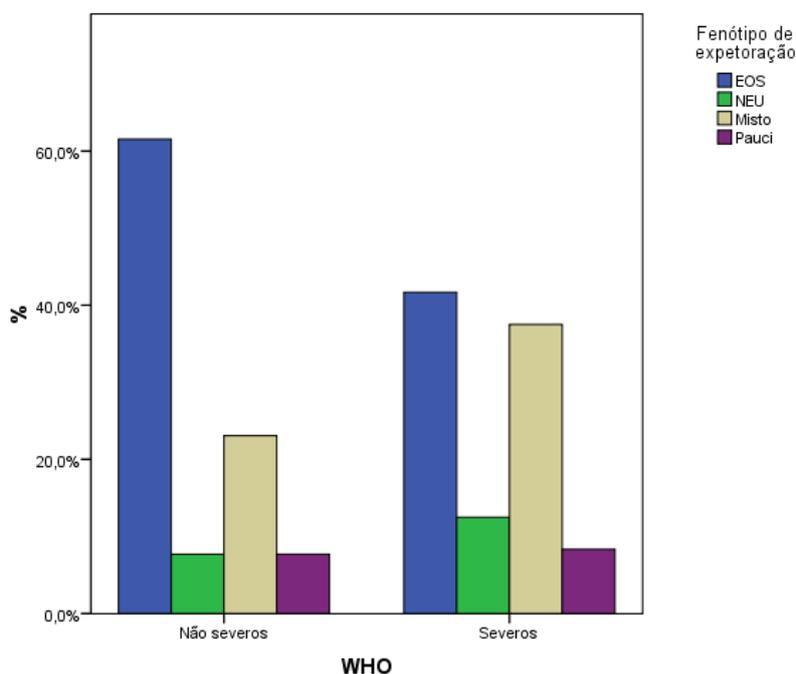


Figura 4 – Distribuição dos fenótipos celulares da expectoração, por grupos de gravidade. Gráfico demonstrativo da maior prevalência do fenótipo eosinofílico nos dois grupos de gravidade, sendo o fenótipo misto o segundo mais prevalente, de forma mais evidente no grupo grave. Eos: eosinofílico; Neu: Neutrofílico; Pauci: paucigranulocítico

Quadro XX – Distribuição dos fenótipos celulares da expectoração, globalmente e por grupos de gravidade (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Fenótipo	Total (n=37)	ATS			WHO		
		Grave (n=20)	Não grave (n=17)	Valor estatístico de p	Grave (n=24)	Não grave (n=13)	Valor estatístico de p
Eos	18(48,6)	9(50.0)	9(50.0)	Fisher=1.6 p=0.716	10(55.6)	8(44.4)	Fisher=1.5 p=0.781
Neu	4(10,8)	2(50.0)	6(50.0)		3(75.0)	1(25.0)	
Misto	12(32,4)	8(66.7)	4(33.3)		9(75.0)	3(25.0)	
Pauci	3(8,1)	1(33.3)	2(66.7)		2(66.7)	1(33.3)	

ATS: American Thoracic Society; Eos: eosinofílico; Neu: Neutrofílico; Pauci: paucigranulocítico; WHO: World Health Organization

Para além dos eosinófilos e neutrófilos foram analisadas outras células, nomeadamente os macrófagos, monócitos, basófilos, células dendríticas e linfócitos T e B (Quadro XXI).

Na contagem diferencial de células, apenas os macrófagos mostraram diferença significativa, com valor mais elevado nos não graves, $p=0.021$. A percentagem de neutrófilos mostrou forte tendência para ser superior no grupo dos graves, (59% (28.7) Vs 40% (33.0), $p=0.086$), bem como a % de células dendríticas (0.22% (0.59) Vs 0.01 (0.02), $p=0.085$) e de basófilos (0.13 (0.27) Vs 0.02 (0.005), $p=0.076$) (Quadro XXI).

Quadro XXI – Contagem diferencial de células na expectoração induzida (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	Total (n=37)	AST			WHO		
		Grave (n=20)	Não grave (n=17)	Valor estatístico de p	Grave (n=24)	Não grave (n=13)	Valor estatístico de p
Eosinófilos (%)	23,6±27,6 (n=37)	25,1±27,6 (n=20)	21,9±28,5 (n=17)	t(35)=-0.3 p=0.732	22,9±26,6 (n=24)	25,0±30,6 (n=13)	t(35)=0.2 p=0.825
Eosinófilos (%) (unidades Log +0.2)	0.9±0.8 (n=37)	1.1±0.6 (n=20)	0.8±0.9 (n=17)	t(35)=-1.1 p=0.283	0.9±0.8 (n=24)	1.0±0.8 (n=13)	t(35)=0.1 p=0.883
Neutrófilos (%)	52,1±31,1 (n=37)	56,5±29,6 (n=20)	46,8±32,9 (n=17)	t(35)=-0.9 p=0.350	58,5±28,7 (n=24)	40,2±33,0 (n=13)	<u>t(35)=-1.8</u> <u>p=0.086</u>
Macrófagos(%)	6,5±11,0 (n=36)	4,1±8,5 (n=20)	9,5±13,1 (n=16)	t(34)=1.5 0.169	3,6±7,8 (n=24)	12,4±14,1 (n=12)	t(34)=2.4 0.021
Monócitos (unidades Log +0.2)	0.6±0.7 (n=37)	0.6±0.7 (n=37)	0.6±0.7 (n=37)	t(35)=0.1 p=0.909	0.6±0.7 (n=24)	0.5±0.8 (n=13)	t(35)=-0.3 p=0.764
Monócitos (%)	8,4±11,0 (n=37)	9,5±14,1 (n=20)	7,1±5,6 (n=17)	t(35)=-0.7 p=0.487	9,2±13,0 (n=24)	6,9±5,7 (n=13)	t(35)=-0.6 p=0.563
Células Dendríticas (%)	0,15±0,48 (n=37)	0,20±0,61 (n=20)	0,08±0,24 (n=17)	t(35)=-0.8 p=0.458	0,22±0,59 (n=24)	0,01±0,02 (n=13)	<u>t(35)=-1.3</u> <u>p=0.085</u>
Basófilos (%)	0,09±0,22 (n=37)	0,14±0,29 (n=20)	0,03±0,05 (n=17)	t(35)=-1.6 p=0.103	0,13±0,27 (n=24)	0,02±0,05 (n=13)	<u>t(35)=-1.4</u> <u>p=0.076</u>
Linfócitos B (%)	0,8±3,0 (n=37)	0,5±1,0 (n=20)	1,2±4,3 (n=17)	t(35)=0.7 p=0.469	0,5±1,0 (n=24)	1,5±5,0 (n=13)	t(35)=1.0 p=0.326
Linfócitos T (unidades Log +0.2)	0.1±0.6 (n=37)	0.0±0.5 (n=20)	0.2±0.6 (n=17)	t(35)=1.6 p=0.125	0.0±0.5 (n=24)	0.3±0.7 (n=13)	t(35)=1.7 p=0.105
Linfócitos T (%)	2,7±5,4 (n=37)	1,5±2,1 (n=20)	4,3±7,4 (n=17)	t(35)=1.6 p=0.114	1,7±2,5 (n=24)	4,8±8,2 (n=13)	t(35)=1.7 p=0.092

ATS: American Thoracic Society; WHO: World Health Organization
(Valor estatístico de p: a sublinhado quando p<0.1; a negrito quando p<0.05)

II.3.3.3 Correlações das características imunocelulares da expectoração com outros parâmetros clínicos avaliados

No estabelecimento das correlações das características imunocelulares da expectoração com outros parâmetros clínicos, encontramos as que estão descritas na *Quadro XXII*. Na *Informação suplementar 3.III*, para melhor percepção dos resultados obtidos relativos às correlações obtidas para as variáveis qualitativas, figuram os respectivos gráficos.

Como se pode constatar, foram registadas poucas correlações significativas das quais destacamos: as negativas da percentagem de neutrófilos com o FEV₁ basal (r= -0,34) e com o

género ($r = -0,37$), tendo os homens valores mais baixos; as positivas da percentagem de macrófagos com o FEV₁ basal ($r = 0,35$) e da percentagem de basófilos com a IgE sérica ($r = 0,42$).

Quadro XXII – Correlações* das características imunocelulares da expectoração com outros parâmetros clínicos

Variáveis	Parâmetros basais da função respiratória				Biomarcadores no sangue			Demografia		
	FEV ₁ (%) n=36	FEV ₁ / FVC (%) n=36	FEV ₂₅₋₇₅ (%) n=35	VR n=36	FeNO n=24	Eos sg (%) n=37	IgE sérica (mmol/L) n=36	Idade n=37	IMC n=37	Género (masc.) n=37
Eosinófilos (unidades Log +0.2)										
Neutrófilos (%)	-0.34*									-0.37**
Macrófagos (%)	0.35*		0.32	-0.44*						
Monócitos (unidades Log +0.2)				-0.43*						
Céls dendríticas (%)				0.31						
Basófilos (%)						0.32	0.42*			0.38*
Linf B (%)		0.32								
Linf T (unidades Log +0.2)					0.38		0.31			

ATS: American Thoracic Society; FVC: forced vital capacity; FeNO: Fraction of exhaled nitric oxide; FEV₁: Forced expiratory volume in the first second; FVC: forced vital capacity; FEV₂₅₋₇₅: Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced Vital Capacity; Linf: Linfócitos; IMC: índice de massa corporal; VR: volume residual; WHO: World Health Organization

* significado estatístico se $p < 0,05$

* in Log(units+0.2)

II.3.4 Caracterização dos fenótipos clínicos da população. Identificação de factores de risco/protecção de fenótipo, com base em modelos de predição

Para definir fenótipos é necessário conhecer pormenores relativos à história de evolução da doença, às características fisiológicas, clínicas, laboratoriais e de resposta à terapêutica.

Foram escolhidos para análise, como referido na metodologia, as seguintes características fenotípicas da doença: atopia, idade de início da doença após 12 anos de idade, HS a AINE's, obesidade ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$), obstrução persistente da via aérea (FEV_1/FVC pós $BD \leq 70\%$), grau de gravidade (segundo a classificação WHO⁵). Cada elemento da amostra pôde pertencer a mais do que um grupo estudado.

Foi feita a sua caracterização (resumida no *Quadro XXIII*, detalhada nos *Quadros IV-S a VIII-S da Informação suplementar 4*) e foram identificados os factores de risco /protecção para a ocorrência de cada um deles, com base nos modelos de regressão construídos, e para os quais se utilizaram variáveis demográficas, clínicas, funcionais e laboratoriais (*Quadros XXIV a XXX*). Os resultados são apresentados com e sem correcção para as co-variáveis idade e género.

Quadro XXIII – Caracterização de fenótipos segundo características clínicas, funcionais e laboratoriais

Variáveis qualitativas (%) quantitativas (M, SD)	População Total (n=72)	Atopia (n=49)	Início asma após 12 anos (n=34)	HS AINE's (n=12)	Obesidade N=21	Obstrução persistente (n=22)	Grave (WHO) N=42
Género Feminino	56(77.8)	37(75.5)	23(67.6)	7(58.3)	19(90.5)	12(54.5)	31(73.8)
Género Masculino	16(22.2)	12(24.5)	11(32.4)	5(41.7)	2(9.5)	10(45.5)	11(26.2)
Idade (anos)	45.7(17.7)	42.2(18.0)	55.3(15.2)	38.7(21.4)	47.4(14.7)	55.6(13.4)	49.0(15.3)
IMC (Kg/m ²)	28.0(5.8)	27.4(5.4)	28.4(5.27)	26.4 (4.52)	35.0(4.1)	27.8(3.6)	29.1(4.9)
Anos de doença	23.3(14.4)	24.7(14.0)	20.9(14.4)	16.7(8.5)	23.3(15.0)	31.0(13.2)	24.5(14.1)
Início asma após 12 anos	34(47.2)	19(38.8)	34(100)	5(41.7)	10(47.6)	14(63.6)	24(57.1)
IMC≥ 25 Kg/m ²	52(72.2)	33(67.3)	29(85.3)	7(58.3)	21(100)	18(81.8)	34(81.0)
Atopia	49(68.1)	49(100)	19(55.9)	9(75.0)	13(61.9)	16(72.7)	25(59.5)
Exposição tabágica	24(33.3)	17(34.7)	13(38.2)	6(50)	5(23.8)	10(45.5)	16(38.1)
Polipose nasal	8(11.1)	5(10.2)	5(14.7)	4(33.3)	4(19.0)	3(13.6)	8(11.1)
Não controlo asma	57(80.3)	37(77.1)	28 (82.4)	8(66.7)	20(95.2)	20(95.2)	41(100)
ACT	19.0(5.0)	19.7(4.6)	18.6(5.8)	18.3(5.7)	19.1(4.9)	18.7(5.2)	17.8(5.7)
CARAT (asma)	11.7(4.7)	12.4(4.5)	11.3(4.7)	11.8(6.0)	11.0(4.2)	11.9(4.9)	10.4(4.5)
ALQ	12.0(3.8)	11.3(3.7)	13.3(3.5)	12.7(4.8)	13.4(3.5)	11.0(4.1)	13.0(3.9)
SOA	10.3(3.8)	9.9(4.0)	11.4(3.9)	11.8(5.1)	11.0(2.7)	12.0(3.4)	12.2(3.2)
FEV ₁ (%) Basal	93.4(26.4)	93.2(27.1)	92.4(27.2)	94.6(30.2)	100.4(22.1)	66.1(12.5)	81.0(24.5)
Δ FEV1 pós-BD (%)	7.0(7.3)	8.0(8.0)	5.7(5.6)	5.8(6.7)	5.2(3.6)	9.3(10.7)	8.4(8.3)
FEV ₁ /FVC (%) Basal	76.2(16.5)	76.4(17.9)	72.9(15.8)	77.4(17.5)	81.9(15.0)	57.4(7.2)	69.8(16.4)
Obstrução persistente (sim)	22(30.6)	16(32.7)	14(41.2)	3(25.0)	4(19.0)	22(100)	22(52.4)
CSI dose >750 µ gr PF ou eq .	29(40.3)	17(34.7)	19(55.9)	6(50.0)	11(52.4)	13(59.1)	28(66.0)
Hospitalização no último ano	25(34.7)	18(36.7)	14(41.2)	4(33.3)	8(38.1)	9(40.9)	18(41.9)
Exacerbação grave no último ano	36(50.0)	22(44.9)	19(55.9)	8(66.7)	10(47.6)	10(45.5)	25(59.5)
Classificação grave (WHO)	42(58.3)	25(51.0)	24(70.6)	7(58.3)	14(66.7)	22(100)	42(100.0)
FeNO >35 ppb	13(31.0)	10(33.3)	7(46.7)	2(22.2)	4(30.8)	4 (36.4)	6(46.2)
Eosinófilos no sangue (%):	3.3(3.3)	3.2(3.4)	4.3(4.1)	4.4(5.6)	3.7(2.9)	4.7(4.8)	4(3.7)

Quadro XXIII (continuação) – Caracterização de fenótipos segundo características clínicas, funcionais e laboratoriais

Variáveis qualitativas (%) quantitativas (M, SD)	População Total (n=72)	Atopia (n=49)	Início asma após 12 anos (n=34)	HS AINE's (n=12)	Obesidade N=21	Obstrução persistente (n=22)	Grave (WHO) N=42
Eosinófilos na expectoração (%):	23.6(27.6)	22.1(24.7)	32.6(31.1)	10.8(13.0)	20.3(21.1)	24.7(20.6)	22.9(26.6)
Neutrófilos na expectoração (%):	52.1(31.1)	52.2(28.9)	48.6(32.7)	63.7(23.3)	55.8(28.3)	66.1(25.1)	58.5 (28.7)

ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; eq.: equivalente; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; HS AINE's: hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteróides; IMC: Índice de massa corporal; PF: propionato de fluticasona; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*

II.3.4.1 Fenótipo de atopia

A prevalência deste fenótipo foi de 68% (n=49), sendo 76% mulheres, com média de idades de 42 anos (18.0) e IMC médio de 27.4 Kg/m² (5.4), com média de 25 anos (14.0) de evolução da doença. A idade de início de asma após os 12 anos foi reportada em 61% e a história de pneumonia em 27%. As comorbilidades mais prevalentes foram a rinite (88%), o excesso de peso (67%), a sinusite (43%), e algum tipo de exposição tabágica (35%).

Quanto ao controlo da doença, a pontuação de ACT, CARAT e ALQ foi respectivamente de 19.7 (4.6); 19 (6.5) e 11.3 (3.7), e 35% fazia tratamento crónico com CSI de alta dose. A avaliação da função respiratória mostrou valores sobreponíveis aos do grupo não atópico, com valores médios de FEV₁ e de FEV₁/FVC, respectivamente de 93% do previsto (27.1) e de 76% (17.9). No entanto, a reversibilidade após BD foi superior ((Δ FEV₁) 8.0% (8.0) Vs 4.8% (4.9)).

Em relação à gravidade da doença, a pontuação do questionário de gravidade SOA foi melhor nos atópicos do que nos não atópicos (9.9 (4.0) Vs 11.3 (3.3)), tendo sido registados em 45% dos doentes pelo menos um episódio de exacerbação grave no último ano e, em 37%, hospitalizações. Obtiveram a classificação de grave pelos critérios WHO⁵ 51% dos doentes.

Quanto aos biomarcadores utilizados, o FeNO mostrou um valor médio de 33 ppb (24.8), a % de eosinófilos no sangue foi de 3.2% (3.44) e na expectoração de 22% (24.7), e a de neutrófilos na expectoração de 53% (28.9), valores aproximados aos dos doentes não atópicos (*Quadro IV – S da Informação suplementar 4*)

Os atópicos diferenciaram-se com significado estatístico dos não atópicos nalguns parâmetros (*Quadro IV- S da Informação suplementar 4*) dos quais se destacam:

- idade dos doentes, menor nos atópicos (42.2 A (18) Vs 53.2 A (14.9), p=0.013);
- idade de início de doença antes dos 12 anos, mais frequente nos atópicos (61% Vs 35%, p=0.036);
- história de pneumonia, menos prevalente nos atópicos, p= 0.033
- qualidade de vida avaliada pelo ALQ, melhor nos atópicos (pontuação de 11.3 (3.7) Vs 13.5 (3.5), p=0.025);
- valor sérico de IgE, maior nos atópicos (valor de 530.8 mmol/L (761.4) Vs 82.4 mmol/L (70.6), p=0.008).

Na predição deste fenótipo (modelo de regressão detalhado na *Quadro XXIV*) encontramos, com impacto, os seguintes factores:

- idade de início de asma antes dos 12 anos, com OR 2.96; IC95%=[1.05;8.32], superior nos doentes atópicos (p=0.039);
- melhor qualidade de vida avaliada pelo ALQ (OR 0.84; IC95%=[0.71;0.98], p=0.03);
- menor ocorrência de história de pneumonia (OR_{adj} 0.28; IC95%=[0.09;0.86], p=0.027);
- menor prevalência do grau de terapêutica GINA 4 ou 5 (OR 0.26; IC95%=[0.07;0.99], p=0.05) (concordante com a menor gravidade da doença).

O pior controlo dos sintomas asmáticos avaliados pelo CARAT (sintomas asma), a maior labilidade brônquica e a menor gravidade da doença pela classificação WHO⁵ revelaram também forte tendência para impacto neste modelo.

Quadro XXIV – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com atopia

ATOPIA				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Co-variáveis				
Género (masculino) (n=71)	1.97	[0.51;7.57]	1.54	[0.44;5.43]
Idade (anos) (n=71)	0.96* (p=0.014)	[0.93;0.99]	0.96* (p=0.017)	[0.93;0.99]
Escalas				
WHO (grave) (n=71)	<u>0.36 (p=0.09)</u>	[0.11;1.19]	<u>0.37 (p=0.07)</u>	[0.12;1.09]
ATS (grave) (n=71)	0.80	[0.28;2.30]	0.75	[0.28;2.02]
Características da doença				
Início da doença antes dos 12 anos (n=71)	2.13	[0.62;7.23]	2.96* (p=0.039)	[1.05;8.32]
Anos de doença (anos) (n=71)	<u>1.07 (p=0.007)</u>	[1.02;1.12]	1.02	[0.99;1.06]
Presença de comorbilidades (n=71)	3.72	[0.41;33.67]	2.24	[0.30;16.98]
Comorbilidades (n=71)				
Atopia	n.a.		n.a.	
Tipo de alergia				
Ácaros	PE		PE	
Pólenes	PE		PE	
Fungus	PE		PE	
Barata	PE		PE	
Fâneros	PE		PE	
IMC (≥30 Kg/m ²)	0.77	[0.25;2.36]	0.68	[0.23;1.97]
HS AINE's	0.98	[0.21;4.66]	1.54	[0.37;6.32]
Rinite	1.67	[0.44;6.39]	2.53	[0.72;8.95]
Polipose	0.86	[0.16;4.49]	0.76	[0.17;3.48]
Sinusite	0.56	[0.19;1.65]	0.69	[0.25;1.86]
Exposição tabágica	1.04	[0.33;3.25]	1.21	[0.42;3.52]
História de Pneumonia	0.28* (p=0.027)	[0.09;0.86]	0.33* (p=0.036)	[0.12;0.93]
Ansiedade	0.83	[0.25;2.76]	0.63	[0.21;1.84]
Depressão	0.42	[0.08;2.16]	0.24 (p=0.068)	[0.05;1.11]
SAOS	2.45	[0.19;31.51]	0.94	[0.08;10.88]
RGE	2.15	[0.60;7.75]	1.13	[0.37;3.47]
Défice de α1AT	0.38	[0.04;3.49]	0.45	[0.06;3.39]
Bronquiectasia	0.33	[0.05;2.10]	<u>0.20 (p=0.078)</u>	[0.03;1.20]
DPOC	0.35	[0.04;2.84]	0.28	[0.04;1.83]
Outra doença obstrutiva	0.50	[0.12;2.13]	<u>0.32 (p=0.09)</u>	[0.09;1.20]
Aspergillus (IgE positiva)	PE		PE	

Quadro XXIV (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com atopia

ATOPIA				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos futuros				
Não controlo da doença (n=71)	0.58	[0.13;2.63]	0.51	[0.13;2.02]
Doente em risco (n=70)	0.52	[0.10;2.86]	0.33	[0.07;1.63]
ACT (n=70)	1.07	[0.96;1.19]	1.08	[0.98;1.20]
CARAT (Rinite) (n=68)	1.02	[0.86;1.20]	0.96	[0.82;1.13]
CARAT (Asma) (n=68)	<u>1.11 (p=0.099)</u>	[0.98;1.25]	1.11 (p=0.057)	[0.99;1.25]
ALQ (n=63)	<u>0.85 (p=0.054)</u>	[0.714;1.00]	0.84* (p=0.03)	[0.71;0.98]
SOA (n=69)	0.917	[0.78;1.08]	0.90	[0.79;1.04]
Hospitalização (último ano) (n=71)	1.34	[0.44;4.08]	1.33	[0.46;3.84]
Exacerbação grave (último ano) (n=71)	0.42	[0.14;1.26]	0.52	[0.19;1.43]
Terapêutica (n=71)				
Dose CSI (>750 µg PF ou eq)	0.46	[0.15;1.40]	0.49	[0.18;1.33]
Terapêutica (step4+step5)	0.37	[0.09;1.53]	0.26* (p=0.05)	[0.07;0.99]
Função pulmonary				
Obstrução persistente (n=71)	2.38	[0.62;9.24]	1.37	[0.46;4.15]
Reversibilidade brônquica (n=71)	1.03	[0.35;3.04]	1.02	[0.37;2.81]
FEV ₁ basal (n=68)	0.99	[0.97;1.02]	0.99	[0.98;1.02]
FEV ₁ (Δ) pós-BD (n=68)	<u>1.09 (p=0.112)</u>	[0.98;1.21]	1.09	[0.98;1.20]
FEV ₁ /FVC basal (n=68)	0.98	[0.94;1.02]	1.00	[0.97;1.04]
FEV ₁ /FVC (Δ) pós-BD (n=68)	1.01	[0.93;1.11]	1.00	[0.93;1.08]
FEV ₂₅₋₇₅ basal (n=68)	1.00	[0.98;1.02]	1.01	[0.99;1.03]
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ) pós-BD (n=68)	1.00	[0.97;1.02]	1.00	[0.99;1.02]
VR basal (n=59)	1.00	[0.98;1.01]	1.00	[0.98;1.01]
VR (Δ) pós-BD	<u>0.94 (p=0.04)</u>	[0.88;0.99]	<u>0.95 (P=0.055)</u>	[0.90;1.00]
DLCO (n=54)	1.02	[0.99;1.05]	1.02	[0.99;1.06]
Biomarcadores				
Eosinófilos sg (n=71)	0.92	[0.79;1.08]	0.95	[0.82;1.10]
Log (Eosinófilos sg +1)	0.20	[0.03;1.58]	0.36	[0.06;2.24]
Log (IgE total +1)	1.01* (p=0.009)	[1.01;1.02]	1.01* (p=0.003)	[1.01;1.002]
IgE total sg (n=70)	1.01* (p=0.009)	[1.01;1.02]	1.01* (p=0.003)	[1.00;1.02]
FeNO (>=35 ppb) (n=41)	1.79	[0.33;9.61]	1.50	[0.33;6.80]
Expectoração				
Fenótipo expectoração (Eos)	0.53	[0.1;2.94]	0.52	[0.10;2.63]
Eosinófilos (%) (n=36)	1.00	[0.97;1.02]	0.99	[0.97;1.02]
Log (Eosinófilos +0.2)	1.14	[0.44;2.93]	1.04	[0.43;2.55]
Neutrófilos (%) (n=36)	1.00	[0.98;1.03]	1.00	[0.98;1.03]
Log (Neutrófilos +0.2)	PE		PE	

ACT: Asthma Control Test; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: Asthma Life Quality Questionnaire; AT: antitripsina; ATS: American Thoracic Society²; BD: broncodilatação; CARAT: Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente; FeNO: Fraction of exhaled nitric oxide; FEV₁: Forced expiratory volume in the first second; FEV₂₅₋₇₅: Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of forced vital capacity; IMC: Índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; PE: Poor estimate; RGE:

refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; Sg: sangue; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*⁵

*Significado estatístico $p < 0.05$

A sublinhado, $p < 0.1$; a negrito: $p < 0.05$

II.3.4.2 Fenótipo com idade de início de asma após os 12 anos de idade

A prevalência foi de 47% ($n=34$), sendo 67% do sexo feminino, com média de idades de 55A (15.2), 21 anos (14.4) de evolução da doença e IMC médio elevado e de 29Kg/m² (5.3). As comorbilidades mais prevalentes foram o excesso de peso e a rinite (85%), a atopia (56%), a exposição tabágica e o RGE (38%).

Em relação ao controlo da doença, apenas se verificou em 18% dos doentes, apesar de 56% fazer tratamento com CSI de altas doses e 73% estar no grau 4 ou 5 de tratamento GINA. A pontuação dos questionários de controlo ACT e CARAT e de qualidade de vida ALQ, foram, respectivamente, de 18.6 (5.80), 19.1 (6.70) e 13.3 (3.55). Tiveram necessidade de recorrer a pelo menos um ciclo de CSO 58% dos doentes, tendo-se verificado uma percentagem de exacerbações graves de 60% e de hospitalizações no último ano de 41%. Na função respiratória, o valor médio de FEV₁ basal foi de 92% (27.2) e o de FEV₁/FVC de 73% (15.8), sendo o VR de 125% (28.8). A obstrução persistente da via aérea foi detectada em 41% do grupo e foram classificados como graves 71% dos doentes, com valor médio no questionário SOA de 11.4 (3.91).

Quanto aos biomarcadores, o FeNO teve um valor médio de 35 ppb (20.4), a percentagem de eosinófilos no sangue e na expectoração foi respectivamente de 4.3 % (4.10) e de 32.6% (31.10) e a de neutrófilos na expectoração de 48.6 % (32.78).

Na análise comparativa destes doentes, em relação aos restantes, encontramos algumas diferenças significativas (*Quadro V - S da Informação suplementar 4*) tais como:

- a distribuição por géneros, em que a maior prevalência das mulheres foi menos acentuada no grupo com idade de início tardio da doença (68% Vs 87%, $p = 0.050$);
- a média de idades dos doentes, significativamente mais elevada nos de asma de início tardio (55 anos (15.2) Vs 37 anos (15.4), $p < 0.001$);
- o excesso de peso (presente em 85% dos doentes com asma de início tardio Vs os 61% nos de asma de início precoce, $p = 0.019$);
- a menor frequência de atopia, (60% Vs 79%, $p = 0.036$);
- o pior controlo da doença e qualidade de vida, com diferença significativa nas pontuações dos questionários ACT ($p = 0.019$), CARAT (rinite) ($p = 0.010$) e ALQ ($p = 0.010$), apesar do significativo maior uso de CSI em altas doses ($p = 0.011$);
- o maior número de doentes graves (71% Vs 47% nos de asma com início da doença depois dos 12 anos, $p = 0.046$) com maior grau de gravidade (valores de SOA significativamente superiores (11.4 (3.91) Vs 9.3 (3.49), $p = 0.02$).

- o valor percentual de eosinófilos no sangue, significativamente superior nos de asma de início tardio, (4.3% (4.1) Vs 2.5% (1.9), $p=0.020$) e apesar do maior grau de atopia nos de asma de início precoce.

Com impacto na predição deste fenótipo (modelo detalhado na *Quadro XXV*) registámos várias variáveis. Designadamente, como factores de risco:

- a idade do doente (ORadj 1.08; IC95%=[1.04;1.12], $p<0.001$);
- a gravidade pela classificação WHO⁵ (OR 2.67; IC95%= [1.01;7.07], $p=0.049$) e pela pontuação SOA (OR 1.17; IC95%=[1.02;1.34], $p=0.025$);
- a elevada dose de CSI utilizada (OR 3.55; IC95%=[1.32;9.54], $p=0.012$);
- a pior qualidade de vida (ORadj 1.33; IC95% = [1.08;1.62], $p=0.007$);
- a reversibilidade da obstrução das pequenas vias aéreas (OR 0.98; IC95%= [0.96-0.99], $p=0.023$);
- alguns biomarcadores como os eosinófilos no sangue (ORadj 1.26; IC95%= [1.02;1.57], $p=0.034$).

O género masculino, o RGE e a obstrução persistente, mostraram também tendência para factores de risco para este fenótipo.

Como factores protectores para a ocorrência do fenótipo detectámos:

- o número de anos de evolução da doença (ORadj 0,75; IC95%= [0.64;0.89], $p=0.001$);
- a atopia (OR 0.34; IC95%=[0.12;0.95], $p=0.039$).

Quadro XXV – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com idade de início de asma após os 12 anos de idade ($p < 0.05$)

Início da doença após 12 anos				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Co-variáveis				
Genero (masculino) (n=71)	3.71 (p=0.075)	[0.88; 15.70]	<u>3.16 (p=0.057)</u>	[0.97; 10.31]
Idade (anos) (n=71)	1.08* (p<0.001)	[1.04; 1.12]	1.08* (p<0.001)	[1.04; 1.11]
Escalas				
WHO (grave) (n=71)	1.99	[0.63; 6.28]	2.67* (p=0.049)	[1.01; 7.07]
ATS (grave) (n=71)	2.49	[0.79; 7.87]	<u>2.45 (p=0.064)</u>	[0.94; 6.33]
Características da doença				
Início da doença antes dos 12 anos (n=71)	n.a	n.a	n.a.	
Anos de doença (anos) (n=71)	0.75* (p=0.001)	[0.64; 0.89]	0.98	[0.94;1.01]
Presença de comorbilidades (n=71)	Pobre estimativa (PE)		PE	
Comorbilidades (n=71)				
Atopia	0.51	[0.15; 1.75]	0.34* (p=0.039)	[0.12; 0.95]
Tipo de alergia				
Ácaros	0.46	[0.14; 1.55]	0.28* (p=0.012)	[0.10; 0.76]
Pólen	1.30	[0.39; 4.36]	1.17	[0.43; 3.20]
Fungus	PE		PE	
Barata	PE		PE	
Fâneros	PE		PE	
IMC (≥ 30 Kg/m ²)	1.11	[0.33; 3.81]	1.02	[0.37; 2.83]
HS AINE's	0.87	[0.15; 4.91]	0.74	[0.21; 2.60]
Rinite	2.79	[0.59; 13.17]	1.31	[0.37; 4.59]
Polipose	1.19	[0.15; 9.69]	2.01	[0.44; 9.13]
Sinusite	0.67	[0.22; 2.07]	0.56	[0.22; 1.43]
Exposição tabágica	2.17	[0.61; 7.71]	1.52	[0.57; 4.07]
História de Pneumonia	0.97	[0.29; 3.23]	0.82	[0.31; 2.17]
Ansiedade	1.17	[0.35; 3.92]	1.22	[0.43; 3.43]
Depressão	0.26	[0.04; 1.58]	0.66	[0.14; 3.00]
SAOS	PE		PE	
RGE	1.36	[0.39; 4.76]	<u>2.74 (p=0.065)</u>	[0.94; 8.02]
Défice de $\alpha 1$ AT	0.43	[0.03; 6.84]	1.13	[0.15; 8.46]
Bronquiectasia	0.57	[0.09; 3.61]	1.13	[0.21; 6.00]
DPOC	0.21	[0.02; 2.14]	1.74	[0.27; 11.11]
Outra doença obstrutiva	0.46	[0.08; 2.42]	2.20	[0.58; 8.32]
Aspergillus (IgE positiva)	0.24	[0.01; 4.95]	1.12	[0.07; 18.7]

Quadro XXV (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com idade de início de asma após os 12 anos de idade ($p < 0.05$)

Início da doença após 12 anos				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos futuros				
Não controlo da doença (n=71)	0.85	[0.19;3.90]	1.29	[0.40;4.19]
Doente em risco (n=70)	1.74	[0.35;8.67]	<u>3.69 (p=0.065)</u>	[0.92;14.78]
ACT (n=70)	0.99	[0.88;1.11]	0.97	[0.88;1.06]
CARAT (Rinite) (n=68)	1.16	[0.97;1.38]	<u>1.20 (p=0.023)</u>	[1.03;1.41]
CARAT (Asma) (n=68)	0.97	[0.85;1.10]	0.96	[0.87;1.07]
ALQ (n=63)	1.33* (p=0.007)	[1.08;1.62]	1.20* (p=0.014)	[1.04;1.40]
SOA (n=69)	1.12	[0.95;1.34]	1.17* (p=0.025)	[1.02;1.34]
Hospitalização (último ano) (n=71)	2.60	[0.77;8.80]	1.72	[0.65;4.57]
Exacerbação grave (último ano) (n=71)	2.20	[0.70;6.93]	1.57	[0.62;3.97]
Terapêutica (n=71)				
Dose CSI (>750 µg PF ou eq)	<u>3.17 (p=0.054)</u>	[0.98;10.27]	3.55* (p=0.012)	[1.32;9.54]
Terapêutica (step4+step5)	0.52	[0.13;2.05]	1.28	[0.46;3.57]
Função pulmonar				
Obstrução persistente (n=71)	0.80	[0.22;2.95]	<u>2.63 (p=0.068)</u>	[0.93;7.40]
Reversibilidade brônquica (n=71)	0.48	[0.15;1.53]	0.77	[0.30;1.98]
FEV ₁ basal (n=68)	1.02	[0.99;1.05]	1.00	[0.98;1.02]
FEV ₁ (Δ) pós-BD (n=68)	0.95	[0.85;1.05]	0.95	[0.88;1.02]
FEV ₁ /FVC basal (n=68)	1.02	[0.98;1.06]	0.98	[0.95;1.00]
FEV ₁ /FVC (Δ) pós-BD (n=68)	0.99	[0.89;1.10]	1.01	[0.94;1.08]
FEV ₂₅₋₇₅ basal (n=68)	1.01	[0.99;1.03]	<u>0.99 (p=0.058)</u>	[0.97;1.00]
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ) pós-BD (n=68)	0.99	[0.97;1.02]	0.98* (p=0.023)	[0.96;0.99]
VR basal (n=59)	1.00	[0.98;1.02]	1.00	[0.99;1.02]
VR (Δ) pós-BD	1.04	[0.98;1.11]	1.01	[0.97;1.07]
DLCO (n=54)	1.01	[0.98;1.04]	1.00	[0.97;1.02]
Biomarcadores				
Eosinófilos sg (n=71)	1.35* (p=0.037)	[1.02;1.80]	1.26* (p=0.034)	[1.02; 1.57]
Log (Eosinófilos sg +1)	16.65* (p=0.023)	[1.46; 189.16]	8.41* (p=0.027)	[1.27; 55.49]
Log (IgE total +1)	1.00	[0.99; 1.00]	<u>0.99 (p=0.098)</u>	[0.99; 1.00]

Quadro XXV (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com idade de início de asma após os 12 anos de idade ($p < 0.05$)

Início da doença após 12 anos				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Biomarcadores				
IgE total sg (n=70)	0.57	[0.19;1.65]	1.00	[0.99;1.00]
FeNO (>=35 ppb) (n=41)	2.38	[0.49;11.54]	3.06	[0.79;11.94]
Expectoração				
Fenótipo expectoração (Eos)	1.19	[0.19;7.47]	1.25	[0.29;5.41]
Eosinófilos (%) (n=36)	1.02	[0.99;1.05]	<u>1.03 (p=0.056)</u>	[1.00;1.06]
Log (Eosinófilos +0.2)	1.45	[0.51;4.08]	PE	
Neutrófilos (%) (n=36)	0.99	[0.96;1.01]	0.99	[0.97;1.01]
Log (Neutrófilos +0.2)	Poor Est		PE	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*⁴; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; PE: *Poor estimate*; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; Sg: sangue; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*⁵

*Significado estatístico se $p < 0.05$.

A sublinhado, $p < 0.1$; a negrito: $p < 0.05$

II.4.4.3 Fenótipo de HS a AINE's

Teve prevalência de 16.7% (n=12), sendo 58% mulheres, percentagem bastante inferior à encontrada na restante população (80%), com IMC médio de 26.4 Kg/m² (4.5). Apesar de em 58% dos doentes a asma ter tido início após os 12 anos, a média de idades (39 anos (21.4)) foi baixa.

Registámos, em relação aos restantes doentes, maior atopia (75% Vs 66%), maior prevalência de polipose nasal (33% Vs 6%), menor obesidade (excesso de peso em 58% Vs 73%) e maior exposição tabágica (50% Vs 31%). A história de pneumonia no decurso da doença foi mais frequente (em 42% Vs 34%).

Apesar da maior gravidade avaliada pelo questionário SOA (11.8 (5.1) Vs 10.3 (3.8)) e de 58% ter obtido a classificação de grave pelos critérios WHO⁵ (percentagem sobreponível ao da restante população), o controlo da doença foi superior neste fenótipo (33% Vs 16%). Em 67% dos doentes foram registados pelo menos um episódio de exacerbação grave no último ano e, em 33%, hospitalizações. A avaliação da função respiratória mostrou valores médios de FEV₁ e de FEV₁/FVC sobreponíveis aos restantes doentes, mas a labilidade brônquica foi inferior (Δ FEV₁ 5.8 % (6,7) Vs 7.2 (7.5)), tendo-se verificado obstrução persistente da via aérea em 25% dos doentes.

Quanto aos biomarcadores utilizados, o FeNO mostrou um valor médio de 32 ppb (33.0), a percentagem de eosinófilos no sangue foi de 4.4% (5.6) e na expectoração de 10.8 % (13.0), sendo a de neutrófilos na expectoração de 64% (23.3), ou seja uma inflamação mista, mas mais neutrofílica em relação à restante população.

Apesar das diferenças descritas, na análise comparativa destes doentes em relação aos restantes (*Quadro VI - S da Informação suplementar 4*), merecem destaque, pelo significado estatístico:

- o menor número de anos de evolução da doença, $p= 0.018$;
- a maior prevalência de polipose nasal, $p= 0.008$;
- a pior qualidade de vida, $p=0.010$;
- a menor inflamação brônquica eosinofílica, $p=0.037$.

Dos factores de risco identificados para este fenótipo, com base no modelo descrito detalhadamente no *Quadro XXVI*, destacamos, com valor estatístico significativo e após correcção para os factores idade e género:

- a polipose nasal, (ORadj 9.5; IC95%=[1.59; 57.07], $p=0.014$);
- o maior grau de gravidade, medido pelo SOA (ORadj 1.2; IC95%= [1.02; 1.49], $p= 0.031$).

A presença de RGE e o género masculino também mostraram forte tendência para impacto neste modelo.

Quadro XXVI – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com HS a AINE’s ($p<0.05$)

HS AINE's				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Género (masculino) (n=71)	3.67	[0.92;14.66]	3.12 (0=0.092)	[0.83;11.68]
Idade (anos) (n=71)	1.0	[0.9;1.0]	0.97	[0.94;1.01]
Escalas				
WHO (grave) (n=71)	1.4	[0.3;6.2]	1.03	[0.29;3.62]
ATS (grave) (n=71)	2.8	[0.6;12.1]	1.78	[0.51;6.25]
Características da doença				
Início da doença antes dos 12 anos (n=71)	1.09	[0.22;5.25]	1.35	[0.39;4.75]
Anos de doença (anos) (n=71)	0.96	[0.90;1.02]	0.95	[0.90;1.01]
Presença de comorbilidades (n=71)	PE		PE	
Atopia	0.98	[0.21;4.56]	1.54	[0.37;6.32]
Tipo de alergia				
Ácaros	0.73	[0.16;3.24]	1.27	[0.34;4.73]
Pollens	0.96	[0.24;3.95]	1.14	[0.30;4.27]
Fungus	PE		PE	
Barata	1.90	[0.13;26.85]	2.59	[0.21;31.12]
Fâneros	2.95	[0.15;59.78]	5.27	[0.31;90.77]

Quadro XXVI (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com HS a AINE's ($p < 0.05$)

HS AINE's				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Comorbilidades (n=71)				
IMC (≥ 30 Kg/m ²)	0.26	[0.03;2.27]	0.19	[0.02;1.59]
HS AINE's	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Rinite	PE		PE	
Polipose	9.53* (p=0.014)	[1.59;57.07]	6.88* (p=0.016)	[1.43;33.11]
Sinusite	2.11	[0.55;8.11]	1.90	[0.54;6.70]
Exposição tabágica	2.03	[0.55;7.56]	2.28	[0.65;8.03]
História de Pneumonia	1.95	[0.49;7.88]	1.39	[0.39;4.95]
Ansiedade	0.22	[0.02;2.00]	0.20	[0.02;1.69]
Depressão	1.72	[0.15;19.12]	0.66	[0.07;5.94]
SAOS	P:E		PE	
RGE	<u>3.78 (p=0.096)</u>	[0.79;18.13]	2.10	[0.58;7.60]
Défice de α 1AT	5.84	[0.65;52.51]	5.70	[0.72;45.3]
Bronquiectasia	PE		PE	
DPOC	1.49	[0.11;20.14]	1.25	[0.13;12.30]
Outra doença obstrutiva	2.12	[0.27;16.66]	1.11	[0.21;5.93]
Aspergillus (IgE positiva)	7.80	[0.34;181.36]	5.17	[0.31;90.77]
Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos futuros				
Não controlo da doença (n=71)	0.64	[0.13;3.17]	0.42	[0.10;1.66]
Doente em risco (n=70)	1.05	[0.19;5.79]	0.61	[0.14;2.67]
ACT (n=70)	0.91	[0.80;1.04]	0.96	[0.85;1.08]
CARAT (Rinite) (n=68)	0.92	[0.75;1.14]	0.90	[0.74;1.10]
CARAT (Asma) (n=68)	0.94	[0.81;1.09]	1.00	[0.87;1.14]
ALQ (n=63)	1.19	[0.96;1.48]	1.07	[0.88;1.29]
SOA (n=69)	1.23* (p=0.031)	[1.02;1.49]	1.14	[0.95;1.35]
Hospitalização (último ano) (n=71)	1.08	[0.27;4.28]	0.91	[0.24;3.36]
Exacerbação grave (último ano) (n=71)	2.55	[0.63;10.38]	2.21	[0.60;8.16]
Terapêutica (n=71)				
Dose CSI (>750 μ g PF ou eq)	2.09	[0.51;8.47]	1.68	[0.48;5.86]
Terapêutica (step4+step5)	1.85	[0.34;9.79]	0.81	[0.22;3.05]
Função pulmonar				
Obstrução persistente (n=71)	0.61	[0.10;3.80]	0.70	[0.17;2.89]
Reversibilidade brônquica (n=71)	1.20	[0.31;4.68]	1.14	[0.32;4.01]
FEV ₁ basal (n=68)	1.00	[0.97;1.03]	1.00	[0.98;1.03]
FEV ₁ (Δ) pós-BD (n=68)	0.98	[0.88;1.09]	0.97	[0.88;1.07]
FEV ₁ /FVC basal (n=68)	0.99	[0.95;1.04]	1.01	[0.97;1.04]
FEV ₁ /FVC (Δ) pós-BD (n=68)	1.02	[0.92;1.12]	1.00	[0.91;1.10]
FEV ₂₅₋₇₅ basal (n=68)	1.00	[0.98;1.02]	1.00	[0.99;1.02]
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ) pós-BD (n=68)	1.00	[0.97;1.03]	1.00	[0.98;1.02]
VR basal (n=59)	1.00	[0.98;1.02]	1.00	[0.98;1.02]
VR (Δ) pós-BD	1.03	[0.97;1.10]	1.02	[0.96;1.08]
DLCO (n=54)	1.00	[0.97;1.04]	1.01	[0.98;1.05]

Quadro XXVI (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com HS a AINE's ($p < 0.05$)

HS AINE's				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Biomarcadores				
Eosinófilos sg (n=71)	1.09	[0.91;1.30]	1.10	[0.94;1.30]
Log (Eosinófilos sg +1)	1.83	[0.17;20.14]	PE	
Log (IgE total +1)	1.00	[0.99;1.00]	1.00	[0.99;1.00]
IgE total sg (n=70)	1.05	[0.29;3.77]	1.00	[0.99;1.00]
FeNO (>=35 ppb) (n=41)	0.39	[0.05;2.85]	0.55	[0.10;3.09]
Expectoração				
Fenótipo expectoração (Eos)	0.96	[0.90;1.02]	0.97	[0.92;1.02]
Eosinófilos (%) (n=36)	1.02	[0.99;1.05]	1.02	[0.99;1.05]
Log (Eosinófilos +0.2)	0.70	[0.060;8.167]	0.33	[0.05;2.42]
Neutrófilos (%) (n=36)	0.55	[0.16;1.97]	1.01	[0.99;1.05]
Log (Neutrófilos +0.2)	PE		PE	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*²; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; PE: *Poor estimate*; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; Sg: sangue; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*⁵

*Significado estatístico se $p < 0.05$

A sublinhado, $p < 0.1$; a negrito: $p < 0.05$

II.4.4.4 Fenótipo de obesidade (IMC ≥ 30 Kg/m²)

A prevalência foi de 29% (n=21), o IMC médio de 35 Kg/m² (4.1), a média de idades de 47.4 anos (14.77), com duração de evolução da doença de 23 anos (15.0). Tiveram idade de início de asma após os 12 anos 52% dos obesos, percentagem semelhante à dos não obesos. A distribuição por género foi maior no feminino, que constituiu 91% da população de obesos, sendo menor a prevalência de atopia, de rinite e de exposição tabágica em relação à restante população (62% Vs 73%, 71% Vs 88% e 24% Vs 38 %).

Verificou-se, segundo os nossos critérios, não existir controlo total da doença em 95% dos obesos, percentagem superior aos 74% nos não obesos, sendo, no entanto, a pontuação média de ACT (19 (4.9)) sobreponível entre os dois grupos. A avaliação da qualidade de vida medida pelo ALQ foi consideravelmente pior (13.4, (3.5) Vs 11.4 (3.7)), e a pontuação no questionário de gravidade SOA superior (11 (2.7) Vs 10 (4.2)), tendo sido classificados como graves pela classificação WHO⁵ 67%. Apesar do maior recurso a tratamento com doses elevadas de CSI (em 52% dos obesos Vs 35% nos não obesos), não houve maior recurso a ciclos de CSO nem foi maior a taxa de hospitalizações.

A função respiratória mostrou melhores valores médios nos obesos do que nos restantes, com FEV₁ basal de 100 % do previsto (22.1) e FEV₁/FVC de 82% (15.0), mas menor reversibilidade (Δ FEV₁ 5.2% (3.6) Vs 7.7% (8.2)).

Quanto aos marcadores de inflamação, tanto o FeNO como a celularidade da expectoração mostraram valores sobreponíveis à restante população.

Na comparação dos dois grupos (*Quadro VII - S da Informação suplementar 4*), não se detectaram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros analisados. No entanto, na comparação dos doentes com IMC>25Kg/m² (excesso de peso Vs sem excesso de peso), as diferenças acentuaram-se e encontrámos algumas significativas, sendo as mais relevantes as relativas ao controlo da doença e da qualidade de vida, à obstrução das pequenas vias aéreas e ao grau de CSI utilizado. Nos doentes com excesso de peso, foi mais frequente o não controlo da doença (p=0.004), com piores valores quando avaliado pelos questionários ACT e CARAT (p= 0.016 e p= 0.015), e pior a qualidade de vida (p=0.022) e a gravidade da doença (SOA, p= 0.034), apesar de mais doentes fazerem CSI em altas doses (p=0.030). Não sendo diferentes os valores basais de FEV₁, verificou-se maior limitação dos débitos intermédios nos doentes com excesso de peso, p=0.026.

Relativamente aos factores preditores do fenótipo obesidade (*Quadro XXVII*), não destacamos nenhum com significado estatístico, embora o não controlo da doença se tenha mostrado importante (OR 7.03; IC95%= [0.86;57.70], p=0.07).

Quadro XXVII – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo obesidade (IMC \geq 30 Kg/m²)

IMC \geq 30 Kg/m ²				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Co-variáveis				
Género (masculino) (n=71)	0.26	[0.05;1.30]	0.28	[0.06;1.35]
Idade (anos) (n=71)	1.01	[0.98;1.04]	1.01	[0.98;1.04]
Escalas				
WHO (grave) (n=71)	1.81	[0.60;5.45]	1.64	[0.57;4.75]
ATS (grave) (n=71)	1.82	[0.63;5.23]	1.75	[0.63;4.91]
Características da doença				
Início da doença antes dos 12 anos (n=71)	0.94	[0.27;3.25]	0.98	[0.35;2.71]
Anos de doença (anos) (n=71)	0.99	[0.95;1.03]	1.00	[0.97;1.04]
Presença de comorbilidades (n=71)	PE		PE	
Comorbilidades (n=71)				
Atopia	0.80	[0.25;2.51]	0.68	[0.23;1.96]
Tipo de alergia				
Ácaros	0.87	[0.28;2.75]	0.73	[0.26;2.05]
Pólenes	0.94	[0.30;2.96]	0.88	[0.29;2.67]
Fungus	PE	PE	PE	Pe
Barata	PE	PE	PE	Pe
Fâneros	PE	PE	PE	PE

Quadro XXVII (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo obesidade (IMC ≥ 30 Kg/m²)

IMC ≥ 30 Kg/m ²				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
IMC (≥ 30 Kg/m ²)	n.a.		n.a.	
HS AINE's	0.24	[0.03;2.12]	0.19	[0.02;1.59]
Rinite	0.41	[0.11;1.55]	<u>0.33(p=0.091)</u>	[0.09;1.19]
Polipose	3.73	[0.73;19.2]	2.77	[0.62;12.30]
Sinusite	1.93	[0.67;5.62]	1.91	[0.68;5.32]
Exposição tabágica	0.60	[0.18;1.96]	0.53	[0.17;1.67]
História de Pneumonia	1.16	[0.39;3.41]	1.23	[0.43;3.54]
Ansiedade	0.39	[0.10;1.48]	0.55	[0.16;1.90]
Depressão	1.14	[0.22;5.86]	1.62	[0.35;7.54]
SAOS	PE	PE	PE	PE
RGE	1.39	[0.41;4.74]	1.46	[0.48;4.41]
Défice de $\alpha 1$ AT	PE	PE	PE	PE
Bronquiectasia	0.29	[0.03;2.78]	0.46	[0.05;4.19]
DPOC	0.75	[0.07;8.60]	0.59	[0.06;5.59]
Outra doença Obstrutiva	0.43	[0.08;2.46]	0.49	[0.09;2.50]
Aspergillus (IgE positiva)	PE	PE	PE	PE
Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos futuros				
Não controlo da doença (n=71)	<u>6.75 (p=0.079)</u>	[0.80;56.71]	<u>7.03 (p=0.07)</u>	[0.86;57.70]
Doente em risco (n=70)	1.30	[0.29;5.77]	1.46	[0.36;5.96]
ACT (n=70)	1.02	[0.91;1.13]	1.01	[0.91;1.12]
CARAT (Rinite) (n=68)	0.90	[0.76;1.07]	0.94	[0.80;1.10]
CARAT (Asma) (n=68)	0.97	[0.87;1.09]	0.96	[0.86;1.07]
ALQ (n=63)	1.14	[0.97;1.35]	1.16	[0.99;1.36]
SOA (n=69)	1.09	[0.93;1.27]	1.07	[0.93;1.23]
Hospitalização (último ano) (n=71)	1.15	[0.39;3.38]	1.23	[0.43;3.54]
Exacerbação grave (último ano) (n=71)	0.90	[0.32;2.57]	0.87	[0.32;2.42]
Terapêutica (n=71)				
Dose CSI (>750 μ g PF ou eq)	2.50	[0.84;7.47]	2.02	[0.72;5.66]
Terapêutica (Step4+step5)	1.85	[0.51;6.78]	2.13	[0.62;7.31]
Função pulmonary				
Obstrução persistente (n=71)	0.47	[0.12;1.86]	0.43	[0.12;1.48]
Reversibilidade brônquica (n=71)	0.73	[0.25;2.11]	0.66	[0.24;1.83]
FEV ₁ basal (n=68)	1.01	[0.99;1.04]	1.01	[0.99;1.04]
FEV ₁ (Δ)pós-BD (n=68)	0.93	[0.84;1.03]	0.94	[0.85;1.03]
FEV ₁ /FVC basal (n=68)	1.05* (p=0.033)	[1.01;1.09]	<u>1.03 (p=0.071)</u>	[0.99;1.07]

Quadro XXVII (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo obesidade (IMC ≥ 30 Kg/m²)

IMC ≥ 30 Kg/m ²				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Função pulmonary				
FEV ₁ /FVC (Δ) pós-BD (n=68)	0.94	[0.86;1.03]	1.03	[0.99;1.07]
FEV ₂₅₋₇₅ basal (n=68)	1.02	[0.99;1.04]	0.95	[0.87;1.03]
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ) pós-BD (n=68)	0.99	[0.97;1.01]	1.01	[0.99;1.02]
VR basal (n=59)	0.98	[0.96;1.00]	<u>0.98 (p=0.063)</u>	[0.96;1.00]
VR (Δ)	1.02	[0.97;1.08]	1.03	[0.98;1.09]
DLCO (n=54)	1.02	[0.99;1.05]	1.01	[0.99;1.04]
Biomarcadores				
Eosinófilos sg (n=71)	1.10	[0.93;1.30]	1.04	[0.90;1.21]
Log (Eosinófilos sg +1)	2.81	[0.37;21.12]	PE	PE
Log (IgE total +1)	1.00	[0.99;1.00]	PE	PE
IgE total sg (n=70)	1.28	[0.51;3.20]	0.99	[0.99;1.00]
FeNO (>=35 ppb) (n=41)	1.23	[0.25;5.94]	0.99	[0.24;4.07]
Expectoração				
Fenótipo expectoração (Eos)	0.19	[0.02;1.56]	0.54	[0.12;2.52]
Eosinófilos (%) (n=36)	0.99	[0.96;1.02]	0.99	[0.97;1.02]
Log (Eosinófilos +0.2)	1.38	[0.49;3.62]	PE	PE
Neutrófilos (%) (n=36)	1.01	[0.98;1.03]	1.01	[0.98;1.03]
Log (Neutrófilos +0.2)	PE		PE	PE

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*⁴; BD: broncodilação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; PE: *Poor estimate*; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; Sg: sangue; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*⁵

*p<0.05

A sublinhado, p<0.1; a negrito: p<0.05

II.4.4.5 Fenótipo com obstrução persistente da via aérea (FEV₁/FVC pós BD \leq 70%)

A prevalência foi de 31% (n=22) e caracterizou-se por média de idade superior à dos restantes doentes (56anos (13.4) Vs 41 anos (17.8)), com 31 anos (12.2) de evolução de doença, sendo que 64% teve início da doença após os 12 anos de idade. O género feminino manteve-se como mais prevalente (55%) mas em muito menor grau do que na restante população (78%).

Em relação às comorbilidades mais frequentes, o IMC médio foi sobreponível ao dos restantes doentes, assim como foi sobreponível a prevalência da atopia, mas com maior prevalência de exposição tabágica e de história de pneumonia no decurso da doença. Em 32% dos doentes registou-se co-existência de outra doença obstrutiva, superior aos cerca de 8% nos restantes doentes.

Quanto ao controlo da doença, 95% mostrou-se não controlado, segundo os nossos critérios, apresentando valores médios de ACT, ALQ e SOA respectivamente de 18.7 (5.2), 11.8 (4.1), e 12.0 (3.4). A função respiratória foi naturalmente pior, com valores basais médios de FEV₁ de 66% do previsto (12.5), FEV₁/FVC de 57% (7.2), FEV₂₅₋₇₅ de 23%, (13.3) e VR de 137% (37.3). A labilidade brônquica mostrou ser ampla, com valor médio de Δ FEV₁ de 9.3% (10.65). O valor da DLCO apresentou-se dentro da normalidade (100% do previsto, (20.7)). A grande maioria dos doentes (91%) estava sob tratamento GINA grau 4 ou 5, tendo havido necessidade de recorrer a cursos de CSO durante o último ano em 68% dos doentes, e registo de episódio de hospitalização em 40%.

Foram classificados como graves pela classificação WHO⁵ 100% dos doentes.

Quanto aos biomarcadores, foram elevados os valores médios de FeNO, 37 ppb (20.3), da percentagem de eosinófilos no sangue e na expectoração, respectivamente de 5% (4.8) e de 25% (20.6), sendo também elevada a de neutrófilos na expectoração, 66% (15.1).

A comparação destes doentes com os restantes (*Quadro VIII - S da Informação Suplementar 4*), mostrou que as diferenças foram significativas para os seguintes parâmetros:

- maior percentagem de doentes graves e pior pontuação no questionário de gravidade ($p < 0.001$ e $p = 0.014$, respectivamente);
- distribuição por género com prevalência nas mulheres menos acentuada ($p = 0.002$);
- maior média de idade dos doentes ($p = 0.001$) e de anos de evolução da doença ($p = 0.002$);
- maior percentagem de doentes não controlados ($p = 0.040$) e pior controlo da doença ($p = 0.040$);
- maior percentagem de uso de CSI de altas doses para tratamento ($p = 0.031$);
- co-existência de outras doenças obstrutivas significativamente superior, nomeadamente o défice de $\alpha 1AT$ ($p = 0.047$) e de DPOC ($p < 0.001$), bem como a sensibilização a *Aspergillus fumigatus* ($p = 0.031$).

Naturalmente, também na avaliação da função respiratória foram notadas diferenças significativas, nomeadamente no FEV₁, na relação de FEV₁/FVC e no FEV₂₅₋₇₅ basais, que foram inferiores ($p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p = 0.015$, respectivamente), e no VR basal, que foi superior ($p = 0.013$).

Finalmente, nos marcadores de inflamação, foi significativamente superior a percentagem de eosinófilos no sangue ($p = 0.015$).

Como factores de risco/protecção para a ocorrência deste fenótipo, encontramos com o nosso modelo de predição, detalhado no *Quadro XXVIII*, várias variáveis com significado estatístico. Destacamos, como factores de risco importantes:

- o género masculino (ORadj 6.88; IC95% = [1.78;26.61], $p = 0.005$);
- a gravidade da doença, avaliada pelas classificações WHO⁵ e ATS⁴ com classificação de grave apresentando uma razão de probabilidades superior nos doentes obstruídos e respectivamente de ORadj 28.54; IC95% = [3.24;251.38], $p = 0.003$) e de ORadj 11.12

[2.41;51.44], ($p=0.002$), e também pelo questionário SOA (OR 1.21; IC95%= [1.03;1.41], $p=0.02$);

- o elevado grau de terapêutica utilizado (ORadj 7.06; IC95%= [1.04;48,16], $p=0.046$), sendo o uso de CSI de altas doses também factor de risco para este fenótipo (OR 3.07; IC95%= [1.09;8.66], $p=0.034$);
- alguns factores relacionados com a função respiratória foram também de risco: o maior VR basal (ORadj 1.03; IC95%= [1.01;1.05], $p=0.02$), o pior FEV₁ basal (ORadj 0.80; IC95%= [0.70;0.93], $p=0.003$), a pior relação FEV₁/FVC basal (OR 0.56; IC95%= [0.38;0.83], $p=0,004$) e a reversibilidade brônquica (ORadj 4.24; IC95%= [1.14;15.77], $p=0.031$);
- finalmente, em relação aos biomarcadores, foi factor de risco a percentagem de eosinófilos no sangue periférico (OR 1.22; IC95%= [1.02;1.49], $p=0.037$).

Como factor protector destacamos o número de anos de evolução da doença (OR 0.24; IC95% [=0.07;0.86], $p=0.029$).

Mostraram ter potencial para factor de risco a história de pneumonia, o não controlo da doença e a percentagem de neutrófilos na expectoração e para factor protector o início de doença antes dos 12 anos.

Quadro XXVIII – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com obstrução persistente da via aérea ($p<0.05$)

Obstrução persistente da via aérea				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Co-variáveis				
Género (masculino) (n=71)	6.88* ($p=0.005$)	[1.78;26.61]	6.11* ($p=0.003$)	[1.85;20.22]
Idade (anos) (n=71)	1.06* ($p=0.004$)	[1.02;1.09]	1.05* ($p=0.003$)	[1.02;1.09]
Escalas				
WHO (grave) (n=71)	28.54* ($p=0.003$)	[3.24;251.38]	29.00* ($p=0.002$)	[3.61;232.88]
ATS (grave) (n=71)	11.12* ($p=0.002$)	[2.41;51.44]	6.60* ($p=0.001$)	[2.08;20.97]
Características da doença				
Início da doença antes 12 anos (n=71)	1.36	[0.34;5.45]	0.38 ($p=0.068$)	[0.16; 1.07]
Anos de doença (anos) (n=71)	1.05 ($p=0.071$)	[1.00;1.10]	1.06* ($p=0.005$)	[1.02;1.10]
Presença de Comorbilidades(n=71)	0.039* ($p=0.024$)	[0.00;0.66]	0.19	[0.02;2.24]
Comorbilidades (n=71)				
Atopia	2.64	[0.67;10,42]		
Tipo de alergia				
Ácaros	2.34	[0.61;9.08]	1.07	[0.38;3.03]
Pólen	2.40	[0.68;8.45]	1.97	[0.68;5.68]
Fungus	6.22	[0.21;186.59]	2.33	[0.14;39.09]
Barata	1.66	[0.11;24.25]	1.14	[0.10;13.31]
Fâneros	PE		PE	PE
IMC (≥ 30 Kg/m ²)	0.46	[0.11;1.91]	0.43	[0.13;1.47]
HS AINE's	0.40	[0.06;2.71]	0.70	[0.17;2.89]
Rinite	0.16* ($p=0.018$)	[0.04;0.73]	0.24* ($p=0.029$)	[=0.07;0.86]
Polipose	0.55	[0.07;4.10]	1.42	[0.31;6.55]

Quadro XXVIII (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com obstrução persistente da via aérea ($p < 0.05$)

Obstrução persistente da via aérea				
Variáveis	OR_{Adjusted}	IC_{95%}	OR	IC_{95%}
Comorbilidades (n=71)				
Sinusite	0.32 (p=0.076)	[0.09;1.13]	0.32* (p=0.04)	[0.11;0.95]
Exposição tabágica	2.42	[0.68;8.61]	2.14	[0.76;6.07]
História de Pneumonia	3.56 (p=0.064)	[0.93;13.767]	1.94	[0.69;5.47]
Ansiedade	0.29	[0.07;1.32]	0.30 (p=0.08)	[0.08;1.15]
Depressão	0.20	[0.02;2.02]	0.29	[0.03;2.48]
SAOS	PE	PE	PE	PE
RGE	0.45	[0.11;1.75]	0.96	[0.31;2.97]
Défice de α 1AT	9.37	[0.46;192.19]	7.73 (p=0.084)	[0.76;79.07]
Bronquiectasia	1.17	[0.18;7.71]	1.15	[0.20;6.80]
DPOC	PE	PE	PE	PE
Outra doença Obstrutiva	2.50	[0.51;12.13]	1.43	[0.14;14.10]
Aspergillus (IgE positiva)	PE	PE	PE	PE
Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos futuros				
Não controlo da doença (n=71)	7.70 (p=0.071)	[0.84;70.46]	7.03 (p=0.07)	[0.86;57.70]
Doente em risco (n=70)	4.13	[0.43;39.67]	6.63 (p=0.079)	[0.81;54.61]
ACT (n=70)	1.00	[0.89;1.13]	0.98	[0.89;1.08]
CARAT (Rinite) (n=68)	1.15	[0.94;1.40]	1.17 (p=0.075)	[0.99;1.39]
CARAT (Asma) (n=68)	1.02	[0.89;1.16]	1.01	[0.91;1.13]
ALQ (n=63)	0.96	[0.81;1.15]	0.98	[0.85;1.13]
SOA (n=69)	1.16	[0.95;1.41]	1.21* (p=0.02)	[1.03;1.41]
Hospitalização (último ano) (n=71)	2.19	[0.63;7.64]	1.37	[0.22;8.74]
Exacerbação grave (último ano) (n=71)	0.74	[0.23;2.41]	1.55	[0.24;9.85]
Terapêutica (n=71)				
Dose CSI (>750 μ g PF ou eq)	2.22	[0.68;7.29]	3.07* (p=0.034)	[1.09;8.66]
Dose CSI (>750 μ g PF ou eq)	2.22	[0.68;7.29]	3.07* (p=0.034)	[1.09;8.66]
Terapêutica (step4+step5)	7.06* (p=0.046)	[1.04;48.16]	6.12* (p=0.023)	[1.29;29.22]
Função pulmonary				
Obstrução persistente (n=71)	n.a.	n.a.		
Reversibilidade brônquica (n=71)	4.24* (p=0.031)	[1.14;15.77]	4.17* (p=0.014)	[1.32;13.11]
FEV ₁ basal (n=68)	0.804* (p=0.003)	[0.70;0.93]	0.83* (p<0.001)	[0.75;0.92]
FEV ₁ (Δ)pós-BD (n=68)	1.12* (p=0.012)	[1.03;1.22]	1.063 (p=0.099)	[0.99;1.14]
FEV ₁ /FVC basal (n=68)	PE		0.56* (p=0.004)	[0.38;0.83]
FEV ₁ /FVC (Δ)pós-BD (n=68)	1.17 (p=0.075)	[0.98;1.40]	1.06	[0.95;1.18]
FEV ₂₅₋₇₅ basal (n=68)	0.902* (p=0.001)	[0.85;0.96]	0.897* (p<0.001)	[0.85;0.95]

Quadro XXVIII (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com obstrução persistente da via aérea ($p < 0.05$)

Obstrução persistente da via aérea				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Biomarcadores				
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ) pós-BD (n=68)	0.99	[0.97;1.01]	0.972* (p=0.021)	[0.95;0.99]
VR basal (n=59)	1.03* (p=0.02)	[1.01;1.05]	1.02* (p=0.023)	[1.01;1.04]
VR (Δ) pós-BD	0.95	[0.89;1.03]	0.95	[0.90;1.01]
DLCO (n=54)	0.98	[0.94;1.02]	0.99	[0.96;1.02]
Eosinófilos sg (n=71)	1.22	[0.96;1.55]	1.22* (p=0.037)	[1.02;1.49]
Log (eosinófilos+1)	7.13	[0.68;75.00]	7.80 (p=0.046)	[1.04;58.33]
IgE total sg (n=70)	1.00	[0.99;1.00]	1.00	[0.99;1.01]
Log (IgE +1)	1.85	[0.60;5.69]	PE	PE
FeNO (>=35 ppb) (n=41)	0.36	[0.03;3.73]	1.40	[0.33;5.97]
Expetoração				
Categorização de fenótipo (Eos)	0.23	[0.03;2.10]	0.39	[0.08;1.78]
Eosinófilos (%) (n=36)	0.99	[0.95;1.03]	1.00	[0.98;1.03]
Log (eosinófilos+0.2)	1.00	[0.31;3.19]	PE	PE
Neutrófilos (%) (n=36)	<u>1.03 (p=0.077)</u>	[0.99;1.07]	<u>1.03 (p=0.066)</u>	[0.99;1.05]
Log (neutrófilos +0.2)	PE		PE	PE

ACT: Asthma Control Test; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: Asthma Life Quality Questionnaire; AT: antitripsina; ATS: American Thoracic Society⁵; BD: broncodilatação; CARAT: Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: Fraction of exhaled nitric oxide; FEV1: Forced expiratory volume in the first second; FEV25-75: Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of forced vital capacity; IMC: Índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; PE: Poor estimate; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; Sg: sangue; SOA: Severity of Asthma Score; VR: volume residual; WHO: World Health Organization⁵

*Significado estatístico se $p < 0.05$

A sublinhado, $p < 0.1$; a negrito: $p < 0.05$

III.4.4.6 Fenótipo grave pela classificação WHO⁵

Neste grupo incluíram-se 42 doentes, com prevalência de 58%, e valor médio no questionário SOA de 12 (3.2). As suas características foram apresentadas em rubrica anterior (II.3.2.1), das quais destacamos as constantes do *Quadro XXIII*, lembrando que os doentes graves diferiram de forma significativa dos não graves: na maior ocorrência de pneumonia e de outra doença obstrutiva, no pior controlo da doença, na pior qualidade de vida, no uso de maior grau de CSI e de tiotrópio, na pior função respiratória e no maior grau de eosinofilia periférica. Outros factores importantes na história da doença, como o seu início tardio e a ocorrência de exacerbações graves no último ano, mostraram relacionar-se com maior gravidade da doença.

Para a ocorrência deste fenótipo identificámos vários factores de risco/protecção, estando o modelo de predição detalhado na *Quadro XXIX*.

Dos factores de risco com significado estatístico, destacamos os seguintes parâmetros:

- a gravidade pela classificação ATS⁴ (ORadj 128.73; IC95%= [14.03;1181.53] p<0.001) e pela pontuação no questionário SOA (OR adj 1.58; IC95%= [1.25;2.00], p<0.001);
- a ocorrência de exacerbações graves no último ano (ORadj 2.87; IC95%= [1.04;7.90], p=0.04);
- a história de pneumonia (ORadj 5.91; IC95%= [1.73;20.17], p=0.005);
- a presença de outra doença obstrutiva que não a asma (OR 9.06; IC95%=[1.09;75.21], p=0.041);
- o pior controlo da doença avaliado pelos questionários ACT (OR adj 0.86; IC95% =[0.75;0.99], p=0.034), CARATasma (ORadj 0.84; IC95%= [0.74;.96], p=0.008) e a pior qualidade de vida (OR adj 1.23; IC95% [1.04;1.44], p=0.013);
- vários parâmetros da função respiratória, destacando-se a obstrução persistente da via aérea (ORadj 37.86; IC95%= [3.62;395.78], p=0.002);
- o elevado grau de terapêutica com dose de CSI>750ug de PF ou equivalente (ORadj 54.59; IC95%= [6.65;448.02], p<0.001);
- os biomarcadores eosinofilia periférica (OR 1.27; IC95%= [1.01;1.61], p=0.045 e neutrofilia da expectoração (OR 1.02; IC95%= [1.00;1.04], p=0.090).

Conferiu protecção para a manifestação deste fenótipo o início de doença antes dos 12 anos (OR 0.38; IC95%= [0.14;0.99], p=0.049, tendo a atopia e a rinite mostrado forte tendência para essa protecção.

Quadro XXIX – Modelo de regressão logística para a predição de doentes graves segundo a WHO⁵ (p<0.05)

WHO				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Co-variáveis				
Género (masculino) (n=71)	1.66	[0.49;5.58]	1.77	[0.55;5.78]
Idade (anos) (n=71)	1.03 (p=0.08)	[1.00;1.06]	<u>1.03 (p=0.07)</u>	[1.0;1.06]
Escalas				
WHO (grave) (n=71)	n-a			
ATS (grave) (n=71)	128.73* (p<0.001)	[14.03;1181.53]	<u>106.33 (p<0.001)</u>	[12.70;890.64]
Características da doença				
Início da doença antes 12 anos (n=71)	0.53	[0.17;1.67]	0.38* (p=0.049)	[0.14;0.99]
Anos de doença (anos) (n=71)	1.00	[0.96;1.04]	1.04	[0.98;1.04]
Presença de comorbilidades (n=71)	0.36	[0.03;3.86]	0.44	[0.04;4.53]
Comorbilidades (n=71)				
Atopia	0.422	[0.13;1.33]	<u>0.37 (p=0.071)</u>	[0.12;1.09]
Tipo de alergia				
Ácaros	0.54	[0.18;1.62]	0.44	[0.16;1.21]
Pólen	0.44	[0.15;1.26]	0.47	[0.17;1.30]
Fungus	PE	[]	PE	
Barata	1.67	[0.14;19.87]	1.45	[0.13;16.76]
Fâneros	0.83	[0.05;14.76]	0.71	[0.04;11.78]

Quadro XXIX (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição de doentes graves segundo a WHO⁵ (p<0.05)

WHO				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Comorbilidades				
IMC (≥ 30 Kg/m ²)	1.77	[0.58;5.42]	1.64	[0.57;4.75]
HS AINE's	1.16	[0.29;4.58]	1.03	[0.29;3.62]
Rinite	0.24 (p=0.094)	[0.05;1.27]	0.23 (p=0.071)	[0.05;1.13]
Polipose	1.99	[0.34;11.43]	2.33	[0.44;12.45]
Sinusite	1.09	[0.41;2.89]	0.94	[0.37;2.42]
Exposição tabágica	1.85	[0.63;5.43]	1.69	[0.61;4.70]
História de Pneumonia	5.91* (p=0.005)	[1.73;20.17]	4.55 (p=0.009)	[1.46;14.14]
Ansiedade	0.99	[0.33;2.99]	1.05	[0.37;3.01]
Depressão	0.43	[0.09;2.18]	0.66	[0.15; 2.88]
SAOS	0.20	[0.02;2.51]	0.34	[0.03;3.94]
RGE	0.37	[0.11;1.21]	0.63	[0.22;1.77]
Défice de $\alpha 1$ AT	1.89	[0.17;21.51]	2.23	[0.22;22.56]
Bronquiectasia	3.42	[0.36;32.68]	3.92	[0.43;35.42]
DPOC	PE	[]	PE	
Outra doença Obstrutiva	6.54 (p=0.093)	[0.73;58.60]	9.06* (p=0.041)	[1.09;75.21]
Aspergillus (IgE positiva)	0.40	[0.02;7.17]	0.71	[0.04;11.78]
Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos futuros				
Não controlo da doença (n=71)	PE		PE	
Doente em risco (n=70)	26.85* (p=0.003)	[2.96;243.51]	27.33* (p=0.002)	[3.30;226.33]
ACT (n=70)	0.86* (p=0.034)	[0.75;0.99]	0.87* (p=0.024)	[0.76;0.98]
CARAT (Rinite) (n=68)	0.99	[0.84;1.16]	1.03	[0.89;1.20]
CARAT (Asma) (n=68)	0.84* (p=0.008)	[0.74;0.96]	0.85* (p=0.008)	[0.75;0.96]
ALQ (n=63)	1.23* (p=0.013)	[1.04;1.44]	1.21* (p=0.013)	[1.04;1.40]
SOA (n=69)	1.58* (p<0.001)	[1.25;2.00]	1.59* (p<0.001)	[1.27;2.00]
Hospitalização (último ano) (n=71)	2.88 (p=0.06)	[0.96;8.62]	2.46 (p=0.09)	[0.87;7.00]
Exacerbação grave (último ano) (n=71)	2.87* (p=0.04)	[1.04;7.90]	2.54 (p=0.058)	[0.97;6.67]
Terapêutica (n=71)				
Dose CSI (>750 μ g PF ou eq)	54.59* (p<0.001)	[6.65;448.02]	58.0* (p<0.001)	[7.14;470.88]
Terapêutica (step4+step5)	29.40* (p<0.001)	[5.24;164.67]	19.5* (p<0.001)	[4.89;77.73]
Função pulmonar				
Obstrução Persistente (n=71)	37.86* (p=0.002)	[3.62;395.78]	29.0* (p<0.001)	[3.61;232.88]
Reversibilidade brônquica (n=71)	2.69 (p=0.052)	[0.99;7.32]	2.89* (p<0.033)	[1.091;7.67]
FEV ₁ basal (n=68)	0.95* (p<0.001)	[0.92;0.977]	0.95* (p<0.001)	[0.92;0.98]
FEV ₁ (Δ) pós-BD (n=68)	1.11* (p=0.046)	[1.01;1.24]	1.09 (p<0.065)	[1.00;1.20]

Quadro XXIX (continuação) – Modelo de regressão logística para a predição de doentes graves segundo a WHO⁵ (p<0.05)

WHO				
Variáveis	OR _{Adjusted}	IC _{95%}	OR	IC _{95%}
Função pulmonar				
FEV ₁ /FVC basal (n=68)	0.93* (p=0.003)	[0.89;0.98]	0.93*(p<0.001)	[0.89;0.97]
FEV ₁ /FVC (Δ) pós-BD (n=68)	0.99	[0.92;1.06]	0.99	[0.92;1.07]
FEV ₂₅₋₇₅ basal (n=68)	0.94* (p<0.001)	[0.91;0.97]	0.95*(p<0.001)	[0.93;0.97]
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ) pós-BD (n=68)	1.02	[0.99;1.04]	1.01	[0.99;1.02]
VR basal (n=59)	1.00	[0.99;1.03]	1.01	[0.99;1.03]
VR (Δ) pós-BD	1.02	[0.97;1.08]	1.01	[0.97;1.07]
DLCO (n=54)	0.97 (p=0.055)	[0.94;1.00]	0.97(p=0.085)	[0.94;1.00]
Biomarcadores				
Eosinófilos sg (n=71)	<u>1.29 (p=0.05)</u>	[1.00;1.65]	1.27*(p=0.045)	[1.01;1.61]
Log (eosinófilos+1)	14.54*(p=0.012)	[1.79;118.05]	12.45*(p=0.012)	[1.74;89.10.06]
IgE total sg (n=70)	1.00	[0.99;1.00]	1.00	[0.99;1.00]
Log (IgE +1)	1.04	[0.43;2.51]	PE	PE
FeNO (>=35 ppb) (n=41)	0.28	[0.05;1.45]	0.52	[0.14;1.97]
Expectoração				
Categorização de fenótipo (Eos)	0.44	[0.07;2.59]	0.42	[0.08;2.07]
Eosinófilos (%) (n=36)	0.99	[0.97;1.02]	1.00	[0.97;1.02]
Log (eosinófilos+0.2)	0.71	[0.27;1.86]	PE	PE
Neutrófilos (%) (n=36)	1.02	[0.99;1.04]	1.02 (p=0.090)	[1.00;1.04]
Log (neutrófilos +0.2)	PE		PE	PE

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; CSO: corticoterapia oral; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; PE: *Poor estimate*; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; Sg: sangue; SOA: *Severity of Asthma Score*; VR: volume residual; WHO: *World Health Organization*

*Significado estatístico se p<0.05

A sublinhado, p<0.1; a negrito: p<0.05

II.3.5 Agrupamento da população em *clusters* e suas características

II.3.5.1 Identificação de *clusters*

Até hoje, não se conhecem estudos portugueses dirigidos ao agrupamento dos asmáticos por *clusters*. A nossa abordagem foi feita de forma não supervisionada, procedendo-se depois à comparação dos grupos obtidos, tendo em conta as características utilizadas para a caracterização da população global e que incluíram, para além das características demográficas e evolutivas da doença, as clínicas, laboratorias e funcionais. A abordagem metabolómica destes resultados é apresentada em rubrica seguinte.

A escolha das variáveis descritas na metodologia do trabalho (*Quadro VIII*, secção II.2.2.5), teve como base as utilizadas nos estudos de Haldar et al.² e de Moore et al.¹²³, sendo portanto mais abrangente do que cada um deles isoladamente.

Reuniram condições estatísticas para inclusão na análise 57 elementos (*Quadro X - S da Informação suplementar 6*), correspondendo a 79% da amostra global.

O dendrograma obtido consta da *Figura 5*.

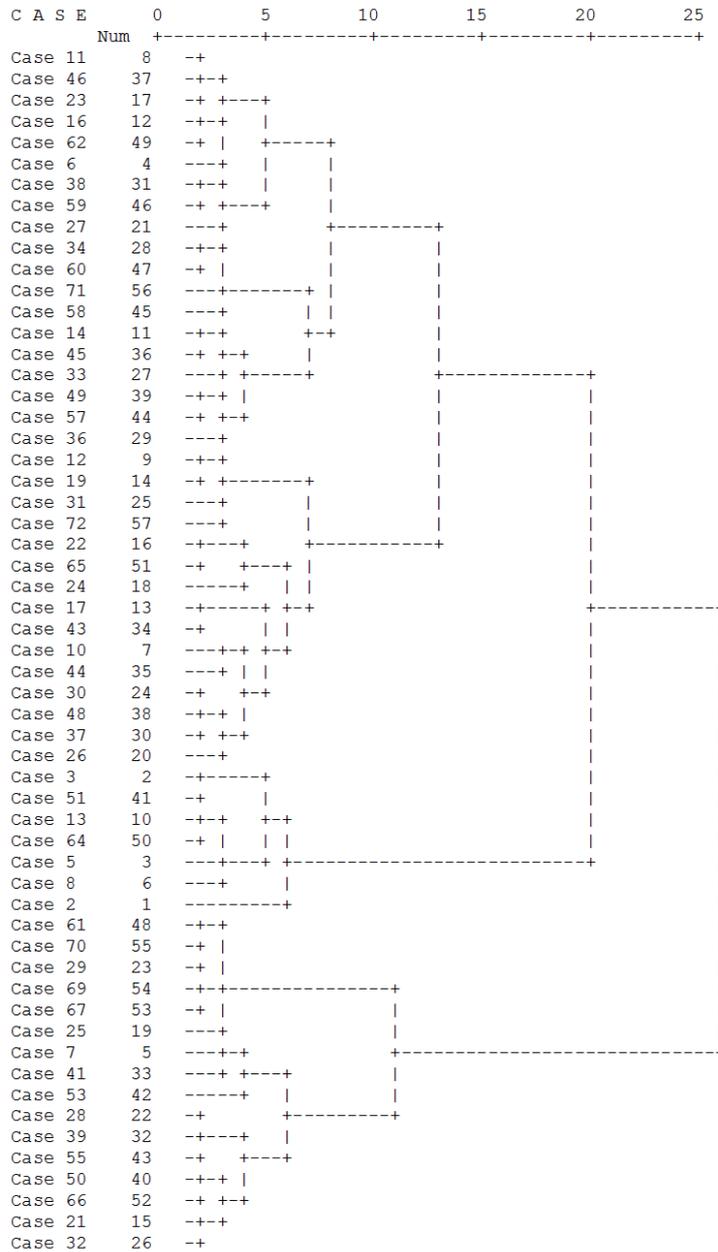


Figura 5 – Dendrograma obtido por análise cluster hierárquica, segundo método Ward. Usando o método hierárquico de cluster, 57 indivíduos foram agrupados até um único cluster final. Em cada geração de clusters, as amostras foram aglomeradas em clusters mais abrangentes, tendo-se tornado evidente a formação de 5-6 grupos.

Pelo dendrograma, as melhores soluções pareceram-nos ser as divisões em 6 ou em 5 grupos.

Como ilustrado no gráfico da *Figura 6*, a partir do *cluster* número 7, as diferenças são muito reduzidas sendo a melhor solução do ponto de vista estatístico, a divisão em 6 grupos.

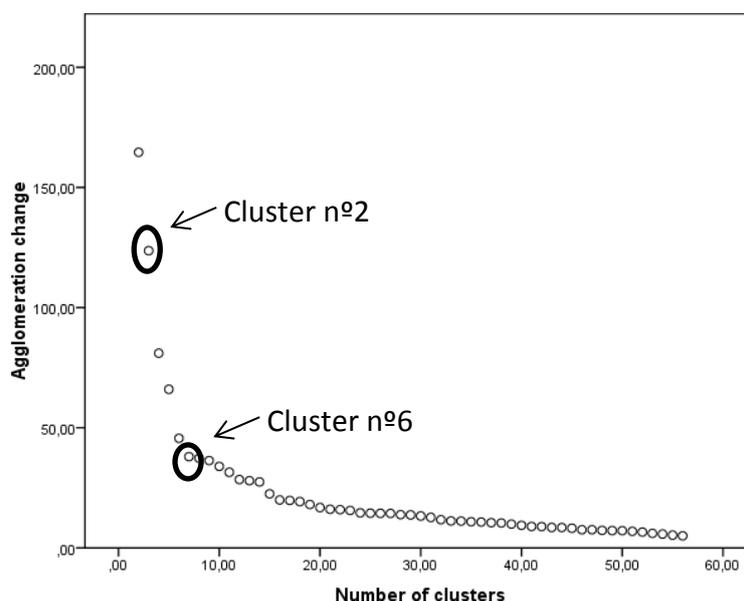


Figura 6 – Gráfico de aglomeração. A partir do *cluster* 7 as diferenças nos critérios de aglomeração são reduzidas.

De forma a validarmos a nossa metodologia, testámos outro método de análise, o método em dois-passos (*two-steps clustering*), apropriado para variáveis quantitativas e qualitativas em simultâneo. Quando o comparámos com as soluções apresentadas pelo método Ward (*Quadro XXX*), notámos, nas distribuições por 5 e 6 *clusters*, bastante coincidência com os resultados obtidos pelo primeiro método, garantindo assim a sua consistência. Para a solução de 4 *clusters*, os dois métodos apresentaram soluções diferentes.

Quadro XXX – Comparação das metodologias de análise cluster Ward e two-step clustering.

Nº de <i>clusters</i>	Distribuição dos elementos da amostra em função dos <i>clusters</i> obtidos					
	Solução 6 <i>clusters</i>		Solução 5 <i>clusters</i>		Solução 4 <i>clusters</i>	
	Ward	Two steps	Ward	Two steps	Ward	Two steps
1	7	7	7	7	7	7
2	9	9	19	9	19	16
3	10	16				
4	15	13	15	19	16	6
5	10	6	10	16	15	28
6	6	6	6	6		

Legenda: As células sombreadas a cinzento representam a correspondência entre o método Ward e o método *Two-steps clustering*.

Apesar de a divisão em 6 *clusters* ser a que mostrou maior sobreposição de grupos obtidos pelos dois métodos, optámos pelo agrupamento em 5 *clusters* já que, após análise criteriosa

dos resultados, era este o agrupamento clinicamente mais relevante. A solução apresentada para os 4 *clusters* não era clinicamente justificável, tendo sido eliminada.

II.3.5.2 Caracterização dos *clusters* identificados

As variáveis que mostraram ter importância (com valor significativo) na divisão dos cinco grupos foram as seguintes: género, idade, IMC, excesso de peso, idade de início de doença antes dos 12 anos, anos de evolução da doença, número de exacerbações no último ano, gravidade pelas classificações WHO⁵ e ATS⁴, número de comorbilidades, controlo da doença, ACT, CARAT, ALQ, SOA, dose de CSI, uso de tiotrópio, número de fármacos de controlo, obstrução persistente, reversibilidade brônquica, FEV₁ basal (%previsto), FEV₁/FVC basal (%previsto) e Δ FEV₁/FVC, FEV₂₅₋₇₅ basal (% previsto), percentagem de eosinófilos no sangue, IgE total sérica. (*Quadros XXXI a XXXV*).

Deste conjunto destaca-se:

- a idade de início da doença (*Figura 7*),
- a gravidade da doença (classificação WHO⁵ e escala SOA) (*Figuras 8 e 9*),
- o IMC (*Figura 10*),
- a inflamação eosinofílica (percentagem de eosinófilos no sangue periférico) (*Figura 11*).

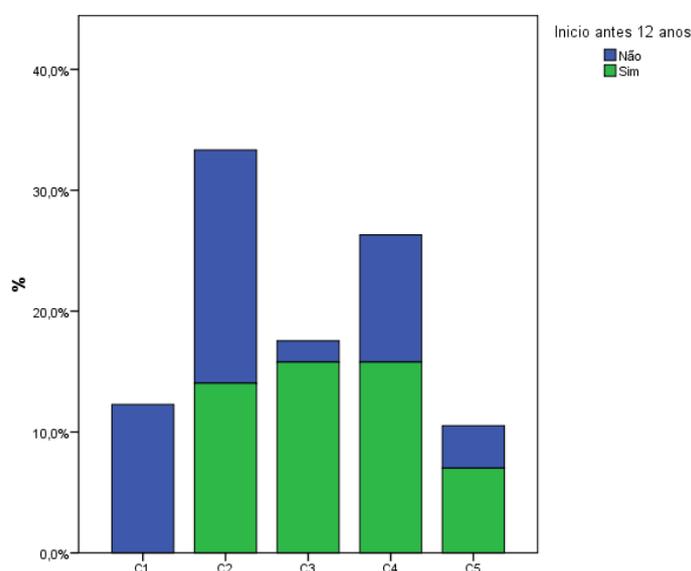


Figura 7 – Variável Início de asma antes dos 12 anos nos 5 clusters. Distribuição da classificação de idade de início de asma antes dos 12 anos (verde) e após os 12 anos (azul) nos *clusters* considerados (C1, C2, C3, C4, C5). Destaca-se que em C1 e C2 a idade de início de asma após os 12 anos ocorreu na totalidade dos elementos de C1 e na maioria dos de C2.

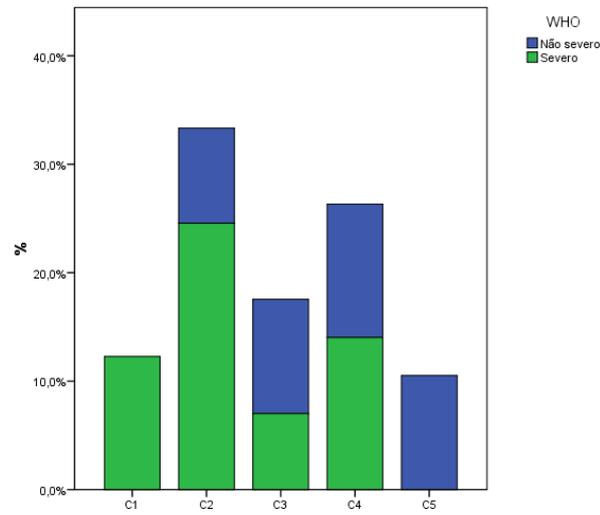


Figura 8 – Variável qualitativa de gravidade (classificação WHO⁵) nos 5 clusters. Distribuição da classificação de não grave (azul) e de grave (verde) pela classificação WHO⁵ nos clusters considerados (C1, C2, C3,C4,C5). Verifica-se que a totalidade dos elementos de C1 e a maioria de C2 tinham asma grave, e a que a totalidade dos elementos de C5 tinha asma não grave.

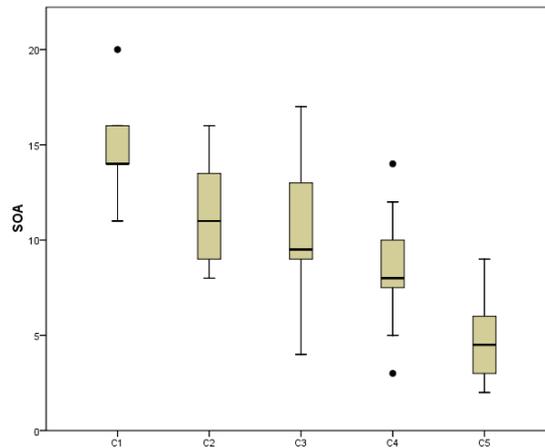


Figura 9 – Variável quantitativa de gravidade (Severity of Asthma Score) nos 5 clusters. Distribuição dos resultados para a variável Severity of Asthma Score nos clusters considerados (C1, C2, C3, C4,C5). Verifica-se que C1 é o grupo que apresenta maior mediana e menor dispersão de resultados, sendo portanto o grupo mais grave, seguido de C2. A menor mediana foi obtida por C5. Os pontos representam outliers moderados.

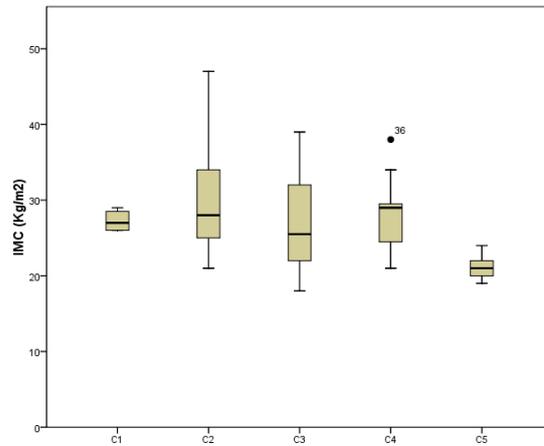


Figura 10 – Variável IMC (Kg/m²) nos 5 clusters. Distribuição dos resultados para a variável IMC nos *clusters* considerados (C1, C2, C3, C4, C5). Verifica-se que C2 e C4 são os grupos que apresentam maior mediana e C5 a menor, com menor dispersão de resultados. Os pontos representam *outliers* moderados.

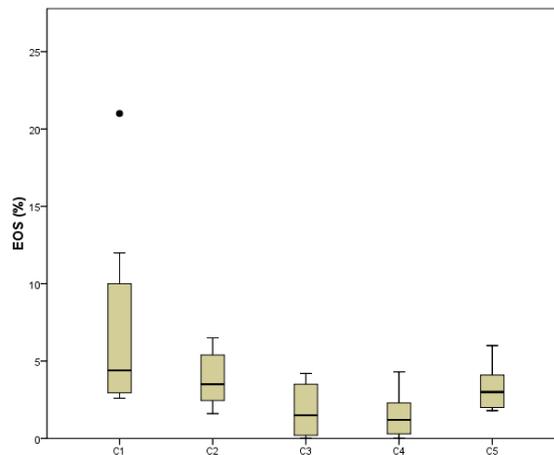


Figura 11 – Variável inflamação eosinofílica no sangue periférico (% eosinófilos) nos 5 clusters. Distribuição dos resultados para a variável percentagem de eosinófilos no sangue periférico nos *clusters* considerados (C1, C2, C3, C4, C5). Verifica-se que C1 é o grupo que apresenta maior mediana mas também maior dispersão de resultados e C4 o grupo com menor mediana e menor dispersão de resultados. Os pontos representam *outliers* moderados.

A distribuição dos 57 elementos que integraram a análise foi a seguinte:
 C1, 7 elementos; C2, 19 elementos; C3, 10 elementos; C4, 15 elementos; C5, 6 elementos.

As características de cada *cluster* estão detalhadas nos *Quadros XXXI a XXXV* e descrevemos as mais relevantes de cada um.

Cluster 1 (n=7): todos os elementos foram classificados como graves, quer pela WHO⁵, quer pela ATS⁴, tiveram início de doença após os 12 anos, eram do género masculino e tinham excesso de peso, com IMC médio de 27 Kg/m² (1.4). A média de idades foi de 64 (8.3) anos, com 30 (13.8) anos de evolução da doença. A história de pneumonia no decurso da doença foi variável. Nenhum doente apresentou controlo da doença, tendo sido frequentes as hospitalizações e exacerbações graves no último ano e o recurso a ciclos de CSO. As pontuações nos questionários ACT e CARAT foram francamente baixas, sendo a do ACT a pior de todos os grupos (15 (6.7)) e as do ALQ e SOA francamente elevadas (a do SOA a pior de todos os grupos (15 (2.8))). A maioria apresentou alterações imagiológicas na TAC-AR, sendo frequente o *air trapping*. Em relação às comorbilidades presentes, a atopia foi frequente, bem como a rinite e a exposição tabágica em alguma altura da vida, tendo sido o grupo que registou mais casos de HS a AINE's. Quanto à terapêutica utilizada para controlo, foi o grupo que usou maior número de fármacos (5 (0.6)) e todos faziam dose de CSI>750 µg PF ou equivalente, estando no grau 4 ou 5 de terapêutica GINA. A avaliação da função respiratória mostrou que todos tinham obstrução persistente da via aérea, apesar de existir reversibilidade brônquica na quase totalidade do grupo, com valor médio de Δ FEV₁ de 8% (9.6), sendo o grupo com valores basais de FEV₁ e FEV₁/FVC mais baixos (66% (16.2) e 56% (6.6), respectivamente) e valores de VR mais elevados (137% (44.8)).

Em relação aos outros biomarcadores, os valores de FeNO foram tendencialmente superiores a 35 ppb, sendo o grupo com maior eosinofilia periférica (8 % (6.8)), tendo sido significativa a diferença para todos os outros grupos, nas comparações múltiplas. Na análise da expectoração, quer a percentagem de eosinófilos quer a de neutrófilos, tiveram o 2º valor médio mais elevado dos cinco grupos, com valores de 32% (21.4) e 55% (25.7) respectivamente, e o mais baixo de macrófagos. Quanto ao fenótipo da expectoração, tendo sido feita colheita para análise em 85% de doentes, os tipos celulares identificados foram o eosinofílico e o misto, com igual prevalência.

Cluster 2 (n=19): sendo o grupo mais prevalente (1/3 da população) e o mais obeso, com IMC médio de 30 Kg/m² (6.8), na grande maioria classificados como graves (74%), o género feminino compreendeu quase a sua totalidade (95%), com predomínio de início de doença após os 12 anos (em 58% da população). A média de idades foi de 50 anos (11.9), com elevada média de anos de evolução da doença (24 (13.0)). A história de pneumonia no decurso da doença foi variável mas com prevalência elevada (42%). Nenhum doente apresentava controlo da doença, tendo sido frequente o recurso a ciclos de CSO, com elevada ocorrência de exacerbações graves mas de hospitalizações variável. As pontuações nos questionários ACT e CARAT foram baixas, tendo sido o grupo que manifestou pior qualidade de vida com valor de ALQ mais elevado (14.2 (2.8)), e o segundo valor de SOA mais elevado (11.6 (2.5)). Em relação às comorbilidades presentes, foi o grupo onde se registou menor número. A atopia foi menos frequente que nos outros grupos, registada em apenas 47% dos doentes, e ganhou protagonismo o distúrbio depressivo-ansioso com prevalência de 42%, só semelhante à prevalência do grupo C4. Em relação à terapêutica utilizada para controlo, foi o segundo grupo

que usou maior número de fármacos (3 (0.9)) e cerca de 80% estavam no grau 4 ou 5 de terapêutica, fazendo na maioria dos casos doses elevadas de CSI. A avaliação da função respiratória mostrou valores basais médios de FEV₁ e de FEV₁/FVC normais, sem aumento do VR. A obstrução persistente da via aérea foi registada em 32% dos doentes que mostraram alguma reversibilidade, com valor médio de grupo para Δ FEV1 de 8% (7.7). Em relação aos outros biomarcadores, os valores de FeNO foram tendencialmente inferiores a 35 ppb, sem eosinofilia periférica (4% (1.7)), sendo o valor da IgE total sérica, o mais baixo de todos os grupos. Quanto à contagem de células na expectoração induzida, dos 58% de doentes que realizaram a sua colheita, 45% mostrou padrão não eosinofílico, com valor médio de eosinófilos de 24% (30.3) mas valor elevado de neutrófilos (51% (32.1)).

Cluster 3 (n=10): 90% dos elementos tiveram início de doença antes dos 12 anos, pertencendo todos ao género feminino, com IMC médio de 27 Kg/m² (7.0), bastante inferior ao *cluster 2*, também constituído maioritariamente por mulheres. A classificação de gravidade da doença foi variável, mas de predomínio não grave (60%). A média de idades foi de 26 anos (8.4), naturalmente com poucos anos de evolução da doença (14 (7.4)). Não apresentaram controlo da doença 90% dos elementos, com necessidade de recurso a ciclos de CSO oscilante e elevada ocorrência de hospitalizações e exacerbações graves (70 e 80%, respectivamente). Apesar disso, as pontuações no questionário ACT estiveram no limiar para o controlo (20 (4.0)), o mesmo não se passando com o valor do CARAT (asma) (11 (3.4)). Quanto à qualidade de vida, o valor de ALQ reportado mostrou algum impacto da doença (12 (3.5)), sendo o valor do SOA de 10 (4.0). A grande maioria não apresentou alterações imagiológicas na TAC-AR. Registou-se um número relativamente elevado de comorbilidades (4 (1.4)) com a atopia a ser muito frequente (80%) e com grande prevalência de alergia a ácaros, sendo também frequente a rinosinusite mas muito raro o distúrbio depressivo-ansioso. Em relação à terapêutica utilizada para controlo, 50% estavam abaixo do grau 4 de terapêutica, na maioria dos casos sem uso de doses elevadas de CSI. A avaliação da função respiratória mostrou valores basais médios de FEV₁ e FEV₁/FVC normais, sem obstrução das pequenas vias nem aumento do VR. Nenhum mostrou obstrução persistente da via aérea, e a labilidade brônquica era normal (Δ FEV1 de 6% (3.9)). Relativamente aos outros biomarcadores, os valores de FeNO foram inferiores a 35 ppb, sem eosinofilia periférica (2% (1.7)). Quanto ao fenótipo da expectoração, em 50% dos doentes que realizaram a colheita para análise, o tipo celular foi eosinofílico mas, se atentarmos nos valores médios de eosinófilos e neutrófilos (6% (6.3) e 36.3% (32.1), respectivamente), era compatível com padrão celular pobre.

Cluster 4 (n=15): com idade de início de doença variável, predomínio do género feminino (80%) e IMC médio de 28 Kg/m² (4.7), a classificação de gravidade da doença foi bastante equilibrada na frequência de graves e não graves. A idade de início da doença foi variável mas predominantemente antes dos 12 anos, com média de idades aproximada do *cluster 2* (54 anos (15.9)), mas com mais anos de evolução da doença, existindo história de pneumonia no decurso da doença em 33% dos casos. Um terço apresentava controlo da doença (foi o segundo grupo com melhor controlo), tendo sido pouco frequente a necessidade de recurso a ciclos de CSO, de ocorrência de hospitalizações ou de exacerbações graves. As pontuações no

questionário ACT estiveram acima do nível de controlo, (22 (2.1)), com pouco impacto na qualidade de vida (a segunda melhor média de grupo para o valor de ALQ 10 (2.9)) e o valor do SOA abaixo dos 10 pontos (9 (2.7)), também o segundo melhor. Dos 53% dos doentes que realizaram TAC-AR, registaram-se alterações na maioria (85%) e o número de comorbilidades presentes foi alto: a atopia foi registada em 2/3 dos doentes, sendo a rinosinusite também frequente. O distúrbio depressivo-ansioso manifestou-se em mais de 50% dos doentes, sendo o grupo com maior prevalência, e 1/3 tinha alguma exposição tabágica na sua vida. Em 26% dos doentes foi detectada a presença de outra doença obstrutiva para além da asma, sendo a bronquiectásica a mais frequente. Em relação à terapêutica utilizada para controlo, a maioria dos casos (87%) não fazia uso de doses elevadas de CSI. A avaliação da função respiratória, mostrou valores basais médios de FEV₁ normais (88% (24.0)), mas baixos de FEV₁/FVC (71% (7.9)), considerando a média de idades da população em causa (54 anos). Foi o grupo onde se registou maior obstrução das pequenas vias aéreas, com valor médio de FEV₂₅₋₇₅ de 39% (18.3), mas menor reversibilidade da mesma quando comparado com C2, com elevação do VR (132% (35.2)). A obstrução persistente da via aérea foi registada num terço dos doentes, havendo resposta positiva à broncodilatação em mais de 50% do grupo, com valor médio de resposta de 8% (6.5) para o FEV₁. Em relação aos outros biomarcadores, os valores de FeNO foram tendencialmente inferiores a 35 ppb, sem eosinofilia periférica (2 % (1.3)). Quanto ao fenótipo da expectoração, dos 47% em que se realizou a colheita da amostra, 57% era do tipo não eosinofílico. De facto, o valor médio da percentagem de neutrófilos foi o mais elevado de todos os grupos (59% (31.8)) e o de eosinófilos o segunda mais baixo (21% (25.6)), aproximando-se do padrão celular do C2.

Cluster 5 (n=6): com idade de início de doença tendencialmente antes dos 12 anos de idade, pertencendo maioritariamente ao género masculino, foi o grupo mais jovem, com média de idades de 23 anos (6.8). Tinham poucos anos de evolução da doença (13 (8.7)) e, em apenas 17%, se registou história de pneumonia. Apresentaram o IMC mais baixo de todos os grupos, com valor normal (21 Kg/m² (8.1)). Todos os doentes foram classificados como não graves pelas duas classificações utilizadas. 67% apresentava completo controlo da doença, sem qualquer registo de hospitalização no último ano e, em apenas 17% dos casos, se registou recurso a ciclos de CSO. Em concordância, as pontuações no questionário ACT e CARAT (asma) mostraram ser normais e as melhores de todos os grupos, sem grande impacto na qualidade de vida. O valor do SOA foi o mais baixo de todos (4.8 (2.5)). A atopia e a rinite foram registadas em 100% dos doentes. Em relação à terapêutica utilizada para controlo, o número médio de fármacos utilizados foi o mais baixo, 83% dos doentes estavam abaixo do grau 4 de terapêutica GINA e nenhum fazia doses elevadas de CSI. A avaliação da função respiratória, mostrou os melhores valores em comparação com os outros grupos. No entanto, o valor médio do VR mostrou-se elevado, mas com grande variação (142% (37.7)). Nenhum doente apresentou obstrução da via aérea, tendo sido baixa a labilidade brônquica (3% (3.0) para a variação de FEV₁ após prova de broncodilatação). Em relação aos outros biomarcadores, os valores de FeNO foram tendencialmente superiores a 35 ppb, mas sem eosinofilia periférica (3% (1.6)) e apresentaram os valores mais elevados de IgE total. Quanto ao fenótipo da expectoração, em apenas 25% foi realizado o estudo celular, não sendo interpretáveis os resultados.

As comparações múltiplas entre os grupos (*Quadros XXX a XXXV*) conseguiram-se estabelecer para os seguintes parâmetros: idade, anos de evolução de doença, IMC, pontuação dos vários questionários, número de fármacos utilizados, valores de função respiratória, percentagem de eosinófilos no sangue e valores logarítmicos de IgE total sérica. Destacamos os seguintes achados:

- Os grupos C3 e C5 não diferiram, com significado estatístico, na idade, nos anos de evolução de doença, no IMC, no número de medicação usada, na função respiratória, nem na eosinofilia periférica, mas diferiram na qualidade de vida (*Figura 12*), no controlo da doença (*Figura 13*) e na gravidade da mesma (*Figuras 8 e 9*), com piores resultados para o sexo feminino.

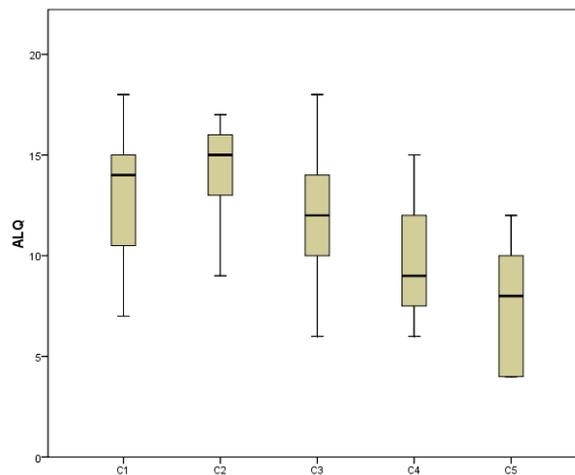


Figura 12 – Variável qualidade de vida (ALQ) nos 5 clusters. Distribuição dos resultados para a variável ALQ nos clusters considerados (C1, C2, C3, C4, C5). O grupo que apresentou mediana mais elevada, e portanto pior qualidade de vida, foi o C2, e com menor dispersão de resultados. O contrário foi verificado em C5.

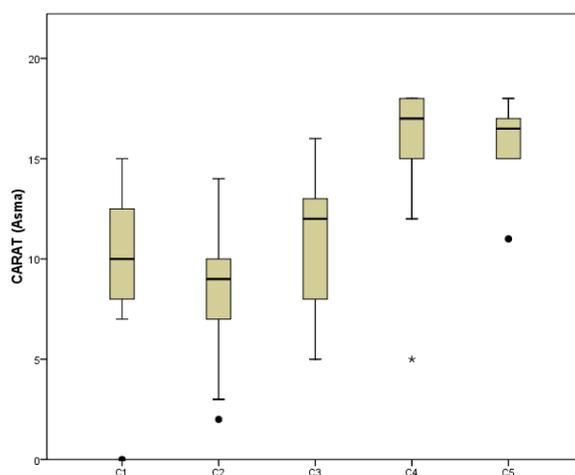


Figura 13 – Variável controlo da asma (CARATasma) nos 5 clusters. Distribuição dos resultados para a variável CARAT (asma) nos clusters considerados (C1, C2, C3, C4, C5). Os grupos que apresentaram medianas mais baixas (piores controlos de sintomas asmáticos) foram o C1 e C2, este último com menor dispersão de resultados. Os pontos representam *outliers* moderados e o asterisco *outliers* severos.

- Os grupos C2 e C4, predominantemente constituídos por mulheres, diferiram essencialmente pela maior gravidade e pior qualidade de vida de C2 (Figura 12), não diferindo com significado estatístico na idade, nos anos de evolução da doença (embora com valores bastante inferiores para o C2, que se aproximou mais de C3 em termos de médias do que de C4), no IMC ou nos valores da função respiratória. No entanto, detectaram-se diferenças significativas entre os grupos respeitante ao controlo da doença (CARAT asma) (Figura 13).
- Os grupos C1 (o mais grave) e C5 (o menos grave) foram os que mais se diferenciaram individualmente: O C1 diferenciou-se pela maior gravidade, com SOA mais elevado (apenas sem diferença estatística para o grupo C2) (Figura 9), pelo maior número de fármacos de controlo utilizados (com significado estatístico em relação a todos os outros grupos) e pelo elevado grau de eosinofilia periférica; C5 diferenciou-se pela idade (apenas sem diferença com o grupo C3) e pela menor gravidade, com o melhor valor de SOA.

Quadro XXXI – Caracterização da população asmática e da história da doença, nos 5 clusters

Variáveis qualitativas (n, %) e quantitativas (M (DP))	C1 (n=7)	C2 (n=19)	C3 (n=10)	C4 (n=15)	C5 (n=6)	Análise estatística	Comparações múltiplas
Idade (anos)	64.3±8.3	49.9±11.9	25.9±8.4	53.7±15.9	23.0±6.8	F(4,52)=19.0 P<0.001	C5=C3; C2=C4=C1
Género Feminino Masculino	0(0.0) 7(46.7)	18(42.9) 1(6.7)	10(23.8) 0(20.0)	12(28.6) 3(20.0)	2(4.8) 4(26.7)	Fisher=29.5 P<0.001	n.a.
IMC (Kg/m ²)	27.3±1.4	30.3±6.8	26.9±7.0	28.1±4.7	21.2±1.8	F(4,52)=3.2 P=0.020	C5=C3=C1=C4; C3=C1=C4=C2
Início de asma antes 12 A Não Sim	7(25.9) 0(0.0)	11(40.7) 8(26.7)	1(3.7) 9(30.0)	6(22.2) 9(30.0)	2(7.4) 4(13.3)	Fisher=15.4 p=0.003	n.a.
Anos de doença	29.7±13.8	24.4±13.0	14.3±7.4	31.8±18.5	12.8±8.7	F(4,52)=3.8 P=0.009	C5=C3=C2=C1; C3=C2=C1=C4
Hospitalização (no último ano) Não Sim	4(11.1) 3(14.3)	12(33.3) 7(33.3)	3(8.3) 7(33.3)	11(30.6) 4(19.0)	6(16.7) 0(0.0)	Fisher=8.6 p=0.060	n.a.
Exacerbação grave (no último ano) Não Sim	1(3.7) 6(20.0)	8(29.6) 11(36.7)	2(7.4) 8(26.7)	11(40.7) 4(13.3)	5(18.5) 1(3.3)	Fisher=12.9 p=0.009	n.a.
ATS Não-grave Grave	0(0.0) 7(26.9)	7(22.6) 12(46.2)	7(22.6) 3(11.5)	11(35.5) 4(15.4)	6(19.4) 0(0.0)	Fisher=19.0 p<0.001	n.a.
WHO Não-grave Grave	0(0.0) 7(21.2)	5(20.8) 14(42.4)	6(25.0) 4(12.1)	7(29.2) 8(24.2)	6(25.0) 0(0.0)	Fisher=16.8 p=0.001	n.a.
TAC-AR Normal Não Sim	5(29.4) 1(12.5)	5(29.4) 3(37.5)	1(5.9) 2(25.0)	6(35.3) 1(12.5)	0(0.0) 1(12.5)	Fisher=5.1 p=0.238	n.a.
Air trapping (AT) Não Sim	2(11.8) 4(50.0)	6(35.3) 2(25.0)	2(11.8) 1(12.5)	6(35.3) 1(12.5)	1(5.9) 0(0.0)	Fisher=4.7 p=0.322	n.a.
Enfisema (E) Não Sim	4(19.0) 2(50.0)	8(38.1) 0(0.0)	3(14.3) 0(0.0)	5(23.8) 2(50.0)	1(4.8) 0(0.0)	Fisher=5.6 p=0.333	n.a.
Bronquiectasias (B) Não Sim	4(23.5) 2(25.0)	5(29.4) 3(37.5)	3(17.6) 0(0.0)	4(23.5) 3(37.5)	1(5.9) 0(0.0)	Fisher=2.3 p=0.845	n.a.
E+B Não Sim	6(25.0) 0(0.0)	8(33.3) 0(0.0)	3(12.5) 0(0.0)	6(25.0) 1(100.0)	1(4.2) 0(0.0)	n.a.	n.a.
AT+E+B Não Sim	5(20.8) 1(100)	8(33.3) 0(0.0)	3(12.5) 0(0.0)	7(29.2) 0(0.0)	1(4.2) 0(0.0)	n.a.	n.a.

ATS: American Thoracic Society; C: Cluster; IMC: Índice de massa corporal; WHO: World Health Organization

Quadro XXXII – Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos adversos, nos 5 clusters

Variáveis: qualitativas (n, %) quantitativas (M(DP))	C1 (n=7)	C2 (n=19)	C3 (n=10)	C4 (n=15)	C5 (n=6)	Análise estatística	Comparações múltiplas
Controlo da doença Sim Não	0(0.0) 7(14.9)	0(0.0) 19(40.4)	1(10.0) 9(19.1)	5(50.0) 10(21.3)	4(40.0) 2(4.3)	Fisher=15.7 p=0.001	n.a.
Doentes em risco (≥1 ponto) Não Sim	0(0.0) 7(15.2)	4(36.4) 15(32.6)	1(9.1) 9(19.6)	2(18.2) 13(28.3)	4(36.4) 2(4.3)	Fisher=8.5 p=0.045	n.a.
Uso de CSO (no ultimo ano): 0 1 2 ≥3	0(0.0) 2(11.1) 2(33.3) 3(42.9)	6(23.1) 7(38.9) 4(66.7) 2(28.6)	4(15.4) 5(27.8) 0(0.0) 1(14.3)	11(42.3) 3(16.7) 0(0.0) 1(14.3)	5(19.2) 1(5.6) 0(0.0) 0(0.0)	n.a.	n.a.
ACT	14.8±6.7	17.7±3.2	19.6±4.0	21.8±2.1	23.5±1.4	F(4,52)=7.6 p<0.001	C1=C2; C2=C3=C4; C3=C4=C5
CARAT (Rinite)	5.6±4.0	6.0±3.7	5.5±2.1	9.3±2.4	6.2±1.8	F(4,52)=3.7 p=0.010	C3=C1=C2=C5; C1=C2=C3=C4
CARAT (Asma)	9.4±5.0	8.7±3.1	11.1±3.4	15.5±3.4	15.7±2.5	F(4,52)=9.5 p<0.001	C2=C1=C3; C3=C4; C4=C5
ALQ	12.9±4.0	14.2±2.7	11.7±3.5	9.6±2.9	7.7±3.3	F(4,52)=7.5 p<0.001	C5=C4; C4=C3=C1, C3=C1=C2
SOA	15.0±2.8	11.6±2.5	10.3±4.0	8.7±2.7	4.8±2.5	F(4,52)=9.4 p<0.001	C5; C4=C3=C2; C2=C1

ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilação; C: Cluster; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; CSO: corticoterapia oral; IMC: Índice de massa corporal; WHO: *World Health Organization*

Quadro XXXIII – Distribuição das comorbilidades nos 5 *clusters*

Variáveis qualitativas (n, %) e quantitativas (M (DP))	C1 (n=7)	C2 (n=19)	C3 (n=10)	C4 (n=15)	C5 (n=6)	Análise estatística
Atopia						
Não	2(11.1)	9(50.0)	2(11.1)	5(27.8)	0(0.0)	Fisher=5.3 P=0.255
Sim	5(12.8)	10(25.6)	8(20.5)	10(25.6)	6(15.4)	
Rinite						
Não	0(0.0)	4(40.0)	1(10.0)	5(10.0)	0(0.0)	Fisher=4.6 p=0.282
Sim	7(14.9)	15(31.9)	9(19.1)	10(21.3)	6(12.8)	
Polipose						
Não	5(10.2)	17(34.7)	8(16.3)	13(26.5)	6(12.2)	Fisher=2.6 p=0.657
Sim	2(25.0)	2(25.0)	2(25.0)	2(25.0)	0(0.0)	
Sinusite						
Não	4(12.9)	9(29.0)	4(12.9)	10(32.3)	4(12.9)	Fisher=2.6 p=0.661
Sim	3(11.5)	10(38.5)	6(23.1)	5(19.2)	2(7.7)	
Exposição tabágica						
Não	2(5.6)	13(36.1)	7(19.4)	10(27.8)	4(11.1)	Fisher=3.9 p=0.432
Sim	5(23.8)	6(28.6)	3(14.3)	5(23.8)	2(9.5)	
História de pneumonia						
Não	4(11.1)	11(30.6)	6(16.7)	10(27.8)	5(13.9)	Fisher=1.6 P=0.857
Sim	3(14.3)	8(38.1)	4(19.0)	5(23.8)	1(4.8)	
HS AINE's						
Não	4(8.3)	18(37.7)	8(16.7)	14(29.2)	4(8.3)	Fisher=7.5 P=0.068
Sim	3(33.3)	1(11.1)	2(22.2)	1(11.1)	2(22.2)	
Ansiedade (sim)	0(0.0)	5(38.5)	1(7.7)	5(38.5)	2(15.4)	Fisher=4.3; P=0.361
Depressão (sim)	0(0.0)	3(50.0)	0(0.0)	3(50.0)	0(0.0)	
RGE						
Não	4(10.0)	13(32.5)	9(22.5)	10(25.0)	4(10.0)	Fisher=2.8; P=0.615
Sim	3(17.6)	6(35.3)	1(5.9)	5(29.4)	2(11.8)	
Défice α1-AT						
Não	5(9.4)	19(35.8)	9(17.0)	14(26.4)	6(11.3)	Fisher=5.6; p=0.105
Sim	2(50.0)	0(0.0)	1(25.0)	1(25.0)	0(0.0)	
Bronquiectasias						
Não	7(13.2)	18(34.0)	10(18.9)	12(22.6)	6(11.3)	Fisher=3.6; p=0.415
Sim	0(0.0)	1(25.0)	0(0.0)	3(75.0)	0(0.0)	
DPOC						
Não	5(9.6)	18(34.6)	10(19.0)	13(25.0)	6(11.5)	Fisher=4.3; p=0.283
Sim	2(40.0)	1(20.0)	0(0.0)	2(40.0)	0(0.0)	
Outra doença obstrutiva						
Não	4(8.3)	17(35.4)	10(20.8)	11(22.9)	6(12.5)	Fisher=7.1; p=0.086
Sim	3(33.3)	2(22.2)	0(0.0)	4(44.4)	0(0.0)	
Aspergillus (IgEpos)						
Não	6(10.9)	19(34.5)	10(18.2)	14(25.5)	6(10.9)	Fisher=4.0; p=0.346
Sim	1(50.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(50.0)	0(0.0)	
Nº de comorbilidades	5.6±3.0	3.3±1.4	3.6±1.4	3.6±1.4	3.5±1.0	F(4,52)=2.6; P=0.046 C2=C5=C3=C4; C5=C3=C4=C1

AT: antitripsina; C: *Cluster*; CSO: corticoterapia oral; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crónica; HS AINE's: hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteróides; Ig: Imunoglobulina; IMC: índice de massa corporal; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono

Quadro XXXIV – Distribuição da terapêutica pelos 5 clusters

Variáveis qualitativas (n, %) e quantitativas (M±DP)	C1 (n=7)	C2 (n=19)	C3 (n=10)	C4 (n=15)	C5 (n=6)	Análise estatística
Imunoterapia						
Não	5(11.1)	19(42.5)	7(15.6)	11(24.4)	3(6.7)	n.a.
Sim	1(9.1)	0(0.0)	3(27.3)	4(36.4)	3(27.3)	
No passado	1(100)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Terapêutica:						
até step3	0(0.0)	0(0.0)	1(33.3)	2(66.6)	0(0.0)	n.a.
step3	0(0.0)	4(28.6)	4(28.6)	1(7.1)	5(35.7)	
step4	5(13.5)	14(37.8)	5(13.5)	12(32.4)	1(2.7)	
step5	2(66.7)	1(33.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Dose CSI:						
≤ 750 µgr PF ou eq	0(0.0)	9(25.7)	7(20.0)	13(37.1)	6(17.1)	Fisher=20.6; P<0.001
>750 µgr PF ou eq	7(31.8)	10(45.5)	3(13.6)	2(9.1)	0(0.0)	
BALA						
Não	0(0.0)	0(0.0)	1(33.3)	2(66.7)	0(0.0)	Fisher=3.6; P=0.436
Sim	7(13.0)	19(35.2)	9(16.7)	13(24.1)	6(11.1)	
Tiotropio						
Não	3(6.7)	15(33.3)	10(22.2)	11(24.4)	6(13.3)	Fisher=8.7; P=0.045
Sim	4(33.3)	4(33.3)	0(0.0)	4(33.3)	0(0.0)	
Montelucaste						
Não	1(3.7)	8(29.6)	5(18.5)	9(33.3)	4(14.8)	Fisher=5.0; P=0.288
Sim	6(20.0)	11(36.7)	5(16.7)	6(20.0)	2(6.7)	
Omalizumabe						
Não	5(9.3)	18(33.3)	10(18.5)	15(27.8)	6(11.1)	Fisher=5.6; P=0.088
Sim	2(66.7)	1(5.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Aminofilina						
Não	5(9.8)	17(33.3)	10(19.6)	13(25.5)	6(11.8)	Fisher=3.6; P=0.410
Sim	2(33.3)	2(33.3)	0(0.0)	2(33.3)	0(33.3)	
CS nasal						
Não	3(20.0)	8(53.3)	0(0.0)	4(26.7)	0(0.0)	Fisher=9.0; P=0.045
Sim	4(9.5)	11(9.5)	10(23.8)	11(26.7)	6(14.3)	
Nº de fármacos	5.0±0.6	3.1±0.9	3.0±1.3	2.9±0.9	2.8±0.8	F(4,52)=6.9; p<0.001 C1; C5=C4=C3=C2

BALA: beta-adrenérgico de longa acção; C: Cluster; CS: corticoterapia; CSI: corticoterapia inalada; eq: equivalente PF: propionato de fluticasona

Quadro XXXV – Função pulmonar nos 5 clusters

Variáveis qualitativas (n, %) e quantitativas (M±DP)	C1 (n=7)	C2 (n=19)	C3 (n=10)	C4 (n=15)	C5 (n=6)	Análise estatística	Comparações múltiplas
Obstrução persistente							
Não	0(0.0)	13(33.3)	10(25.6)	10(25.6)	6(15.4)	Fisher=21.4; P<0.001	n.a.
Sim	7(38.9)	6(33.3)	0(0.0)	5(27.8)	0(0.0)		
Reversibilidade brônquica							
Não	1(4.0)	5(20.0)	9(36.0)	7(28.0)	3(12.0)	Fisher=13.5; P=0.006	n.a.
Sim	6(18.8)	14(43.8)	1(3.1)	8(25.0)	3(9.4)		
FeNO(ppb):							
<35	1(5.0)	8(40.0)	5(25.0)	4(20.0)	2(10.0)	Fisher=4.8; P=0.320	n.a.
≥35	3(23.1)	2(15.4)	2(15.4)	3(23.1)	3(23.1)		
Fenótipo expectoração							
EOS (n=15)	3(20.0)	6(40.0)	2(13.3)	3(20.0)	1(6.7)	n.a.	n.a.
NEU (n=3)	0(0.0)	1(33.3)	0(0.0)	2(66.7)	0(0.0)		
Misto (n=9)	3(33.3)	3(33.3)	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)		
PAUCI (n=3)	0(0.0)	1(33.3)	1(33.3)	1(33.3)	0(0.0)		
FEV₁ basal (%)	66.1±16.2	87.5±24.3	114.7±13.8	88.0±24.0	114.0±27.2	F(4,52)=6.7 p<0.001 F(4,52)=6.5 p=0.001 F(4,52)=0.8 p=0.281	C1=C2=C4; C2=C4=C5=C3 C1=C4=C2; C4=C2=C5=C3
FEV₁ após BD (%)	74.0±14.7	95.6±23.9	120.4±12.9	95.5±21.1	116.8±25.8		
Δ FEV₁ (%)	7.9±9.6	8.1±7.7	5.7±4.0	7.5±6.5	2.8±3.0		
FEV₁/FVC basal (%)	56.3±6.6	73.4±15.3	93.7±15.4	71.1±7.9	96.3±5.7	F(2,52)=14.9 p<0.001 F(4,52)=11.3 p<0.001 F(4,52)=2.7 p=0.05	C1=C4;C4=C2; C3=C5 C1=C4; C4=C2; C2=C3; C3=C5 n.a.
FEV₁/FVC após BD (%)	58.9±6.9	76.4±15.8	88.9±10.6	72.6±8.4	95.0±4.1		
Δ FEV₁/FVC (%)	2.6±3.4	3.0±4.6	-4.8±13.2	1.5±2.7	-1.3±4.4		

Quadro XXXV (continuação) – Função pulmonar nos 5 clusters

Variáveis qualitativas (n, %) e quantitativas (M±DP)	C1 (n=7)	C2 (n=19)	C3 (n=10)	C4 (n=15)	C5 (n=6)	Análise estatística	Comparações múltiplas
FEV ₂₅₋₇₅ basal (%)	19.1±6.0	42.8±24.0	88.7±11.3	39.0±18.3	120.3±24.9	F(4,52)=35.03 p<0.001	C1=C4=C2; C3; C5
FEV ₂₅₋₇₅ após BD (%)	9.7±15.8	67.4±36.1	111.7±18.9	55.9±28.4	131.2±21.8	F(4,52)=21.2 p<0.001	C1; C4=C2;C3=C5
Δ FEV ₂₅₋₇₅ (%)	-9.4±16.8	24.6±30.1	23.0±17.2	16.9±34.2	10.8±13.5	F(4,52)=2.2 p=0.076	n.a.
VR basal (%)	137.4±44.8	117.4±25.6	106.7±34.4	132.2±35.2	142.0±37.7	F(4,52)=1.8 p=0.149	n.a.
VR após BD (%)	136.2±46.5	114.9±27.6	107.2±32.0	127.5±37.8	136.6±42.0	F(4,52)=1.1 p=0.392	n.a.
Δ VR (%)	-12.0±4.6	-2.6±12.8	-2.7±12.6	-5.3±8.2	-5.2±8.3	F(4,52)=0.9 p=0.482	n.a.
Eosinófilos sangue (%):	7.7±6.8	3.9±1.7	1.8±1.7	1.5±1.3	3.3±1.6	F(4,52)=7.0 p<0.001	C4=C3=C5=C2; C1
IgEt sérica (log(mmol/L)):	2.5±0.4	1.9±0.4	2.1±0.7	2.3±0.7	2.7±0.2	F(4,52)=3.2 p=0.019	C2=C3=C4=C1; C3=C4=C1=C5
Eosinófilos expectoração (%)	32.0±21.4 (n=6)	24.3±30.3 (n=11)	5.8±6.3 (n=4)	21.3±25.6 (n=7)	44.5±48.8 (n=2)	n.a.	
Neutrófilos expectoração (%)	55.2±25.7 (n=6)	50.6±32.1 (n=11)	36.3±32.1 (n=4)	59.4±31.8 (n=7)	38.0±53.7 (n=2)	n.a.	
Macrófagos (%)	1.7±2.8 (n=6)	8.6±14.1 (n=11)	3.8±4.8 (n=4)	5.7±8.9 (n=7)	13.5±10.6 (n=2)	n.a.	
Monócitos (%)	4.0±5.4 (n=6)	7.7±6.9 (n=11)	22.5±27.8 (n=4)	6.4±5.1 (n=7)	2.0±2.8 (n=2)	n.a.	
Céls. dendríticas (%)	0.0±0.0 (n=6)	0.19±0.60 (n=11)	0.0±0.0 (n=4)	0.17±0.37 (n=7)	0.04±0.05 (n=2)	n.a.	
Basófilos (%)	0.37±0.48 (n=6)	0.03±0.06 (n=11)	0.03±0.05 (n=4)	0.03±0.04 (n=7)	0.07±0.10 (n=2)	n.a.	

BD: broncodilatação; FVC: forced vital capacity; C: Cluster; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; Eos: eosinofílico; FeNO; *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced Expiratory Volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced Vital Capacity*; Ig: Imunoglobulina; Neu: neutrofilico; Pauci: paucigranulocítico; VR: volume residual

II.3.6 A metabolómica na asma grave e na identificação de biomarcadores urinários específicos da asma (grupos de gravidade, fenótipos e *clusters*)

Nesta rúbrica, tivemos como intuito a identificação de metabolitos urinários relacionados com a peroxidação lipídica, que fossem biomarcadores de gravidade da asma e dos *clusters* previamente identificados. Este objectivo, se cumprido, permitir-nos-ia contribuir para o estudo da patogenia da asma, correlacionando os perfis metabolómicos urinários da peroxidação lipídica dos asmáticos com parâmetros clínicos e de gravidade da doença.

A técnica utilizada para obtenção de dados foi a análise bidimensional por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa por tempo de voo, que permite avaliar compostos voláteis resultantes do *stress* oxidativo. Os dados obtidos foram submetidos a análises dirigidas e supervisionadas.

II.3.6.1 Asma grave

Dados obtidos por GCxGC- ToFMS

Das várias dezenas de metabolitos detectáveis na urina, utilizou-se para a análise pela técnica GCxGC uma base de dados reduzida, compreendendo 34 aldeídos e alcanos alifáticos, relacionados com a peroxidação lipídica (decorrente do *stress* oxidativo), dum perfil metabolómico urinário (*Quadro I - 5 da Informação suplementar 1*).

A análise supervisionada, pelo método PLS-DA, incidiu na matriz acima referenciada, tendo-se obtido a separação por grupos de gravidade constantes do gráfico da *Figura 14*. Esta distribuição sobre as duas componentes LV1 (*First Latent Variable*) e LV2 (*Second Latent Variable*), que explicam 61,8% da variabilidade, mostra claramente a separação de dois grupos: um relativo a doentes graves e outro a não graves. No entanto, essa separação não foi conseguida num número considerável de elementos (n=28), que aparecem sobrepostos (*Figura 14*).

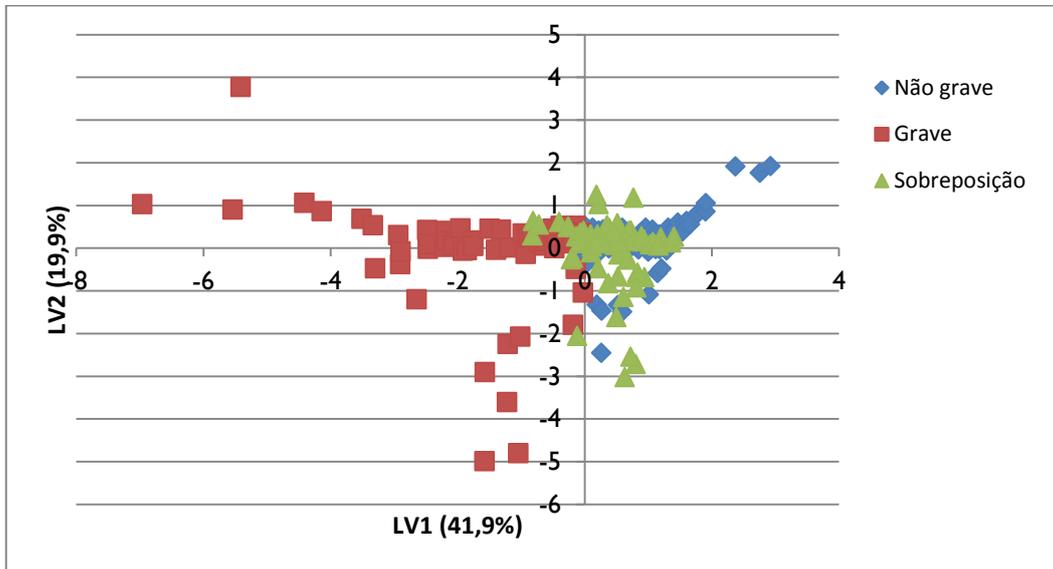


Figura 14 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves. O gráfico das coordenadas factoriais mostra que as amostras estão dispersas ao longo da primeira variável latente, com predomínio das amostras de AG no seu lado negativo e das amostras de asma não grave no seu lado positivo. Um grupo de amostras sobrepõe-se no eixo de LV1.

Perante os resultados obtidos, na tentativa de obter melhor separação entre grupos de gravidade, e variando a extensão do *stress* oxidativo com a idade, procedeu-se ao mesmo tipo de análise, tendo em conta o factor idade. A divisão foi feita em 4 faixas etárias (*Figuras 15-A a 18-A*), tendo-se então obtido separação muito clara, por grupos de gravidade e sem amostras sobrepostas, sendo os compostos responsáveis por essa separação os constantes dos gráficos correspondentes (*Figuras 15-B a 18-B*).

Indivíduos até 21 anos (incluindo asmáticos graves e não graves)

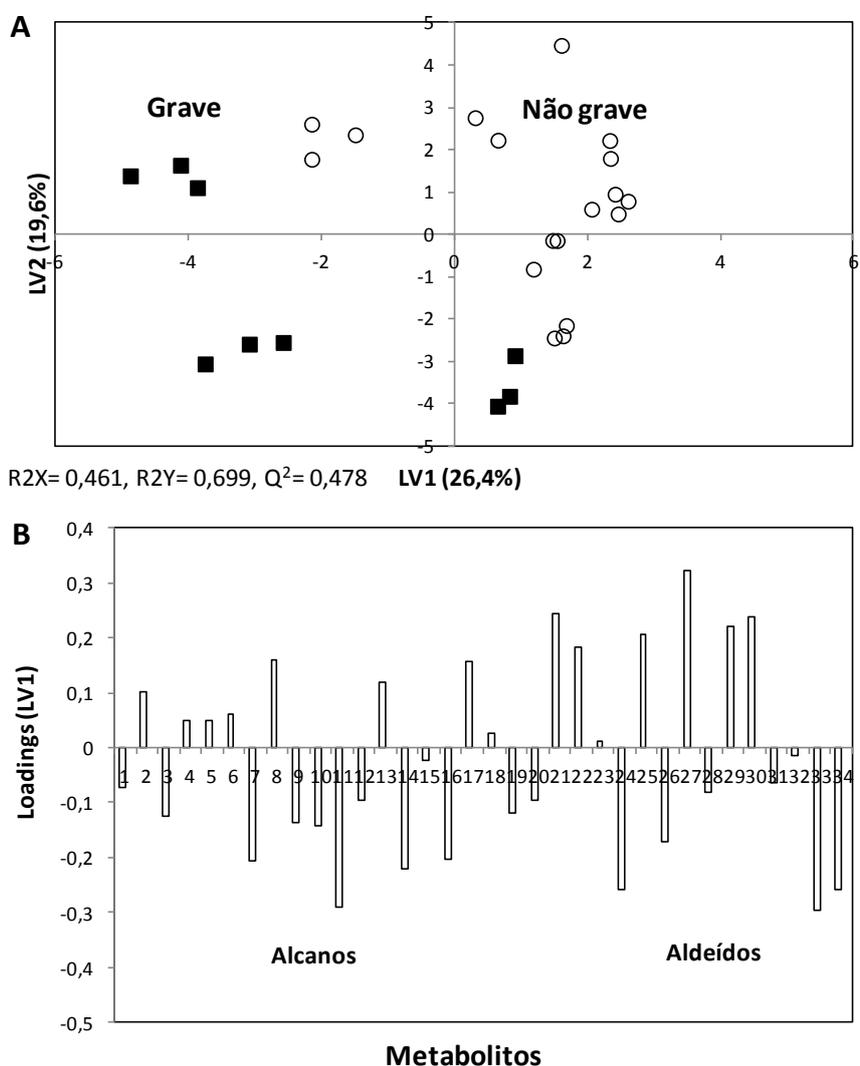


Figura 15 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, com < 21 anos de idade.

- A** - O gráfico das coordenadas factoriais mostra a discriminação ao longo do LV1 havendo predomínio de doentes graves no seu lado negativo e de doentes não graves no lado positivo. Os símbolos preenchidos representam os elementos graves e os não preenchidos os não graves.
- B** - No gráfico das contribuições factoriais, apesar de se verificar uma distinção entre AG e asma não grave, quando se consideram as famílias de peroxidação lipídica, não é possível, nesta faixa etária, fazer a caracterização da gravidade em função da família química. A atribuição dos números relativos aos picos dos metabolitos está patente no *Quadro I - S da Informação suplementar 1*.

Indivíduos de 22 a 40 anos (incluindo asmáticos graves e não graves)

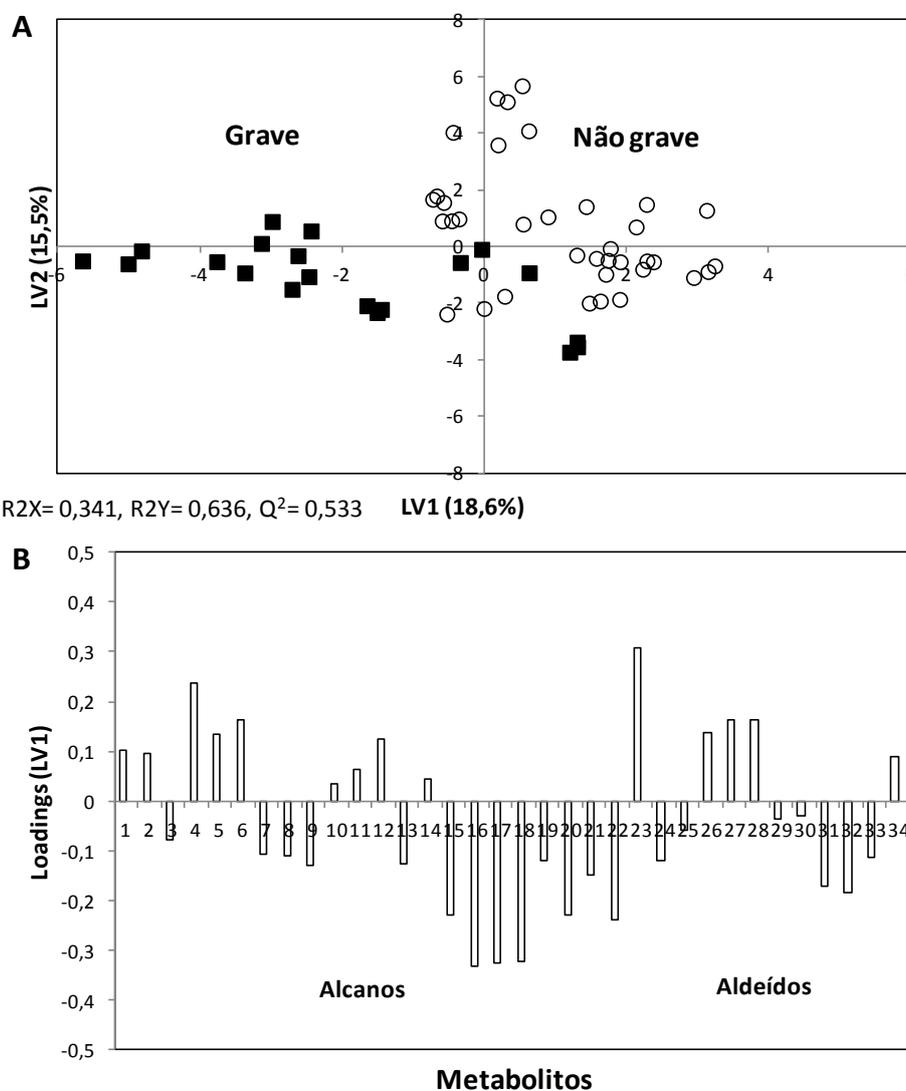


Figura 16 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, entre 22-40 anos de idade.

- A** - O gráfico das coordenadas factoriais mostra a discriminação ao longo do LV1 havendo predomínio de doentes graves no seu lado negativo e de doentes não graves no lado positivo. Os símbolos preenchidos representam os elementos graves e os não preenchidos os não graves.
- B** - No gráfico das contribuições factoriais, nota-se que, nos componentes identificados responsáveis pela separação da AG, predominam os alcanos. A atribuição dos números relativos aos picos dos metabolitos está patente Quadro I - S da Informação suplementar 1.

Indivíduos de 41 a 60 anos (incluindo asmáticos graves e não graves)

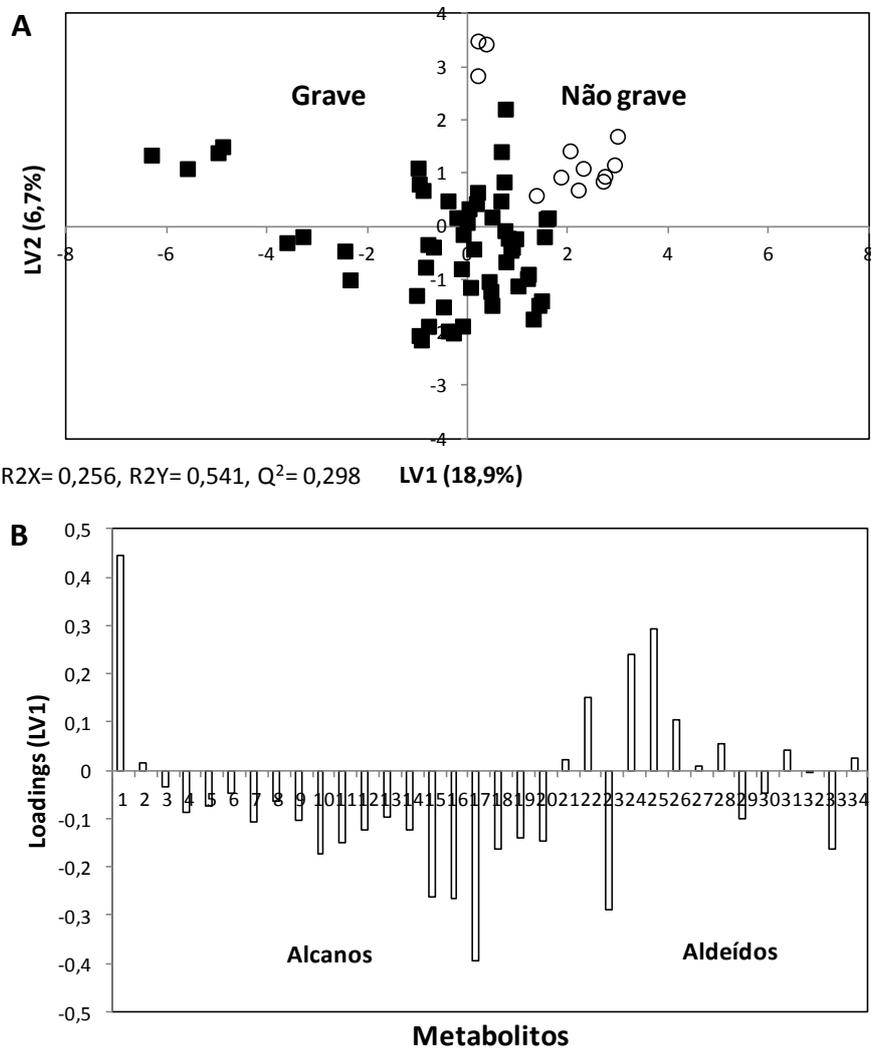


Figura 17 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, entre 41-60 anos de idade.

- A** - O gráfico das coordenadas factoriais mostra a discriminação ao longo do LV1 havendo predomínio de doentes graves no seu lado negativo e de doentes não graves no lado positivo. Os símbolos preenchidos representam os elementos graves e os não preenchidos os não graves.
- B** - No gráfico das contribuições factoriais, nota-se que nos componentes identificados responsáveis pela separação da AG predominam os alcanos. A atribuição dos números relativos aos picos dos metabolitos está patente no Quadro I - 5 da Informação suplementar 1.

Indivíduos com mais de 60 anos (incluindo asmáticos graves e não graves)

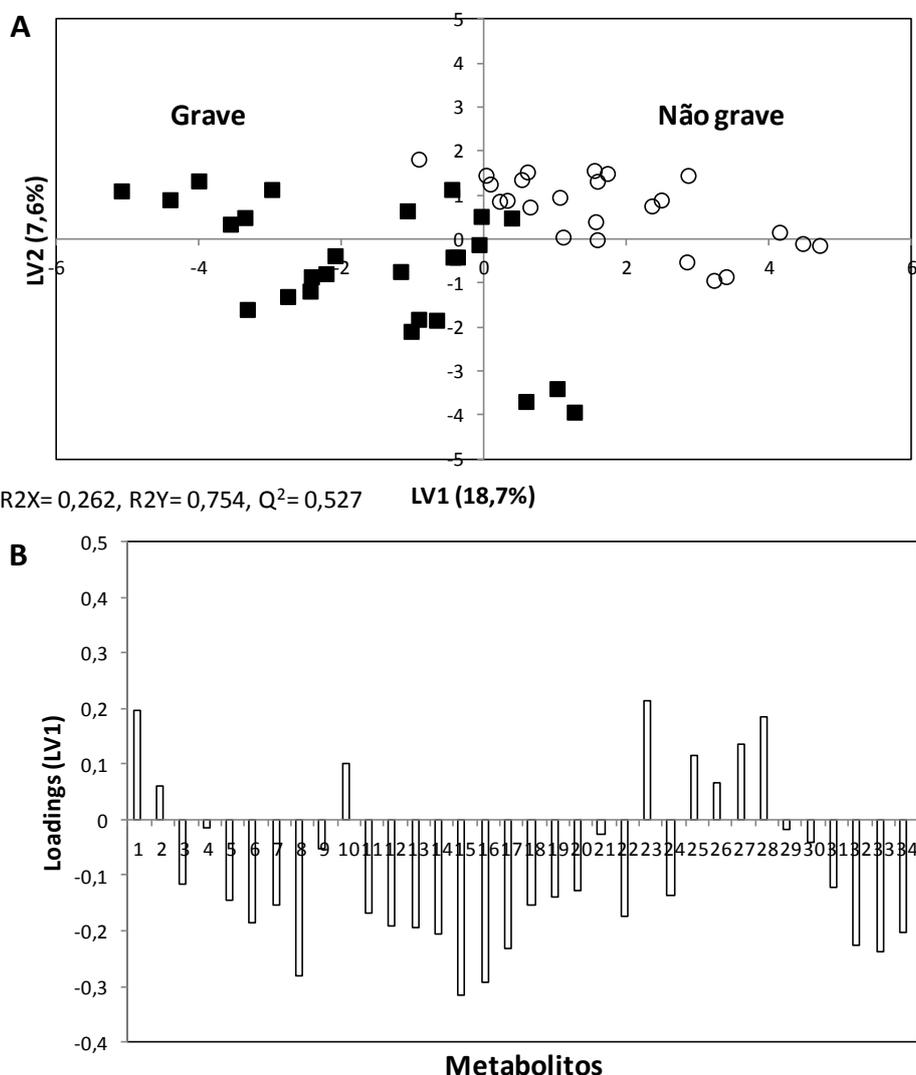


Figura 18 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, para indivíduos com mais de 60 anos de idade.

- A-** O gráfico das coordenadas factoriais mostra a discriminação ao longo do LV1 havendo predomínio de doentes graves no seu lado negativo e de doentes não graves no lado positivo. Os símbolos preenchidos representam os elementos graves e os não preenchidos os não graves.
- B-** No gráfico das contribuições factoriais, nota-se que nos componentes identificados responsáveis pela separação da AG predominam os alcanos. A atribuição dos números relativos aos picos dos metabolitos está patente no Quadro I - S da Informação suplementar 1.

Resumindo, com excepção da faixa de indivíduos com menos de 21 anos de idade, a família química que predomina nos doentes graves é a dos alcanos, com maior extensão à medida que a idade aumenta. Nos gráficos das contribuições factoriais nota-se que a AG é caracterizada pelo predomínio de alcanos, que se começa a observar para os indivíduos com idades entre 22-40 anos, acentuando-se nas duas faixas etárias seguintes.

II.3.6.2 Clusters

Com o intuito de encontrar biomarcadores de diferentes *clusters*/endótipos, procedemos à sua análise metabolómica, fazendo uso da mesma técnica GCxGC, agora dirigida aos *clusters* obtidos previamente.

Foi, também aqui, utilizada a base de metabolitos urinários relacionados com a peroxidação lipídica, referida no *Quadro I - S da Informação suplementar 1*, à qual se aplicou a PLS-DA.

A separação obtida para os 5 *clusters* não foi clara, principalmente devido aos *clusters* 2 e 4 (*Figura 19*).

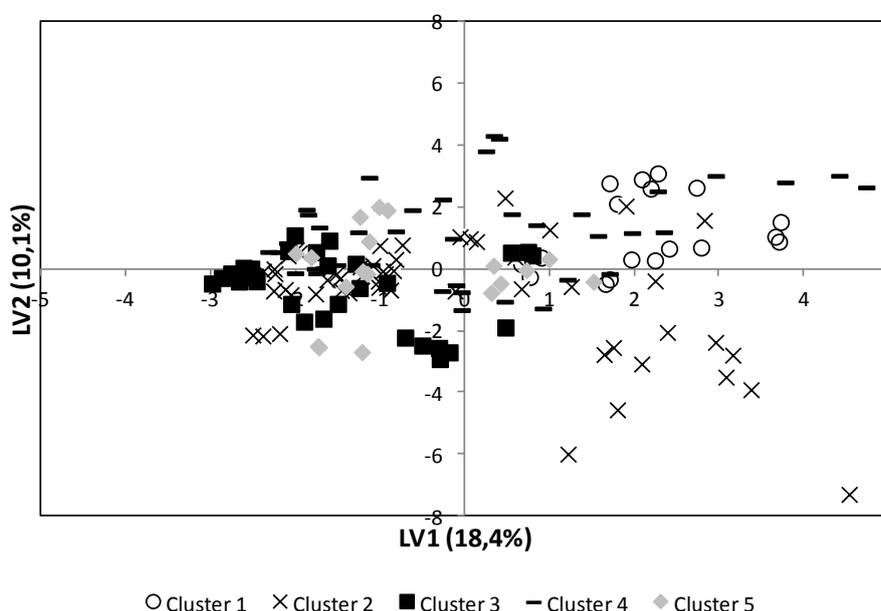


Figura 19 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina dos 57 indivíduos, distribuídos pelos 5 *clusters*.

O gráfico das coordenadas factoriais, obtido por PLS-DA, aplicada às áreas de pico dos aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina dos indivíduos dos cinco *clusters*, mostra não haver discriminação clara entre os grupos, ao longo da primeira e da segunda variável latente, principalmente devido a c2 e C4 que se sobrepõe.

Perante este resultado, procedemos a outras análises supervisionadas que mostraram que os *clusters* obtidos eram clinicamente justificáveis. Em primeiro lugar fizemos análise supervisionada dos C1, C3 e C5, por terem diferentes graus de gravidade mas, em comum, uma provável resposta inflamatória do tipo Th2. Depois, fizemos análise supervisionada aos C2 e C4, já que partilhavam características como a idade e o IMC, mas apresentavam gravidade e controlo de doença discordantes, sugerindo diferente resposta inflamatória. Desta forma, obtivemos uma boa discriminação para os *clusters* 1, 3 e 5 (*Figura 20*), mas não tão clara para os *clusters* 2 e 4 (*Figura 21*).

Os *clusters* 1, 3 e 5 diferenciaram-se com base na composição urinária dos aldeídos e alcanos alifáticos, como mostra o gráfico das coordenadas factoriais (*Figura 20-A*) onde a primeira e segunda variável latente explicam 49% da variabilidade total. Ao longo de LV1, encontra-se separação entre o C1 e os outros *clusters* (C3 e C5) e, ao longo de LV2, entre C3 e C5. Como se observa na *Figura 20-A*, as amostras de C1 localizam-se no lado positivo de LV1 e, as de C3 e C5, no seu lado negativo; as amostras de C1 e C5 localizam-se no lado positivo de LV2 e as de C3 no seu lado negativo.

De acordo com o gráfico das contribuições factoriais de LV1 e LV2 (*Figure 20-B*), C1 apresenta maior peso de todos os metabolitos estudados, com excepção do hexanal que caracteriza os indivíduos de C3.

Deste modo, este três *clusters* podem ser organizados de acordo com o estado relativo de peroxidação lipídica: *cluster 1>cluster 3>cluster 5*.

Os metabolitos com valores VIP>1 foram os determinantes para esta diferenciação, nomeadamente: hexanal, nonanal, decanal, heptadecano, 2,6,10-trimetillpentadecano, dodecanal, tetradecano, undecanal, tetradecanal, hexadecano. Estão ilustrados na *Figura 20-C*.

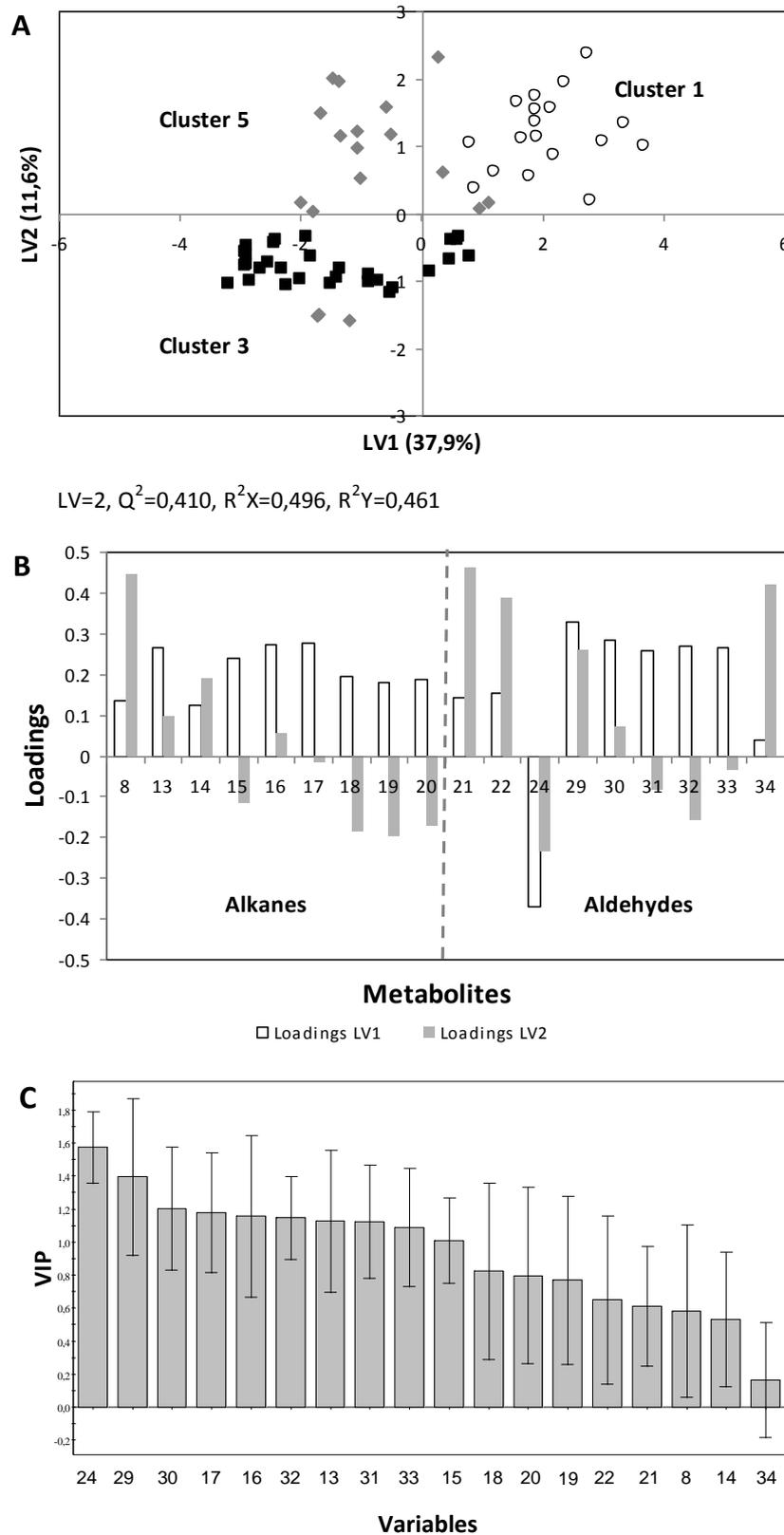


Figura 20 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos detectados na urina de indivíduos dos clusters C1, C3 e C5. **A** - O gráfico LV1 Vs LV2 mostra a discriminação ao longo de LV1 entre o C1 e os restantes. C3 está localizado maioritariamente no lado negativo de LV1 e no lado negativo de LV2. C5 está

no lado negativo de LV1 e positivo de LV2. Os símbolos não preenchidos correspondem aos elementos do C1, os preenchidos escuros ao C3 e os preenchidos claros ao C5.

B- O gráfico das contribuições factoriais de LV1 e LV2 explica a separação observada no gráfico A (com excepção do hexanal, que caracteriza os indivíduos do C3, todos os metabolitos em estudo caracterizam o C1).

C- Coluna VIP explicando o gráfico A. Os metabolitos com valores VIP>1 são os que contribuem para a diferenciação entre os 3 clusters. Identificação de compostos: **8:** 2,2,4,6,6-pentametilheptano, **13:** tetradecano, **14:** pentadecano, **15:** hexadecano, **16:** 2,6,10-trimetilpentadecano, **17:** heptadecano, **18:** octadecano, **19:** nonadecano, **20:** eicosano, **21:** 3-metilbutanal, **22:** 2-metilbutanal, **24:** hexanal, **29:** nonanal, **30:** decanal, **31:** undecanal, **32:** dodecanal, **33:** tetradecanal, **34:** hexadecanal.

Relativamente a C2 e C4 encontrou-se tendência para maior extensão de *stress* oxidativo em C2, quando comparado com C4 (*Figura 21*).

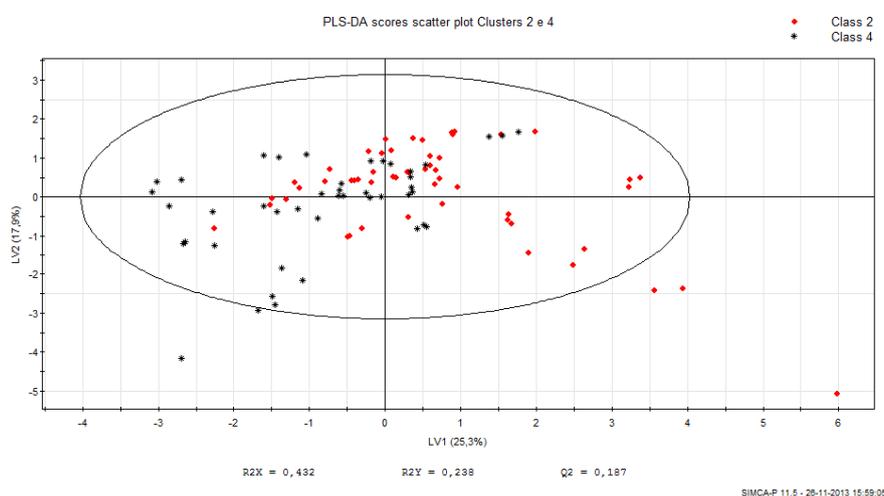


Figura 21 – Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos dos *clusters* C2 e C4. O gráfico LV1 Vs LV2 mostra grande heterogeneidade da amostra não havendo discriminação clara ao longo de LV1 entre o C2 e C4. No entanto, C2 está localizado maioritariamente no lado positivo de LV1 e C4 no seu lado negativo.

II.3.6.3 Relação entre as características fenotípicas e os *clusters* encontrados com os biomarcadores urinários identificados

Como descrito na metodologia, os modelos para identificação de correlações entre os metabolitos urinários e os parâmetros clínicos (FEV₁; FeNO; ACT, CARAT, ALQ e SOA) foram feitos usando regressões PLS nos conjuntos de metabolitos determinados por *Genetic Algorithm* para cada parâmetro.

Quando correlacionámos a metabolómica dos 5 *clusters* (em simultâneo) com os parâmetros clínicos, não encontrámos correlações significativas. Então, e à semelhança do racional utilizado anteriormente para a execução de análises supervisionadas aos *clusters*, seleccionámos os agrupamentos previamente obtidos (C1, C3 e C5; C2 e C4). Obtivemos, assim,

modelos significativos para os parâmetros FEV₁, FeNO e SOA, com identificação do respectivo conjunto óptimo de metabolitos (*Quadro XXXVI*).

Para a predição do FEV₁, foi obtido um modelo significativo após exclusão do C2 e do C4, correspondentes a mulheres mais velhas com excesso de peso (*Figura 22-A*). O conjunto óptimo de metabolitos incluiu os seguintes: 2-metilpentano; heptano; 2,4-dimetilheptano; nonano; undecano; dodecano; pentadecano; 2-metilbutanal; hexanal; decanal; tetradecanal e hexadecanal.

Para a predição do FeNO foram calculados dois modelos: após exclusão de C2 e C4, restavam apenas 16 amostras (*Figura 22-B*), pelo que optámos por fazer outro modelo que incluísse um maior número de elementos. Nesse modelo, que excluiu apenas o C3, os resultados foram piores (*Figura 22- C*) do que os encontrados com o modelo de predição que excluiu C2 e C4 (*Figura 22-B*). O conjunto óptimo de metabolitos para a predição de FeNO (C1,C3,C5) incluiu: 2,2,4,6,6-pentametilheptano, 2,4-dimetilheptano, 2-hexanal, 2-metilbutanal, decano, heptanal, hexadecano, hexano, pentanal, tetradecanal e tetradecano.

Para a predição do SOA, excluímos o C2 e C4 (*Figura 22-D*) e o conjunto óptimo de metabolitos incluiu: 4-metilheptano, octano, 2,2,4,6,6-pentametilheptano, tridecano, octadecano, pentanal, dodecanal, tetradecanal e hexadecanal.

Quadro XXXVI – Metabolitos urinários VIP e predição de parâmetros clínicos

Parâmetros clínicos	Metabolitos urinários VIP
FEV ₁ (%previsto)	Metilpentano, heptano, 2,4-dimetilheptano, nonano, undecano, dodecano, pentadecano, 2-metilbutanal, hexanal, decanal, tetradecanal e hexadecanal.
FeNO	2,4,6,6-pentametilheptano, 2,4-dimetilheptano, 2-hexanal, 2-metilbutanal, decano, heptanal, hexadecano, hexano, pentanal, tetradecanal e tetradecano.
SOA	4-metilheptano, octano, 2,2,4,6,6-pentametilheptano, tridecano, octadecano, pentanal, dodecanal, tetradecanal e hexadecanal.

FEV₁: Forced expiratory volume in the first second; FeNO: Fraction of exhaled nitric oxide; SOA: Severity of Asthma Score; VIP: Variable importance in the projection

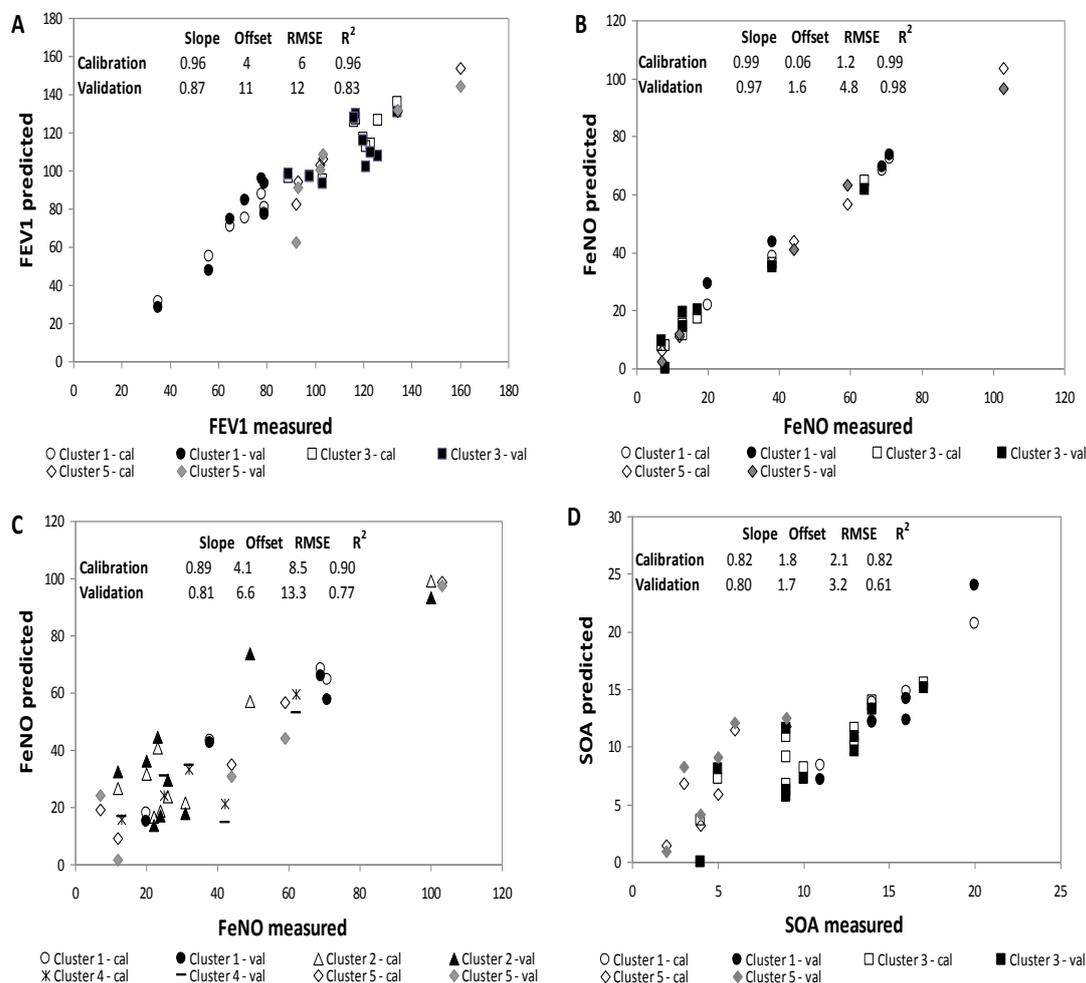


Figura 22 – Curvas previstas Vs curvas medidas e respectivos modelos estatísticos de PLS para a predição de parâmetros clínicos usando metabolitos urinários

A- modelo de predição de FEV₁ para os *clusters* 1, 3 e 5, usando 12 metabolitos; **B-** modelo de predição do FeNO para os *clusters* 1, 3 e 5, usando 11 metabolitos; **C-** modelo de predição do FeNO para os *clusters* 1, 2, 4 e 5, usando 11 metabolitos; **D-** modelo de predição do SOA para os *clusters* 1, 3 e 5 usando 9 metabolitos.

Os modelos de calibração PLS foram validados usando o procedimento *leave-one-out*. Os símbolos não preenchidos e os símbolos preenchidos foram usados para os dados de calibração e de validação, respectivamente. O conjunto óptimo de metabolitos foi seleccionado para cada modelo usando *Genetic Algorithm*.

III.

DISCUSSÃO GLOBAL
DOS RESULTADOS

III.

III.1 CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

O número final de doentes incluídos no estudo (42 doentes graves e 30 não graves) foi por nós aceite como suficiente, reconhecendo poder ser considerada uma amostra pequena quando comparada com a de outros estudos e tendo em conta o resultado do cálculo para a correcta dimensão da amostra. Porém, os resultados obtidos permitem-nos afirmar que a dimensão da amostra foi adequada. Acresce que, o número de casos foi superior ao valor empírico de 30 amostras, sugerido pelo Teorema do Limite Central¹⁵⁸.

A representatividade da amostra em relação à população portuguesa também nos parece relevante já que o centro hospitalar onde foi recrutada cobre uma área de 500 000 habitantes, incluindo zonas rurais e urbanas, acolhendo na Consulta Externa em causa, doentes referenciados de vários serviços, onde se incluem os de cuidados de saúde primários:

- Serviço de urgência dos HUC, do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra ou de outros hospitais distritais de Coimbra;
- Consulta Externa de Serviços de Pneumologia de outros hospitais do Distrito;
- Outros Serviços dos HUC;
- Cuidados de saúde primários do Distrito.

Escolha da classificação de gravidade da asma

Os estudos de larga escala dedicados ao entendimento da asma usam diferentes critérios de classificação de gravidade. Se o estudo SARP utiliza a definição ERS/ATS de 2000⁴, o estudo ENFUMOSA¹³⁵ classifica a gravidade da asma com base no nível regular de tratamento com CSI e o BioAIR classifica-a com base na história de exacerbações graves no último ano, apesar de uso de elevadas doses de CSI (≥ 1600 μg de budesonide ou equivalente) e cuidados médicos especializados¹⁷⁵.

Para esta investigação aplicámos duas escalas de gravidade: WHO⁵ e ATS/ERS (2000)⁴. A escala por nós utilizada na classificação dos doentes para a análise metabólica foi feita utilizando a escala WHO⁵, já extensamente abordada no capítulo da Introdução (I.7). Na discussão de resultados usámos também a escala ATS/ERS (2000)⁴, pela sua utilidade na comparação com dados de outros estudos.

Das várias rubricas apresentadas discutiremos os resultados obtidos, destacando como importantes para essa discussão os seguintes:

A) Caracterização da população global:

1. Em relação à história da doença, a ocorrência de pneumonia foi importante no grupo de doentes graves, bem como a idade de início tardio da doença, que se relacionaram com a maior gravidade. As comorbilidades mais frequentes foram rinite, atopia e excesso de peso, sendo o RGE poucas vezes reportado, devendo por isso ser mais investigado, particularmente em casos de asma difícil. A elevada prevalência do excesso de peso detectada, torna a sua abordagem uma prioridade também ao nível comunitário.
2. O não controlo da doença (por nós considerado quando ACT <20 ou CARATb <16 ou ALQ>10 ou FEV₁ pré-BD <80%) foi frequente, muito provavelmente pela concorrência de critérios que utilizámos. Se considerássemos apenas a pontuação de ACT, 56% dos doentes apresentava pontuação igual ou superior a 20. A baixa percentagem de controlo foi obtida, como era expectável, principalmente à custa dos doentes graves.
3. No grupo de doentes não graves houve alguma discordância na avaliação dos sintomas pelo ACT e pelo CARAT. Este último teste pode contribuir para aumentar o limiar de alerta para risco de eventos futuros, nomeadamente na abordagem de exacerbações em contexto de descontrolo de rinite.
4. Apesar do relativo controlo sintomático da população grave face à realidade da população asmática portuguesa, 81% do grupo manifestou, pelo menos, um critério da componente de risco onde se inclui a ocorrência de exacerbações (pelos critérios de gravidade da classificação WHO⁵), colocando-os numa situação de não controlo da doença.
5. Nos doentes graves, verificou-se idade de início de doença mais tardio, menor grau de atopia, maior prevalência de excesso de peso e de história de pneumonia, coexistência de outra doença obstrutiva e presença de distúrbio ansioso/depressivo. O questionário de gravidade SOA foi discriminativo, revelando diferença estatística nas pontuações obtidas para os dois grupos (grave Vs não grave).
6. Em relação às correlações estabelecidas entre os parâmetros avaliados, confirmámos as já bem estabelecidas correlações da função respiratória dos asmáticos (piores valores com idade mais avançada, mais anos de evolução da doença, maior gravidade, história de pneumonia e neutrofilia da expectoração), e identificámos outras importantes e com significado estatístico, como o género masculino e o questionário de gravidade SOA. A eosinofilia periférica também se correlacionou, de forma significativa, com a classificação de grave, com a pior qualidade de vida e com a idade de início de doença após os 12 anos (correlação que se manteve quando analisada para o sub-grupo de doentes graves).

B) Com base na análise da expectoração induzida:

1. Identificaram-se os diferentes fenótipos celulares, tendo sido o eosinofílico o mais prevalente, seguido do misto. No entanto, a proporção do fenótipo misto nos doentes graves foi superior à dos não graves.
2. Das várias células analisadas, os macrófagos mostraram diferença significativa entre grupos de gravidade, com valores mais baixos nos doentes graves.
3. Das correlações estabelecidas destacamos: a negativa da percentagem de neutrófilos com o FEV₁ basal; a positiva da percentagem de macrófagos com o FEV₁ basal; a positiva da percentagem de basófilos com a IgE sérica.

C) Em relação aos fenótipos clínicos estudados destacamos que:

1. Os doentes atópicos apresentaram idade de início de doença mais precoce, menor ocorrência de história de pneumonia e melhor qualidade de vida.
2. Os com asma de início após os 12 anos eram mais obesos, menos atópicos, com pior qualidade de vida e maior gravidade da doença.
3. Os que apresentaram HS a AINE's tinham maior prevalência de polipose nasal, pior qualidade de vida e menor inflamação brônquica eosinofílica.
4. Os com excesso de peso apresentaram menor controlo da doença, pior qualidade de vida e maior gravidade.
5. Os com obstrução persistente tinham menor controlo da doença e maior coexistência de outras doenças obstrutivas.

D) Dos resultados obtidos com os modelos de predição dos fenótipos clínicos destacamos como factores de risco (favoráveis) e de protecção (não favoráveis) para a ocorrência dos mesmos, os seguintes:

1. Para o fenótipo *atopia* foram de risco a idade de doença antes dos 12 anos, o melhor controlo da doença, a maior reversibilidade da obstrução brônquica e o menor grau de terapêutica utilizado. Como inovadores e desfavoráveis a essa ocorrência, apontamos a história de pneumonia no decurso da doença, a presença de outra doença obstrutiva, a classificação de grave pela WHO⁵.

2. Para o fenótipo de *asma com início após os 12 anos de idade* foram identificados como preditores de risco a idade avançada e menor número de anos de evolução da doença, maior gravidade da doença e maior uso de CSI. Os factores protectores foram a atopia e a rinite. Como mais-valia em relação ao já conhecido, o nosso estudo mostrou que a maior pontuação no questionário de gravidade SOA é factor de risco para o fenótipo em causa, assim como o género masculino e a obstrução persistente da via aérea.
 3. No fenótipo de *HS a AINE's*, identificou-se, à semelhança do já conhecido, a polipose nasal e a maior gravidade da doença como factores de risco, tendo o questionário SOA novamente papel na predição de gravidade.
 4. No modelo de estudo para o fenótipo *obesidade* não foram encontrados factores preditores relevantes.
 5. Para o fenótipo da *obstrução persistente da via aérea*, múltiplos factores de risco foram identificados: a idade mais avançada de início da doença, o género masculino, a maior intensidade de terapêutica, a pior função respiratória, a maior gravidade da doença (novamente com destaque para o papel do questionário SOA na sua avaliação) e a inflamação neutrofílica da via aérea, tendo o início da doença antes dos 12 anos mostrado papel protector para o fenótipo em causa.
 6. Em relação ao fenótipo *grave* destacamos como factor de risco inovador a identificação da percentagem de eosinofilia no sangue periférico.
- E) Não sendo conhecidos estudos portugueses que utilizem a **análise cluster dirigida à população asmática**, este estudo adquire, também aqui, carácter inovador entre nós:
1. A distribuição obtida fez-se em 5 grupos distintos, sendo evidente a sobreposição de alguns *clusters* (C1, C2, C5) com os identificados noutros estudos: o C1 correspondeu ao grupo de doentes com asma de início tardio, evoluída, com obstrução da via aérea e de maior gravidade; o C2, ao grupo de predomínio feminino, com asma de início tardio, obesidade marcada e menor grau de atopia; o C5, ao de asma ligeira, alérgica, eosinofílica e de início precoce. Os grupos C3 e C4 trazem alguma novidade neste tipo de análise: o C3 identificou um grupo de doentes com asma intermitente, cuja gravidade se prende com a ocorrência de exacerbações graves; o C4, correspondeu a um grupo com provável alteração de fenótipo inicial (eosinofílico) pela presença de obesidade.
 2. O uso da análise da expectoração induzida na distinção dos *clusters* pareceu-nos fundamentalmente importante na caracterização do *Cluster 1* (grupo grave com asma de início tardio, inflamação mista e elevação marcada de eosinófilos) e do

Cluster 2 e 4 (grupo obeso e maior prevalência do género feminino, inflamação de relativo predomínio neutrofilico).

F) À semelhança do que já tínhamos demonstrado relativamente à importância da **metabolómica urinária na previsão de exacerbações^{74,75}, também **demonstrámos a sua importância na gravidade da doença e na identificação de *clusters***:**

1. Em relação à gravidade da doença, obteve-se separação clara entre grupos de gravidade, consoante a faixa etária, identificando-se como responsáveis por essa separação um grupo de compostos relacionados com a peroxidação lipídica.
2. Na identificação de *clusters*, obteve-se separação clara dos grupos C1, C3 e C5, passíveis de serem organizados pela extensão da peroxidação lipídica (C1>C3>C5), com identificação dos compostos responsáveis por essa separação.
3. Os modelos de regressão PLS mostraram que os níveis de peroxidação lipídica patentes nos perfis metabolómicos urinários destes doentes podem prever o perfil da função respiratória (FEV₁), o tipo de inflamação Th2 (FeNO) e o grau de gravidade (SOA).
4. Ficou demonstrado que a extensão do *stress* oxidativo se relaciona com a gravidade da doença, existindo correlação com os parâmetros referidos. Portanto, endótipos obtidos pela metabolómica urinária mostraram que alguns *clusters* e características fenotípicas de gravidade da asma podem ser associados com metabolitos específicos da peroxidação lipídica.

III.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA COM ENFOQUE NOS DOENTES GRAVES, SUPOSTADA EM PARÂMETROS FUNCIONAIS RESPIRATÓRIOS E LABORATORIAIS IMUNO-INFLAMATÓRIOS

III.2.1 Características Demográficas e Clínicas (população total)

Neste estudo, o género feminino foi mais prevalente (78%), valor superior aos 57% encontrados no único estudo Português de prevalência da asma¹⁵, abrangendo população infantil e adulta com média de idades de 39 anos. Sendo conhecida a maior prevalência do género masculino em idades mais jovens, que passa a ser mais prevalente no género feminino em idade adulta, a discrepância pode dever-se à média de idades da nossa população (46 anos (17.7)), que apenas incluiu asmáticos com ≥ 18 anos de idade.

Relativamente à história da doença, 53% da população acusava início antes dos 12 anos de idade, com 23 anos (14.4) de evolução. Estes dados são consistentes com os do estudo GA²LEN¹⁴, dirigido a população entre os 15-49A de idade, de 15 países europeus, em que a

prevalência da asma mostrou ser maior em adultos jovens do que nos restantes grupos etários.

Comparando os asmáticos segundo a idade de início de doença (depois e antes dos 12 anos), o grau de grave dos que iniciaram tardiamente foi mais frequente (71% Vs 47%). Consistentemente, os valores de SOA foram piores (11.4 (3.91) Vs 9.3 (3.49), $p=0.02$) e o uso de CSI em altas doses e de ciclos de CSO maior (56% Vs 26 % e 68% Vs 39%, respectivamente). Quanto ao valor de FEV₁ (% do previsto) não se encontraram diferenças significativas mas, à semelhança do estudo SARP, foi maior a prevalência de doentes obstruídos (41% Vs 21%). Outros parâmetros foram avaliados, tendo-se notado maior prevalência de excesso de peso nos doentes com asma de início tardio (85% Vs 61%), que apresentaram pior controlo dos sintomas, sendo concordante com a conhecida associação entre pior controlo asmático e obesidade, que mostrou já ser independente da atopia¹⁷⁶ e da inflamação eosinofílica¹⁷⁷.

Em relação às comorbilidades apresentadas, a percentagem de doentes com RGE foi reportada em valor bastante inferior ao da literatura (outro estudo aponta para valores de 75%¹⁷⁸), admitindo-se que os nossos doentes podem não valorizar estes sintomas ou apresentar doença assintomática (Harding et al.¹⁷⁹ identificou RGE em 24% dos doentes graves, sem clínica de doença gástrica). Apesar do RGE ser implicado como factor de pior controlo da asma, a melhoria dos sintomas asmáticos com o tratamento da doença gástrica não é consistente na literatura¹⁷⁸.

Quanto ao excesso de peso, em meta-análise de 7 estudos prospectivos¹⁸⁰ tinha sido mostrada maior incidência de asma neste grupo (com OR 1.92; IC95%=1.43-2.59), não sendo surpreendente o valor reportado nos nossos doentes (72%), tanto mais que foi notória a prevalência do género feminino. De facto, a co-existência de excesso de peso e asma (mais evidente no sexo feminino), tem sido relacionada com pior controlo da doença, mesmo sob terapêutica apropriada^{181,182}.

A atopia foi reportada em 68% da população total e a rinite em 83%. Sendo conhecido que 75% dos adultos com asma tem rinite alérgica¹⁸³, estes valores não são surpreendentes.

A percentagem de 43% encontrada para o conjunto dos distúrbios depressivos e ansiosos não se afasta da conhecida (40% e 24%, respectivamente¹⁸⁴). Como é sabido, os asmáticos tendem a manifestar maior incidência destes distúrbios, podendo ser factor de grande impacto na asma, por mecanismo de *feedback* negativo, envolvendo componentes comportamentais e de adesão terapêutica.

Em relação ao controlo da doença, 56% apresentava pontuação de ACT \geq 20, percentagem sobreponível aos 53.5% do estudo europeu de prevalência da asma não-controlada, *European National Health and Wellness Survey*, que fez uso da escala ACT nessa avaliação¹⁸⁵. O valor obtido foi no entanto superior ao encontrado num estudo dirigido à população portuguesa, que englobou no inquérito 5551 doentes com idades superiores a 12 anos, e cuja percentagem de asmáticos com valor ACT \geq 20 foi de apenas 39%⁶.

Na avaliação da função respiratória, os valores médios de FEV₁ e de FEV₁/FVC basais da população (*Quadro XIV*) foram ligeiramente superiores aos encontrados no estudo ENFUMOSA, em que os valores médios de FEV₁ basal e de FEV₁/FVC foram normais para os doentes controlados (89% (18.1) e 90% (12.9), respectivamente), e estiveram no limiar da normalidade para os graves (72% (23.1) e 80% (16.6), respectivamente)¹³⁵.

Relativamente à história da doença, 50% da nossa amostra referia pelo menos uma exacerbação grave no último ano e 35% hospitalização. De acordo com a literatura⁶, os factores de risco que se têm vindo a associar ao internamento são: problemas com a terapêutica (como a ausência de plano escrito para tratamento de crise, o não cumprimento da terapêutica instituída, a ausência de medicação preventiva e ainda dificuldade no acesso a cuidados médicos diferenciados); os factores genéticos, demográficos e ambientais (como problemas psicossociais, meio socio-económico e cultural desfavorecido, sensibilização alérgica, tabagismo activo e/ou passivo, poluição atmosférica); e os relacionados com a evolução da doença (como a história de internamentos anteriores por asma, história de internamento no último ano, três ou mais recursos ao serviço de urgência por asma no último ano e gravidade da doença)⁶.

No nosso grupo de doentes a taxa de hospitalização foi maior no género feminino, naqueles que manifestavam pior controlo dos sintomas e história de exacerbações mais frequente no último ano, tendo maior grau de gravidade de doença, em concordância com a evidência actual. As comorbilidades que mais se destacaram neste sub-grupo foram o excesso de peso, a atopia, a exposição tabágica e o distúrbio ansioso-depressivo.

Relativamente ao tratamento utilizado pela totalidade da população e, tendo sido verificada a adesão terapêutica na inclusão dos doentes que completaram o estudo, verifica-se que 71% estava pelo menos no grau 4 da terapêutica GINA e 40% fazia CSI em altas doses. No estudo ENFUMOSA¹³⁵, a dose média de CSI utilizada no tratamento dos doentes controlados foi de 666 µg de beclometasosna ou equivalente e de 1,773 µg nos asmáticos graves e, no estudo SARP, 75% dos doentes que fazia tratamento com CSI, fazia-o em associação com LABA¹⁸⁶. Parece-nos, por isso, haver a este nível sobreposição da nossa abordagem terapêutica com a doutros estudos. Quanto ao uso de CSO de forma continuada, ela não foi utilizada, ao contrário do verificado no estudo SARP, em que 32% dos doentes graves o fazia. No entanto, 6% dos nossos doentes fazia tratamento biológico com omalizumabe (actualmente de primeira linha no grau 5 de tratamento, se adequado à situação clínica³). Alguns trabalhos têm sugerido orientação de terapêutica com CSs, consoante os valores de celularidade da expectoração, com um *cut-off* de 3% para os eosinófilos¹⁸⁷, já que a normalização de eosinofilia leva à redução da HRB, do recurso a cuidados de saúde e da necessidade de ciclos de CSO. Outros estudos verificaram que a elevada percentagem de neutrofilia na expectoração se associa a uma má resposta à CSI¹⁸⁸. Se atentarmos nos resultados da contagem diferencial de células na expectoração, obtidos num sub-grupo da nossa amostra, com média de idades de 48 anos (17.6), onde 65% dos doentes eram graves, encontrámos valor médio de 24% (27.6) de eosinófilos e de 52% (31.1) de neutrófilos, perto dos 60% considerados normais para esta faixa

etária¹⁶⁹. Na comparação entre grupos de gravidade, a percentagem de eosinófilos não variou de forma significativa mas a de neutrófilos foi fortemente superior no grupo de doentes graves, apontando para uma possível refractariedade à corticoterapia. No entanto, se à primeira vista e com base na eosinofilia da expectoração poderá parecer que, nos não graves, existe margem para aumentar a dose de CSI, ela não será clinicamente necessária para atingir o controlo sintomático dos doentes, que apresentaram um valor médio de ACT de 21 (3.4). Quanto à prevenção da componente risco, apesar de no estudo SARP 32% dos doentes graves fazerem CSO de forma crónica, na sua maioria reportavam história de hospitalização, 40% evento anterior com necessidade de cuidados intensivos e 12% com ocorrência desse evento no último ano. No nosso grupo de graves, sem uso crónico de CSO, a taxa de hospitalização no último ano foi de 42%, sem registo de eventos com necessidade de cuidados intensivos. Não podemos, no entanto, excluir que a taxa de exacerbações graves pudesse ser inferior, se houvesse maior uso de CSs.

Se atentarmos noutros biomarcadores como o FeNO e a eosinofilia periférica, constatamos que os nossos valores são inferiores aos dos outros estudos, nos diferentes grupos de gravidade. O valor médio do FeNO de 32 ppb (23.8) foi inferior ao encontrado no estudo SARP (45ppb (39) para os moderados e 40ppb (38) para os graves), e a eosinofilia no sangue (3.3% (3.3)), inferior à encontrada no estudo ENFUMOSA (4.1% (3.1) nos controlados e 4.4% (5.0) nos graves).

Em relação ao FeNO (apontado como marcador favorável à inflamação brônquica eosinofílica), não encontramos correlação do seu valor com o de eosinofilia na expectoração, sendo a evidência actual controversa em relação a este aspecto, particularmente na asma grave. Podendo ser útil na prevenção das exacerbações^{189, 190}, não está preconizado o seu uso para titular a corticoterapia (segundo as últimas normas da ERS/ATS¹²²). O facto de os nossos valores para os biomarcadores da inflamação eosinofílica terem sido notoriamente inferiores aos dos outros estudos em que foi feito uso de CSO, aponta-nos para a correcta abordagem terapêutica.

O uso de outros fármacos de controlo foi amplamente feito, provavelmente como alternativa à recorrência à CSs, tendo-se incluído antileucotrienos (em 54%), anticolinérgicos de longa acção (em 7%), teofilinas (em 10%) e omalizumabe (em 6%).

De notar ainda que a imunoterapia específica foi utilizada em 18% dos doentes, sem diferença estatística nos grupos de gravidade.

Na análise por sexos, não foram verificadas diferenças significativas em relação aos anos de evolução, à história de pneumonia no decurso da mesma, e às hospitalizações e exacerbações graves no último ano.

Quanto às comorbilidades, o facto das percentagens de atopia, polipose nasal, exposição tabágica activa ou passiva e co-existência de outra doença obstrutiva que não a asma, reportadas para o sexo masculino, serem superiores às encontradas no sexo feminino, pode justificar a maior gravidade da doença encontrada nos homens e o pior valor de FEV₁ basal (p=0.028). Já noutros estudos, o sexo masculino tinha sido identificado como factor de risco associado a limitação do fluxo aéreo na asma de difícil tratamento¹⁹².

Contudo, as pontuações de controlo sintomático pelo ACT não diferiram significativamente entre géneros. Ao contrário, o de impacto na qualidade de vida, mostrou ser pior para o género feminino (não atingindo significado estatístico), podendo relacionar-se com a maior prevalência do distúrbio ansioso/depressivo nas mulheres.

Nos estudos BioAIR e SARP (dirigidos ao estudo da asma grave) não foi encontrada diferença significativa entre sexos para a gravidade da doença. No entanto, no estudo ENFUMOSA, foi encontrada maior prevalência de asma grave no sexo feminino, particularmente quando na presença de obesidade. Na nossa população, a sub-análise da gravidade da doença por género e categoria de IMC não mostrou diferenças significativas.

Quanto ao tratamento com CSI em altas doses foi superior no género masculino (56% Vs 36%), consistente com o seu maior grau de gravidade.

Em resumo:

Na população do estudo prevaleceu o género feminino; os doentes com asma de início tardio apresentaram maior gravidade da doença, maior grau de obesidade e pior controlo sintomático, sendo estes dados consistentes com os da literatura. Em relação às comorbilidades mais frequentes, a atopia, a rinite, o excesso de peso e o distúrbio ansioso-depressivo, foram semelhantes aquelas encontradas na literatura actual.

A história de hospitalizações foi mais frequente no género feminino, nos doentes com asma de início tardio e pior controlo da doença, apesar do elevado uso de CSI em altas doses.

O grau de terapêutica inalatória crónica não se afastou do utilizado em outros estudos mas o uso de CSO foi nitidamente inferior. Apesar disso, os marcadores de inflamação eosinofílica mostraram valores inferiores aos dos outros estudos e a ocorrência de exacerbações graves não foi superior. Esta é uma questão para reflexão, a que mesmo as últimas normas de tratamento para a asma grave (ERS/ATS¹²²) não conseguem responder.

III.2.2 Classificação de gravidade

Como justificado na rubrica da metodologia, escolhemos para classificar a gravidade dos doentes os critérios da WHO⁵, tendo sido documentada a boa concordância com a classificação ATS⁴

Considerando a classificação escolhida, alguns doentes preenchem mais do que um dos critérios necessários para adquirir o grau de grave (*Quadro XVI*).

Pelas NAEPP *guidelines*¹⁵⁹, os 42 doentes considerados graves apresentaram doença não controlada. Nestas normas incluem-se as componentes controlo (avaliação de sintomas e função respiratória) e risco (história de pelo menos uma hospitalização no último ano; uso de altas doses de CSI ou CSO crónico ou omalizumabe e recurso a 2 ou mais ciclos de CSO por ano para controlo de exacerbação).

Em relação à componente controlo, avaliada simultaneamente pela escala ACT e pela presença de obstrução da via aérea, constatámos que o valor médio de ACT do grupo grave (18 (5.69)),

foi sobreponível ao encontrado na população asmática portuguesa (de 17.2) por outro estudo⁶ que considerava em conjunto doentes graves e não graves. Além disso, no nosso grupo de doentes graves, apenas 50% apresentava ACT <20 (contra os 61% da população portuguesa asmática) e 24% tinha ACT > 20, apesar de FEV₁ <80%. Quanto ao segundo critério da componente controlo, apresentaram obstrução da via aérea 52% dos doentes, com valor médio de FEV₁ basal de 65% (11.6), percentagem inferior à do estudo TENOR¹³⁶, em que o valor médio da população total adulta (que incluía doentes graves e não graves) era de 74%, e superior à encontrada no estudo SARP⁹⁰, em que 80% dos doentes graves apresentavam FEV₁ <80%.

Apesar do relativo controlo sintomático da população grave, face à realidade da população asmática portuguesa, 81% do grupo manifestou, pelo menos, um critério da componente de risco, colocando-os numa situação de não controlo da doença. Destacamos a percentagem de exacerbações graves, com 40% de doentes com necessidade de pelo menos 2 ciclos de CSO no último ano, apesar de tudo inferior à relatada no estudo SARP (em que 54% necessitou de pelo menos 3 ciclos de CSO no último ano). Quanto à ocorrência de hospitalizações, que ocorreu em 43% dos doentes, não se afastou da percentagem encontrada no mesmo estudo para recurso ao SU por asma nos asmáticos graves (40%)¹⁸⁶.

A análise destes dados pode apontar para o uso menos atempado da corticoterapia, com consequente instalação de exacerbações e com necessidade de internamento. Vários condicionalismos podem concorrer para esta situação, nomeadamente as características socio-económicas da população, tradicionalmente educada para a dependência médico/doente e à “aversão” pela toma de CSO, aliada à possível menor acessibilidade aos cuidados de saúde primários por alguns doentes, em tempo útil. Mais importante, é a falta de padronização de biomarcadores que possam orientar a titulação da corticoterapia na asma grave. Vários candidatos são a contagem de eosinófilos na expectoração¹⁸⁷, o FeNO¹⁹³ e a percentagem de eosinófilos no sangue periférico. O uso de escalas de controlo de sintomas e a história de exacerbação grave são também ferramentas a ter em conta (independentemente da idade, e apesar da terapêutica de controlo, os doentes com asma difícil demonstram elevadas taxas de recurso a cuidados de saúde, sendo a história de exacerbação recente o preditor mais forte de exacerbações futuras¹⁹⁴).

III.2.3 Características Demográficas e Clínicas (considerando o grupo de gravidade)

Para esta discussão, é de particular interesse o conhecimento dos estudos ENFUMOSA¹³⁵, TENOR¹³⁶ e SARP⁹⁰, já apresentados na Introdução.

No nosso estudo, na comparação entre grupos de gravidade, a tendência para idade superior não foi surpreendente, já que está associada a factor de risco para gravidade da doença, como já descrito no estudo SARP⁹⁰. Relativamente ao género, não foram encontradas diferenças significativas na sua distribuição, apesar de se manter a prevalência do género feminino (como na população global), sendo menos notória no grupo dos graves. O mesmo não se passou no estudo ENFUMOSA¹³⁵ onde, nos doentes graves, houve prevalência de 4/1 do género

feminino. Por sua vez, no estudo SARP⁹⁰, o género feminino foi factor de risco para asma grave apenas no fenótipo da asma com início na idade adulta e relacionada com a obesidade.

O facto das percentagens reportadas para o sexo masculino, relativas à prevalência de história de atopia, polipose nasal, exposição tabágica activa ou passiva, e co-existência de outra doença obstrutiva que não a asma terem sido superiores às encontradas no sexo feminino (81% Vs 66%; 19% Vs 9%, 44% Vs 30 %, e 25 Vs 12%, respectivamente), pode justificar a maior gravidade da doença verificada nos homens, no nosso estudo.

Quanto à elevada presença do distúrbio de ansiedade/depressão, (embora não tenha diferido significativamente do grupo não grave) sabemos de outros estudos¹⁹⁵ que a sua co-existência com asma aumenta o risco de recorrer ao SU (OR 5.3, IC95%=1.4–19.6), ter exacerbações (OR 12.4, IC95%=1.5–101.7) e hospitalizações (OR 4.8, IC95%= 1.1–21.0), quando comparado com asmáticos que não apresentam esse distúrbio. Portanto, devemos aumentar o nosso limiar de alerta neste grupo de doentes.

Em relação à história da doença, comparando os nossos asmáticos de início precoce Vs tardio, a gravidade daqueles com início tardio foi maior (com 71% dos doentes classificados como graves Vs os 47% nos de início precoce), sendo os valores de SOA significativamente superiores ($p=0.02$). Já nos estudos BioAIR⁹³ e SARP⁹⁰, o grupo de doentes graves tinha início mais tardio da doença. Com base nesse parâmetro, foram distinguidos no estudo SARP dois fenótipos graves: o de asma grave de início tardio, que se caracterizava por maior prevalência de doença sinopulmonar e FEV₁ basal mais baixo e o fenótipo de asma grave, de início precoce, com maior grau de atopia, mais sintomas, maior eosinofilia na expectoração e maior recurso a CSO.

Relativamente ao valor de FEV₁ (% do previsto) não encontramos diferenças significativas mas, à semelhança do estudo SARP, foi maior a prevalência de doentes obstruídos (41% Vs 21%).

Relativamente à percentagem de hospitalizações no último ano, ela não diferiu significativamente entre os grupos de gravidade. No estudo SARP, tinha-se cifrado em 30% nos adultos asmáticos graves, número inferior ao do nosso grupo (43%). Porém, 12% tinha tido internamento em UCI, o que não se passou com nenhum dos nossos doentes. Tal leva-nos a acreditar que uma das razões para esta discrepância, possa ser a diferença de critérios para internamento (no nosso caso, a decisão de internamento hospitalar poderá suceder para doentes com exacerbações menos graves, impedindo-se a progressão da gravidade). Outra razão pode prender-se com o uso de CSO como terapêutica crónica utilizada pelos doentes no estudo SARP, já que 32% dos doentes fazia tratamento continuado com CSO, o que não aconteceu no nosso estudo (apesar de 10% dos graves fazer tratamento biológico com omalizumabe). O uso alargado de CSO verificado no estudo SARP, e que não impediu a elevada taxa de internamentos, pode relacionar-se não só com a gravidade da doença mas também com a menor adesão à terapêutica inalatória já que os dados do estudo foram colhidos em vários centros, sem aferição da adesão à terapêutica. Contudo, não podemos excluir que isto possa significar um menor grau de gravidade do nosso grupo grave, em comparação com o estudo SARP, podendo as diferentes classificações utilizadas (WHO⁵ e ATS⁴) ter influência, visto avaliarem a doença com abrangência e dimensões diferentes.

Quanto às comorbilidades apresentadas, o excesso de peso presente em 81% dos doentes graves, com IMC médio de 29 Kg/m² (4.9), não se afasta do valor dum estudo multicêntrico realizado no RU em doentes com asma grave (com IMC médio 30 Kg/m²)¹⁹⁶, sendo ligeiramente superior ao reportado no estudo ENFUMOSA (IMC 27 Kg/m² nos doentes graves).

Quanto à atopia, apesar de resultados dos estudos ENFUMOSA¹³⁵ e TENOR¹³⁶ apontarem para a asma do adulto ser significativamente menos atópica, o fenótipo dos asmáticos alérgicos graves e de início precoce, parece contar para 40% do total dos doentes graves¹²³. No nosso grupo grave, essa percentagem foi de 60%, podendo este aumento justificar-se pelo prolongado período de polinização que se verifica no nosso país e pela conhecida elevada prevalência de sensibilização alérgica a ácaros (alergeno perannual).

A maior prevalência de história de pneumonia e da co-existência de outra doença obstrutiva para além da asma (com diferença significativa entre grupos de gravidade, p=0.021), é coerente com os dados da literatura. No estudo SARP, 2/3 dos doentes reportaram história de pneumonia sendo, com excepção do valor basal de FEV₁ (%previsto), o maior factor predictor de gravidade.

A história de qualquer exposição tabágica também já mostrou associar-se a pior prognóstico nos doentes asmáticos e a maior risco de hospitalização, por mecanismos relacionados com a sensibilidade à corticoterapia e à pior função pulmonar. As percentagens encontradas no nosso estudo para os graves, de 13% de fumadores e de 70% sem história de exposição tabágica prévia, não se afasta da reportada pelo estudo do RU¹⁹⁶ em que, sendo o tabagismo activo pouco frequente, a história anterior de tabagismo registava-se em cerca de 30% dos doentes graves (semelhante ao estudo TENOR¹⁴¹ em que 4.3% dos adultos com asma de difícil controlo eram fumadores, 32% ex-fumadores e 63.7% não fumadores).

Em relação ao controlo da doença, à qualidade de vida e ao risco futuro, encontraram-se naturalmente diferenças significativas entre grupos de gravidade, tendo em conta as pontuações dos vários questionários utilizados.

Se nos doentes graves a pontuação ACT e CARAT foi inferior aos *cut-offs* para controlo da doença, no grupo de doentes não graves, apesar do valor de ACT apontar para o seu controlo, (estando acima dos 20 pontos), a avaliação dos sintomas pelo CARAT foi indicativo de algum descontrolo, sobretudo na avaliação dos sintomas da via aérea superior. Apesar de não termos dados que correlacionam os questionários ACT e CARAT, o segundo mostrou boa correlação com o ACQ5 e a avaliação do controlo feita pelo médico¹⁹⁷. Tal significa que o CARAT pode constituir uma mais-valia na avaliação clínica, com aumento do limiar de alerta para risco de eventos futuros, principalmente na abordagem precoce da exacerbação com terapêutica dirigida à rinosinusite.

Quanto ao questionário utilizado para avaliar a gravidade da asma (SOA), os valores obtidos mostraram diferença significativa entre os grupos (p<0.001). O SOA foi desenvolvido para identificar doentes com asma moderada-grave em risco para *outcomes* adversos, sem

necessidade de avaliar a função respiratória, tendo mostrado superioridade nessa avaliação em relação às escalas ACT, WPAI-A (*Work productivity and activity impairment-asthma*) e ao valor de FEV₁ basal (%previsto). No nosso estudo, a percentagem de doentes em risco para eventos futuros, mostrou ser também superior nos doentes graves, com valor significativo ($p < 0.001$). Consistentemente, o grupo de doentes graves fazia maior uso de CSI em altas doses, de montelucaste e de tiotrópio.

À semelhança do estudo ENFUMOSA¹³⁵, a função respiratória avaliada pelos diversos parâmetros utilizados mostrou ser significativamente pior nos graves, com maior prevalência de obstrução brônquica e maior labilidade brônquica. Nesse estudo, os doentes com asma grave apresentaram valores percentuais de FEV₁, FEV₁/FVC e FEV₂₅₋₇₅(% do previsto) menores que os não graves (respectivamente de 82% (24.5) Vs 109% (19.9), $p < 0.001$; 69% (16.4) Vs 85% (12.2), $p < 0.001$; 37% (25.2) Vs 80% (30.2), $p < 0.001$). Alguns estudos têm apontado o encerramento precoce da via aérea e hiperinsuflação pulmonar como factores de risco para asma de difícil controlo¹³⁰. O aumento do VR e o atingimento das pequenas vias aéreas verificados, apontam para a necessidade de avaliação completa da função respiratória, particularmente nos doentes graves, já que mesmo na presença de altas doses de CSI podem existir alterações estruturais com conseqüente obstrução persistente da via aérea.

Na comparação entre grupos, houve ainda diferença significativa quanto à presença de obstrução persistente (definida por FEV₁/FVC pós BD $\leq 70\%$), $p < 0.001$, apontando para a existência das referidas alterações estruturais.

Não obstante, a labilidade brônquica mostrou forte tendência para ser superior nos doentes graves ($p = 0.05$), consistente com os dados do estudo SARP⁹⁰ onde apenas 9% dos asmáticos graves com FEV₁ $< 60\%$ mostraram irreversibilidade ao salbutamol.

Relativamente aos biomarcadores, a tendência para o valor mais elevado do FeNO no grupo dos não graves não nos surpreende, dada a sobreposição do aumento do valor de FeNO na asma leve a moderada relatada na literatura¹⁸⁶. No entanto, devemos ter presente que valores de FeNO > 35 ppb, parecem associar-se ao aumento da hipereactividade brônquica, hiperinsuflação, visitas ao SU, atopia e eosinofilia na expectoração¹⁹⁸. De facto, no nosso estudo, o valor de FeNO relacionou-se com a presença de obstrução persistente apenas no grupo dos graves ($r = 0.45$, $p < 0.005$, *Quadro XVIII*). A ausência de indicação para o uso deste biomarcador na titulação da terapêutica¹⁹¹, prende-se exactamente com a dificuldade de encontrar *cut-offs* óptimos para tal.

O facto de termos encontrado maior grau de eosinofilia periférica no grupo de doentes graves, é consistente com a elevada prevalência de atopia registada e conseqüente padrão Th2. Não obstante, nos doentes submetidos a análise da expectoração (37, sendo 65% graves), não se notou diferença na percentagem de eosinófilos entre grupos de gravidade. Por sua vez, a percentagem de neutrófilos mostrou-se tendencialmente superior nos doentes graves (58.5% Vs 40%). Vários estudos têm apontado para a combinação da inflamação eosinofílica e neutrofílica nos fenótipos mais graves, relacionando-a com mais frequentes exacerbações e maior uso de CSO¹³⁷.

Em resumo:

Consistente com outros dados da literatura, o nosso grupo de doentes graves teve, face aos não graves, idade superior, maior IMC, maior história de pneumonia, maior prevalência de outra doença obstrutiva, menor atopia, pior controlo da doença e pior função respiratória, mas maior labilidade brônquica. Quanto aos biomarcadores avaliados não se encontraram diferenças significativas para o FeNO e IgEtotal mas a neutrofilia na expectoração foi tendencialmente superior.

III.2.4 Correlações entre parâmetros avaliados

Como já referido na apresentação de resultados, as correlações encontradas entre diferentes parâmetros avaliados (demográficos; relativos à evolução da doença, ao controlo da doença e qualidade de vida; ao grau de terapêutica; função respiratória; biomarcadores e grau de gravidade), podem ajudar na melhor compreensão das manifestações da doença na nossa população.

III.2.4.1 Correlações entre parâmetros avaliados na população total

No *Quadro XVII* apresentaram-se os valores de correlação que mostraram significado estatístico.

Das correlações que destacámos na rubrica dos resultados:

A função respiratória basal mostrou-se pior para os doentes mais velhos e com mais anos de evolução da doença, com correlações de intensidade moderada, mas também para os mais graves, pior controlados. O estudo SARP tinha já identificado a diminuição do FEV₁ e a idade como factores de risco para gravidade da doença mas outros estudos identificaram não só a diminuição do FEV₁, mas também a obstrução das pequenas vias como factores de risco para asma de difícil controlo¹³⁰. Quer a duração da doença, quer a sua gravidade, têm vindo a ser associadas à obstrução persistente¹⁹⁹, sendo consistente com a forte intensidade da correlação negativa de FEV₁ com a obstrução persistente por nós identificada (valores menores de FEV₁ na presença dessa obstrução). O facto do VR basal (% do previsto) se ter correlacionado positivamente com a presença de obstrução persistente, reforça a importância do envolvimento das pequenas vias aéreas nesta patologia, devendo fazer-se uma avaliação alargada da função respiratória, particularmente nos doentes de maior gravidade, nos quais a avaliação apenas por espirometria pode ser insuficiente.

Quando analisamos as correlações estabelecidas para o valor basal de FEV₁ (% previsto), ressalta a correlação com o género masculino que, embora de fraca intensidade, foi significativa. O sexo masculino tinha já sido identificado por outros como factor de risco para asma difícil¹⁹². Para além disso, o facto de no nosso estudo a exposição tabágica e a presença de outra doença obstrutiva ter sido mais prevalente entre os homens, reforça os motivos para essa relação. Não menos importante, foi a correlação estabelecida com a história de

pneumonia no decurso da doença, factor já identificado no estudo SARP como dos principais preditores de gravidade da asma.

Importante, e com tradução na prática clínica diária, foi a correlação encontrada entre FEV₁/FVC e a pontuação no questionário de gravidade SOA (quanto menores os valores basais, maior pontuação no questionário). Este foi apenas validado para população com asma moderada a grave⁹⁴ pelo que, no nosso grupo, que também incluiu doentes com asma leve, a identificação desta correlação torna-se significativa.

Relativamente à correlação da Δ FEV₁ após BD com a gravidade da doença, a mesma não foi verificada no estudo SARP¹⁸⁶ que, no entanto, a correlacionou com o nível de obstrução basal ($r = 0.37$; $P < .0001$), e que de alguma forma corrobora os nossos resultados.

Relativamente aos biomarcadores analisados (FeNO, eosinófilos no sangue, IgE total sérica, percentagem de eosinófilos e neutrófilos na expectoração), destacamos a correlação do FeNO com os anos de evolução da doença e com os sintomas de rinite. O estudo SARP tinha já estabelecido a correlação do FeNO com a idade de início da doença. Num estudo muito recente²⁰⁰, o FeNO correlacionou-se também com a percentagem de eosinófilos na expectoração e, num outro, com a IgE sérica²⁰¹.

No nosso estudo, a percentagem de eosinófilos no sangue periférico correlacionou-se significativamente com vários parâmetros avaliados, sendo superior nos doentes mais graves, nos que faziam doses de CSI > 750 µg de PF ou equivalente, ou naqueles com idade de início da doença após os 12 anos, aumentando com a pior pontuação para a qualidade de vida e para os sintomas de rinite. Várias revisões têm focado o fenótipo alérgico e não alérgico da asma, apesar de apenas 50% das asma ser atribuíveis a inflamação eosinofílica²⁰².

Noutro estudo dirigido aos diferentes fenótipos inflamatórios da asma²⁰³, os doentes com padrão eosinofílico elevado mostraram valores totais de IgE superiores, com menor valor de FEV₁ e maior HRB do que aqueles com padrão eosinofílico baixo, para além de reportarem mais sintomas, mesmo após ajuste para a dose de CSI, o que suporta as correlações por nós encontradas.

As correlações que identificámos para a IgE total, com o género masculino, com a atopia, e com a pior qualidade de vida corroboram as restantes. Assim, apesar de na sub-análise do estudo SARP acima referida²⁰⁰, a contagem de eosinófilos, os níveis de FeNO ou os de IgE, sozinhos ou em combinação, não terem sensibilidade ou especificidade suficiente para servirem como biomarcadores de maior gravidade da asma ou de maior uso de cuidados de saúde, não podemos ignorar as correlações por nós e por outros encontradas, e que apontam para uma relação da inflamação eosinofílica com maior repercussão da doença asmática.

Finalmente, em relação aos biomarcadores da expectoração induzida, avaliada num sub-grupo de doentes, verificámos que os de início tardio de asma tiveram valores superiores de eosinófilos e de neutrófilos na expectoração. A maior percentagem de eosinófilos nesse grupo pode relacionar-se com a gravidade da doença, já que esse foi um factor preditor de

gravidade, como se verá na discussão dos modelos de predição de fenótipos, em rubrica posterior.

Por outro lado, as correlações significativas e de moderada intensidade encontradas para a percentagem de neutrófilos (negativa com o valor FEV₁ basal, de eosinófilos no sangue e na expectoração, e positiva com história de exacerbação grave no último ano) não são de menosprezar. Novamente, na sub-análise do estudo SARP, apesar de a idade ou o valor de FEV₁ basal, sozinho ou em combinação, não terem sido suficientes para predizer a percentagem de neutrófilos na expectoração, a correlação com a idade ($r=0.40$, $p<.001$) e a negativa com o FEV₁ basal ($r=0.16$, $p<0.013$), foi também por eles encontrada.

A inflamação neutrofílica é associada em vários estudos a maior gravidade da asma, menor FEV₁ e redução da reversibilidade brônquica^{204, 123}, podendo estar relacionada com mecanismos inflamatórios induzidos pela IL-17.

III.2.4.2 Correlações entre parâmetros avaliados na população grave

A totalidade das correlações estabelecidas no grupo de doentes graves está descrita no *Quadro XVIII* dos resultados, onde se apresentam os valores de correlação com significado estatístico.

Várias das correlações encontradas na população total mantiveram-se na população grave, mas estabeleceram-se outras e diferentes.

Quanto à função respiratória de base, e à semelhança do sucedido na população total, mas de forma mais marcada, mostrou-se pior nos doentes mais velhos e com mais anos de evolução da doença. Como discutido anteriormente, o FEV₁ foi identificado como o preditor de gravidade de maior importância. De facto, e como discutiremos mais à frente (modelos de predição dos fenótipos, III.4.4), a nossa população de obesos mostrou para a função basal melhores valores médios em relação à população total. Apesar de alguns estudos reportarem aumento da resistência da via aérea nos obesos, por mecanismo mal esclarecido, a obesidade não condiciona obstrução da via aérea donde o aumento dos sintomas asmáticos e da gravidade nos obesos, possa prender-se com outros factores como a produção de adipocinas²⁰⁵.

As restantes correlações do FEV₁ basal (negativas com a obstrução persistente, a reversibilidade brônquica, a idade e os anos de evolução da doença) mantiveram-se neste grupo grave.

A importância da correlação negativa do FEV₁ com o género masculino, encontrada na amostra global, não se manteve neste subgrupo, o que pode ser explicado pela existência de dois grupos predominantes de doentes graves na nossa população, identificados mais à frente como *Clusters 1 e 2*, sendo o primeiro constituído preferencialmente por homens com pior função respiratória e o segundo por mulheres obesas, com mau controlo da doença mas menor rebate na função respiratória.

A labilidade brônquica, medida pelo Δ FEV₁ pós-BD, manteve a correlação que se tinha estabelecido na população total com os anos de evolução da doença e, encontrou-se como nova, a correlação inversa com o IMC, significando que os doentes mais obesos têm menor

resposta à BD. Já na população total se tinha estabelecido a correlação da ΔFEV_1 com a gravidade da doença.

Novamente, o significado estatístico da correlação encontrada na população total entre FEV_1/FVC e a pontuação no questionário de gravidade SOA não se manteve no grupo dos graves. Podendo ser surpreendente, já que esse instrumento foi desenhado tendo particular atenção os doentes graves, pode explicar-se pela maior homogeneidade de piores valores de SOA neste grupo, diluindo o efeito de linearidade da correlação, já que a diferença de médias dos valores de SOA entre doentes graves e não graves foi significativa ($p < 0.001$), e pior nos graves.

Relativamente às correlações estabelecidas para os biomarcadores, as encontradas neste grupo de doentes graves foram importantes, com destaque para a do FeNO com a obstrução persistente, sugerindo que a inflamação eosinofílica se correlaciona com a remodelação da via aérea. Nos doentes graves, a elevação do FeNO foi já correlacionada com maior obstrução da via aérea, eosinofilia e utilização de cuidados de saúde urgentes¹⁹⁸. Para além disso, o FeNO tem mostrado melhor correlação com os eosinófilos na asma grave do que na não grave suportando a presença da inflamação Th2, mas também a relação da inflamação eosinofílica com o *stress* oxidativo como evidenciado por alguns estudos^{206, 207}.

III.2.5 Importância clínica dos resultados e limitações

Da discussão dos resultados apresentada em III.2.1, destacamos como clinicamente relevante:

- A boa representatividade da nossa amostra, já que os resultados obtidos se sobrepõem em larga escala aos de outros estudos.
- A prevalência do género feminino na população total, que nos deve fazer alertar para a problemática da asma neste grupo, muitas vezes estigmatizado pela coexistência da síndrome ansiedade-depressão.
- Nos doentes com asma de início tardio, em sobreposição com outros estudos, verificámos menor grau de atopia, maior gravidade e menor controlo da doença, sendo maior a prevalência de obstrução da via aérea. Estes doentes faziam maior uso de CSI em altas doses e tiveram maior necessidade de recurso a ciclos de CSO. O conjunto destes factores deve-nos fazer equacionar, em casos seleccionados e após ponderar e integrar os parâmetros do controlo da doença, do risco de eventos futuros e dos dados dos biomarcadores disponíveis, a necessidade de instituir corticoterapia oral de forma mais precoce e eventualmente por períodos mais prolongados.
- As comorbilidades mais importantes (rinite, atopia, excesso de peso) estiveram também em concordância com a literatura. A epidemia da obesidade é uma preocupação transversal a todas as áreas da medicina e na abordagem terapêutica da asma não deve ser desvalorizada, já que, o controlo do peso, pode melhorar a sintomatologia dos doentes.

Apesar da aparente baixa prevalência de RGE no nosso grupo, a sua presença deve ser pesquisada, mesmo em doentes assintomáticos que revelem difícil controlo da doença, considerando a frequente coexistência com a obesidade.

- Em concordância com a evidência actual, no nosso grupo de doentes a taxa de hospitalização foi maior nos doentes femininos, naqueles que manifestavam pior controlo dos sintomas e história de exacerbações no último ano, tendo maior grau de gravidade de doença. As comorbilidades que mais se destacaram neste sub-grupo foram o excesso de peso, a atopia, a exposição tabágica e o distúrbio ansioso-depressivo.
- Em relação ao grau de terapêutica crónica, o não uso de CSO de forma continuada não aumentou a ocorrência de exacerbações graves em relação a outros estudos onde faziam uso dessa opção terapêutica. Como referido na discussão, se por um lado o aumento dos marcadores de inflamação eosinofílica na expectoração indicavam margem terapêutica para a sua aplicação, o bom controlo e função respiratória verificados na população (e superior aos dados conhecidos noutros estudos) apontaram em sentido inverso. Por outro lado, a inflamação da via aérea dos doentes graves foi mista, o que pode indicar refractariedade à corticoterapia, devendo preferir-se associar outras alternativas terapêuticas.
- Na análise por género, a maior prevalência de comorbilidades como a polipose nasal, exposição tabágica e co-existência de outra doença obstrutiva, no sexo masculino, poderá justificar a maior gravidade verificada no grupo dos homens.
- Não havendo *gold standard* para a classificação da gravidade da asma, e fazendo os diversos estudos de larga escala uso de diferentes classificações, a escolha da classificação WHO⁵ prendeu-se com o facto de incluir três componentes que se interligam e nos parecem fundamentais na abordagem da asma grave. São elas a gravidade da doença, o seu controlo e a resposta à terapêutica.

Os dados discutidos tornam imperioso fazer: 1) controlo sintomático dos doentes, com enfoque na educação para o uso da corticoterapia de forma adequada e rigorosa; 2) avaliação alargada da função respiratória com prova de broncodilatação e determinação do volume residual; 3) melhor caracterização e monitorização da evolução sintomática, para direccionar a prevenção de exacerbações graves, nomeadamente com uso de biomarcadores inovadores a ganhar lugar.

Na análise por grau de gravidade, verificou-se idade de início de doença mais tardio, havendo neste sub-grupo (fenótipo de doentes graves com asma de início tardio) sobreposição com o fenótipo descrito por Moore et al.¹²³, no menor grau de atopia.

Os doentes graves revelaram, na sua globalidade, maior prevalência de excesso de peso, atopia, história de pneumonia, co-existência de outra doença obstrutiva e presença de distúrbio ansioso/depressivo.

O questionário de gravidade SOA revelou diferença estatística nas pontuações obtidas para os diferentes grupos de gravidade, podendo ser uma ferramenta útil na nossa rotina de consulta. Igualmente, a avaliação alargada da função respiratória, particularmente dos doentes graves, pode adicionar informações importantes na caracterização dos doentes.

Os dados obtidos com o estudo das correlações entre os parâmetros avaliados vieram adicionar informação ao conhecimento actual, relativamente às já bem estabelecidas correlações entre a pior função respiratória dos asmáticos e a maior idade, mais anos de

evolução da doença, maior gravidade e história de pneumonia. A estas, juntámos a correlação com o género masculino e com o questionário de gravidade SOA. Na prática clínica reforça o acima mencionado, relativamente à necessidade do uso regular do questionário SOA, de fácil aplicabilidade e com pouca necessidade de recursos, por não implicar realização de estudo funcional respiratório.

Também importantes foram os achados da correlação da eosinofilia periférica com a gravidade da doença, o seu início tardio e a pior qualidade de vida e ainda a dos neutrófilos na expectoração com a história de pneumonia. Estes achados podem ajudar a melhor compreender o papel do tipo de resposta imunitária na asma.

Um dos vieses que pode ser apontado na classificação da nossa população, facto transversal a muitos outros estudos referenciados, é o da falta de controlo na adesão terapêutica. O facto de este problema ter sido equacionado desde o processo de selecção dos doentes (feito sempre pelo mesmo investigador), deverá ter minimizado este efeito, estando convictos que a sua interferência nos resultados foi minimizada. No entanto, não foi avaliada de forma objectiva a adesão à corticoterapia, por exemplo com medição sérica dos níveis de cortisol.

Outro viés possível refere-se à capacidade de memória dos nossos doentes já que, nalguns questionários, a solicitação de memória correspondeu a um ano e, na recolha de informação, tiveram de se reportar até ao início da doença. Exceptuando os questionários estandardizados (ACT, CARAT, ALQ, SOA) que foram preenchidos pelos doentes, todos os outros dados foram colhidos pelo investigador principal o que, como é sabido, permite maior acuidade dos resultados, com diminuição do efeito deste problema.

Outra possível limitação deste estudo é o facto da classificação utilizada para estabelecer a gravidade incluir, como critério, o nível de terapêutica utilizado para controlo dos doentes. Tal pode levar à inclusão de indivíduos com menor gravidade intrínseca da doença onde o efeito da má adesão pode ser superior. Em todo o caso, é reconhecido que para maior grau de gravidade e maior carga terapêutica maior é o grau de adesão.

III.3 IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS CELULARES DA EXPECTORAÇÃO NUMA POPULAÇÃO DE ASMÁTICOS, COM ENFOQUE NOS DOENTES GRAVES, E CORRELAÇÕES COM PARÂMETROS CLÍNICOS, FUNCIONAIS E LABORATORIAIS.

As características demográficas, apresentadas na *Informação suplementar 5*, para este subgrupo de doentes, em que a maioria era grave (24 Vs 13), sobrepõe-se com a maior parte das características da população do estudo, com excepção para o controlo da doença, qualidade de vida e função respiratória, parâmetros que se mostraram mais próximos para os encontrados na população grave.

III.3.1 Contagem diferencial de células nos fenótipos celulares da expectoração

A escolha dos *cut-offs* utilizados na classificação de fenótipo eosinofílico e neutrofílico da expectoração (de 2% para os eosinófilos e de 60% para os neutrófilos) foi baseada na literatura

existente: em relação aos eosinófilos tivemos em conta as recomendações ATS/ERS⁹⁵; em relação ao valor de neutrófilos, tendo em conta que o mesmo varia com a idade, o valor foi escolhido com base na média de idades da nossa população e os valores publicados para essa faixa etária¹⁶⁹.

Apesar de alguns estudos apontarem para a falta de consistência da classificação da asma com uso de apenas uma amostra de expectoração¹⁶⁸, outros têm utilizado esses resultados para melhor entender o mecanismo fisiopatológico a ela subjacente e mesmo orientar terapêuticas. Haldar et al.², reportaram que, num sub-grupo de doentes com asma eosinofílica refractária, as exacerbações se correlacionaram com a percentagem de eosinófilos na expectoração. Outros autores, verificaram que os neutrófilos se relacionam com a gravidade da obstrução da via aérea²⁰⁸ e, associados ou não ao aumento de eosinófilos, se encontram na via aérea dos doentes com asma grave²⁰⁹.

Outro estudo²⁰³, que pretendeu avaliar a heterogeneidade da asma em relação com os padrões inflamatórios (do sangue periférico), que envolveu mais de 300 doentes com asma, definiu quatro fenótipos: EOShi/NEUlo; EOSlo/NEUhi, EOShi/NEUhi, EOSlo/NEUlo. Nos que apresentaram inflamação eosinofílica, os níveis de IgE foram mais elevados, o FEV₁ mais baixo, houve mais história de exacerbações e piores pontuações nos questionários de sintomas.

No nosso estudo, verificámos que na identificação do fenótipo celular da expectoração, o padrão eosinofílico foi o mais frequente nos dois grupos de gravidade, seguido do misto, de forma mais importante no grupo grave. Segundo evidência actual, os asmáticos com elevação simultânea de neutrófilos e eosinófilos na expectoração são os que têm pior função respiratória, pior controlo da asma, maior recurso a cuidados de saúde e mais sintomas¹³⁷.

Da literatura, apenas 50% dos asmáticos têm inflamação eosinofílica da via aérea²⁰², o que se aproxima dos nossos dados, tendo sido reportado, para adultos com asma estável tratada com CSI, prevalência de 40% para o padrão eosinofílico e de 25% para o neutrofilico²¹⁰.

Enquanto o número de eosinófilos nos diversos compartimentos pulmonares foi já associado à gravidade da obstrução da via aérea e da hiperreactividade²¹¹, o de neutrófilos associou-se à inflamação sistémica²¹², podendo a causa desta inflamação decorrer da inflamação subclínica do tracto respiratório, da hipoxia tecidual, da exposição tabágica e da obesidade, mas também da activação neutrofilica sistémica, com libertação de proteases.

Recentemente, a contagem de células na expectoração tem sido usada pela transcriptómica descrevendo-se três perfis genéticos na asma moderada a grave: um, idêntico ao endótipo Th2hi e dois com características do Th2lo (um dominado pelos neutrófilos e o outro pelos macrófagos)²¹³.

No nosso estudo, na contagem diferencial de células da expectoração, apenas os macrófagos mostraram diferença significativa, com valor mais baixo nos graves, $p=0.021$. Os macrófagos participam na homeostasia imunitária pulmonar, quer pela fagocitose, quer pela libertação de mediadores em resposta a antigénios. O seu papel regulador permanece controverso mas dados recentes sugerem que possa participar activamente na asma, produzindo mediadores

pró e anti-inflamatórios, incluindo citocinas Th1, Th2, Th17 e IL-33, dependendo das diferentes condições do meio envolvente. Enquanto a IL-33 amplifica a polarização dos macrófagos contribuindo para a inflamação da via aérea⁴¹, a depleção dos macrófagos inibe o desenvolvimento da HRB, enfatizando a sua importância na asma, podendo mesmo vir a ser um alvo terapêutico⁴². No entanto, estudos feitos em animais com asma experimental, mostraram antes aumento da inflamação⁴³. Outro factor a ter em conta é a proximidade dos macrófagos às células dendríticas, com envolvimento na sua activação mas que, na presença de exposição alérgica, pode estar comprometido²¹⁴.

No estudo de Hastie et al.²⁰⁰, também apenas os macrófagos mostraram diferença significativa entre grupos de gravidade, diminuindo a sua percentagem com o aumento da gravidade. A inferioridade dos macrófagos no grupo de graves, nos dois estudos, poderá relacionar-se mais com a sua capacidade anti-inflamatória do que com a reguladora, já que experimentalmente a função homeostática dos macrófagos alveolares parece perder-se na presença da asma²¹⁵. Existem duas sub-populações de macrófagos: os M1 relacionados com a indução de inflamação em resposta aos patógenos intracelulares e os M2, envolvidos na fagocitose e na apoptose. As citocinas Th2 induzem a diferenciação no sub-tipo M2 mas o sub-tipo mais envolvido nos processos patogénico e resolutivo da asma não está identificado, sendo necessários mais estudos para clarificar o papel da plasticidade macrófágica na asma²¹⁶.

Em relação aos neutrófilos, que também no nosso estudo se relacionaram com a gravidade da asma, sabe-se que o mecanismo para o seu aumento envolve a libertação da IL-8, o recrutamento de neutrófilos activados, que libertam quantidades elevadas de mieloperoxidase (MPO) e LTB₄²¹⁷, e a contribuição do uso de CS que aumentam a sua sobrevivência. Estudos recentes mostraram que os neutrófilos têm também capacidade para extensas alterações na expressão génica, importantes na regulação de muitas das suas funções. A asma neutrofílica associa-se à activação da resposta imunitária inata e à expressão de receptores TLR2, TLR4 e CD14, bem como a citocinas pró-inflamatórias como a IL-8 e IL-1b⁴⁶.

Quanto às células dendríticas (DCs – *Dendritic cells*), cuja percentagem se verificou aumentada no grupo dos graves, são o tipo celular principal na apresentação antigénica e estão envolvidas não só na indução da resposta alérgica Th2 na asma, mas também na indução da resposta imune adaptativa, supraregulando várias quimiocinas como a CCL17 e CCL2, que atraem os eosinófilos e os basófilos para o pulmão²¹⁸. As DCs plasmocitóides (pDCs), um sub-tipo com poucas células apresentadoras de Ags às CD4+ mas com apresentação eficiente às CD8+²¹⁹, já tinham mostrado estar aumentadas em doentes com asma²²⁰. Faz portanto sentido, o aumento na percentagem de pDCs no grupo dos graves, verificado no nosso estudo, mas também da percentagem de basófilos já que, como se disse atrás, as DCs atraem os basófilos para o pulmão.

Os basófilos constituem cerca de 1% dos leucócitos periféricos, ainda com papel fisiológico por esclarecer²²¹, mas com capacidade para se desenvolver em eosinófilos e mastócitos²²². São importantes produtores de IL-4 e, como tal, podem contribuir para a propagação da resposta Th2 CD4+⁴². Nos processos inflamatórios, os basófilos desgranulam em resposta às reacções IgE mediadas e, na exposição alérgica, induzem a propagação da resposta Th2 mediada²²³.

III.3.2 Correlações das características imunocelulares da expectoração com outros parâmetros clínicos

Das correlações significativas encontradas destacamos a que estabelece a relação de neutrófilos na expectoração, com o FEV₁ basal (% do previsto) ($r = -0,34$), à semelhança de outro estudo¹³⁷, mas também com o género masculino ($r = -0,37$). Esta última correlação pode ser condicionada pela maior prevalência do género feminino, na nossa amostra.

Numa subanálise do estudo SARP²⁰⁰, em que a população consistia em asmáticos leves, moderados e graves, foram encontradas algumas associações com a gravidade da doença. O estudo referenciado encontrou relação entre a percentagem de eosinófilos na expectoração com a contagem de eosinófilos no sangue e com os níveis de FeNO, sendo os *cut-offs* de 30 ppb para o FeNO, 300/ μ l eosinófilos no sangue e 2% de eosinófilos na expectoração. No entanto, o uso destes parâmetros para a predição de eosinofilia na expectoração não mostrou boa acuidade.

O facto da percentagem de macrófagos se ter relacionado directamente com o FEV₁ basal ($r = 0,35$) e inversamente com o VR ($r = -0,44$), corrobora os resultados de ter sido maior a sua percentagem no grupo não grave.

Outra célula que mostrou correlação foi o basófilo, de forma directa com a IgE sérica ($r = 0,42$). Como atrás referido, os basófilos desgranulam em resposta às reacções IgE mediadas e, na exposição alérgica, induzem a propagação da resposta Th2 mediada, fazendo esta correlação todo o sentido²²³.

Em resumo:

Na interpretação destes resultados tivemos em mente que o sub-grupo em causa teve maior prevalência de doentes graves e se aproximou em alguns parâmetros (controlo da doença e função respiratória) do grupo grave da população total.

O fenótipo eosinofílico foi o mais prevalente, e o misto o segundo, quer nos doentes graves quer nos não graves. No entanto, a proporção relativa do fenótipo misto nos doentes graves foi superior à dos não graves. À semelhança da literatura recente, estes dados apontam para o envolvimento de mecanismos não Th2 no fenótipo misto. O aumento verificado de neutrófilos correlacionou-se com a gravidade da função respiratória, independentemente da gravidade dos doentes. A menor percentagem de macrófagos verificada nos doentes graves aponta para a preponderância do seu papel anti-inflamatório, em detrimento do papel regulador, nos doentes asmáticos, devendo ser um factor importante e a ter em conta em futuras abordagens terapêuticas. Relembramos que a percentagem de doentes com história de pneumonia na evolução da doença foi muito superior nos graves. Outras células, nomeadamente as dendríticas, têm tido crescente atenção na investigação actual e que, no nosso estudo, também se mostraram mais elevadas nos doentes graves.

III.3.3 Importância clínica dos resultados e limitações

A expectoração induzida constitui um método de estudo fiável, reprodutível, não invasivo e com pouco dispêndio de tempo, valioso na avaliação da inflamação da via aérea. Até novos estudos estarem disponíveis, a identificação do fenótipo eosinofílico baseado na contagem de células da expectoração induzida parece ser o método mais adequado para identificar actividade eosinofílica. Para além dos neutrófilos e eosinófilos, outras células merecem maior investigação, como sejam os macrófagos pelo seu papel anti-inflamatório e as células dendríticas por poderem ser futuros alvos terapêuticos.

Das correlações referidas, a que estabelece relação entre percentagem de neutrófilos com o FEV₁ basal ressalta a importância da neutrofilia nos processos de remodelação brônquica.

Sendo a colheita da expectoração induzida uma técnica acessível, requer contudo equipamento especializado. A nebulização com solução salina hipertónica pode provocar broncoespasmo, estando contraindicada em doentes com obstrução grave da via aérea. No entanto, se feita por pessoal treinado, o uso de solução salina isotónica não está contraindicado, podendo os doentes fazer pré-medicação com β_2 agonista, sem haver interferência nos resultados²²⁴.

O sucesso da colheita é de 70-90% e depende da obtenção de número adequado de células e de pouca contaminação por células epiteliais da saliva²²⁵. No nosso estudo, a eficiência da técnica foi optimizada, já que a colheita foi feita por pessoal treinado e após ensino adequado do doente para a expectoração.

Na interpretação dos resultados, deve ter-se presente que a percentagem de eosinófilos e de neutrófilos na expectoração não é específica da asma, podendo ser influenciada por outros factores como a idade, os hábitos tabágicos e outras doenças concomitantes. Não obstante, o *cut-off* utilizado para a valorização da neutrofilia teve em conta a média de idades da população em causa.

Outra limitação a considerar é a reduzida dimensão da amostra por poder ter limitado o estabelecimento de mais correlações.

III.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FENÓTIPOS CLÍNICOS DA POPULAÇÃO; IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE RISCO/PROTECÇÃO DE FENÓTIPO, COM BASE EM MODELOS DE PREDIÇÃO

Neste ponto da investigação, depois de caracterizados os fenótipos considerados, foram desenhados os seus modelos de predição, com base na metodologia referida em rubrica anterior, e com o objectivo de identificar os factores de risco/protecção para a ocorrência do mesmo. *Quadros XXIV a XXIX*.

Apresentaram-se os seguintes fenótipos: atopia, idade de início da doença após 12 anos de idade, HS a AINE's, obesidade, obstrução persistente e gravidade, tendo em conta as variáveis demográficas, clínicas, funcionais e laboratoriais. Os resultados constam dos *Quadros III-S a VII-S da Informação suplementar 4*.

III.4.1 Fenótipo de atopia

A prevalência encontrada na nossa população (68%), aproxima-se dos 60% descritos na literatura, reforçando que a asma não alérgica parece existir em apenas 2 em cada 5 casos de asma dos adultos, constituindo um fenótipo mais grave²²⁶. Os estudos ENFUMOSA¹³⁵ e SARP⁹⁰ mostraram uma associação negativa da atopia com a asma grave do adulto, podendo mesmo os doentes alérgicos terem melhor função pulmonar²²⁷.

Na comparação entre atópicos e não atópicos, os resultados colhidos estabeleceram as diferenças significativas para a menor idade dos doentes, $p=0.013$, a maior frequência de idade de início de doença antes dos 12 anos, $p=0.039$, e a menor prevalência de história de pneumonia, $p=0.033$, nos atópicos.

O facto do início da doença antes dos 12 anos ter sido, no nosso modelo, factor de risco para a atopia (OR 2.96; IC95%=1.05-8.32), $p=0.039$) apesar de novo, não é surpreendente, já que o fenótipo atópico é especialmente prevalente nas crianças¹³². Relevante e inovador foi o impacto encontrado para a história da pneumonia na evolução da doença: nos asmáticos, a probabilidade da sua ocorrência foi significativamente inferior nos doentes atópicos (ORadj 0.28; IC95%=0.09-0.86), $p=0.027$). Alguns avanços têm sido feitos na compreensão da imunopatogenia da asma, tendo-se identificado dois fenótipos moleculares *Th2-Hi* e *Th2-Lo*, incluindo-se no primeiro quer os alérgicos de início precoce, quer os menos alérgicos e com início tardio da doença. Nos asmáticos de início tardio poderá ser importante no seu desenvolvimento a componente da imunidade inata, onde o epitélio da via aérea responde a insultos ambientais, como sejam os peptídeos antimicrobianos²²⁸. A identificação de células linfocitárias inatas, capazes de secretar citocinas Th2 em resposta ao dano epitelial, pode ser crucial nesse entendimento.

Apesar destes factos, o fenótipo não alérgico parece partilhar com o alérgico reacções medidas pela IgE, já que esta está presente na via aérea de ambos, independentemente de existir evidência de atopia, aumento das células Th2, activação mastocitária e infiltração eosinofílica²²⁹.

Na monitorização do controlo da doença, as pontuações dos questionários ACT, CARAT e ALQ foram melhores na presença de atopia, o último com valor significativo, $p=0.025$. A avaliação da função respiratória não foi diferente neste grupo (quer em relação à população total quer em relação aos não atópicos). Já o estudo TENOR¹³⁶ mostrou que, apesar das mulheres serem mais atópicas do que os homens, têm melhor função pulmonar e não necessitam de maior nível de tratamento²³⁰.

Em relação à gravidade da doença, a pontuação do questionário de gravidade SOA foi melhor nos atópicos do que nos não atópicos e 51% obteve a classificação de grave pelos critérios WHO⁵. O sub-grupo de doentes graves do fenótipo atópico, tinha sido definido no *coorte* do estudo SARP, representando 40-50% dos asmáticos graves¹²³, e caracterizava-se pelo maior número de positividade dos testes alérgicos, níveis séricos de IgE total mais elevados, maior exposição ambiental e forte história familiar de atopia²³¹. No nosso modelo, a menor gravidade

da doença, mostrou ser potencial factor de impacto na predição do fenótipo de atopia, com OR para a classificação de grave (WHO⁵) de 0.36; IC95%=[0.11;1.19].

Quanto aos biomarcadores até agora conhecidos, o valor de FeNO, que tem sido reportado como biomarcador de asma atópica, apesar de elevado não mostrou ter impacto no nosso modelo. A contagem de células da expectoração apontou para uma inflamação de predomínio eosinofílico e o valor sérico de IgE mostrou ser significativamente superior nos atópicos, $p=0.008$. Como é sabido, o tratamento anti-IgE com omalizumabe, foi o primeiro tratamento fenotipicamente orientado, nomeadamente para o fenótipo alérgico grave.

III.4.2 Fenótipo com idade de início de asma após os 12 anos de idade

A importância clínica deste fenótipo surge após vários grupos terem identificado, por diferentes abordagens de análise, a idade de início de doença como factor determinante na distinção dos fenótipos asmáticos (usando a idade de 12 anos como *cut-off*)^{2,123}.

A asma com início antes dos 12 anos associou-se consistentemente a maior condição atópica, enquanto a iniciada após os 12 anos se associou quer a asma com inflamação eosinofílica, quer a asma do obeso, mais comum em mulheres e, em geral, menos alérgica. Apesar disso, não se encontraram biomarcadores relacionados com a de início precoce.

Segundo Wenzel, que agrupou os fenótipos conhecidos de acordo com as suas características, a idade de início da doença pareceu-lhe ser melhor discriminador da asma do adulto do que os sintomas alérgicos. A asma de início precoce revelou apresentar-se com vários graus de gravidade, em associação a outras doenças como a rinite e sintomas alérgicos, boa resposta à corticoterapia e a tratamentos Th2 direccionados, como o omalizumabe. Tem como biomarcadores as citocinas Th2 e os níveis totais de IgE. Dentro deste grupo, verificou-se recentemente a distinção molecular de asma alérgica ligeira-Th2, associada a maior eosinofilia¹³². Outros estudos sugerem que, à medida que a gravidade da asma de início precoce aumenta, vias não-Th2 como as Th17 e Th1 possam envolver-se²³².

A asma de início mais tardio, cuja prevalência se estima em 50% dos asmáticos¹³⁰, tem tendencialmente apresentação na idade adulta, com predomínio eosinofílico, mas menos alérgica, podendo ter maior prevalência de sinusite e polipose nasal. Foi recentemente identificado o biomarcador periostina nesse sub-grupo e as vias patobiológicas envolvidas resultam da interacção da imunidade Th2, vias IL-33 e IL-17. Relaciona-se com eosinofilia refractária à corticoterapia, não estando esclarecida a razão da diferença de resposta terapêutica. Na sua patobiologia está também envolvida a IL-5, apresentando resposta terapêutica ao anticorpo IL-5 e a modificadores dos leucotrienos¹³².

Ainda, na asma com início na idade adulta, têm sido avançados sub-fenótipos não Th2, entre os quais o relacionado com a obesidade, com o fumo do tabaco, a asma neutrofílica e a paucigranulocítica¹³².

No nosso estudo, quando comparámos os doentes com idade de início de asma após os 12 anos com os restantes, e que passaremos a discutir, encontramos algumas diferenças

significativas (detalhadas no Quadro V-S da *Informação suplementar 4*). Dos vários factores de risco para o fenótipo em causa, apresentados na rubrica de resultados e resumidas no *Quadro XV*, destacamos a idade do doente, a gravidade pela escala WHO⁵ e pelo *score* SOA, a elevada dose de CSI utilizada, a qualidade de vida, a atopia, a reversibilidade da obstrução e alguns biomarcadores como os eosinófilos no sangue.

Com prevalência aproximada à da literatura, a idade mais avançada foi identificada como factor de risco para o fenótipo em causa (OR_{adj} 1.08; IC95%=1.04-1.12, $p < 0.001$), à semelhança do estudo SARP. Este facto suporta os nossos resultados, uma vez que também identificamos como factores de risco para o fenótipo em causa a classificação de grave pela escala WHO⁵ (OR 2.67; IC95%=1.01-7.07, $p = 0.049$) e a maior pontuação no questionário SOA (OR 1.17; IC95%=1.02-1.34, $p = 0.025$). Aliás, aquando da comparação da gravidade dos asmáticos de início precoce Vs tardio, tínhamos já verificado a diferença significativa de gravidade entre os grupos, superior nos de asma de início tardio, (quer para a classificação de grave pela WHO⁵, $p = 0.046$, quer para a pontuação no questionário SOA, ($p = 0.02$)).

O género masculino mostrou-se importante na predição do fenótipo em causa, embora sem significado estatístico (OR_{adj} 3.71 (0.088-15.70), $p = 0.075$), podendo dever-se ao facto deste género ser factor de risco conhecido para obstrução fixa, como identificado no coorte TENOR¹⁹².

O facto do IMC médio da população ter sido elevado, e o excesso de peso se ter mostrado com diferença significativa consoante a idade de início de doença ($p = 0.019$), coincide com a existência do sub-fenótipo da asma de início tardio anteriormente descrito, não-Th2, e relacionado com obesidade. Este sub-fenótipo associa-se a um estado pró-inflamatório generalizado com produção de TNF- α , IL-6 e leptinas, com menor grau de atopia, muitos sintomas, mas pouca necessidade de intervenção médica de alto grau²³³.

A atopia foi menos frequente nos de asma com início tardio ($p = 0.036$), e identificada como factor de protecção para este fenótipo (OR 0.34; IC95%=0,12-0,95, $p = 0.039$) confirmando-se os resultados de outros estudos que sugerem que os mecanismos de resposta Th2, nestes doentes, serão mais complexos do que os associados aos da asma de início precoce. Tal foi também corroborado pela comprovação da existência de inflamação mista verificada e a pior resposta à corticoterapia.

De facto, a terapêutica com CSI em altas doses foi, no nosso estudo, factor de risco (OR 3.55; IC95%=1.32-9.54, $p = 0.012$) para o fenótipo em causa (idade de início de asma após os 12 anos), tendo já sido referido o elevado grau de terapêutica de manutenção utilizado, denotando provável refractariedade à corticoterapia de alguns sub-fenótipos do grupo.

Outro potencial factor de risco identificado foi a obstrução persistente, com elevada prevalência e razão de probabilidades elevada para a asma de início tardio (OR 2.63; IC95%=0.93-7.40, $p = 0.068$), o que pode estar em relação com a elevada exposição tabágica do grupo (38%) e com a presença de outra doença obstrutiva para além da asma (que ocorreu em 21% dos doentes). O sub-fenótipo de asma de início tardio não Th2 associado ao tabagismo,

avançado por Wenzel²³⁴, foi relacionado com deterioração da função respiratória e resistência à corticoterapia, podendo o tabagismo aumentar a sensibilização a alérgenos ocupacionais e agravar a qualidade de vida.

Constata-se, no nosso estudo, que a qualidade de vida avaliada pelo ALQ foi significativamente pior nestes doentes ($p=0.010$), apesar do significativo maior uso de CSI em altas doses ($p=0.011$) concordante, quer com o sub-fenótipo da asma associada ao tabagismo, quer com a pior qualidade de vida conhecida nos doentes com asma-obesidade (o excesso de peso nesse grupo foi significativamente maior).

Relativamente aos biomarcadores de inflamação eosinofílica, e apesar do menor grau de atopia nos de asma de início tardio, o valor percentual de eosinófilos no sangue foi significativamente superior ($p= 0.020$). Consistentemente, indo de encontro à presença de inflamação eosinofílica já descrita, identificámos de novo e como factor de risco para asma de início tardio, a percentagem de eosinófilos no sangue (ORadj 1.26; IC95%=1.02-1.57, $p=0.034$).

III.4.3 Fenótipo de HS a AINE's

Clinicamente distinto, este fenótipo é referido com prevalência em 5-10% dos asmáticos. Pensa-se que resulta não de um mecanismo imunológico mas sim do aumento de LTs que ocorre em resposta à diminuição dos níveis de prostaglandina (PG) E2 após inibição da ciclooxigenase (COX) 1²³⁸.

Na nossa amostra, foi identificado com base na história dos doentes, não se tendo em nenhum dos casos utilizado a prova confirmatória de provocação.

A prevalência notada foi de 17%, o que não nos surpreende dada a elevada percentagem de doentes graves do grupo (58%), e este ser um fenótipo caracteristicamente relacionado com maior gravidade de doença, como demonstrado também no estudo ENFUMOSA, que aliás o reportou como factor de risco para a gravidade de doença (OR 5.12 nos homens e 4.61 nas mulheres)¹³⁵. De facto, no nosso estudo, estes doentes apresentaram uma pontuação no questionário de gravidade SOA superior aos restantes doentes.

A percentagem de mulheres (58%) foi bastante inferior à encontrada na restante população (80%), tendo o género masculino sido identificado pelo nosso modelo, como potencial factor de risco (OR 3.78; IC95%=0.79-18.13, $p=0.096$). A média de idades e os anos de evolução da doença foram inferiores neste grupo, este último com diferença significativa, $p=0.018$. Apesar disso, em 42% dos doentes a asma teve idade de início após os 12 anos. Num estudo recente de prevalência deste fenótipo, realizado numa população coreana²³⁵, verificou-se também uma média de idades inferior à da população global. Outro estudo que incluiu 592 doentes, 163 com asma induzida pela aspirina, encontrou nesse sub-grupo uma média de idades significativamente inferior (43 anos Vs 46 anos, $p<0.005$). Também verificou que o IMC era significativamente inferior ao da população global, à semelhança dos nossos resultados, mas era menor a percentagem de fumadores activos (21.5% Vs 27.7%) apesar do inferior valor de FEV₁ (87.6% (17.0) Vs 90.5% (17.0), $p<0.005$)²³⁶.

Outras características clínicas descritas para este fenótipo²³⁷ são a co-existência de rinosinusite e polipose nasal. Nesse sentido, registámos, com diferença significativa em relação aos restantes doentes, maior prevalência de polipose nasal ($p=0.008$), que juntamente com o RGE foram identificados, no nosso estudo, como factores de risco para o fenótipo em causa (ORadj 9.5, $p=0.014$ e OR3.78, $p=0.096$, respectivamente).

Em relação à gravidade da doença, estes doentes apresentam alguma heterogeneidade mas, muitas vezes e apesar de não estarem expostos ao desencadeante em causa, mostram maior gravidade. Apesar da relação de causalidade com a gravidade da doença não estar esclarecida, é associada ao aumento de excreção urinária de (LTs)E4 e a defeitos genéticos nas suas vias de sintetização²³⁹, factores que não foram avaliados no nosso estudo.

No nosso sub-grupo, apesar de ser maior o controlo da doença, foi significativamente pior a qualidade de vida em relação aos restantes, $p=0.010$, e a pontuação do questionário de gravidade SOA superior, com impacto na predição deste fenótipo (ORadj 1.23; IC95%= 1.02-1.49, $p=0.031$), como mostrou o nosso modelo. Em 67% dos doentes foram registados pelo menos um episódio de exacerbação grave no último ano e, em 33%, hospitalizações. Já no estudo acima referenciado²³⁵, foi maior o uso de cuidados de saúde por estes doentes, sendo que a visita ao SU no último ano tinha mostrado ser factor de risco para o fenótipo, com OR 2.19, $p=0.029$.

A avaliação da função respiratória mostrou, no nosso estudo, valores sobreponíveis entre este fenótipo e a restante população, mas identificou-se obstrução persistente da via aérea em 25% dos doentes com HS a AINE's. No estudo TENOR¹⁹², ficou demonstrada a associação da obstrução persistente do fluxo aéreo com a sensibilidade à aspirina (OR 1.5 (IC95%= 1.0–2.4), o que não se confirmou no nosso grupo. No entanto, a menor reversibilidade após prova de BD (Δ FEV1 5,8 % (6,7) Vs 7% (7,3)), aponta para maior remodelação da via aérea.

Apesar da relação de causalidade da doença não estar esclarecida, é associada ao aumento de excreção urinária de LT's^{238,239}.

III.4.4 Fenótipo de obesidade (IMC ≥ 30 KG/M²)

Antes de discutirmos os factores com impacto no nosso modelo de predição para este fenótipo, cumpre-nos discutir a sua importância clínica.

Tanto a prevalência como a incidência da asma nos obesos estão aumentadas, havendo evidência de que a obesidade seja precursora da asma. Meta-análises de estudos longitudinais em adultos confirmaram que a obesidade se associa a risco de início de asma, quer em homens, quer em mulheres, sendo o risco superior nos mais obesos¹⁸⁰. Os mecanismos desta associação podem ser de vária ordem. Por exemplo, factores mecânicos como a pressão causada pelo aumento da massa na parede torácica, exercendo efeitos mecânicos directos no pulmão, podem estar relacionados. Como os obesos respiram a volumes mais baixos, em caso de broncoconstrição, o volume corrente está mais limitado, resultando em maior

sintomatologia. Também já foi demonstrado que a obesidade é factor de risco para encerramento precoce da via aérea nos asmáticos, afectando as relações da ventilação/perfusão²⁴⁰.

Outro factor responsável por esta associação poderá ser o efeito pró-inflamatório das adipocinas na circulação dos doentes obesos, com indução ou agravamento da inflamação. Várias citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, VEGF, PCR²⁴¹ e marcadores do *stress* oxidativo como 8-isoprostano²⁴², estão elevados nos obesos. Apesar disso, os efeitos da inflamação sistémica não explicam consistentemente esta associação²⁴³.

Recentemente, e como abordado na rubrica dos diferentes fenótipos da asma, identificou-se um endótipo *Th2-Lo*, com vários subgrupos, sendo o dos obesos o melhor definido. Este caracterizou-se pela menor probabilidade de atopia, predomínio do sexo feminino e melhoria sintomática com perda de peso. Alguns mecanismos fisiopatológicos apontados prendem-se com o balanço adiponectina/leptina e com a síndrome metabólica e seu contributo para aumento do *stress* oxidativo¹³².

No nosso estudo, a distribuição por género foi maior para o feminino constituindo 90.5% da população de obesos, com menor prevalência de atopia, de rinite e de exposição tabágica do que na restante população. Também no *coorte* do estudo SARP, a elevação do IMC se associou ao género feminino e ao início da asma na idade adulta.

Esta prevalência do género feminino adiciona algumas pistas na compreensão do mecanismo da sua associação à asma: os níveis elevados de leptina estão mais relacionados com a obesidade do género feminino do que com o masculino²⁴⁴; os níveis de progesterona diminuem na obesidade, podendo modular a reactividade da via aérea pela acção nos receptores β -adrenérgicos, já que níveis inferiores levam a menor relaxamento da via aérea²⁴⁵; e o aumento de estrogénios na obesidade pode modular a actividade eosinofílica.

Em relação à atopia, vários estudos têm demonstrado que a associação obesidade-asma é mais forte nos doentes não atópicos²⁴⁶ sendo que no nosso modelo, apesar de não ter significado estatístico, a razão de probabilidades para a presença de atopia nos obesos foi inferior a 1.

Apesar da evidente relação causal obesidade – asma, não lhe eram até há pouco associados marcadores específicos de inflamação, nomeadamente obstrução aumentada ou inflamação eosinofílica. No entanto, parece ser um grupo com asma de mais difícil controlo, sintomas mais frequentes, maior uso de terapêutica de alívio e pior qualidade de vida^{110,247}.

A importância clínica deste fenótipo prende-se exactamente com factores de ordem terapêutica, dado o mau controlo apesar de terapêutica adequada, permanecendo a sua causa por esclarecer. Podendo relacionar-se com o estado inflamatório, várias evidências apontam para a inflamação paucicelular, podendo estes doentes beneficiar com tratamento da obesidade, nomeadamente o cirúrgico, como indicam estudos recentes²⁴⁸. Este benefício aponta para a importância do efeito mecânico da obesidade que condiciona restrição pulmonar, embora sem rebate na melhoria da HRB²⁴⁹. Vários estudos epidemiológicos têm avaliado a associação do controlo da asma com a obesidade. A pontuação ACT não tem

mostrado associação consistente, mas vários estudos apontam para a relação da obesidade com o pior controlo da doença^{110, 181, 250, 251} e da qualidade de vida.^{110, 252}

No nosso estudo, o não controlo da doença foi identificado como factor de risco para este fenótipo (OR 6.75; IC95%= 0.80-56.71, p=0.079), sendo no entanto a pontuação média de ACT (19 (4.9)) sobreponível entre os dois grupos. A avaliação da qualidade de vida medida pelo ALQ foi consideravelmente pior.

No entanto, naqueles com excesso de peso (IMC $\geq 25\text{Kg/m}^2$), o controlo da doença avaliado pelos questionários ACT e CARAT foi significativamente pior do que nos doentes sem excesso de peso (p= 0.016 e p= 0.015, respectivamente), sendo também pior a qualidade de vida (p=0.022) e a gravidade da doença (SOA, p= 0.034).

Apesar do maior recurso a tratamento com doses elevadas de CSI, não houve maior recurso a ciclos de CSO nem foi maior a taxa de hospitalizações, à semelhança do acontecido no estudo SARP, onde a taxa de hospitalizações não foi superior.

A avaliação da função respiratória mostrou melhores valores médios espirométricos nos obesos em relação aos restantes, mas menor reversibilidade, e a percentagem dos doentes com obstrução persistente da via aérea foi também menor. Como já referido nos mecanismos de associação obesidade-asma, o aumento da pressão intra-abdominal no diafragma, leva a menor capacidade residual funcional e volume de reserva expiratório, respirando os doentes a volumes mais baixos e contra maior resistência.

Os valores da CRF e do VRE têm-se mostrado consistentemente diminuídos nos obesos²⁵³, embora não haja uma associação típica com a diminuição da relação FEV₁/FVC. No nosso modelo, apesar do valor modesto de OR para a relação FEV₁/FVC (1.05, IC95%= 1.01-1.09, p=0.033), ele foi estatisticamente significativo, sendo que os obesos apresentaram valores mais elevados do que os restantes.

Apesar de alguns estudos reportarem aumento da resistência da via aérea nos obesos, por mecanismo não esclarecido, a obesidade não condiciona obstrução da via aérea, pelo que o aumento dos sintomas nos asmáticos obesos poderá prender-se com os factores já referidos.

Não obstante o reconhecido pior controlo da doença nos obesos, a sua associação com a gravidade não é consistente, sendo contrariada por uns (Wenzel reportou prevalência semelhante de obesidade na asma moderada e grave²⁵⁴) mas evidenciada por outros. Nomeadamente, num estudo de Gibeon et al.²⁵⁵, desenhado para avaliar a relação da obesidade com a gravidade da doença, o fenótipo da obesidade nos graves caracterizou-se por início mais tardio da doença, com predominância do género feminino, e apresentando os doentes mais sintomatologia do que os classicamente atópicos, com relativa menor inflamação eosinofílica. No nosso grupo de obesos, foram classificados como graves pela classificação WHO⁵ 67% (percentagem superior aos 57% verificados nos restantes doentes) e a pontuação no questionário de gravidade SOA foi superior (11 SD 2.7 Vs 10 SD 4.2).

Quanto aos biomarcadores existentes, vários estudos têm demonstrado aumento do *stress* oxidativo nos asmáticos obesos, podendo ser factor de risco para o fenótipo em causa, interferindo com a cascata inflamatória, e tendo já sido detectado o aumento do 8-isoprostano no ar exalado destes doentes²⁴².

Recentemente foi ainda identificado um possível biomarcador: a dimetilarginina (ADMA - *Asymmetric dimethyl arginine*)²⁵⁶ cujo aumento se associou a menores níveis de IgE, mais sintomas respiratórios e pior função em doentes obesos com asma de início tardio, quando comparados com doentes obesos com asma de início precoce.

III.4.5 Fenótipo com obstrução persistente da via aérea

A significância clínica deste fenótipo prende-se com o seu pior prognóstico, já que a limitação persistente do débito aéreo pode resultar na limitação da capacidade de exercício pela hiperinsuflação dinâmica, semelhante à observada na DPOC²⁵⁷.

O gene que tem vindo a ser insistentemente associado à obstrução persistente da via aérea é o ADAM 33, que se relaciona com o aumento da remodelação da via aérea²⁵⁸. As alterações patológicas encontradas nestes doentes são a desnudação epitelial, o espessamento da membrana sub-epitelial, o aumento do músculo liso e o alargamento das glândulas brônquicas²⁵⁹, com provável diminuição da retracção elástica pulmonar, em consequência das exacerbações e de alterações proteicas da matriz extracelular, associadas ao processo inflamatório crónico²⁶⁰.

Neste grupo de doentes tem vindo a ser descrito o sub-fenótipo da asma-DPOC, actualmente reconhecido nas normas espanholas da SEPAR²⁶¹ para a DPOC, e que é definido pela obstrução do fluxo aéreo que não é completamente revertida, mas é acompanhada por sinais ou sintomas de reversibilidade. Numa recente revisão, o fenótipo asma-DPOC foi definido por 5 critérios *major* - diagnóstico clínico de asma e DPOC no mesmo doente; história de atopia; mais de 40 A; carga tabágica >10 UMA; FEV₁pós-BD<80% do previsto e FEV₁/FVC<70% - e um *minor* - aumento $\geq 15\%$ ou $\geq 12\%$ e 200 ml no FEV₁ após BD.

Este fenótipo asma-DPOC caracteriza-se clinicamente por indivíduos com idade superior a 40 anos, história tabágica positiva, atopia, rinosinusite e RGE associando-se a maior frequência de exacerbações graves. A inflamação da via aérea é mista ou de predomínio neutrofílico, podendo co-existir enfisema. Os factores de risco associados são a atopia, os hábitos tabágicos e asma grave persistente na infância²⁶². Assim, no fenótipo dos doentes asmáticos com obstrução persistente, estará incluído um sub-fenótipo, até há pouco não reconhecido, de sobreposição Asma-DPOC, com consequentes implicações na abordagem terapêutica.

No nosso estudo, a obstrução persistente teve prevalência de 30%, sendo conhecidos na literatura^{263, 264, 265} valores que variam entre os 16% na asma leve, 23% na moderada e 49% na de difícil tratamento, apesar da utilização não uniforme da definição desta obstrução. Em 32% deles registou-se a co-existência de outra doença obstrutiva, superior aos cerca de 20% da população global, indo de encontro à existência do sub-fenótipo asma-DPOC, acima descrito.

Encontrámos como factor de risco para o fenótipo em causa o género masculino, após ajuste para a idade (ORadj 6.88; IC95%=[1.78;26.61], $p=0.005$), factor já encontrado por outro estudo desenhado para identificar factores de risco associados com a obstrução persistente do fluxo aéreo²⁶⁶ (apesar da maior prevalência do género feminino na asma de início na idade adulta). No entanto, este dado não é consensual na literatura, uma vez que, independentemente da exposição tabágica, o género masculino foi identificado por uns¹⁹² e o feminino por outros²⁶⁰ (este particularmente relacionado com alguns determinantes genéticos).

O mecanismo subjacente à relação com o género masculino poderá estar relacionado com factores ambientais para além do tabagismo, ou com a predisposição genética, não havendo, no entanto, evidência, até ao momento, a suportar esta hipótese.

Outra característica do fenótipo, por nós verificada, foi a maior prevalência do início da doença após os 12 anos de idade, em relação à população global, tendo-se identificado como protector para este fenótipo o início da doença antes dos 12 anos. Consistentemente, foi factor de risco para os doentes obstruídos, a idade mais avançada (ORadj 1.06 [1.02; 1.09], $p=0.004$).

A asma de início na idade adulta, em particular a não-atópica, tem-se relacionado com o maior declínio da função pulmonar, não parecendo ser este um processo gradual mas antes caracterizado por episódios recorrentes de degradação²⁶⁷. A aplicação da análise *cluster* à asma com início na idade adulta, realizada por Moore et al. no *coorte* do estudo SARP, identificou dois sub-fenótipos, um deles caracterizado pela maior prevalência do género masculino, com menos sintomas, inflamação da via aérea e obstrução persistente do fluxo aéreo.

Os parâmetros fisiológicos que têm vindo a ser associados à obstrução persistente são a duração da doença e a sua gravidade¹⁹⁹. Em concordância, comorbilidades como a exposição tabágica, a história de pneumonia no decurso da doença e a co-existência de outra doença obstrutiva, foram superiores neste fenótipo. Apesar de não se terem identificado como factores de risco, na comparação entre os doentes com obstrução persistente e os restantes, encontrámos como estatisticamente significativa a diferença na coexistência de outras doenças obstrutivas, nomeadamente o défice de $\alpha 1AT$ ($p=0.047$) e de DPOC ($p<0.001$), bem como a sensibilização a *Aspergillus fumigatus*. Por outro lado, e apesar da percentagem de doentes com excesso de peso ter sido superior à da população global, a obesidade não se mostrou importante no modelo de predição do fenótipo, achado concordante com outros estudos²⁶⁶.

Alguns factores de risco, previamente reportados por outros, são coincidentes com os nossos resultados, como é o caso do início de asma (não alérgica) na idade adulta com história de infecções respiratórias prévias, o tabagismo e a sensibilização alérgica a *Aspergillus fumigatus*²⁶⁰.

Ainda com impacto na predição deste fenótipo encontramos a gravidade da doença, avaliada quer pelas classificações WHO⁵ (ORadj 28.54; IC95%= [3.24;251.38], $p=0.003$) e ATS⁴ (ORadj 11.12; IC95%= [2.41;51.44], $p=0.002$), quer pela pontuação no questionário SOA (OR 1.21; IC95%= [1.03;1.41], $p=0.02$).

Outros factores de risco para obstrução persistente por nós identificados, foram o grau de terapêutica utilizado, (ORadj 7.06; IC95%= [1.04;48,16], $p=0.046$) e o uso de CSI de altas doses, (OR 3.07; IC95%= [1.09;8.66], $p=0.034$). De facto, na comparação deste fenótipo com os restantes doentes, tinha sido significativa a diferença na percentagem de uso de altas doses de CSI ($p= 0.031$), mantendo, no entanto, maior percentagem de doentes não controlados ($p= 0.040$).

Já no estudo ENFUMOSA, mesmo na presença de altas doses de CSI, aqueles com asma grave apresentavam valores de FEV₁ e relação FEV₁/FVC menores, VR aumentado e tendência no sentido da elevação da relação VR/CPT, sugerindo a existência de um componente fixo de doença das pequenas vias aéreas, como consequência de alterações estruturais na evolução da doença. De forma não consensual, parâmetros como a maior reversibilidade e hiperreactividade brônquicas têm sido apontados em alguns estudos como outros factores de risco para a obstrução persistente^{263, 264}.

Também no estudo SARP, que teve como objectivo fundamental identificar e caracterizar doentes com asma grave, incluídos de acordo com os critérios ATS⁴, observou-se reversibilidade em 61% dos doentes com asma grave, mesmo nos que estavam medicados cronicamente com broncodilatadores. O valor da reversibilidade correlacionou-se com o FEV₁ basal e só 9% dos asmáticos graves mostraram irreversibilidade ao salbutamol.

No nosso estudo a avaliação da função respiratória, já descrita na rubrica dos resultados, foi concordante com esses estudos: houve reversibilidade brônquica em 77% dos doentes, com valor médio de 9%, (10.7) e identificámos como factor de risco para a obstrução persistente a reversibilidade brônquica (ORadj 4.24; IC95%= [1.14;15.77], $p=0.031$). Naturalmente, na avaliação da função respiratória já tinham sido notadas diferenças significativas, nomeadamente no FEV₁, na relação de FEV₁/FVC, no FEV₂₅₋₇₅ basais e no VR basal, piores neste fenótipo.

Para concluir, e em relação aos biomarcadores, a eosinofilia periférica e a percentagem de neutrófilos na expectoração mostraram ser factores de risco deste fenótipo (OR de 1,22; [1.02;1.49], $p=0.023$ e OR1.03 IC95%=[0.99;1.07], $p=0,077$, respectivamente). É já conhecido, de outros estudos, que a obstrução persistente do fluxo aéreo na asma se acompanha de inflamação mista, mesmo sob altas doses de CSI, relacionados com processos de remodelação, com fibrose sub-epitelial²⁶⁸.

III.4.6 Fenótipo grave (classificação WHO⁵)

A asma grave compreende vários fenótipos, arbitrariamente definidos em grupos consoante a idade de início da doença, a presença de atopia, a natureza da inflamação e a função respiratória. Como vimos nos fenótipos anteriormente discutidos, em todos existe um sub-grupo de doentes graves, com prevalência de 58% no nosso estudo.

Em relação às análises *cluster* conhecidas na asma grave, os fenótipos foram estabelecidos usando modelos diferentes. A metodologia do estudo SARP incluiu na determinação do

número de *clusters* a função respiratória, mas não o doseamento de eosinófilos pulmonares ou na expectoração. O contrário se passou no estudo de Haldar et al.² No entanto, em ambos os modelos, a idade de início da asma foi um preditor independente para a discriminação de grupos, sendo que a asma de início tardio inclui vários potenciais sub-fenótipos, talvez o mais distinto o da hipereosinofilia, constituindo cerca de 25% dos asmáticos graves²³¹.

A combinação destes estudos permitiu identificar 5 *clusters* de doentes, 3 deles com maior probabilidade de incluir doentes graves: o da asma de início tardio, muito sintomática, relacionada com a obesidade e o predomínio do género feminino (correspondente ao *cluster* 3 de Moore et al.¹²³); o da asma alérgica de início precoce (correspondente ao *cluster* 4 de Moore et al.¹²³); e o da asma de início tardio, eosinofílica com um sub-grupo de doentes com asma induzida pela aspirina (correspondente ao *cluster* 5 de Moore et al.¹²³).

O primeiro caracterizou-se por IMC mais elevado, menor grau de atopia, menor valor de FEV₁ basal, maior eosinofilia na expectoração e recurso a CSO de forma frequente (>3ciclos/ano); o *cluster* 4, por asma grave de início precoce, com diminuição marcada do FEV₁ basal, mas com reversibilidade aos valores normais, muitos sintomas e eosinofilia na expectoração. O último *cluster*, de asmáticos graves com obstrução persistente da via aérea, caracterizou-se pela idade mais avançada dos doentes e maior número de anos de evolução da doença, menor grau de atopia, com FEV₁ basal diminuído e não reversível, com inflamação mista da expectoração¹⁸⁶.

Os factores de risco identificados na análise de regressão do nosso modelo para o fenótipo grave, são consistentes com os resultados da caracterização do grupo e com a maioria dos factores de risco encontrado no estudo SARP. Nesse estudo cinco variáveis foram identificadas como factores de risco para gravidade da doença: FEV₁ pré-BD (% do previsto); história de pneumonia (OR 3.30; IC 1.92-5.69; p<0.001), número de basófilos no sangue periférico (OR 2.25; IC 1.46-4.47; p=0.001), sintomas diários (OR 2.28; IC 1.25-4.15; p=0.007) e menor número de testes alérgicos positivos (OR 1.11; IC 1.00-1.22; p=0.04)⁹⁰.

Dos restantes factores de risco referidos, e já amplamente abordados na discussão da caracterização do grupo, realçamos a percentagem de eosinofilia no sangue periférico ser factor de risco para gravidade (OR 1.27; IC95%=1.01-1.61, p=0.045), facto não previamente identificado.

Esta rubrica pretendeu não só caracterizar fenotipicamente a realidade dos nossos doentes, no enquadramento nosológico, fazendo contraponto com os dados conhecidos na literatura para outros países, mas também apontar dados inovadores que pudessem contribuir para a comunidade científica melhor interpretar a heterogeneidade da asma.

Evidenciamos da discussão o seguinte:

- Os factores de risco encontrados para o fenótipo da atopia foram sobreponíveis aos já relacionados por outros estudos, dos quais destacamos a idade de doença antes dos 12 anos, o melhor controlo da doença, a maior reversibilidade da obstrução brônquica e o menor grau de terapêutica utilizado. Como inovadores e protectores para a ocorrência do fenótipo em

causa, foram identificados a história de pneumonia no decurso da doença, a presença de outra doença obstrutiva, a classificação de grave pela WHO⁵.

- Para o fenótipo de asma com início após os 12 anos de idade foram identificados de forma coincidente com outros estudos, os factores de risco de idade avançada e menor número de anos de evolução da doença, maior gravidade da doença e maior uso de CSI e, como factores protectores, a atopia e a rinite. Como mais-valia em relação ao já conhecido, o nosso estudo mostrou que o questionário de gravidade SOA é uma ferramenta útil, já que valores superiores são factor de risco para o fenótipo em causa. Nesta população, que julgamos representativa da população portuguesa tratada em cuidados de saúde diferenciados, o género masculino, a obstrução persistente da via aérea e a percentagem de eosinófilos no sangue foram também factores de risco para o fenótipo em causa.
- No fenótipo de HS a AINEs, considerado por outros estudos como um sub-fenótipo da asma de início tardio, identificou-se, à semelhança do que é já conhecido, a polipose nasal e a maior gravidade da doença como factores de risco, tendo o questionário SOA novamente mostrado relevante papel na predição de gravidade.
- Para o fenótipo da obstrução persistente foram identificados múltiplos factores de risco, sobreponíveis a outros estudos: a idade mais avançada da doença, o género masculino, a maior intensidade de terapêutica, a pior função respiratória, a maior gravidade da doença (novamente com papel do questionário SOA nesta avaliação) e a inflamação mista da via aérea. O início da doença antes dos 12 anos mostrou papel protector para o fenótipo em causa. De forma inovadora, identificámos como factor de risco a maior labilidade brônquica.
- Por fim, para além dos factores de risco já identificados por outros e por nós corroborados, destacamos como inovador em relação ao fenótipo grave a identificação da percentagem de eosinofilia no sangue periférico como factor de risco.

III.4.7 Importância clínica e limitações

O entendimento da asma, particularmente da grave, tem evoluído na última década, sendo hoje reconhecida como doença heterogénea com vários fenótipos, determinando abordagens terapêuticas diversas.

A melhor caracterização desses fenótipos, com abordagem multidisciplinar incluindo parâmetros comportamentais, clínicos, funcionais, laboratoriais e de resposta à terapêutica, é com certeza uma mais-valia no controlo dos diferentes mecanismos da doença.

Nesse sentido, apesar de alguns objectivos permanecerem por cumprir, devem ser alvos de investigação nos próximos anos.

Neles se incluem a validação dos vários fenótipos até agora identificados, o esclarecimento patológico dos diferentes fenótipos, determinando a contribuição celular e molecular para o mecanismo em causa, a importância de mecanismos como o *stress* oxidativo e de resposta imunitária inata, e a melhoria de resposta terapêutica de alguns sub-grupos de doentes.

Nesta rubrica foram corroboradas, numa realidade clínica portuguesa, muitas das características de fenótipos já conhecidas de outros estudos, tendo-se adicionado outras

importantes, podendo estes achados ter impacto na melhor interpretação dos mecanismos da doença.

As mesmas limitações aduzidas à adesão terapêutica e à capacidade de memória, já abordadas na discussão da caracterização da amostra, mantêm-se para este ponto. A escolha das variáveis a ter em conta nos modelos de regressão logística, utilizados para identificar potenciais factores com impacto na predição do fenótipo em causa, foi arbitrária mas feita de acordo com os argumentos já especificados na rubrica da metodologia e que incluem, para além da experiência na nossa realidade clínica, a aproximação à metodologia para escolha das variáveis utilizadas nos outros estudos publicados. Ressalta-se o facto de os biomarcadores da expectoração terem sido adquiridos numa amostra mais pequena, podendo justificar a escassez de impacto destes parâmetros na predição dos vários fenótipos.

III.5 AGRUPAMENTO DA POPULAÇÃO EM CLUSTERS

Considerando a heterogeneidade da asma, várias metodologias de análise têm sido aplicadas ao estudo desta patologia.

Até há alguns anos, a asma era classicamente definida com base em dois fenótipos principais: asma extrínseca, definido por um desenvolvimento típico na infância, acompanhada por reacções alérgicas IgE-mediadas, e asma intrínseca, com desenvolvimento típico mais tardio, sem associação a sensibilização alérgica. No entanto, a limitada abrangência desta divisão, no que diz respeito à heterogeneidade da asma, motivou estratégias de análise com base em metodologia *cluster*, combinando várias variáveis, definidas por cada investigador, para agrupar sujeitos cujas características se aproximam.

Dois importantes estudos realizados até ao momento são o de Haldar et al.² e o de Moore et al.¹²³ (amplamente abordados nos fundamentos teóricos) que, apesar de aplicarem diferentes metodologias na análise *cluster*, obtiveram alguns resultados sobreponíveis, nomeadamente na identificação do início de idade de doença como um dos discriminadores mais importantes na distribuição dos grupos.

Fazendo a análise combinada dos resultados destes dois estudos, e em relação ao grupo de doentes mais graves, consegue identificar-se pelo menos três subgrupos de doentes: os de asma alérgica grave de início precoce; os de asma de início tardio, eosinofílica, com um subgrupo de doentes com HS a AINEs; e o de asma de início tardio, obesos e sintomáticos, com predominância do género feminino.

Apesar destas classificações fenotípicas trazerem informações relevantes, não adicionaram muito ao conhecimento patobiológico da asma, nem identificaram biomarcadores com utilidade clínica, permanecendo a necessidade de se estabelecerem endótipos.

A combinação de alguns dos componentes definidos pelo PRACTALL²⁶⁹, como necessários à definição de endótipo (entre os quais se contam os parâmetros clínicos, os aspectos fisiológicos, a resposta à terapêutica e os biomarcadores), tem orientado para a emergência de novos endótipos que, contudo, necessitam de maior validação e se distinguem pelo grau de envolvimento de resposta Th2. Estes endótipos emergentes foram já descritos na rubrica I.8 e incluem 6 fenótipos:

- asma com resposta Th2, que integra os fenótipos asma alérgica de início precoce; asma eosinofílica de início tardio e asma induzida pelo exercício;
- asma sem resposta Th2, que integra os fenótipos de asma do obeso; de asma neutrofílica e de asma do fumador.

Nesta rubrica procurámos evidenciar dois aspectos, também fulcrais no nosso estudo:

- corroborámos as características dos nossos grupos de fenótipos;
- enfatizámos o que identificámos de novo como responsável pela separação dos elementos do estudo, na convicção de serem características diferenciadoras de pelo menos “uma realidade clínica portuguesa”.

III.5.1 Discussão dos *clusters* identificados

Não sendo conhecidos estudos portugueses que utilizem a abordagem *cluster*, este estudo adquire entre nós um carácter inovador. A aplicação da análise não supervisionada por metodologia *cluster* à nossa população, permitiu a identificação de cinco *clusters*. A escolha das variáveis utilizadas, teve como base as descritas nos dois estudos atrás referidos, e foi por isso mais abrangente do que cada um deles isoladamente.

Tendo os doentes incluídos sido tratados em cuidados de saúde diferenciados, discutiremos os nossos resultados apenas em função dos resultados de Moore et al.¹²³ (já que em Haldar et al.² se incluíam doentes tratados em cuidados de saúde primários).

Alguns discriminadores da análise que ressaltaram como mais determinantes na discriminação dos grupos, foram sobreponíveis aos encontrados por Moore et al.¹²³, como a idade de início de doença ($p=0.003$), o género ($p<0.001$), a função respiratória basal ($p<0.001$) e o grau de corticoterapia inalada ($p<0.001$).

No entanto, encontrámos outros de igual importância na nossa discriminação: o excesso de peso ($p=0.001$), a idade ($p=0.001$), o controlo da doença ($p=0.001$), a qualidade de vida ($p<0.001$) e a eosinofilia periférica ($p<0.001$). Corroborando a conclusão de Moore et al.¹²³, em relação ao uso deste tipo análise como suficiente para atribuir grau e tipo de gravidade aos doentes, identificámos ainda no nosso estudo, como discriminador de análise com significado estatístico, a gravidade da doença ($p(\text{WHO})=0.001$ e $p(\text{SOA})<0.001$).

Relativamente à identificação dos *clusters*, os resultados mostram evidente sobreposição com outros estudos:

Cluster 1 (asma alérgica grave, evoluída, associada a obstrução crónica e inflamação eosinofílica): este grupo, com prevalência de 12%, apresentou-se como de maior grau de gravidade, tendo bastante correspondência com o C5 de Moore et al.¹²³.

No nosso estudo, 100% cumpria os critérios de gravidade ATS⁴ e WHO⁵ (no de Moore et al.¹²³ cumpriam os critérios ATS⁴ 80% dos doentes) e em ambos, o número médio de anos de evolução de doença foi aproximado de 30 anos. Diferiram, no entanto, na distribuição por género (no de Moore et al.¹²³ a prevalência foi do feminino).

Em ambos os estudos a atopia esteve presente na maioria dos doentes, assim como o excesso de peso, de forma mais marcada no estudo de Moore et al. (31 Kg/m²)¹²³. Os grupos referidos mostraram a pior função pulmonar, apesar do grande número de fármacos de controlo utilizados e do recurso a CSI de altas doses e a CSO, com hospitalizações no último ano também frequentes (50% no nosso estudo e 25% em Moore et al.¹²³, mas reportando 40% deles história prévia de admissão em UCI durante a vida.

A maior diferença entre os grupos dos dois estudos foi na identificação da inflamação (que não ocorreu no de Moore et al.¹²³). No nosso estudo verificámos elevação dos marcadores de inflamação eosinofílica, com valores de FeNO tendencialmente superiores a 35 ppb, sendo o único grupo a mostrar eosinofilia periférica. O padrão celular da expectoração distribuiu-se equitativamente pelo tipo eosinofílico e misto, com valores médios de percentagem de neutrófilos e de eosinófilos muito elevados, estando de acordo com a literatura respeitante aos asmáticos graves, em que predominam os padrões eosinofílico e misto¹⁶⁷.

O nosso grupo partilhou ainda muitas das características encontradas pelo estudo TENOR¹⁴¹ para o grupo de doentes com asma associada a obstrução crónica, onde os doentes eram mais idosos, com história de exposição tabágica frequente e muitos anos de evolução da doença, fazendo tratamento com altas doses de CSI e mostrando inflamação eosinofílica, sendo sabido que um dos mecanismos para a persistência de inflamação eosinofílica nos asmáticos sob CS é a redução da actividade da histona desacetilase (HDAC)²⁷⁰. Estes doentes foram descritos pelas Recomendações para diagnóstico e terapêutica da asma grave em Portugal (2010)¹²⁴ como o fenótipo de asma associada a obstrução crónica, existindo alguns estudos genéticos a apontar para a relação deste fenótipo com polimorfismos dos genes ADAM 33, IL-4 e IL-4R, e TGF- β 1^{125, 271, 272}. No entanto, poderão também incluir-se no nosso C1 alterações relacionadas com outros dois fenótipos descritos pelas mesmas Recomendações¹²⁴: o da asma relacionada com a HS a AINE's e a asma corticoidesistente relacionada com a exposição tabágica, pois o grupo de doentes em causa apresentou maior prevalência desses factores.

Cluster 2 (asma grave em mulheres obesas, maioritariamente não alérgicas, muito sintomáticas): com sobreposição com o C3 de Moore et al.¹²³, é um grupo claramente distinto dos outros pela grande prevalência do género feminino, pelo maior grau de obesidade e menor grau de atopia. À semelhança do encontrado por Moore et al.¹²³, embora de forma menos acentuada, a idade de início de doença foi maioritariamente após os 12 anos de idade, sendo elevado o número médio de anos de evolução da doença. Já nesse estudo, os grupos mais graves apresentaram mais anos de evolução da doença. No nosso estudo, foi o segundo grupo com maior gravidade e o primeiro onde se registou maior impacto na qualidade de vida e maior prevalência de distúrbio ansioso-depressivo. Tanto no nosso estudo como no de

Moore et al.¹²³, o elevado grau de sintomas dos doentes e de recurso a ciclos de CSO e cuidados de saúde não programados, apesar do elevado grau de terapêutica usado, foi desproporcionado face ao pouco rebote na função pulmonar. Isto sugere que o pior controlo destes doentes poderá ser condicionado por alterações mecânicas do pulmão, factores psicogénicos como a ansiedade/depressão e coexistência de outras comorbilidades como o sedentarismo. Para além disso, o menor grau de inflamação eosinofílica²⁷³, pode explicar a refractariedade à corticoterapia e a boa resposta ao tratamento dirigido à obesidade, como já discutido em rubrica anterior. No estudo Moore et al.¹²³ foi notório, no grupo correspondente, o menor grau de inflamação eosinofílica. No nosso grupo registámos também baixa percentagem de eosinófilos no sangue, tendo sido o valor de FeNO em 80% dos casos inferior a 35 ppb. O fenótipo celular da expectoração foi de predomínio eosinofílico, com valor médio percentual de eosinófilos bastante baixo em relação a C1. Em relação à gravidade da doença, dada a notória presença de comorbilidades, do recurso a cuidados de saúde e do risco associado a eventos futuros, torna notória a sua gravidade.

Cluster 3 (asma alérgica moderadamente grave, de início precoce, em mulheres jovens, “brittle”): este *cluster* distinguido na nossa análise não tem correspondência exacta nos outros estudos, partilhando de algumas características do C1 de Moore et al.¹²³ Está, no entanto, bastante bem definido como fenótipo nas Recomendações para diagnóstico e terapêutica da asma grave em Portugal (2010)¹²⁴ correspondendo ao grupo de doentes com asma instável, com predomínio do género feminino e marcada sensibilização a aeroalergenos. A asma definida como instável pode ser do tipo I e do tipo II, apresentando-se, este último, com crises graves de asma, intercaladas por períodos de bom controlo de doença. De facto, o nosso C3 foi constituído na totalidade por mulheres, com apresentação precoce e poucos anos de evolução da doença, predomínio de atopia (à semelhança de C1 de Moore et al.¹²³), tendo sido dos grupos com menor IMC (Kg/m²). Tanto no nosso como no estudo de Moore et al.¹²³, a função respiratória basal apresentava-se normal, havendo pouco uso de terapêutica com elevadas doses de CSI, e sem evidência de inflamação eosinofílica. De facto, este foi o grupo com menor valor de percentagem de eosinófilos na expectoração, mas também o mais baixo de neutrófilos, aproximando-se do padrão paucigranulocítico. A marca mais marcante do nosso C3 foi exactamente a dissociação entre a boa pontuação no questionário de controlo da asma ACT (mas não do CARAT) e a ocorrência de hospitalizações e exacerbações graves registadas, sugerindo o referido fenótipo de *brittle* asma. Para além dos estudos que reportam uma associação deste fenótipo à frequente sensibilização a aeroalergenos e alergenos alimentares (podendo funcionar como *triggers* de exacerbações^{274, 275}), e mais recentemente a polimorfismos dos genes para a IL-4¹²⁵, a média de idades do grupo e o predomínio do género feminino, faz pensar que a ocorrência de variações hormonais podem também estar relacionadas.

Relevante para a prática clínica neste grupo mostra-se a aplicação do questionário CARAT, se não de forma preferencial, com toda a certeza complementar à do questionário ACT, dada a referida dissociação entre a pontuação no questionário ACT e a ocorrência de hospitalizações e exacerbações graves registadas.

Cluster 4 (asma alérgica moderada, longa evolução, predomínio feminino e excesso de peso)

Este grupo partilha algumas características com o C2 no excesso de peso, idade mais avançada e padrão celular da expeção neutrofílico mas com melhor qualidade de vida, controlo da doença e baixa recorrência a cuidados de saúde ou de hospitalizações.

Na comparação com os outros estudos, parece haver alguma sobreposição com o C5 de Moore et al.¹²³ correspondendo ao grupo de doentes de predomínio feminino, mais velhas, com IMC elevado, mas diferindo na vertente do mau controlo da doença e atingimento grave da função respiratória.

Uma vez que os fenótipos asmáticos não são estáticos mas antes sujeitos a alterações, quer de ordem intrínseca quer ambiental, parece-nos que o nosso C4 constituirá um grupo até agora não identificado, correspondente à modificação de um fenótipo de asma alérgica de início precoce que, provavelmente pela aquisição de excesso de peso na maioria dos doentes, terá tido uma modificação de resposta imunocelular constituindo um fenótipo misto de asma de início precoce, agora evoluída, com atopia, na mulher com excesso de peso.

Cluster 5 (asma alérgica ligeira, de início precoce, fácil controlo, com inflamação eosinofílica):

correspondeu ao C1 de Moore et al.¹²³ tendo sido o grupo mais jovem e menos grave. No entanto, no nosso estudo houve predomínio do género masculino, em concordância com a conhecida prevalência do género masculino nos escalões etários mais jovens, enquanto no outro estudo se manteve o predomínio do género feminino. Foi comum aos grupos dos dois estudos: a marcada prevalência de atopia; a baixa prevalência de excesso de peso, o menor grau de obesidade, a melhor função respiratória em todos os valores avaliados, o melhor controlo da doença, com menos recursos a cuidados de saúde não programados, quando comparados com os outros grupos. Quanto aos marcadores de inflamação eosinofílica, os valores de FeNO mostraram-se tendencialmente elevados.

Considerando o grau de gravidade da asma nos diferentes grupos, constatamos que o C1 e C2 são os de maior grau, tendo os C3 e C4 apresentado grau variável. À semelhança do verificado pelo estudo de Moore et al.¹²³, os grupos com início de asma após os 12 anos apresentaram o maior grau de gravidade.

Nos grupos de predominou do género feminino (C2, C3 e C4), se atentarmos nos parâmetros em que foi possível estabelecer comparações múltiplas entre grupos, verificamos que o C3 se distinguiu de C2 e C4 pela idade mais jovem e pela melhor função basal; o C4 de C2 e C3 pelo maior número de anos de evolução da doença e melhores pontuações nos questionários ACT e ALQ; o C2 de C3 e C4 pelo maior IMC e pior ALQ.

Quanto aos resultados das comparações múltiplas entre grupos, e revendo os resultados dos parâmetros em que as conseguimos estabelecer (idade, anos de evolução de doença, IMC, pontuação dos vários questionários, número de fármacos utilizados, valores de função respiratória, percentagem de eosinófilos no sangue e valores logarítmicos de IgE total sérica) permitem-nos os seguintes comentários:

- Apesar da partilha de muitas características entre C3 e C5 (idade precoce de início de doença, idade jovem, sem excesso de peso e boa função), as diferenças claras de distribuição por género e na necessidade de cuidados de saúde e de exacerbações graves, levam-nos a associar o fenótipo de asma “*brittle*” ao género feminino, concordante com outros resultados da literatura²⁷⁶.
- Os grupos C2 e C4 diferiram essencialmente pela gravidade, pelo controlo e qualidade de vida, tendo-se distinguido C4 por melhores valores e menor gravidade. Isto leva-nos a crer que estes dois *clusters* podem ter endótipos diferentes a justificarem a diferente forma de apresentação, pois, fenotipicamente, a maior diferença entre eles é o grau de obesidade (IMC superior a 30 Kg/m² no C2). Curiosamente, registaram-se maiores valores de VR, com hiperinsuflação sem se registarem mais exacerbações. Este facto adquire importância clínica, na medida em que o valor da avaliação alargada da função respiratória, particularmente nalguns fenótipos com excesso de peso, pode ter impacto na nossa abordagem terapêutica.

Concluindo, as várias sobreposições dos nossos resultados com os de outros estudos, dão consistência aos nossos resultados: C1 correspondeu ao grupo de doentes com asma de início tardio, evoluída, com obstrução da via aérea e de maior gravidade; C2 ao grupo de predomínio feminino, com asma de início tardio, obesidade marcada e menor grau de atopia; C5 ao de asma ligeira, alérgica, eosinofílica e de início precoce. Os grupos C3 e C4 trazem alguma novidade neste tipo de análise: C3 identificou um grupo de doentes com asma intermitente, cuja gravidade se prende com a ocorrência de exacerbações graves; C4 correspondeu a um grupo com provável alteração de fenótipo inicial (eosinofílico) pela presença de obesidade.

Recorrendo às três importantes características na distinção dos fenótipos graves propostas por Wenzel (idade de início de doença, alergia, eosinofilia) temos que:

- O C1 e o C2 tiveram idade de início de doença após os 12 anos, o C5 e o C3 predominantemente antes dos 12 anos, e o C4 teve uma distribuição mais equilibrada.
- Mostraram claramente inflamação eosinofílica os grupos C1 e C5;
- A alergia esteve presente em todos os grupos mas de forma menos marcada no C2.

De acordo com o tipo de resposta imunitária (Th2/não-Th2) (e tendo presente o já anteriormente discutido e a informação colhida da literatura mais recente¹³²), podemos estabelecer correspondência com alguns dos nossos *clusters*/fenótipos. Deste modo:

- Os fenótipos com resposta Th2 (eosinofílicos), responsivos à corticoterapia, dividem-se nos grupos com asma eosinofílica alérgica de início precoce (C5) e asma eosinofílica de início tardio (C1);
- Os fenótipos com resposta não Th2 (não eosinofílicos), dividem-se nos grupos com asma não eosinofílica de início tardio de predomínio feminino e relacionada com a obesidade (C2), na asma associada ao tabagismo, e na asma paucigranulocítica. O grupo com resposta não Th2 tem com frequência instalação da doença na idade adulta, é habitualmente insensível à corticoterapia e os factores que estão mais associados a este tipo de resposta são o tabagismo, a exposição a infecções, o ganho de peso, o tratamento com corticóides e a própria diversidade natural¹³².

Fazendo a correspondência do agrupamento dos nossos doentes pela análise *cluster* à sistematização acima descrita (Figura 23), temos que:

- Se associam claramente a resposta Th2 o grupo C5;
- Se associam claramente a resposta não-Th2 o grupo C2;
- Se associam provavelmente a resposta mista mas com predomínio não Th2 o grupo C4 condicionado pelo ganho de peso;
- Se associam provavelmente a resposta mista mas com predomínio Th2 o grupo C1.

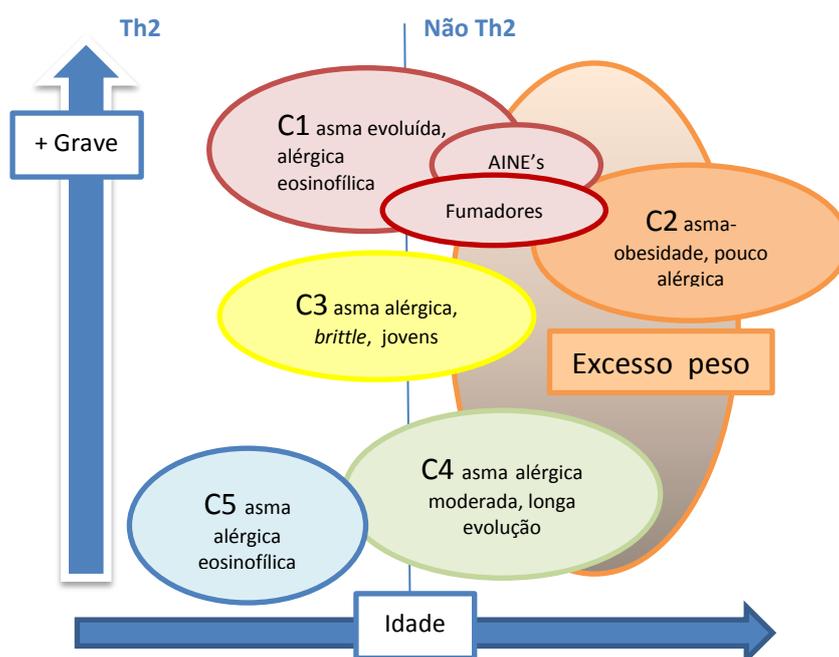


Figura 23- Adaptação esquemática dos nossos *clusters* à representação esquemática de Wenzel¹³²

É importante ter presente que os fenótipos conhecidos, derivados em parte da análise *cluster*, incluindo desta esquematização, podem não ser estáveis no tempo, sofrendo modificações condicionadas por diversos factores, quer internos, quer externos ao doente.

III.5.2 Importância clínica dos resultados e limitações

A importância do agrupamento dos doentes na vida real, segundo as suas características, permite a reflexão sobre os diferentes mecanismos da doença, facilitando melhor e mais atempada abordagem clínica e terapêutica dos doentes.

Esta análise adquire importância suplementar considerando a sua originalidade no contexto nosológico português, sendo o primeiro a aplicar a metodologia *cluster*, em doentes com diferentes graus de gravidade.

As análises *cluster* são relativamente complexas e de difícil interpretação. O facto de termos utilizado na nossa abordagem dois métodos diferentes (método Ward, aplicável apenas a variáveis quantitativas, e método *two-step clustering*, aplicável a variáveis quantitativas e qualitativas) e de ter existido uma boa concordância entre eles, diminui as limitações da metodologia escolhida (Método Ward) e valida empiricamente os nossos resultados.

Outra limitação deste tipo de sistematização é a de, apesar de utilizar métodos matemáticos, adquirir carácter semi-objectivo, já que é orientada por variáveis definidas *a priori* pelos investigadores.

Outro ponto importante diz respeito à aplicabilidade aos cenários clínicos. A nossa metodologia foi utilizada em doentes com diferentes graus de gravidade mas tratados em ambiente hospitalar, pelo que não se aplicará a cenários de cuidados de saúde primários.

III.6 A METABOLÓMICA NA ASMA E NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES URINÁRIOS DE ASMA (grupos de gravidade, fenótipos e *clusters*)

Baseados no facto de que o *stress* oxidativo está aumentado nos asmáticos, com efeitos nos lípidos e proteínas^{73, 77, 277}, foi feita análise metabolómica da urina dos doentes com asma, para avaliar a extensão da peroxidação lipídica e a sua relação com a doença. A peroxidação lipídica, nomeadamente dos ácidos gordos não saturados, leva à formação de hidroperóxidos que depois originam aldeídos e alcanos como produtos finais de degradação do seu metabolismo.

III.6.1 Gravidade da asma

A análise supervisionada das amostras de urina, dirigida à gravidade da doença, mostrou claramente uma segregação dos elementos em grupos de gravidade, quando foi eliminado o efeito confundidor da idade.

A divisão por faixas etárias permitiu distinguir os asmáticos graves dos não graves, com base na análise dos metabolitos provenientes da peroxidação lipídica, sendo que os caracterizadores dos asmáticos graves foram da família dos alcanos (produtos finais da degradação dos lípidos). Como já abordado no *Capítulo I - Introdução*, outros estudos tinham relacionado a resposta inflamatória na asma com o aumento do *stress* oxidativo e libertação de ROS, com consequente dano celular²⁷⁸. Nomeadamente, a alteração do metabolismo lipídico foi já identificada na urina de doentes asmáticos¹⁵⁰, estando ainda mais elevado em períodos de exacerbação⁷⁴.

A análise metabolómica do metabolismo lipídico urinário, dirigida à gravidade da doença, veio mostrar a maior distinção entre grupos, com o aumento da gravidade da asma, já que essa separação foi mais notória nas faixas etárias mais avançadas (se atentarmos na média de idades dos *clusters* identificados podemos concluir que os grupos de maior gravidade tinham média de idades superior).

III.6.2 Clusters

A análise supervisionada das amostras de urina, dirigida aos grupos identificados por análise *cluster*, mostraram claramente que C1, C3 e C5 tinham diferentes extensões de *stress oxidativo*, provavelmente em correlação com os diferentes graus de gravidade. O grupo mais grave (C1), apresentou a maior extensão, expressa no aumento de todos os metabolitos. O C3 (asma *brittle*) caracterizou-se fundamentalmente pelo aumento do hexanal. O hexanal é um aldeído derivado do ácido linoleico (C18:2), ácido gordo polinsaturado usado na biossíntese do ácido araquidónico (AA), e portanto na produção de eicosanóides, que tendem a ser pró-inflamatórios. Alguns destes eicosanóides, como os isoprostanos, produzidos independentemente pela peroxidação do AA na presença de ROS, foram implicados na asma. O 8-iso-PGF2 α é, até ao momento, o mais bem estudado^{72,279}, tendo sido também relacionado com a gravidade da doença. A identificação do hexanal como biomarcador do grupo C3 pode ter implicações terapêuticas, como seja a orientação para o uso de modificadores dos leucotrienos, se for essa a via do ácido araquidónico implicada.

O grupo C5 mostrou a menor extensão de *stress oxidativo*, sem aumento de qualquer dos metabolitos quando comparado com C1 e C3.

Sendo assim, endótipos obtidos pela metabolómica urinária mostraram que alguns *clusters* e características fenotípicas de gravidade da asma podem ser associados com metabolitos específicos da peroxidação lipídica.

Os metabolitos com valores VIP superiores a 1, responsáveis pela diferenciação entre os 3 grupos, foram: hexanal, nonanal, decanal, heptadecano, 2,6,10-trimetilpentadecano, dodecanal, tetradecano, undecanal, tetradecanal, hexadecano.

Potencial e futuramente, a identificação destes 10 metabolitos na urina poderá ser usada para avaliar o *stress oxidativo*, mas serão necessários mais estudos, desenhados para a sua validação.

III.6.3 Relação entre características fenotípicas/*clusters* encontradas e os biomarcadores urinários identificados

Estudos prévios, baseados na metabolómica do ar exalado, reportaram a relação estreita do metabolismo lipídico com a patologia da asma^{280, 281, 282}. Mais recentemente, valores inferiores de FEV₁ foram relacionados com valores mais elevados de produtos de VLDL/LDL, sem diferenças nos padrões metabólicos, tendo em conta o nível de tratamento de CSI²⁸³.

No nosso estudo, os modelos de regressão PLS mostraram que níveis urinários de peroxidação lipídica de doentes com asma conseguiram prever a função respiratória (valores de FEV₁), a inflamação Th2 (FeNO) e a gravidade da doença (SOA), tendo sido identificados os grupos óptimos de metabolitos para essa predição.

Os melhores modelos de predição para cada parâmetro foram feitos tendo em conta, não só a melhor separação de *cluster* obtida (C1, C3 e C5) mas também outros factores: para o modelo de predição de FEV₁, aceitámos a exclusão de C2 e C4 considerando a conhecida pobre relação da asma do obeso com os valores de função pulmonar, podendo ter esta um mecanismo

patobiológico distinto dos outros parâmetros; para o modelo de predição do SOA, o mesmo racional foi considerado; para o modelo de predição do FeNO (C1, C2, C4, C5), aceitámos a exclusão do C3 considerando o seu fenótipo *brittle*, com padrão paucigranulocítico de inflamação, cuja gravidade da asma se relacionou mais com a elevada taxa de exacerbações graves e hospitalizações do que com o estado inflamatório em períodos de estabilidade. Para além disso, mostrou ter um metabolito específico responsável pela sua separação (hexanal).

III.6.4 Importância clínica dos resultados e limitações

A urina é facilmente colectável em todas as idades e em doentes não cooperantes, sendo um meio valioso para análise. O papel dos produtos metabólicos dos lípidos, nas doenças respiratórias, foi já estabelecido e deve ser considerado no esforço dirigido à exploração dos mecanismos da asma e à identificação de biomarcadores.

A análise metabolómica do perfil de peroxidação lipídica dos asmáticos mostrou ser relevante, quer na avaliação da gravidade dos doentes, quer na distinção dos diferentes fenótipos identificados por análise *cluster*, como foi o caso da asma *brittle*. O padrão de *stress* oxidativo e de oxidação lipídica por nós explorado parece ser aplicável à avaliação do estado de oxidação dos asmáticos, salientando-se o facto de existir correlação clara com parâmetros clínicos, permitindo uma abordagem atempada, potencialmente com uso de tratamento anti-oxidante. Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo a abordar a gravidade da asma com análise metabolómica, tendo em conta a abordagem *cluster* e a translação dos resultados para os parâmetros clínicos. Os modelos de regressão PLS mostraram que os seus níveis conseguiram prever a função pulmonar, a inflamação eosinofílica e a gravidade da asma. Esta visão integrada aumenta a especificidade e a robustez da metodologia, quando comparada com o uso de marcadores individuais.

Finalmente, este estudo é relevante porque aponta uma direcção para prosseguirmos com investigação de forma a identificar assinaturas metabolómicas nos asmáticos, de maior robustez que os biomarcadores individuais até agora utilizados.

Apesar da análise metabolómica já ter mostrado resultados positivos no estudo da asma, particularmente em crianças¹⁵⁰ e nas exacerbações da asma⁷⁴, a nossa abordagem foca apenas os marcadores da peroxidação lipídica, podendo outros produtos resultantes do *stress* oxidativo ser relevantes.

Para além disso, existem potenciais confundidores na separação dos *clusters* por PLS-DA como a idade, sendo conhecida a sua interferência com o *stress* oxidativo. No entanto, os dados que atrás discutimos relativos à diferenciação dos grupos de gravidade por faixas etárias, minimiza esse efeito. A obesidade, outro factor associado ao *stress* oxidativo e à inflamação sistémica, pode ser um mecanismo de aumento da gravidade da doença. No entanto, até agora e tendo em conta os dados conflituosos existentes na literatura, não é claro se o aumento do *stress* oxidativo nos asmáticos obesos é em parte consequência da obesidade^{233, 284}.

O efeito confundidor do tratamento com CSI, que poderia interferir na peroxidação lipídica, está limitado pela evidência de outros estudos, que mostraram que a probabilidade do aumento da metilação decorrente dessa terapêutica parece ser baixa²⁸³.

Para além do mais, as análises supervisionadas realizadas minimizam o potencial impacto destes confundidores: a análise supervisionada ao C1, C3 e C5 minimiza o efeito da idade, obesidade e tratamento com CSI (C1 e C3 tinham IMC sobreponível; C3 e C5 idade e dose de tratamento com CSI equivalentes); a análise supervisionada a C2 e C4 minimiza o efeito da idade e da obesidade (idade e IMC sobreponíveis).

Outra limitação é a aplicação dos nossos resultados a todos os cenários clínicos, uma vez que a nossa abordagem foi feita em doentes tratados em cuidados de saúde secundários, podendo não se aplicar nos cuidados de saúde primários.

IV.

CONCLUSÕES

IV.

IV.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO GLOBAL COM ENFOQUE NOS DOENTES GRAVES, SUPORTADA EM PARÂMETROS FUNCIONAIS RESPIRATÓRIOS E LABORATORIAIS IMUNOINFLAMATÓRIOS

Boa parte das características identificadas na população asmática portuguesa em estudo, particularmente na grave, foram amplamente coincidentes com os resultados dos grandes estudos descritos na literatura, assim como o foram as correlações estabelecidas para os parâmetros avaliados. Contudo, encontraram-se igualmente dados inovadores e consistentes com o conhecimento mais actual sobre a doença. Da sua extensa análise e com possível repercussão na nossa prática clínica concluímos:

- A elevada frequência de indivíduos do género feminino nos asmáticos deve-nos alertar para a problemática da asma neste grupo, muitas vezes estigmatizado pela coexistência da síndrome ansiedade-depressão.
- A obesidade deve ser valorizada na abordagem terapêutica da asma dada a frequente coexistência das duas patologias, que se condicionam reciprocamente, e que tem impacto determinante na sintomatologia dos doentes.
- No grupo de doentes não graves houve alguma discordância na avaliação dos sintomas pelo ACT e pelo CARAT, podendo a utilização deste último aumentar o limiar de alerta para risco de eventos futuros, nomeadamente na abordagem de exacerbações em contexto de descontrolo de rinite.
- O controlo da doença foi inferior ao reportado na literatura, muito provavelmente pela concorrência dos vários critérios utilizados. De facto, se considerássemos apenas a pontuação de ACT, onde 56% dos doentes apresentou pontuação igual ou superior a 20, o valor percentual de controlo seria mais elevado e largamente superior ao encontrado pelo estudo de prevalência da asma em Portugal⁶. Estes dados vêm sugerir que, além do controlo da doença suportado na utilização de questionários padronizados, existe enorme interesse na identificação/monitorização de parâmetros relacionados com o risco de eventos futuros na avaliação dos doentes asmáticos, particularmente dos graves e/ou com tendência a exacerbações. Novas ciências como a metabolómica podem ganhar aqui um justo protagonismo.

- O grau de terapêutica inalatória crónica não se afastou do utilizado em outros estudos mas o uso de CSO foi nitidamente inferior. Apesar disso, os marcadores de inflamação eosinofílica mostraram valores inferiores, a ocorrência de exacerbações graves não foi superior e não se registou história de eventos com necessidade de cuidados intensivos. A escolha do melhor esquema de corticoterapia oral é um ponto necessário de reflexão, que mesmo as últimas normas de tratamento para a asma grave (ERS/ATS¹²²) não conseguem responder. Em casos criticamente seleccionados e após ponderar e integrar os parâmetros do controlo da doença, do risco de eventos futuros e dos dados dos biomarcadores disponíveis, deve equacionar-se a necessidade de instituir corticoterapia oral de forma mais aberta e precoce e eventualmente por períodos mais prolongados, como aliás vem equacionado nas últimas normas da GINA (Maio de 2014)³.
- Os dados discutidos relativamente à classificação da gravidade, alertam-nos para a necessidade: 1) do controlo sintomático dos doentes, com enfoque na educação para o uso da corticoterapia de forma adequada; 2) da avaliação alargada da função respiratória com prova de broncodilatação e determinação do volume residual; 3) da sua monitorização, que deve procurar a prevenção/detecção atempada de exacerbações graves, nomeadamente com uso de biomarcadores inovadores, como já por nós demonstrado⁷⁴.
- Os doentes graves diferiram de forma significativa dos não graves na maior ocorrência de pneumonia e de outra doença obstrutiva, no pior controlo da doença, na pior qualidade de vida, no uso de maior grau de CSI e de tiotrópio, na pior função respiratória e no maior grau de eosinofilia periférica. Outros factores importantes na história da doença, como o seu início tardio e a ocorrência de exacerbações graves no último ano, devem fazer aumentar o nosso grau de alerta, e consequentemente de vigilância clínica mais apertada, uma vez que se relacionaram com maior gravidade da doença.
- O questionário de gravidade SOA revelou diferença estatística nas pontuações obtidas para os diferentes grupos de gravidade, devendo ser instrumento útil na nossa rotina de consulta.
- O estudo das correlações entre os parâmetros avaliados na amostra do estudo, vieram adicionar informação relevante ao conhecimento actual, e por nós confirmado, relativamente às já bem estabelecidas correlações entre a pior função respiratória dos asmáticos e a maior idade, mais anos de evolução da doença, maior gravidade e história de pneumonia. A estas, juntámos a correlação com o género masculino e com a pontuação no questionário de gravidade SOA, reforçando a utilidade do seu uso mais generalizado aos cuidados de saúde primários (por ser de fácil aplicabilidade e com pouca necessidade de recursos, já que não implica o desejável, mas nem sempre realizado estudo funcional respiratório).
Também importantes foram os achados da correlação da eosinofilia periférica com a gravidade da doença, o seu início tardio e a pior qualidade de vida. Estes dados adquirem particular relevância por poderem auxiliar o clínico na identificação de doentes potencialmente mais graves.

IV. 2 IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS CELULARES DA EXPECTORAÇÃO NUMA POPULAÇÃO DE ASMÁTICOS E SUAS CORRELAÇÕES COM PARÂMETROS CLÍNICOS, FUNCIONAIS E LABORATORIAIS

O fenótipo eosinofílico foi identificado como o mais prevalente, seguido do misto. A identificação deste fenótipo pela contagem de células da expectoração induzida parece ser útil na identificação da actividade eosinofílica e pode ser usado para guiar terapêuticas (como sugerido pelas normas da GINA³ para os doentes no grau 5 de tratamento). Para além dos neutrófilos e eosinófilos, outras células merecem maior investigação, como os macrófagos (pelo seu papel anti-inflamatório) e as células dendríticas, podendo vir a ser futuros alvos terapêuticos.

Das correlações estabelecidas, a relação da percentagem de neutrófilos com o FEV₁ basal ressalta o impacto da neutrofilia nos processos de acentuada obstrução brônquica.

IV. 3 CARACTERIZAÇÃO DOS FENÓTIPOS CLÍNICOS DA POPULAÇÃO E POTENCIAIS FACTORES DE RISCO E DE PROTECÇÃO, COM BASE EM MODELOS DE PREDIÇÃO

Concluimos da caracterização dos fenótipos estudados que os doentes atópicos são mais jovens, têm idade de início de doença mais precoce, menor ocorrência de história de pneumonia e melhor qualidade de vida que os não atópicos; os com asma de início após os 12 anos de idade são mais obesos, menos atópicos, têm pior controlo da doença, pior qualidade de vida e maior gravidade da doença que os doentes com idade de início antes dos 12 anos; os que apresentam HS a AINE's têm maior prevalência de polipose nasal, pior qualidade de vida e menor inflamação brônquica eosinofílica; os com excesso de peso, apesar do maior grau de terapêutica, apresentam menor controlo da doença, pior qualidade de vida e maior grau de gravidade que os doentes sem excesso de peso; os com obstrução persistente têm menor controlo da doença e maior coexistência de outras doenças obstrutivas, naturalmente com pior função respiratória que os doentes sem obstrução persistente.

Em relação aos factores de risco/protecção para a ocorrência dos fenótipos avaliados, foram corroboradas, na nossa amostra, muitas das características definidoras de fenótipos já conhecidas de outros estudos. Adicionámos ainda preditores inovadores e importantes, podendo ter impacto na comunidade científica. Para os vários fenótipos estudados realçamos como factores de risco para a sua ocorrência:

- I) No *atópico* - início precoce da doença, melhor controlo da doença, menor grau de terapêutica.
- II) No *asma com início após 12 anos* - género masculino, obstrução persistente da via aérea, maior percentagem de eosinófilos no sangue e da pontuação no SOA.
- III) No *hipersensibilidade a AINE's* – polipose nasal e maior gravidade da doença.
- IV) No *obstrução persistente da via aérea* – género masculino, maior intensidade de terapêutica, pior função respiratória, maior gravidade da doença e inflamação neutrofílica da via aérea.

V) No *grave* – percentagem de eosinofilia no sangue periférico.

Como factores de protecção para a sua ocorrência:

I) No *atópico* - história de pneumonia, presença de outra doença obstrutiva, doença grave.

II) No *asma com início após 12 anos* - atopia.

III) No *obstrução persistente da via aérea* – início da doença antes dos 12 anos.

IV.4 AGRUPAMENTO DA POPULAÇÃO EM *CLUSTERS* E SUAS CARACTERÍSTICAS

A importância do agrupamento dos doentes na vida real, segundo as suas características, permite a reflexão sobre os diferentes mecanismos da doença, podendo ajudar numa melhor condução diagnóstica e numa mais atempada abordagem terapêutica.

Esta análise pode adquirir importância suplementar, dada a originalidade no contexto nosológico português, sendo o primeiro que conhecemos a aplicar a metodologia *cluster*, em doentes com diferentes graus de gravidade.

Para os 5 *clusters* de asmáticos identificados, foi evidente na sua caracterização a sobreposição com outros estudos (C1, C2 e C5), trazendo os grupos C3 e C4 alguma novidade. C1 correspondeu ao grupo de doentes com asma de início tardio, evoluída, com obstrução da via aérea e de maior gravidade; C2 ao grupo de predomínio feminino, com asma de início tardio, obesidade marcada e menor grau de atopia; C3 identificou um grupo de doentes com asma intermitente, cuja gravidade se prende com a ocorrência de exacerbações graves; C4 correspondeu a um grupo com provável alteração de fenótipo inicial (eosinofílico) pela presença de obesidade; C5 correspondeu ao de asma ligeira, alérgica, eosinofílica e de início precoce.

Algumas das características que mostraram significado para a separação dos *clusters* (como a idade, o excesso de peso, a gravidade e a eosinofilia periférica) são relevantes na medida em que permitem a adaptação dos resultados aos endótipos actualmente descritos na literatura (Th2*Hi* e Th2*Lo*).

IV. 5 A METABOLÓMICA NA ASMA GRAVE E NA IDENTIFICAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DA ASMA (grupos de gravidade, fenótipos e *clusters*)

A análise metabolómica do perfil de peroxidação lipídica dos asmáticos mostrou ser relevante, quer na avaliação da gravidade dos doentes, quer na distinção dos diferentes fenótipos identificados, como foi o caso da asma *brittle*. Em relação à gravidade da doença, obteve-se separação clara por grupos de gravidade tendo em conta a faixa etária, identificando-se como responsáveis por essa separação um grupo de compostos relacionados com a peroxidação lipídica. Na identificação de *clusters*, obteve-se separação clara dos grupos C1, C3 e C5, passíveis de serem organizados pela extensão da peroxidação lipídica (C1>C3>C5), com identificação dos compostos responsáveis por essa separação.

A identificação do hexanal como biomarcador do grupo C3 pode ter implicações terapêuticas, reforçando a orientação para o uso de modificadores dos leucotrienos.

Demonstrámos ainda que os níveis de peroxidação lipídica patentes nos perfis metabolómicos urinários destes doentes podem prever a função respiratória (FEV₁), a inflamação Th2 (FeNO) e a gravidade (SOA). Os endótipos obtidos pela metabolómica urinária mostraram que alguns *clusters* e características fenotípicas de gravidade da asma podem ser associados com metabolitos específicos da peroxidação lipídica.

Em síntese, a partir da investigação realizada e com o apoio de modelos matemáticos, descrevemos para a população portuguesa parâmetros do **doente** (género, idade, IMC), da **doença** (início, evolução e duração; ocorrência de exacerbações; intensidade dos sintomas clínicos e de terapêutica instituída), das **comorbilidades** (como atopia, rinite, obesidade, tabagismo, RGE, hipersensibilidade a AINE's, ansiedade/depressão), de **ferramentas de avaliação de controlo e gravidade da doença** e de **qualidade de vida** (ACT, CARAT, SOA e ALQ) da **função respiratória** (obstrução, reversibilidade, insuflação) e **laboratoriais** (FeNO, celularidade da expectoração e perfil metabolómico urinário) que, na sua complexa interrelação, interpretam a doença e o seu risco futuro e que, por isso, devem ser valorizados no acompanhamento clínico do doente asmático.

V.

PUBLICAÇÕES



PUBLICAÇÕES

Do trabalho científico relacionado com esta dissertação resultou a publicação dos seguintes artigos científicos:

- Loureiro CC, Duarte IF, Gomes J, Carrola J, Barros AS, Gil AM, Bousquet J, Bom AT, Rocha SM. Urinary metabolomic changes as a predictive biomarker of asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jan;133(1):261-3.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.004. **(Factor de impacto 12.05)**
- Loureiro CC, Bousquet J, Todo Bom A, Rocha SM. Reply. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 May;133(5):1499. doi: 10.1016/j.jaci.2014.02.011. Epub 2014 Mar 27. **(Factor de impacto 12.05)**
- Loureiro CC, Caldeira M, Rocha S, Todo-Bom A, Loureiro M. Metabolomic applied to omalizumab effect in severe asthmatics – a preliminary result. *Clinical and Translational Allergy.* 05/2013; 3(1). doi: 10.1186/2045-7022-3-S1-P26 **(Open access, peer-review)**

Outro está em processo de submissão:

- “Metabolomic endotypes of severe asthma clusters” dos autores Cláudia Chaves Loureiro, Pedro Sá-Couto, Ana Sofia Oliveira, Francisco Matos, Magda Santos, Alisa Rudnitskaya, Ana Todo-Bom, Jean Bousquet, Sílvia M. Rocha.

VI.

BIBLIOGRAFIA

VI.

BIBLIOGRAFIA

1. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006;355:2226-35.
2. Haldar P, Pavord I, Shaw D, Berry M, Thomas M, Brightling C, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:218-24.
3. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2012. Updated 2014. [citado em 2014, 02 de Junho]. Disponível na Internet em: <http://www.ginasthma.org/>.
4. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma. current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-2351.
5. Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, Aït-Khaled N, Baena-Cagnani CE, Bleecker ER, et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:926-938.
6. Morais-Almeida M, Fonseca J, Bugalho A. Cap. 2 Epidemiologia da asma. Em *Recomendações para Diagnóstico e Terapêutica da Asma Grave em Portugal*, 1 ed. Lisboa: Marianela Vaz. Grupo Keypoint; 2010.
7. Bourdin A, Halimi L, Vachier I, Paganin F, Lamouroux A, Gouita M, et al. Adherence in severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2012;42:1566-1574.
8. Pascual R, Peters S. The irreversible component of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:883-90.
9. Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. *Chest* 2002;121:1051-7.
10. Contoli M, Baraldo S, Marku B, Casolari P, Marwick JA, Turato G. Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: 5-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:830-7.
11. Bugalho A, Covas A, Prates L, Fragoso E. Internamento e mortalidade intra-hospitalar por asma em Portugal Continental (2000-2007). *Rev Port Pneumologia* 2009;15:367-83.
12. Rosado Pinto J, Nunes C, Chieira ML, Pinheiro JA, Santos JL, Praça F, et al. ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood. – O projecto mundial e a sua expressão em Portugal. Em: Rosado Pinto J, Morais Almeida M (Eds.). *A Criança Asmática no Mundo da Alergia*. Euromédice, Edições Médicas Lda; 2003:37-40.
13. Loureiro C, Todo-Bom A, Pereira C, Delgado L, Miranda M, Morais-Almeida M, et al. Prevalência de rinite e de asma em Portugal. *Rev Port Imunoalergologia* 2003;11:324.
14. Jarvis D, Newson R, Lotvall J, Hastan D, Tomassen P, Keil T, et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GALEN survey in Europe. *Allergy* 2012;67:91-98.
15. Sá-Sousa, Morais-Almeida M, Azevedo LF, Carvalho R, Jacinto T, Todo-Bom A, et al. Prevalence of asthma in Portugal - The Portuguese National Asthma Survey. *Clin Transl*

- Allergy 2012;2(1):15.
16. World health rankings. [Internet]. 2013 [citado em 2013, 21 de Junho]. Disponível em <http://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/asthma/by-country/>.
 17. Gaspar A, Morais-Ameia M, Nunes C. Epidemiologia da asma grave. Rev Port Imunoalergologia 2006; 14 (2):27-41.
 18. Relatório do Observatório Nacional das Doenças Respiratórias. 2013 - Prevenir a doença, acompanhar e reabilitar o doente. Relator: A. Teles de Araújo.
 19. Trend in Asthma Morbidity and Mortality. American Lung Association. Epidemiology and Statistics Unit, Research and Health Education Division. 2012.
 20. Bradding P, Walls A, Holgate S. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. J Allergy Clin Immunol 2006;117(6):1277-84.
 21. Sismanopoulos N, Delivanis D-A, Mavrommati D, Hatziagelaki E, Conti P, Theoharides TC. Do mast cells link obesity and asthma? Allergy 2013;68: 8–15.
 22. Enoksson M, Lyberg K, Moller-Westerberg C, Fallon PG, Nilsson G, Lunderius-Andersson C. Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. J Immunol 2011;186:2523–2528.
 23. Moulin D, Donze O, Talabot-Ayer D, Mezin F, Palmer G, Gabay C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. Cytokine 2007;40(3):216-25.
 24. Piconese S, Gri G, Tripodo C, Musio S, Gorzanelli A, Frossi B et al. Mast cells counteract regulatory T-cell suppression through interleukin-6 and OX40/OX40Laxis toward Th17-cell differentiation. Blood 2009; 114:2639–2648.
 25. Wenzel S, Balzar S, Cundall M, Chu H. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation and wound repair. J Allergy Clin Immunol 2003;111:1345-52.
 26. Anderson CK, Tufvesson E, Aronsson D, Bergavist A, Mori M, Bjermer L, et al. Alveolar mast cells shift to an FcεRI expressing phenotype in mild atopic asthma: a novel feature in allergic asthma pathology. Allergy 2011;66:1590–1597.
 27. Balzar S, Fajt M, Comhair S, Erzurum S, Bleecker E, Busse W, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma: data from the Severe Asthma Research Programm. Am J Respir Crit Care Med 2011;183:299-309.
 28. Camarda L, Grayson M. Can specific IgE discriminat betweene intrinsic and atopic asthma? Am J Respir Crit Care Med 2011;184:152-153
 29. Glich GJ. Mecanismos of eosinophil-associated inflammation. J Allergy Clin Immunol 2000;105: 651-63.
 30. Holgate S. Pathogenesis of asthma. Clinical and Experimental Allergy 2008;38:872-897.
 31. Kay A. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. Trends Mol Med 2005;11:148-52.
 32. Shamri R, Xenakis J, Spencer L. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. Cell Tissue Res 2011;343:57–83.
 33. Schwartz N, Grossman A, Levy Y, Schwarz Y. Correlation between eosinophil count and methacholine challenge test in asymptomatic subjects. J Asthma 2012;49:336–341.
 34. Leckie M, Brinke A, Khan J. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airways hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. Lancet 2000;356:2144-8.
 35. Holgate S. Mechanisms of allergy and adult asthma. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2001;1:47–50.
 36. Venge P. The eosinophil and airway remodelling in asthma. Clin Respir J 2010;4:5–19.
 37. Halwani R, Vazquez-Tello A, Sumi Y, Pureza MA, Bahammam A, Al-Jahdali H, et al.

- Eosinophils induce airway smooth muscle cell proliferation. *J Clin Immunol* 2013;33:595–604.
38. Vignola A, Gjomarkaj M, Arnoux B, Bousquet J. Monocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101: 149-52.
 39. Sher E, Leung D, Surs W, Kam JC, Zieg G, Kamada AK, et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest* 1994;93:33-9.
 40. Zeibecoglou K, Yng S, Meng Q, Poluter L, Robinson D, Kay A. Macrophage subpopulation and macrophage-derived cytokines in sputum of atopic and nonatopic asthmatic subjects and atopic and normal control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:697-704.
 41. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 2009;183:6469–6477.
 42. Kim H, DeKruyff R, Umetsu D. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2010;11(7):577–584.
 43. Careau E, Bissonnette EY. Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2004;31:22–27.
 44. Prussin C, Metcalfe D. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2):S450-S456.
 45. Marone G, Triggiani M, de Paulis A. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma?. *Trends Immunol* 2005;26:25-31.
 46. Baines KJ, Simpson JL, Bowden NA, Scott RJ, Gibson PG. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. *Eur Respir J* 2010;35:522–531.
 47. Barnes PJ. New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1055-62.
 48. Meyts I, Hellings P, Hens G. IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma. *J Immunol* 2006;177:6460-70.
 49. Bradding P, Walls A, Holgate P. The role of mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;117:1277-84.
 50. Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax* 2006;61,202-8.
 51. Subrata LS, Bizzantino J, Mamessier E, Bosco A, McKenna KL, Wikström ME, et al. Interactions between innate antiviral and atopic immune-inflammatory pathways precipitate and sustain asthma exacerbations in children. *J Immunol* 2009;183:2793–2800.
 52. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426–430.
 53. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of TH2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 2005;174:8183–8190.
 54. Letuve S, Lajoie-Kadoch S, Audusseau S, Rothenberg ME, Fiset PO, Ludwig MS, et al. IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:590–596.
 55. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1484– 1490.

56. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 2003;97:726–733
57. Ying S, Meng Q, Corrigan C, Lee T. Lack of fillagrin expression in the human bronchial mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1386-8.
58. Morrison D, Raham I, MacNee W. Permeability, inflammation and oxidant status in airspace epithelium exposed to ozone. *Respir Med* 2006;100: 2227-34.
59. Morcillo E, Cortijo J. Mucus and MUC in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2006;12:1-6.
60. Gupta S, Siddiqui S, Haldar P, Raj JV, Entwisle JJ, Wardlaw AJ, et al. Qualitative analysis of high-resolution CT scans in severe asthma. *Chest* 2009;136:1521-8.
61. Blakey J, Halapi E, Bjornsdottir US, Wheatley A, Kristinsson S, Upmanyu R, et al. Contribution of ADAM 33 polymorphisms to the population risk of asthma. *Thorax* 2005;60:274-6.
62. Melén E, Pershagen G. Pathophysiology of asthma: lessons from genetic research with particular focus on severe asthma. *Journal of Internal Medicine* 2012;272:108-120.
63. Bousquet J, Jacot W, Yssel H, Vignola A, Humbert M. Epigenetic inheritance of fetal genes in allergic asthma. *Allergy* 2004;59:138-47.
64. Holgate ST. Cap. 15. Epithelial mesenchymal communication in the pathogenesis of severe asthma. Em: Chung KF, Bel EH, Wenzel SE, eds. *Difficult-to-treat Severe Asthma*. *Eur Respir Monogr* 2011; 51:200–207.
65. Chetta A, Zanini A, Foresi A. Vascular endothelial growth factor upon regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1437-42.
66. Kay A, Ali F, Heaney L, Benyahia F, Soh CP, Renz H, et al. Airway expression of calcitonin gene related peptide in T-cell peptide-induced late asthmatic reactions in atopics. *Allergy* 2007;62:495-503.
67. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications of cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2007;47:143-183.
68. Wood L, Gibson P, Garg M. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J* 2003;21:177-186
69. Raham I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung disease. *J Biochem Mol Biol* 2003;36(1):95-109.
70. Zuo L, Nogueira L, Hogan M. Reactive oxygen species formation during tetanic contractions in single isolated *Xenopus* myofibers. *J Appl Physiol* 2011;111(3):898-904.
71. Nabe T, Ikedo A, Hosokawa F, Kishima M, Fujii M, Mizutani N, et al. Regulatory role of antigen-induced interleukin-10, produced by CD4+ T cells, in airway neutrophilia in a murine model for asthma. *Eur J Pharmacol* 2012;677(1-3):154-62.
72. Montuschi P, Corradi M, Cabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate in asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160: 1947-1951.
73. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1450–1454.
74. Loureiro CC, Duarte I, Gomes J, Carrola J, Barros AS, Gil AM, et al. Urinary metabolomic changes as a predictive biomarker of asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 2014 Jan;133(1):261-3.e1-5.
75. Loureiro CC, Couto PS, Oliveira AS, Matos F, Santos M, Rudnitskaya A, et al. Metabolomic validation of asthma clusters. Em submissão.
76. Ricci K, Arroliga M, Lara A, Dweik R, Song W, Hazen S, et al. Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(3):306-13.

77. Mauad T, Poon A, Hamid Q. Cap 7. Pathology, inflammation and cytokines of severe asthma. Em: Chung KF, Bel EH, Wenzel SE, eds. *Difficult-to-treat Severe Asthma*. Eur Respir Monogr 2011; 51:97-106.
78. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1185-7.
79. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1293-8.
80. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, et al. Differences in airway remodelling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:544-9.
81. Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, et al. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest*. 2008;133:420-6.
82. Poon AH, Eidelman DH, Martin JG, Laprise C, Hamid Q. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2012;42(5):625-37.
83. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 Sep 1;180(5):388-95.
84. Dente FL, Carnevali S, Bartoli ML, Cianchetti S, Bacci E, Di Franco A, et al. Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:312-20.
85. Préfontaine D, Nadigel J, Chouiali F, Audusseau S, Semlali A, Chakir J, et al. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:752-4.
86. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased sérum IL-17 is an independent risk for severe asthma. *Respir Med* 2010;104: 4531-7.
87. Reijmerink NE, Postma DS, Bruinenberg M, Nolte IM, Meyers DA, Bleecker ER, et al. Association of IL1RL1, IL18R1, e IL18RAP with asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:651-4.
88. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2006;111:476-94.
89. Brightling CE, Gupta S, Gonen S, Siddiqui S. Lung damage and airway remodelling in severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2012;42(5):638-49.
90. Jarjour NN, Erzurum SC, Bleecker ER, Calhoun WJ, Castro M, Comhair SA, et al; NHLBI Severe Asthma Research Program (SARP). Severe asthma: lessons learned from the National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(4):356-62.
91. Thomas B, Rutman A, Hirst RA, Haldar P, Wardlaw AJ, Bankart J, et al. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(4):722-729.
92. Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, Palmer LJ, Marigowda G, Israel E; Severe Asthma Research Program, National Heart, Lung, and Blood Institute. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(7):824-30.
93. Kupczyk M, Wenzel SE. U.S. and European severe asthma cohorts: what can they teach us about severe asthma? *J Intern Med* 2012;272(2):121-32.
94. Eisner M, Yegin A, Trzaskoma B. Severity of asthma score predicts clinical outcomes in patients with moderate to severe persistent asthma. *Chest* 2012;141(1):58-65.

95. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:59-99.
96. Bousquet J. "Severe asthma – a new definition?" Conferência em: Reunião Anual da SPAIC, Albufeira 2009.
97. Weiss S, Tantisira K. Cap. 8. Pharmacogenetics of asthma. Em: Cezmi Akdis, Iona Agache, eds. *Global Atlas of Asthma*. Published by EAACI; 2013.
98. March M, Sleiman P, Hakonarson H. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. *Int J Gen Med* 2013;6:253-265.
99. Annesi-Maesano I. Cap. 12 Environmental risk factors for asthma. Em: Cezmi Akdis, Iona Agache, eds. *Global Atlas of Asthma*. Published by EAACI; 2013.
100. Arrobas A, Todo-Bom A, Almeida J, Vaz M. Cap. 4. Diagnóstico e orientação inicial. Em: *Recomendações para Diagnóstico e Terapêutica da asma Grave em Portugal*, 1 ed. Lisboa: Marianela Vaz. Grupo Keypoint; 2010.
101. Papadopoulos N, Christodoulou I, Rohde G, Agache I, Almqvist C, Bruno A, et al. Viruses and bacteria in acute asthma exacerbation - a GA²LEN-DARE systematic review. *Allergy* 2011;66: 458-68.
102. Bousquet J, Vignola A, Demoly P. Links between rhinitis and asthma. *Allergy* 2003;58:691-706.
103. Pakdaman MN, Luong A. The links between chronic rhinosinusitis and asthma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;19:218-33.
104. Bilodeau I, Boulay M, Prince P, Boisvert P, Boulet P. Comparative clinical and airway inflammatory features of asthmatics with or without polyps. *Rhinology* 2010;48: 420-5.
105. Low K, Lau KK, Holmes P, Crossett M, Vallance N, Phyland D, et al. Abnormal vocal cord function in difficult to treat asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:2-3.
106. Van Lieshout R, Macqueen G. Psychological factors in asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2008;4:12-28.
107. Havemann B, Henderson C, El-Serag H. The association between gastro-oesophageal reflux disease and asthma: a systematic review. *Gut* 2007;56:1654-64.
108. Mastrorade JG, Anthonisen NR, Castro M, Holbrook JT, Leone FT, Teague WG, et al. American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. Efficacy of esomeprazole for treatment of poorly controlled asthma. *N Engl J Med* 2009;360(15):1487-99.
109. Sharma B, Feinsilver S, Owens R, Malhotra A, McSharry D, Karbowitz S. Obstructive airway disease and obstructive sleep apnea: effect of pulmonary function. *Lung* 2011;189:37-41.
110. Mosen DM, Schatz M, Magid DJ, Camargo CA Jr. The relationship between obesity and asthma severity and control in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep;122(3):507-11.
111. Farah C, Salome C. Asthma and obesity: A known association but unknown mechanism. *Respirology* 2012;17(3):412-421.
112. Sutherland TJ, Cowan JO, Young S, Goulding A, Grant AM, Williamson A, et al. The association between obesity and asthma: interactions between systemic and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 Sep;178(5):469-75.
113. Shore SA. Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008 May;121(5):1087-93.
114. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, Larsen K, Skadhauge LR, Steffensen I, et al. The

- incidence of asthma in young adults. *Chest* 2005;127: 1928–34.
115. Lugogo N, Kraft M, Dixon A. Does obesity produce a distinct asthma phenotype? *J Appl Physiol* 2010;108:729-734.
 116. Eneli IU, Skybo T, Camargo CA Jr. Weight loss and asthma: a systematic review. *Thorax* 2008;63:671–6.
 117. Kowalski ML, Makowska JS, Blanca M, Bavbek S, Bochenek G, Bousquet J, et al. Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) - classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA and GA²LEN/HANNA. *Allergy*. 2011 Jul;66(7):818-29.
 118. Brightling CE, Gupta S, Gonem S, Siddiqui S. Lung damage and airway remodelling in severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2012 May;42(5):638-49.
 119. Bousquet J, Dahl R, Khaltaev N. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. *Eur Respir J* 2007;29:233-239.
 120. Wenzel SE. Cap. 4. Characteristics, definition and phenotypes of severe asthma. Em: Chung KF, Bel EH, Wenzel SE, eds. *Difficult-to-treat Severe Asthma*. *Eur Respir Monogr* 2011;51:50–58.
 121. Bel EH, Sousa A, Fleming L, Bush A, Chung KF, Versnel J, et al. Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome (U-BIOPRED) Consortium, Consensus Generation. Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). *Thorax*. 2011 Oct;66(10):910-7
 122. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014 Feb;43(2):343-73
 123. Moore W, Meyers D, Wenzel S, Teague W, Li H, Li X, et al. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:315–323.
 124. Barata LT, Segorbe-Luís A, Inácio F. Cap. 3. Fenótipos de asma grave. Em *Recomendações para Diagnóstico e Terapêutica da asma Grave em Portugal*, 1 ed. Lisboa: Marianela Vaz. Grupo Keypoint; 2010.
 125. Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, et al. Polymorphisms in the IL-4, IL-4RA, and FCεR1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:135–40.
 126. ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Factors associated with persistente airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Sep;164(5):744-8.
 127. Plleyn L, Newton R, Adcock I, Barnes P. TGF-beta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet* 2001 Dec;109:623-7.
 128. Ito K, Caramori G, Lim S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, et al. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Aug 1;166(3):392-6.
 129. Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, et al. Pathological features and inhaled corticosteroids response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*. 2007 Dec;62(12):1043-9.
 130. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Sep;160(3):1001-8.
 131. Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* 2012 Jul;67(7):835-46.

132. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012 May 4;18(5):716-25.
133. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008 Sep 20;372(9643):1107-19.
134. Wenzel SE. Complex phenotypes in asthma: current definitions. *Pulm Pharmacol Ther* 2013 Dec;26(6):710-5.
135. The ENFUMOSA Study Group. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. *Eur Respir J* 2003;22:470-7.
136. Dolan CM, Fraher KE, Bleecker ER, Borish L, Chipps B, Hayden ML, et al. TENOR Study Group. Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004 Jan;92(1):32-9.
137. Hastie A, Moore WC, Meyers DA, Vestal PL, Li H, Peters SP, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 May;125(5):1028-1036.e13.
138. Wang F, He XY, Baines KJ, Gunawardhana LP, Simpson JL, Li F, et al. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur Respir J* 2011 Sep;38(3):567-74.
139. Kikuchi S, Nagata M, Kikuchi I, Hagiwara K, Kanazawa M. Association between neutrophilic and eosinophilic inflammation in patients with severe persistent asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;137 Suppl 1:7-11.
140. Slager RE, Li X, Meyers DA, Bleecker ER. Cap. 6. Recent developments in the genetics of asthma susceptibility and severity. Em: Chung KF, Bel EH, Wenzel SE, eds. *Difficult-to-treat Severe Asthma*. *Eur Respir Monogr* 2011;51:82-96.
141. Haselkorn T, Fish JE, Zeiger RS, Szefler SJ, Miller DP, Chipps BE, et al. TENOR Study Group. Consistently very poorly controlled asthma, as defined by the impairment domain of the Expert Panel Report 3 guidelines, increases risk for future severe asthma exacerbations in The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study. *J Allergy Clin Immunol* 2009 Nov;124(5):895-902.e1-4.
142. Macedo P, Hew M, Torrego A, Jouneau S, Oates T, Durham A, et al. Inflammatory biomarkers in airways of patients with severe asthma compared with non-severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2009 Nov;39(11):1668-76.
143. Wheelock C, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ, et al. U-BIOPRED Study Group. Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J*. 2013 Sep;42(3):802-25.
144. Adamko DJ, Sykes BD, Rowe BH. The Metabolomics of Asthma. Novel Diagnostic Potential. *Chest* 2012 May;141(5):1295-302.
145. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011 Sep 22;365(12):1088-98.
146. Clarke DL, Dakshinamurti S, Larsson AK, Ward JE, Yamasaki A. Lipid metabolites as regulators of airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther* 2009 Oct;22(5):426-35.
147. Kupczyk M, Lundstrom S, Dahlen B, et al. Cap. 17. Lipid mediators in severe asthma. Em: Chung KF, Bel EH, Wenzel SE, eds. *Difficult-to-treat Severe Asthma*. *Eur Respir Monogr* 2011; 51: 218–23.
148. Daham K, Song WL, Lawson JA, Kupczyk M, Gülich A, Dahlén SE, et al. Effects of

- celecoxib on major prostaglandins in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2011 Jan;41(1):36-45.
149. Lundström SL, Balgoma D, Wheelock ÅM, Haeggström JZ, Dahlén SE, Wheelock CE. Lipid mediator profiling in pulmonary disease. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Jul;12(7):1026-52.
 150. Saude E, Skappak C, Regush S. Metabolomic profiling of asthma: Diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:757-64.
 151. Mattarucchi E, Baraldi E, Guillou C. Metabolomics applied to urine samples in childhood asthma; differentiation between asthma phenotypes and identification of relevant metabolites. *Biomed Chromatogr* 2012 Jan;26(1):89-94.
 152. Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, de Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 Dec;180(11):1076-82.
 153. Ambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 2009; 31:412–424.
 154. Forsythe, I. J., Wishart, D. S. 2009. Exploring human metabolites using the Human Metabolome Database. *Current Protocols in Bioinformatics*. 25:14.8.1–14.8.45.
 155. Wenzel S. Severe asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:149–160.
 156. Scheaffer, RL, Mendenhall, W, Ott, L Gerow, K. Elementary survey sampling, 7th edition. Boston: Cengage learning; 2012.
 157. Rice J, *Mathematical Statistics and Data Analysis*, 2nd edition. Duxbury Press; 1995.
 158. Kallenberg, O. *Foundations of Modern Probability*. New York: Springer-Verlag; 1997.
 159. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. National Asthma Education and Prevention Program. *J Allergy Clin Immunol* 2007 Nov;120(5 Suppl):S94-138.
 160. Global Initiative for Asthma 2002. Update from Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report 1995. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute; 2002. [citado em 2013, 23 de Novembro]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org/>.
 161. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O’Byrne PM, Anderson SD, et al. Airway responsiveness: standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report of the Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993;16:53–83.
 162. Winder JA, Nash K, Brunn JW. Validation of a life quality test for asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85(6):467–472.
 163. Heinzerling L, Frew AJ, Bindselev-Jensen C, Bonini S, Bousquet J, Bresciani M, et al. Standard skin prick testing and sensitization to inhalant allergens across Europe a survey from the GA²LEN network. *Allergy*. 2005;60(10):1287- 300.
 164. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, et al. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319–338.
 165. Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005;26:511–522.
 166. Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2104–2117.
 167. Gibson PG, Wang F, He X, Brightling CE. Cap. 16. Noninvasive assessment of inflammation in severe asthma. Em: Chung KF, Bel EH, Wenzel SE , eds. *Difficult-to-*

- treat Severe Asthma. *Eur Respir Monogr* 2011; 51,208–217.
168. Hancox RJ, Cowan DC, Aldridge RE, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, et al. Asthma phenotypes: consistency of classification using induced sputum. *Respirology* 2012 Apr;17(3):461-6.
169. Brooks CR, Gibson PG, Douwes J, Van Dalen CJ, Simpson JL. Relationship between airway neutrophilia and ageing in asthmatics and non-asthmatics. *Respirology* 2013 Jul;18(5):857-65.
170. Rocha SM, Caldeira M, Carrola J, Santos M, Cruz N, Duarte IF. Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *J Chromatogr A* 2012;1252,155-163.
171. Ball GH, Hall DJ. A clustering technique for summarising multivariate data. *Behav Sci* 1967;12:153–155.
172. Leardi R. Genetic algorithms in chemistry. *J Chromatogr A* 2007;1158:226–33.
173. Paszkowicz W. Genetic algorithms, a nature-inspired tool: a survey of applications in materials science and related fields: Part II. *Mater Manuf Process* 2013;28:708-25.
174. Chipperfield AJ, Fleming PJ. The MATLAB genetic algorithm toolbox. Em: *Proceedings of IEE Colloquium on Applied Control Techniques Using MATLAB*, 1995;10/1-10/4.
175. Kupczyk M, Hague S, Middelveld R, Dahlen B, Dahlen SE. On behalf of the BIOAIR group. Identification of risk factors for frequent exacerbations in severe asthma. Trabalho apresentado em *American Thoracic Society International Conference 2012*, em 20 de Maio de 2012, San Francisco, California.
176. Jarvis D, Chinn S, Potts J, Burney P. On behalf of the European Community Respiratory Health Survey. Association of body mass index with respiratory symptoms and atopy. *Clin Exp Allergy* 2002;32:831-37.
177. Scott HA, Gibson PG, Garg ML, Wood LG. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. *Eur Respir J* 2011 Sep;38(3):594-602.
178. Leggett JJ, Johnston BT, Mills M, Gamble J, Heaney LG. Prevalence of gastroesophageal reflux in difficult asthma: relationship to asthma outcome. *Chest* 2005;127:1227–1231.
179. Harding SM, Guzzo MR, Richter JE. The prevalence of gastroesophageal reflux in asthma patients without reflux symptoms. *Am J Resp Crit Care Med* 2000;162:34-9.
180. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Apr 1;175(7):661-6.
181. Saint-Pierre P, Bourdin A, Chanez P, Daures JP, Godard P. Are overweight asthmatics more difficult to control? *Allergy* 2006;61:79–84.
182. Boulet LP, Franssen E. Influence of obesity on response to fluticasone with or without salmeterol in moderate asthma. *Respir Med* 2007;101:2240–2247.
183. Sly PD, Boner AL, Björkstén B, Bush A, Custovic A, Eigenmann PA, et al. Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children. *Lancet*. 2008 Sep 20;372(9643):1100-6.
184. Smith H. Cap. 17. Psychological factors and asthma. Em: Cezmi Akdis, Iona Agache, eds. *Global Atlas of Asthma*. Published by EAACI; 2013.
185. Demoly P, Annunziata K, Gubba E, Adamek L. Repeated cross-sectional survey of patient-reported asthma control in Europe in the past 5 years. *Eur Respir Rev*. 2012 Mar 1;21(123):66-74.
186. Moore W, Bleeker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Ameredes BT, Bacharier L, et al. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and

- Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Feb;119(2):405-13.
187. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002 Nov 30;360(9347):1715-21.
188. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of a subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002;57:875–879.
189. Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson DS, Durham SR, Chung KF, et al. Increase in exhaled nitric oxide levels in patients with difficult asthma and correlation with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Asthma and Allergy Group. Thorax.* 1998 Dec;53(12):1030-4.
190. Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35(9):1175-9.
191. Brusselle GG, Kraft M. Trustworthy guidelines on severe asthma thanks to the ERS and ATS. *Eur Respir J* 2014 Feb;43(2):315-8.
192. Lee JH, Haselkorn T, Borish L, Rasouliyan L, Chipps BE, Wenzel SE. Risk factors associated with persistent airflow limitation in severe or difficult-to-treat asthma: insights from the TENOR study. *Chest* 2007 Dec;132(6):1882-9.
193. Donohue JF, Jain N. Exhaled nitric oxide to predict corticosteroid responsiveness and reduce asthma exacerbation rates. *Respir Med* 2013;107(7):943-52.
194. Chipps BE, Zeiger RS, Borish L, Wenzel SE, Yegin A, Hayden ML, et al, TENOR group. Key findings and clinical implications from The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study. *J Allergy Clin Immunol.* Aug 2012; 130(2): 332–42.e10.
195. ten Brinke A, Ouwerkerk ME, Zwinderman AH, Spinhoven P, Bel EH. Psychopathology in patients with severe asthma is associated with increased health care utilization. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1093–1096.
196. Heaney L, Brightling C, Menzies-Gow A, Stevenson M, Niven R, on behalf of the British Thoracic Society Difficult Asthma Network Refractory asthma in the UK: cross-sectional findings from a UK multicentre registry *Thorax* 2010 Sep;65(9): 787–794.
197. Fonseca J, Nogueira-Silva L, Morais-Almeida M, Sa-Sousa A, Azevedo L, Ferreira J, et al. Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test (CARAT) can be used to assess individual patients over time. *Clin Transl Allergy.* 2012 Aug 30;2(1):16.
198. Dweik RA, Sorkness RL, Wenzel S, Hammel J, Curran-Everett D, Comhair SA, et al. Use of exhaled nitric oxide measurement to identify a reactive, at-risk phenotype among patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 May 15;181(10):1033-41.
199. Hudon C, Turcotte H, Laviolette M, Carrier G, Boulet LP. Characteristics of bronchial asthma with incomplete reversibility of airflow obstruction. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;78:195–202.
200. Hastie A, Moore W, Li H, Rector B, Ortega E, Pascual R, et al, on behalf of the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Biomarker surrogates do not accurately predict sputum eosinophil and neutrophil percentages in asthmatic subjects *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:72-80.
201. Gruchalla RS, Sampson HA, Matsui E, David G, Gergen PJ, Calatroni A, et al. Asthma morbidity among inner-city adolescents receiving guidelines-based therapy: role of predictors in the setting of high adherence. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:213-21.
202. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and

- possible mechanisms. *Thorax* 2002;57:643–8.
203. R Nadif, V Siroux, M-P Oryszczyn, C Ravault, C Pison, I Pin, et al., on behalf of the Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma (EGEA). Heterogeneity of asthma according to blood inflammatory patterns. *Thorax* 2009;64:374–380.
204. Little SA, Macleod KJ, Chalmers GW, Love JG, McSharry C, Thomson NC. Association of forced expiratory volume with disease duration and sputum neutrophils in chronic asthma. *Am J Med* 2002;112:446-52.
205. Fredberg JJ. Frozen objects: small airways, big breaths, and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Oct;106(4):615-24.
206. MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, et al. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol*. 2001;166(9):5763–72.
207. Yamamoto M, Tochino Y, Chibana K, Trudeau J, Holguin F, Wenzel S. Nitric oxide and related enzymes in asthma: relation to severity, enzyme function and inflammation. *Clin Exp Allergy* 2012 May;42(5):760–768.
208. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Aug 1;176(3):231-7.
209. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1185–1190.
210. Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006;11(1):54-61.
211. Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:256–259.
212. Wood LG, Baines KJ, Fu J, Scott HA, Gibson PG. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma. *Chest* 2012 Jul;142(1):86-93.
213. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Gibson PG. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 153–60.
214. Moreira AP, Hogaboam CM. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *J Interferon Cytokine Res*. 2011 Jun;31(6):485-91.
215. Careau E, Proulx LI, Pouliot P, Spahr A, Turmel V, Bissonnette EY. Antigen sensitization modulates alveolar macrophage functions in an asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 May;290(5):L871-9.
216. Balhara J, Gounni AS. The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. *Mucosal Immunol* 2012 Nov;5(6):605-9.
217. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med*. 1997 Nov 3;186(9):1567-74.
218. Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 2009;31:412–424.
219. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* 2008;9: 551–557.

220. Bratke K, Prieschenk C, Garbe K, Kuepper M, Lommatzsch M, Virchow JC. Plasmacytoid dendritic cells in allergic asthma and the role of inhaled corticosteroid treatment. *Clin Exp Allergy*. 2013 Mar;43(3):312-21.
221. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2 Suppl Mini-Primer):S450-6.
222. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:18105–18110.
223. Siracusa MC, Wojno ED, Artis D. Functional heterogeneity in the basophil cell lineage. *Adv Immunol* 2012;115:141–159.
224. Wark PA, Simpson JL, Hensley MJ, Gibson PG. Safety of sputum induction with isotonic saline in adults with acute severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1745–1753.
225. Vlachos-Mayer H, Leigh R, Sharon RF, Hussack P, Hargreave FE. Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *Eur Respir J* 2000;16:997–1000.
226. Knudsen TB, Thomsen SF, Nolte H, Backer V. A population-based clinical study of allergic and non-allergic asthma. *J Asthma* 2009;46:91–94.
227. Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, Anto JM, Bel EH, Boulet LP, et al. Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jun;119(6):1337-48.
228. Fahy J, Locksley R. The airway epithelium as a Regulator of Th2 responses in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Aug 15;184(4):390-2.
229. Barnes PJ. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin Exp Allergy* 2009;39:1145–1151.
230. Lee JH, Haselkorn T, Chipps BE, Miller DP, Wenzel SE; Tenor Study Group. Gender differences in IgE-mediated allergic asthma in The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study. *J Asthma* 2006;43:179–184.
231. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jan;113(1):101-8.
232. Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K et al. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):928-35.
233. Holguin F, Bleeker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Erzurum SC, et al. Obesity and asthma: an association modified by age of asthma onset. *J Allergy Clin Immunol* 2011 Jun;127(6):1486-93.
234. Xie M, Wenzel SE. A global perspective in asthma: from phenotype to endotype. *Chin Med J (Engl)* 2013 Jan;126(1):166-74 .
235. Moon JY, Kim SH, Kim TB, Kim SH, Chang YS, Lee JH, et al. COREA study group. Aspirin-intolerant asthma in the Korean population: prevalence and characteristics based on a questionnaire survey. *Respir Med* 2013 Feb;107(2):202-8.
236. Park J, Kim J, Bae J, Park B, Cheong HS, Chun J, et al. Possible association of SLC22A2 polymorphisms with aspirin-intolerant asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155(4):395-4022.
237. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:913–21.
238. Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:248–253.

239. Sayers I, Barton S, Rorke S, Beghé B, Hayward B, Van Eerdewegh P, et al. Allelic association and functional studies of promoter polymorphism in the leukotriene C4 synthase gene (LTC4S) in asthma. *Thorax* 2003;58:417–424.
240. Chapman DG, Berend N, King GG, Salome CM. Increased airway closure is a determinant of airway hyperresponsiveness. *Eur Respir J*. 2008 Dec;32(6):1563-9.
241. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;19(4):547-66.
242. Komakula S, Khatri S, Mermis J, Savill S, Haque S, Rojas M, et al. Body mass index is associated with reduced exhaled nitric oxide and higher exhaled 8-isoprostanes in asthmatics. *Respir Res* 2007 Apr 16;8:32.
243. Sood A, Qualls C, Arynchyn A, Beckett WS, Gross MD, Steffes MW, et al. Obesity-asthma association: is it explained by systemic oxidant stress? *Chest*. 2009 Oct;136(4):1055-62.
244. Sood A, Ford ES, Camargo CA Jr. Association between leptin and asthma in adults. *Thorax* 2006;61:300–305.
245. Perusquia M, Hernández R, Montaña LM, Villalón CM, Campos MG. Inhibitory effect of sex steroids on guinea-pig airway smooth muscle contractions. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1997 Sep;118(1):5-10.
246. Fenger RV, Gonzalez-Quintela A, Vidal C, Gude F, Husemoen LL, Aadahl M, Berg ND, et al. Exploring the obesity-asthma link: do all types of adiposity increase the risk of asthma? *Clin Exp Allergy*. 2012 Aug;42(8):1237-45.
247. Vortmann M, Eisner MD. BMI and health status among adults with asthma. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jan;16(1):146-52.
248. Juel CT, Ali Z, Nilas L, Ulrik CS. Asthma and obesity: does weight loss improve asthma control? A systematic review. *J Asthma Allergy*. 2012;5:21-6.
249. Brashier B, Salvi S. Obesity and Asthma: Physiological Perspective. *J Allergy (Cairo)*. 2013;2013:198068.
250. Lavoie KL, Bacon SL, Labrecque M, Cartier A, Ditto B. Higher BMI is associated with worse asthma control and quality of life but not asthma severity. *Respir Med*. 2006 Apr;100(4):648-57.
251. Lessard A, Turcotte H, Cormier Y, Boulet LP. Obesity and asthma: a specific phenotype? *Chest* 2008 Aug;134(2):317-23.
252. Peters JI, McKinney JM, Smith B, Wood P, Forkner E, Galbreath AD. Impact of obesity in asthma: evidence from a large prospective disease management study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 Jan;106(1):30-5.
253. Jones RL, Nzekwu MM. The effects of body mass index on lung volumes. *Chest*. 2006 Sep;130(3):827-33.
254. Wenzel SE, Busse WW. Severe asthma: lessons from the severe asthma research program. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:14-21.
255. Gibeon D, Batuwita K, Osmond M, Heaney LG, Brightling CE, Niven R, et al. Obesity-associated severe asthma represents a distinct clinical phenotype: analysis of the British Thoracic Society Difficult Asthma Registry Patient cohort according to BMI. *Chest*. 2013 Feb 1;143(2):406-14.
256. Holguin F, Comhair SA, Hazen SL, Powers RW, Khatri SS, Bleecker ER, et al. An association between L-arginine/asymmetric dimethyl arginine balance, obesity, and the age of asthma onset phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 Jan 15;187(2):153-9.
257. Sciurba FC. Physiologic similarities and differences between COPD and asthma. *Chest* 2004;126: Suppl 2,117S–124S.
258. van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Schouten JP, Boezen HM. A

- disintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:329–333.
259. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164:S28-38.
260. Bel E, Brinke A, Sorkness L. Cap. 11. Fixed airway obstruction in severe asthma Em: Chung KF, Bel EH, Wenzel SE, eds. *Difficult-to-treat Severe Asthma*. *Eur Respir Monogr* 2011; 51:147–159.
261. Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. Spanish COPD Guidelines (GesEPOC): pharmacological treatment of stable COPD. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol*. 2012 Jul;48(7):247-57.
262. Louie S, Zeki AA, Schivo M, Chan AL, Yoneda KY, Avdalovic M, et al. The asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome: pharmacotherapeutic considerations. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2013 Mar;6(2):197-219.
263. Vonk JM, Jongepier H, Panhuysen CI, Schouten JP, Bleecker ER, Postma DS. Risk factors associated with the presence of irreversible airflow limitation and reduced transfer coefficient in patients with asthma after 26 years of follow up. *Thorax*. 2003 Apr;58(4):322-7.
264. Ulrik CS, Backer V. Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma. *Eur Respir J* 1999;14:892–896
265. ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):744-8.
266. Amelink M, de Nijs SB, Berger M, Weersink EJ, ten Brinke A, Sterk PJ, et al. Non-atopic males with adult onset asthma are at risk of persistent airflow limitation. *Clin Exp Allergy* 2012 May;42(5):769-74.
267. Ulrik CS, Backer V, Dirksen A. A 10 year follow up of 180 adults with bronchial asthma: factors important for the decline in lung function. *Thorax* 1992;47:14–1.
268. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:45-51.
269. Lotvall J, Akdis C, Bacharier L, Bjermer L, Casale T, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:355-60.
270. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005;25:552–563.
271. Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, et al. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004 May;34(5):757-60.
272. Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGF beta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet* 2001;109:623–27.
273. Boulet LP. Asthma and obesity. *Clin Exp Allergy* 2013 Jan;43(1):8-21.
274. Miles JF, Cayton RM, Tunnicliffe WS, Ayres JG. Increased atopic sensitization in brittle asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1074-1082.
275. Baker C, Duncanson R, Tunnicliffe WS, Ayres JG. Development of a standardized methodology for double-blind, placebo-controlled food challenge in patients with brittle asthma and perceived food intolerance. *J Am Diet Assoc*. 2000 Nov;100(11):1361-7.
276. Ayres J. Classification and management of brittle asthma. *British Journal of Hospital Medicine* 57(8):387-9 27.

277. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* 2012 Jan;5(1):9-19.
278. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;429:195-207.
279. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 2000;35:967-974.
280. Dallinga JW, Robroeks CM, van Berkel JJ, Moonen EJ, Godschalk RW, Jöbsis Q, et al. Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children. *Clin Exp Allergy.* 2010 Jan;40(1):68-76.
281. Caldeira M, Perestrelo R, Barros AS, Bilelo MJ, Morête A, Câmara JS, et al. Allergic asthma exhaled breath metabolome: a challenge for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr A.* 2012 Sep 7;1254:87-97.
282. Ibrahim B, Basanta M, Cadden P, Singh D, Douce D, Woodcock A, et al. Non-invasive phenotyping using exhaled volatile organic compounds in asthma. *Thorax* 2011;66:804-9.
283. Jung J, Kim SH, Kim SH, Lee HS, Choi GS, Jung YS, et al. Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. *Clin Exp Allergy.* 2013 Apr;43(4):425-33.
284. Lugogo NL, Bappanad D, Kraft M. Obesity, metabolic dysregulation and oxidative stress in asthma. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1810(11):1120-6.

VII.

INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

VII.

Informação suplementar 1

Quadro I-S – Aldeídos e alcanos urinários identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS e seleccionados para análise multivariada

Nº de pico	t_R^a (s)	t_R^a (s)	Compostos	Nº CAS	R _l ^b	R _l ^c
Alcanos						
1	90	0.34	2-metilpentano	107-83-5	587	558
2	102	0.34	hexano #	110-54-3	600	600
3	156	0.41	heptano #	142-82-5	663	700
4	222	0.43	4-metilheptano	589-53-7	738	765
5	276	0.41	octano #	111-65-9	800	800
6	324	0.45	2,4-dimetilheptano	2213-23-2	819	822
7	498	0.43	nonano #	111-84-2	900	900
8	666	0.41	2,2,4,6,6-pentametilheptano	13475-82-6	991	997
9	684	0.42	decano #	124-18-5	1000	1000
10	840	0.46	undecano #	1120-21-4	1105	1100
11	972	0.43	dodecano #	112-40-3	1200	1200
12	1098	0.47	tridecano #	629-50-5	1300	1300
13	1212	0.48	tetradecano #	629-59-4	1401	1400
14	1314	0.45	pentadecano #	629-62-9	1500	1500
15	1416	0.46	hexadecano #	544-76-3	1601	1600
16	1464	0.48	2,6,10-trimetilpentadecano	3892-00-0	1651	1649
17	1512	0.51	heptadecano #	629-78-7	1701	1700
18	1602	0.46	octadecano #	593-45-3	1808	1800
19	1686	0.50	nonadecano #	629-92-5	1901	1900
20	1770	0.49	eicosano #	112-95-8	2001	2000

Quadro I-5 (continuação) – Aldeídos e alcanos urinários identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS e seleccionados para análise multivariada

Nº de pico	¹ t _R ^a (s)	² t _R ^a (s)	Compostos	Nº CAS	RI _{calc} ^b	RI _{lit.} ^c
Aldeídos						
21	126	0.55	3-metilbutanal	590-86-3	628	646
22	132	0.53	2-metilbutanal	96-17-3	635	646
23	150	0.62	pentanal #	110-62-3	656	697
24	276	0.97	hexanal #	66-25-1	800	800
25	402	1.65	2-hexanal	6728-26-3	856	854
26	504	0.98	heptanal #	111-71-7	904	899
27	606	0.76	2-etilhexanal	123-05-7	958	955
28	690	0.81	octanal #	124-13-0	1004	1001
29	846	0.82	nonanal #	124-19-6	1105	1098
30	978	0.80	decanal #	112-31-2	1205	1204
31	1104	0.73	undecanal #	112-44-7	1306	1291
32	1218	0.73	dodecanal #	112-54-9	1407	1407
33	1428	0.72	tetradecanal	124-25-4	1613	1611
34	1614	0.76	hexadecanal	629-80-1	1815	1819

^a Índice de retenção em segundos (s) para primeira (¹t_R) e segunda (²t_R) dimensões

^b RI: Índice de retenção obtido pelo cromatograma modulado

^c RI: Índice de retenção reportado na literatura para a primeira componente de GC (para colunas do tipo 5%-fenil-metilpolisiloxane ou equivalente.)

Composto confirmado pela co-injecção de químico *standard*

Informação suplementar 2

Quadro II-S – Caracterização da amostra consoante ocorrência de episódio de hospitalização no último ano

Variáveis	Hospitalização no último ano		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Classificações			
WHO			
Não -grave	23(48.9)	7(28.0)	
Grave	24(51.1)	18(72.0)	
ATS			
Não -grave	27(57.4)	11(44.0)	
Grave	20(42.6)	14(56.0)	
Demografia			
Género			
Feminino	35(74.5)	21(84.0)	
Masculino	12(25.5)	4(16.0)	
Início de doença antes 12 anos			
Não	20(42.6)	14(56.0)	
Sim	27(57.4)	11(44.0)	
Exacerbação grave no último ano			
Não	34(72.3)	2(8.0)	$\chi^2(1)=27.03;$ $p<0.001$
Sim	13(27.7)	23(92.0)	
Idade (anos)	46.1±18.4	44.9±16.8	
IMC (Kg/m ²)	27.7±6.0	28.7±5.3	
IMC (≥25 Kg/m ²)			
Não	15(31.9)	5(20.0)	
Sim	32(68.1)	20(80.0)	
IMC (≥30 Kg/m ²)			
Não	34(68.0)	17(68.0)	
Sim	13(32.0)	8(32.0)	
Anos de doença (anos)	24.4±15.0	21.3±13.3	
Controla da doença, qualidade de vida risco de eventos adversos			
Controlo da doença			
Sim	11(23.9)	3(12.0)	
Não	35(76.1)	22(88.0)	
Doentes em risco			
Não	13(27.7)	0(0.0)	$\chi^2(1)=8.44;$ $p=0.003$
Sim	34(72.3)	25(100)	
ACT	19.5±4.6	18.0±5.7	
CARAT (Rinite)	6.5±3.4	6.9±3.0	
CARAT (Asma)	12.3±4.5	10.6±4.9	
ALQ	18.8±6.8	17.8±6.6	
SOA	8.9±3.5	8.3±2.3	$t(68)=-4.7$ $p<0.001$
Comorbilidades			
Atopia			
Não	16(34.0)	7(28.0)	
Sim	31(66.0)	18(72.0)	

Quadro II-S (continuação) – Caracterização da amostra consoante ocorrência de episódio de hospitalização no último ano

Variáveis	Hospitalização no último ano		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Classificações			
HS AINE's			
Não	38(82.6)	21(84.0)	
Sim	8(17.4)	4(16.0)	
Rinite			
Não	7(14.9)	5(20.0)	
Sim	40(85.1)	20(80.0)	
Polipose			
Não	42(89.4)	22(88.0)	
Sim	5(10.6)	3(12.0)	
Sinusite			$\chi^2(1)=4.91$; $p=0.027$
Não	21(44.7)	18(72.0)	
Sim	26(55.3)	7(28.0)	
Exposição tabágica			
Não	33(70.2)	15(60.0)	
Sim	14(29.8)	10(40.0)	
História de pneumonia			
Não	31(66.0)	16(64.0)	
Sim	16(34.0)	9(36.0)	
Ansiedade			
Não	35(76.1)	16(64.0)	
Sim	11(23.9)	9(36.0)	
Depressão			
Não	40(87.0)	23(92.0)	
Sim	6(13.0)	2(8.0)	
Défice de $\alpha 1$ -AT			
Não	44(93.6)	24(96.0)	
Sim	3(6.4)	1(4.0)	
Bronquiectasia			
Não	43(91.5)	23(92.0)	
Sim	4(8.5)	2(8.0)	
DPOC			
Não	44(93.6)	23(92.0)	
Sim	3(6.4)	2(8.0)	
Outra doença obstrutiva			
Não	40(85.1)	21(84.0)	
Sim	7(14.9)	4(16.0)	
Sensibilização Aspergillus			
Não	47(100)	23(92.0)	
Sim	0(0.0)	2(8.0)	
Terapêutica			
Dose CSI			
<=750 μ g PF ou eq	30(63.8)	13(51.0)	
>750 μ g PF ou eq	17(36.2)	12(48.0)	

Quadro II-5 (continuação) – Caracterização da amostra consoante ocorrência de episódio de hospitalização no último ano

Variáveis	Hospitalização no último ano		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Classificações			
Terapêutica			
<Step3	1(2.1)	2(8.0)	
Step3	14(29.8)	4(16.0)	
Step4	31(66.0)	16(64.0)	
Step5	1(2.1)	3(12.0)	
CSNasal			
Não	13(27.7)	10(40.0)	
Sim	34(72.3)	15(60.0)	
Função pulmonar			
FeNO (ppb)			
<35	22(68.8)	7(70.0)	
(≥35)	10(31.2)	3(30.0)	
Obstrução fixa			
Não	34(72.3)	16(64.0)	
Sim	13(27.7)	9(36.0)	
Reversibilidade brônquica			
Não	18(38.3)	14(58.3)	
Sim	29(61.7)	10(41.7)	
FEV ₁ basal	93.8±26.4	92.7±27.1	
FEV ₁ (Δ)	6.8±6.9	7.3±8.1	
FEV ₁ /FVC basal	77.2±16.3	74.1±17.1	
FEV ₁ /FVC (Δ)	2.5±4.5	-0.9±9.4	t(67)=-2.1 p=0.044
FEV ₂₅₋₇₅ basal	57.0±35.9	52.5±32.3	
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ)	17.4±28.3	19.3±30.2	
VR basal	123.4±30.9	122.1±35.8	
VR (Δ)	-4.1±10.3	-5.5±11.4	
DLCO	105.0±22.2	102.3±20.4	
Biomarcadores sangue			
Eosinófilos (%)	3.2±2.4	3.7±4.5	
IgE sérica	399.8±773.5	377.2±411.0	
Biomarcadores expectoração			
Fenótipo celular			
Eosinofílico	12(48.0)	6(50.0)	
Neutrofílico	4(16.0)	0(0.0)	
Misto	8(32.0)	4(33.3)	
Paucigranulocítico	1(4.0)	2(16.7)	
Eosinófilos (%)	20.7±25.3	29.8±32.4	
Neutrófilos (%)	54.5±31.6	47.0±30.7	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig: Imunoglobulina; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score* VR: volume residual; WHO: *World Health Organization* *p<0.05

Quadro III-S – Caracterização da amostra por Género

Variáveis	Género		Valor estatístico* de p
	F	M	
Classificações			
WHO			
Não -grave	25(44.6)	5(31.3)	
Grave	31(55.4)	11(68.8)	
ATS			
Não -grave	30(53.6)	8(50.0)	
Grave	26(46.4)	8(50.0)	
Demografia			
Início de doença antes 12 anos			
Não	23(41.1)	11(68.8)	$\chi^2(1)=3.83;$ $p=0.047$
Sim	33(58.9)	5(31.3)	
Hospitalização no último ano			
Não	35(62.5)	12(75.0)	
Sim	21(37.5)	4(25.0)	
Exacerbação grave no último ano			
Não	28(50.0)	8(50.0)	
Sim	28(50.0)	8(50.0)	
Idade (anos)	44.8±17.0	48.8±20.3	
IMC (Kg/m ²)	28.6±6.1	26.1±3.9	
IMC (≥25 Kg/m ²)			
Não	15(26.8)	5(31.3)	
Sim	41(73.2)	11(68.8)	
IMC (≥30 Kg/m ²)			
Não	37(66.1)	14(87.5)	
Sim	19(33.9)	2(12.5)	
Anos de doença (anos)	23.2±14.1	23.8±16.1	
Controla da doença, qualidade de vida risco de eventos adversos			
Controlo da doença			
Sim	10(18.2)	4(25.0)	
Não	45(81.8)	12(75.0)	
Doentes em risco			
Não	10(17.9)	3(18.8)	
Sim	46(82.1)	13(81.3)	
ACT	18.9±4.8	19.3±6.0	
CARAT (Rinite)	6.7±3.2	6.5±3.7	
CARAT (Asma)	11.3±4.6	13.0±4.9	
ALQ	12.5±3.4	10.5±4.4	
SOA	10.2±3.4	10.8±5.1	
Comorbilidades			
Atopia			
Não	19(33.9)	4(25.0)	
Sim	37(66.1)	12(75.0)	
HS AINE's			
Não	48(87.3)	11(68.8)	
Sim	7(12.7)	5(31.3)	

Quadro III-S (continuação) – Caracterização da amostra por Género

Variáveis	Género		Valor estatístico* de p
	F	M	
Classificações			
Rinite			
Não	11(19.6)	1(6.3)	
Sim	45(80.4)	15(93.8)	
Polipose			
Não	51(91.1)	13(81.3)	
Sim	5(8.9)	3(18.8)	
Sinusite			
Não	29(51.8)	10(62.5)	
Sim	27(48.2)	6(37.5)	
Exposição tabágica			
Não	39(69.6)	9(56.3)	
Sim	17(30.4)	7(43.8)	
História de pneumonia			
Não	35(62.5)	12(75.0)	
Sim	21(37.5)	4(25.0)	
Ansiedade			
Não	37(67.3)	14(87.5)	
Sim	18(32.7)	2(12.5)	
Depressão			
Não	47(85.5)	16(100)	
Sim	8(14.5)	0(0.0)	
Défice de α 1-AT			
Não	54(96.4)	14(87.5)	
Sim	2(3.6)	2(12.5)	
Bronquiectasia			
Não	50(89.3)	16(100)	
Sim	16(10.7)	0(0.0)	
DPOC			
Não	54(96.4)	13(81.3)	$\chi^2(1)=4.44;$ $p=0.035$
Sim	2(3.6)	3(18.8)	
Outra doença obstrutiva			
Não	49(87.5)	12(75.0)	
Sim	7(12.5)	4(25.0)	
Sensibilização Aspergillus			
Não	55(98.2)	15(93.8)	
Sim	1(1.8)	1(6.3)	
Terapêutica			
Dose CSI			
$\leq 750\mu\text{g}$ PF ou eq	36(64.3)	7(43.8)	
$>750\mu\text{g}$ PF ou eq	20(35.7)	9(56.3)	
Terapêutica			
<Step3	2(3.6)	1(6.3)	
Step3	13(23.2)	5(31.3)	
Step4	39(69.6)	8(50.0)	
Step5	2(3.6)	2(12.5)	
CSNasal			
Não	19(33.9)	4(25.0)	
Sim	37(66.1)	12(75.0)	

Quadro III-S (continuação) – Caracterização da amostra por Género

Variáveis	Género		Valor estatístico* de p
	F	M	
Classificações			
Função pulmonar			
FeNO (ppb)			
<35	25(78.1)	4(40.0)	
(>=35)	7(21.9)	6(60.0)	
Obstrução fixa			
Não	44(78.6)	6(37.5)	$\chi^2(1)=9.89; p=0.002$
Sim	12(21.4)	10(62.5)	
Reversibilidade brônquica			
Não	27(49.1)	5(31.3)	
Sim	28(50.9)	11(68.8)	
FEV ₁ basal	97.3±26.3	80.8±23.5	t(70)=2.25 p=0.028
FEV ₁ (Δ)	7.3±7.5	5.8±6.5	
FEV ₁ /FVC basal	77.8±15.9	70.9±17.9	
FEV ₁ /FVC (Δ)	1.5±7.3	0.9±4.2	
FEV ₂₅₋₇₅ basal	57.3±32.8	49.9±40.5	
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ)	22.7±29.8	2.8±18.3	t(66)=2.53 p=0.014
VR basal	121.1±30.9	129.4±40.0	
VR (Δ)	-3.3±11.1	-9.3±7.2	
DLCO	101.9±17.7	110.9±30.3	
Biomarcadores sangue			
Eosinófilos (%)	2.9±2.3	18.6±6.1	t(70)=-2.39 p=0.020
IgE sérica	385.9±740.3	412±304.0	U=288.5 p=0.037
Biomarcadores expectoração			
Fenótipo celular			
Eosinófilico	14(50.0)	4(44.4)	
Neutrófilico	4(14.3)	0(0.0)	
Misto	7(25.0)	5(55.6)	
Paucigranulocítico	3(10.7)	0(0.0)	
Eosinófilos (%)	22.3±29.7	27.6±20.8	
Neutrófilos (%)	49.9±33.3	59.0±23.3	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig:Imunoglobulina; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score* VR: volume residual; WHO: *World Health Organization* *p<0.05

Informação suplementar 3

3.1) Correlações obtidas para as variáveis qualitativas estudadas na população total do estudo

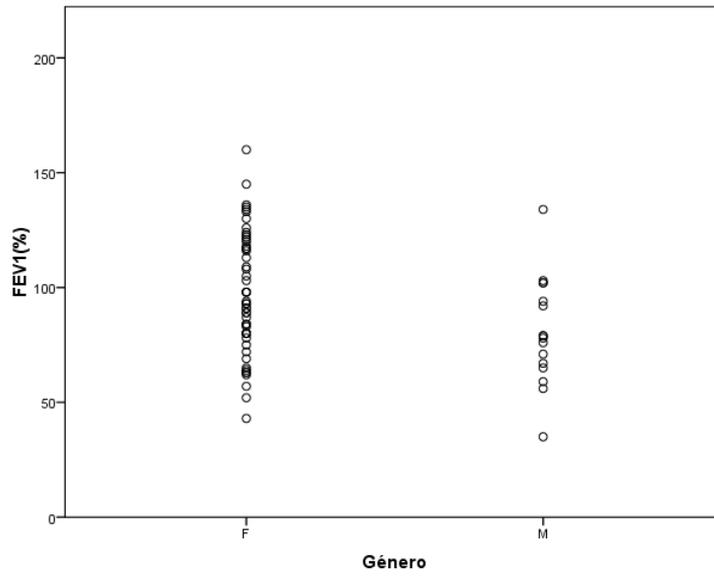


Figura S-1 – Correlação FEV₁(%) com Gênero (população total). O género masculino apresentou menores valores de FEV₁

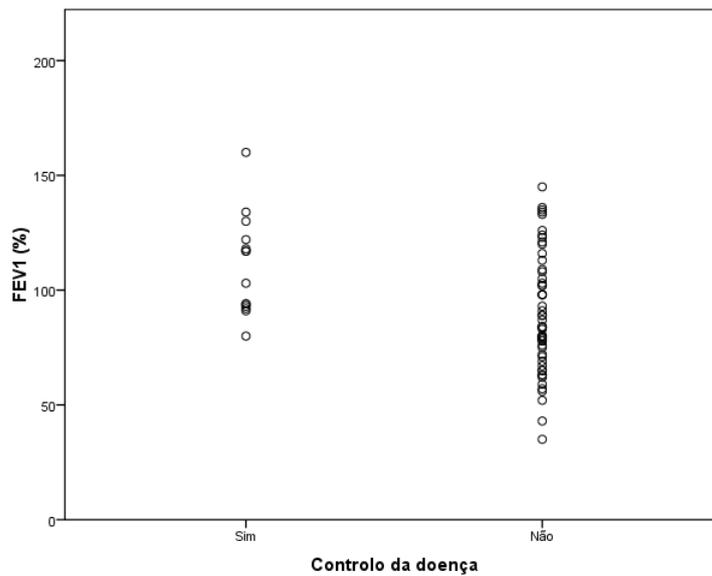


Figura S-2 – Correlação FEV₁(%) com Controlo da doença (população total). Os doentes não controlados apresentaram valores menores de FEV₁

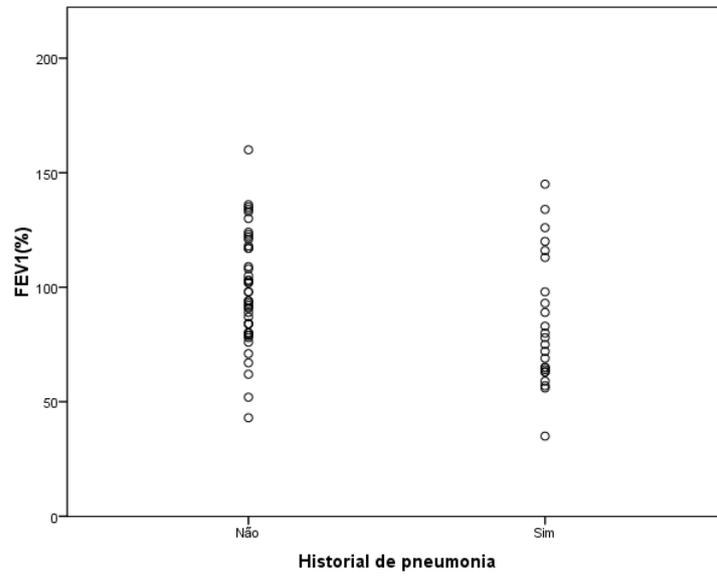


Figura S-3 – Correlação FEV₁(%) com História de pneumonia (população total). Os doentes com história de pneumonia apresentaram valores menores de FEV₁.

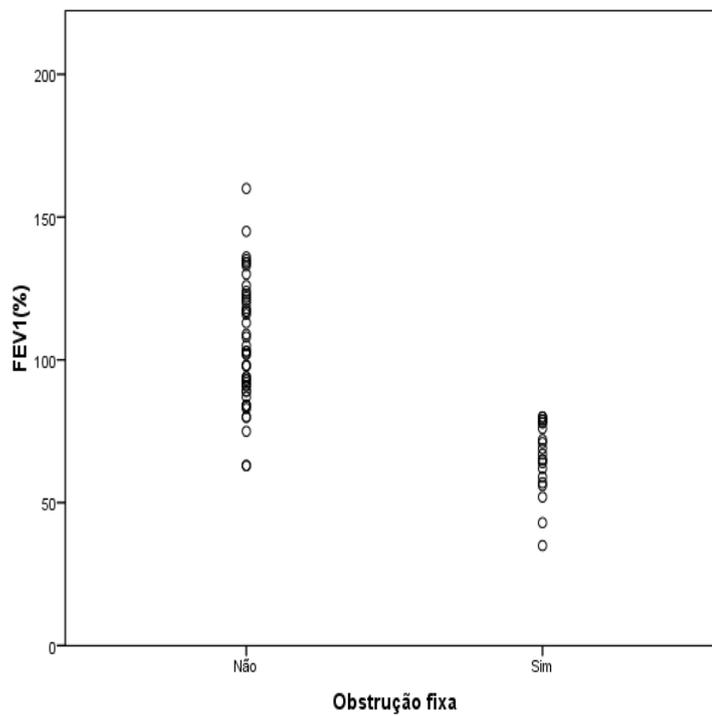


Figura S-4 – Correlação FEV₁(%) com Obstrução persistente (população total). Os doentes com obstrução persistente apresentaram valores menores de FEV₁.

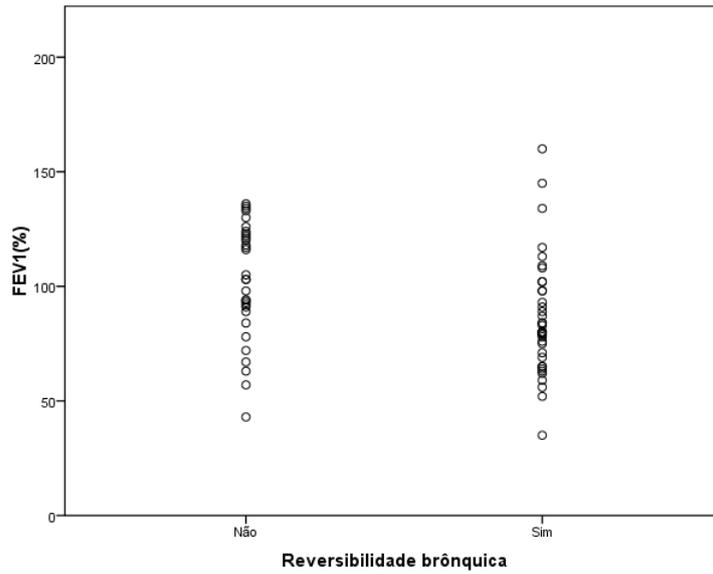


Figura S-5 – Correlação FEV₁(%) com Reversibilidade brônquica (população total). Os doentes com reversibilidade brônquica apresentaram valores menores de FEV₁.

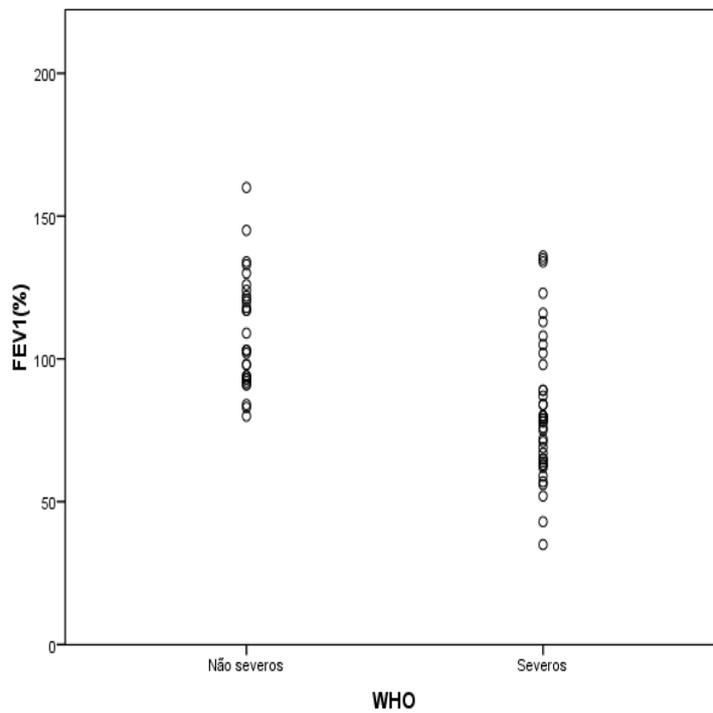


Figura S-6 – Correlação FEV₁(%) com Classificação de grave (pela WHO⁵) (população total). Os doentes graves apresentaram valores menores de FEV₁.

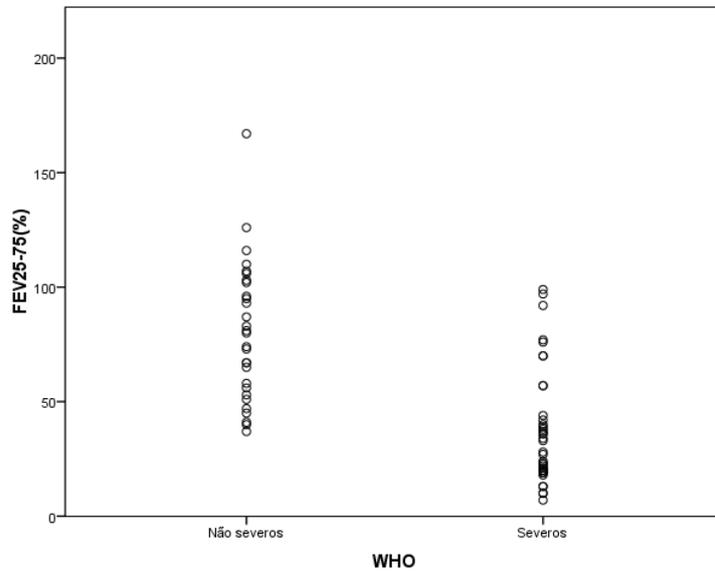


Figura S-7 - Correlação FEV₂₅₋₇₅(%) com Classificação de grave (WHO⁵) (população total). Os doentes graves apresentaram valores menores de FEV₂₅₋₇₅.

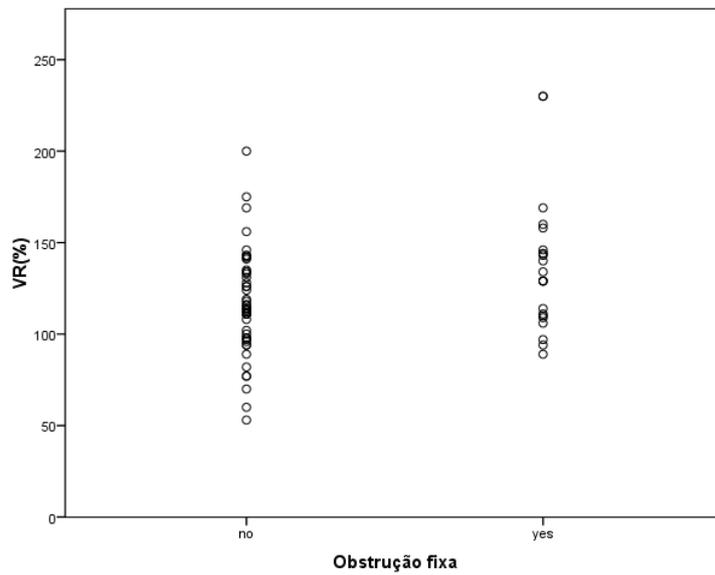


Figura S-8 - Correlação VR (%) com Obstrução persistente (população total). Os doentes com obstrução persistente apresentaram valores maiores de VR.

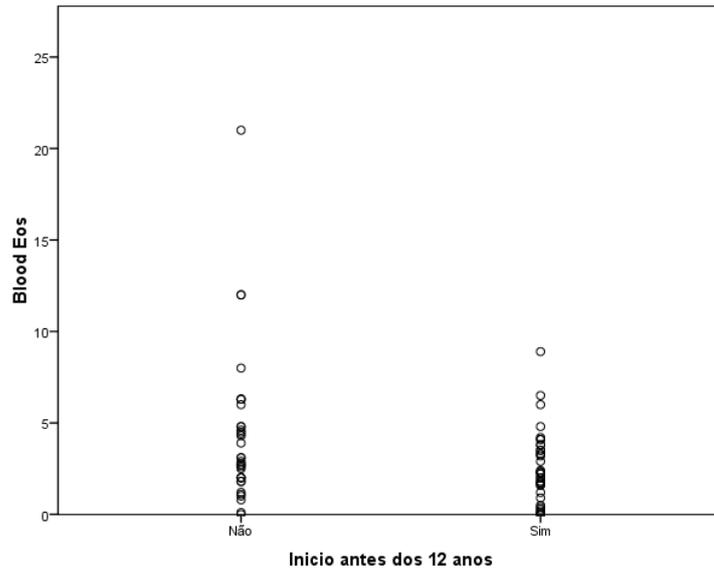


Figura 5-9 – Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com início de asma antes dos 12 anos (população total). Os doentes com início de asma antes dos 12 anos apresentaram menores valores de eosinofilia periférica.

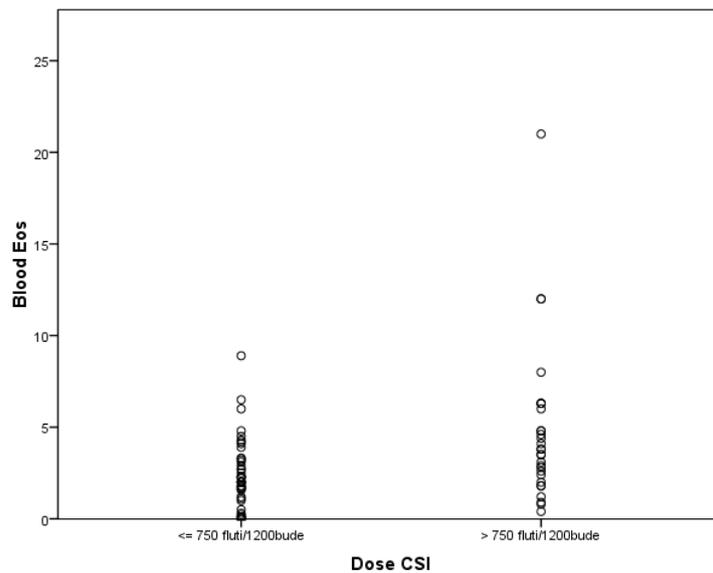


Figura 5-10 – Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com dose de CSI >750 µg de PF ou equivalente (população total). Os doentes que faziam dose de CSI >750 µg de PF ou equivalente apresentaram valores superiores de eosinofilia periférica.

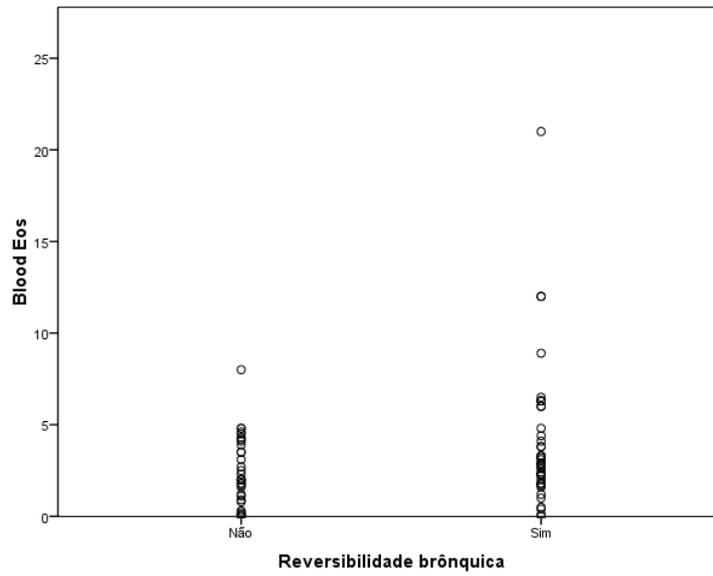


Figura S-11 – Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com reversibilidade brônquica (população total). Os doentes com reversibilidade brônquica apresentaram valores maiores de eosinofilia periférica.

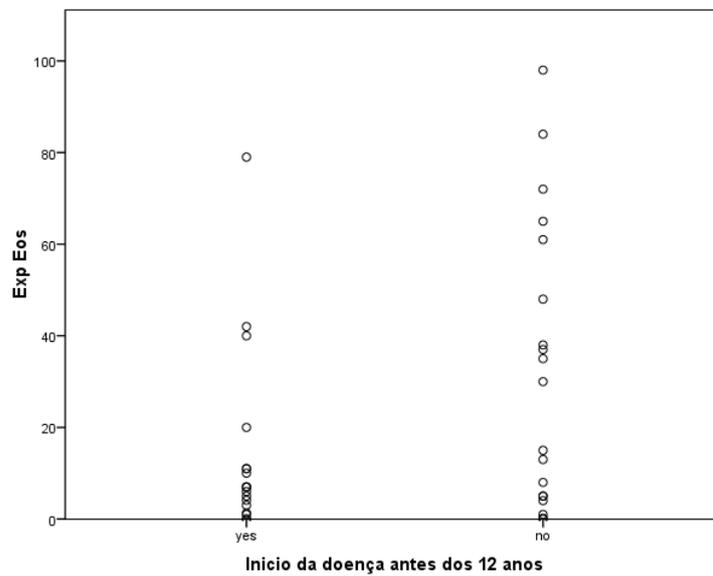


Figura S-12 – Correlação eosinófilos expectoração (%) com início da doença antes dos 12 anos (população total). Os doentes com início de asma antes dos 12 anos apresentaram menores valores de eosinofilia periférica.

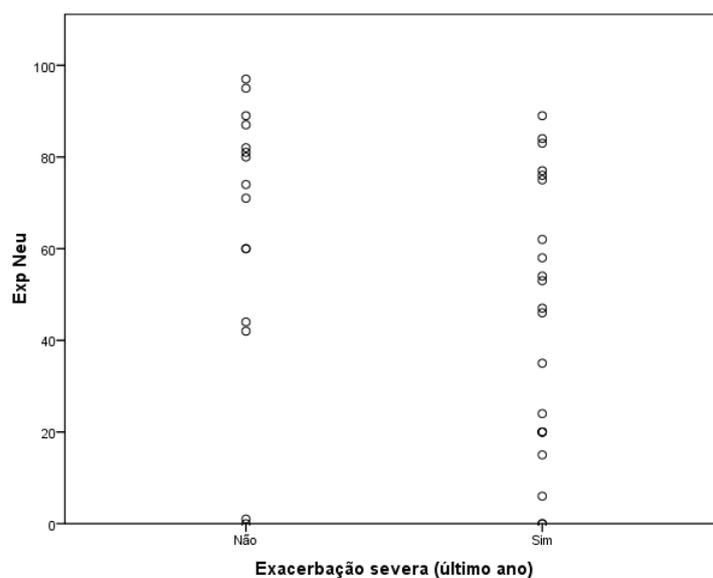


Figura S-13 – Correlação neutrófilos expectoração(%) com exacerbação grave no último ano (população total). Os doentes com história de exacerbação grave no último ano tinham valores menores de neutrófilos na expectoração.

3.II) Correlações obtidas para as variáveis qualitativas estudadas na população grave do estudo

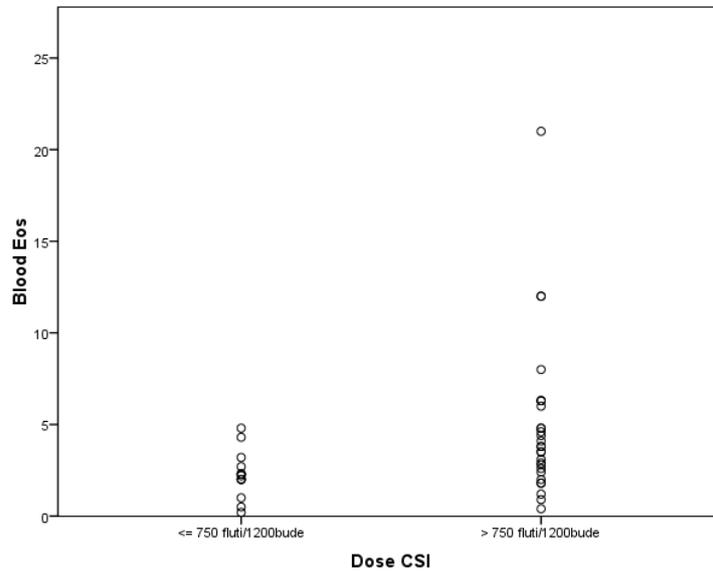


Figura S-14 – Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com Dose de CSI >750 µg de PF ou equivalente (população grave). Os doentes que faziam dose de CSI >750 µg de PF ou equivalente apresentaram valores superiores de eosinofilia periférica.

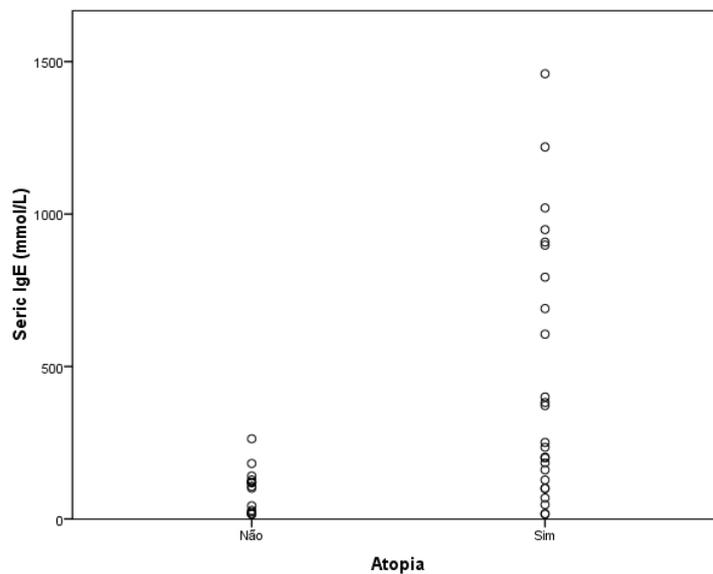


Figura S-15 – Correlação IgE sérica (mmol/L) com Atopia (população grave). Os doentes atópicos apresentaram valores maiores de IgE no sangue periférico.

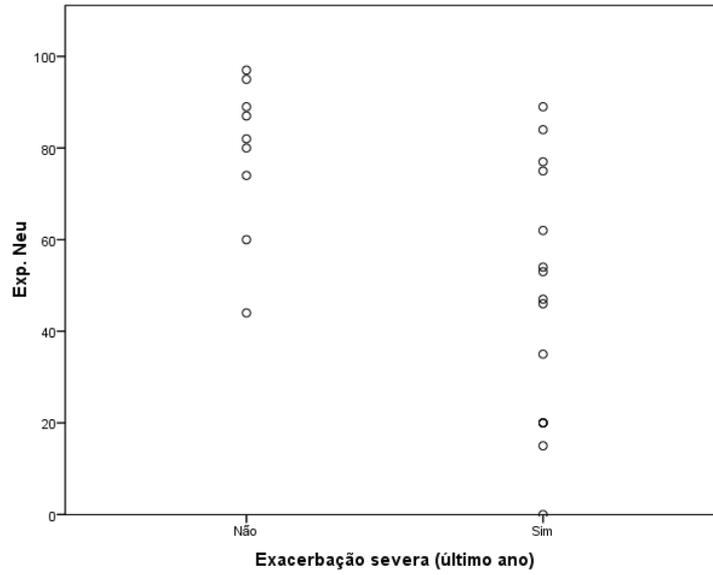


Figura S-16 – Correlação neutrófilos na expectoração (%) com Exacerbação grave no último ano (população grave). Os doentes com história de exacerbação grave no último ano apresentaram valores menores de neutrófilos na expectoração.

3.III) Correlações obtidas para as variáveis qualitativas estudadas na população submetida a colheita da expectoração

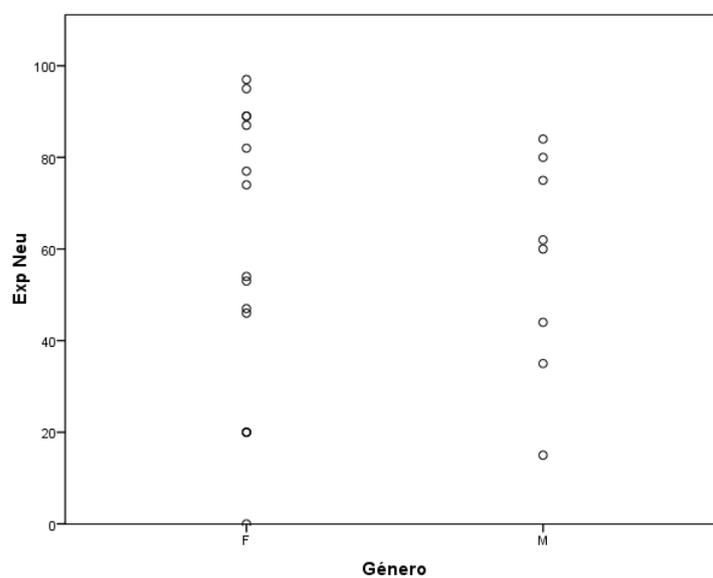


Figura S-17 – Correlação neutrófilos na expectoração (%) com Género (população submetida a colheita da expectoração). Os doentes do género masculino apresentaram valores menores de neutrófilos na expectoração.

Informação suplementar 4

Quadro IV-5 – Caracterização da amostra consoante existência de atopia

Variáveis	Atopia		Valor estatístico * de p
	Não	Sim	
Escalas			
WHO			
Não	6(26.1)	24(49.0)	
Sim	17(73.9)	25(51.0)	
ATS			
Não	11(47.8)	27(55.1)	
Sim	12(52.2)	22(44.9)	
Demografia			
Género			
Feminino	19(82.6)	37(75.5)	
Masculino	4(17.4)	12(24.5)	
Início da doença antes 12 anos			
Não	15(65.2)	19(38.8)	$\chi^2(1)=4.39$; $p=0.036$
Sim	8(34.8)	30(61.2)	
Hospitalização no último ano			
Não	16(69.6)	31(63.3)	
Sim	7(30.4)	18(36.7)	
Exacerbação grave no último ano			
Não	9(39.1)	27(55.1)	
Sim	14(60.9)	22(44.9)	
Idade (anos)	53.2±14.9	42.2±18.0	$t(70)=2.54$; $p=0.013$
IMC (Kg/m ²)	29.5±6.5	27.4±5.4	
IMC (≥25 Kg/m ²)			
Não	4(17.4)	16(32.7)	
Sim	19(82.6)	33(67.3)	
IMC (≥30 Kg/m ²)			
Não	15(65.2)	36(73.5)	
Sim	8(34.8)	13(26.5)	
Anos de doença (anos)	20.4±15.2	24.7±14.0	
Controlo da doença, qualidade de vida, risco de eventos adverso			
Controlo da doença			
Sim	3(13.0)	11(22.9)	
Não	20(87.0)	37(77.1)	
Doentes em risco			
Não	2(8.7)	11(22.4)	
Sim	21(91.3)	38(77.6)	
ACT	17.7±5.7	19.7±4.6	
CARAT (Rinite)	6.9±3.9	6.5±3.0	
CARAT (Asma)	10.1±4.8	12.4±4.5	
ALQ	13.5±3.5	11.3±3.7	$t(62)=2.30$; $p=0.025$
SOA	11.3±3.3	9.9±4.0	

Quadro IV-5 (continuação) – Caracterização da amostra consoante existência de atopia

Variáveis	Atopia		Valor estatístico * de p
	Não	Sim	
Comorbilidades			
HS AINE's			
Não	20(87.0)	39(81.3)	
Sim	3(13.0)	9(18.8)	
Rinite			
Não	6(26.1)	6(12.2)	
Sim	17(73.9)	43(87.8)	
Polipose			
Não	20(87.0)	44(89.8)	
Sim	3(13.0)	5(10.2)	
Sinusite			
Não	11(47.8)	28(57.1)	
Sim	12(52.2)	21(42.9)	
Qualquer exposição tabágica			
Não	16(69.6)	32(65.3)	
Sim	7(30.4)	17(34.7)	
História pneumonia			
Não	11(47.8)	36(73.5)	$\chi^2(1)=4.54;$ $p=0.033$
Sim	12(52.2)	13(26.5)	
Ansiedade			
Não	15(65.2)	36(75.0)	
Sim	8(34.8)	12(25.0)	
Depressão			
Não	18(78.3)	45(93.8)	
Sim	5(21.7)	3(6.3)	
Défice α 1-AT			
Não	21(91.3)	47(95.9)	
Sim	2(8.7)	2(4.1)	
Bronquiectasias			
Não	19(82.6)	47(95.9)	
Sim	4(17.4)	2(4.1)	
DPOC			
Não	20(87.0)	47(95.9)	
Sim	3(13.0)	2(4.1)	
Outra doença obstrutiva			
Não	17(73.9)	44(89.8)	
Sim	6(26.1)	5(10.2)	
Sensibilização a <i>Aspergillus fumigatus</i>			
Não	23(100)	47(95.9)	
Sim	0(0.0)	2(4.1)	
Terapêutica			
Dose CSI			
$\leq 750 \mu\text{g}$ PF ou eq	11(47.8)	32(65.3)	
$> 750 \mu\text{g}$ PF ou eq	12(52.2)	17(34.7)	
Terapêutica			
<Step3	1(4.3)	2(4.1)	
Step3	2(8.7)	16(32.7)	
Step4	19(82.6)	28(57.1)	
Step5	1(4.3)	3(6.1)	

Quadro IV-5 (continuação) – Caracterização da amostra consoante existência de atopia

Variáveis	Atopia		Valor estatístico * de p
	Não	Sim	
Função pulmonar			
FENO (ppb)			
<35	9(75.0)	20(66.7)	
=>35	3(25.0)	10(33.3)	
Obstrução fixa			
Não	17(73.9)	33(67.3)	
Sim	6(26.1)	16(32.7)	
Reversibilidade brônquica			
Não	10(45.5)	22(44.9)	
Sim	12(54.2)	27(55.1)	
FEV ₁ basal (% previsto)	93.9±25.5	93.2±27.1	
FEV ₁ (Δ)	4.8±4.9	8.0±8.0	
FEV ₁ /FVC basal(% previsto)	75.6±13.4	76.4±17.9	
FEV ₁ /FVC (Δ)	1.4±4.0	1.4±7.6	
FEV ₂₅₋₇₅ basal (% previsto)	47.6±23.7	59.1±38.2	
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ)	15.6±30.9	19.1±28.0	
VR basal (% previsto)	125.9±31.6	121.6±33.2	
Volume Residual (Δ)	-0.9±8.5	-6.6±11.2	t(57)=2.02 p=0.048
DLCO (% previsto)	98.7±17.0	107.6±23.4	
Biomarcadores sangue			
Eosinófilos (%)	3.7±2.8	3.2±3.4	
IgE sérica (mmol/L)	82.4±70.6	530.8±761.4	t(69)=-2.75 p=0.008
Biomarcadores expectoração			
Categoria fenótipo			
Eosinofílico	7(55.8)	11(45.8)	
Neutrofílico	3(23.1)	1(4.2)	
Misto	3(23.1)	9(37.5)	
Paucigranulocítico	0(0.0)	3(12.5)	
Eosinófilos (%)	26.4±33.3	22.1±24.7	
Neutrófilos (%)	50.0±35.8	53.2±28.9	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced vital vapacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig:Imunoglobulina; RGE: refluxo gastroesofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score* VR: volume residual; WHO: *World Health Organization* *p<0.05

Quadro V-S – Caracterização da amostra consoante idade início de doença após 12 anos

Variáveis	Idade de início asma após 12 anos		Valor estatístico* de p
	Sim	Não	
Escalas			
WHO			$\chi^2(1)=3.98;$ p=0.046
Não	10(29.4)	20(52.6)	
Sim	24(70.6)	18(47.4)	
ATS			$\chi^2(1)=3.48;$ p=0.062
Não	14(41.2)	24(63.2)	
Sim	20(58.8)	14(36.8)	
Demografia			
Género			$\chi^2(1)=3.83;$ p=0.050
Feminino	23(67.6)	33(86.8)	
Masculino	11(32.4)	5(13.2)	
Hospitalização no último ano			
Não	20(58.8)	27(71.1)	
Sim	14(41.2)	11(28.9)	
Exacerbação grave no último ano			
Não	15(44.1)	21(55.3)	
Sim	19(55.9)	17(44.7)	
Idade (anos)	55.3±15.2	37.2±15.4	t(70)=5.00 p<0.001
IMC (≥ 25 Kg/m ²)			$\chi^2(1)=5.49;$ p=0.019
Não	5 (14.7)	15(39.5)	
Sim	29(85.3)	23(60.5)	
IMC (≥ 30 Kg/m ²)			
Não	24(70.6)	27(71.1)	
Sim	10(29.4)	11(28.9)	
Anos de doença (anos)	20.9±14.4	25.6±14.3	
Controlo da doença, qualidade de vida, risco de eventos adverso			
Controlo da doença			
Sim	6(17.6)	8(21.6)	
Não	28(82.4)	29(78.4)	
Doentes em risco			$\chi^2(1)=3.71;$ p=0.054
Não	3(8.8)	10(26.3)	
Sim	31(91.2)	28(73.7)	
ACT	18.6±5.8	19.4±4.2	t(67)=2.41 p=0.019
CARAT (Rinite)	7.6±3.3	5.8±3.0	t(62)=2.66 p=0.010
CARAT (Asma)	11.3±4.7	12.1±4.7	
ALQ	13.3±3.5	10.9±3.6	t(62)=2.66 p=0.010
SOA	11.4±3.9	9.3±3.5	t(68)=2.37 p=0.020

Quadro V-S (continuação) – Caracterização da amostra consoante idade início de doença após 12 anos

Variáveis	Idade de início asma após 12 anos		Valor estatístico* de p
	Sim	Não	
Comorbilidades			
Atopia			$\chi^2(1)=4.39$; p=0.036
Não	15(44.1)	8(21.1)	
Sim	19(55.9)	30(78.9)	
HS AINE's			
Não	29(85.3)	30(81.1)	
Sim	5(14.7)	7(18.9)	
Rinite			
Não	5(14.7)	7(18.4)	
Sim	29(85.3)	31(81.6)	
Polipose			
Não	29(85.3)	35(92.1)	
Sim	5(14.7)	3(7.9)	
Sinusite			
Não	21(61.8)	18(47.4)	
Sim	13(38.2)	20(52.6)	
Qualquer exposição tabágica			
Não	21(61.8)	27(71.1)	
Sim	13(38.2)	11(28.9)	
História pneumonia			
Não	23(67.6)	24(63.2)	
Sim	11(32.4)	14(36.8)	
Ansiedade			
Não	23(69.7)	28(73.7)	
Sim	10(30.3)	10(26.3)	
Depressão			
Não	30(90.9)	33(86.8)	
Sim	3(9.1)	5(13.2)	
Défice α 1-AT			
Não	32(94.1)	36(94.7)	
Sim	2(5.9)	2(5.3)	
Bronquiectasias			
Não	31(91.2)	35(92.1)	
Sim	3(8.8)	3(7.9)	
DPOC			
Não	31(91.2)	36(94.7)	
Sim	3(8.8)	2(5.3)	
Outra doença obstrutiva			
Não			
Sim	27(79.4)	34(89.5)	
	7(20.6)	4(10.5)	
Sensibilização a <i>Aspergillus fumigatus</i>			
Não	33(97.1)	37(97.4)	
Sim	1(2.9)	1(2.6)	

Quadro V-5 (continuação) – Caracterização da amostra consoante idade início de doença após 12 anos

Variáveis	Idade de início asma após 12 anos		Valor estatístico* de p
	Sim	Não	
Terapêutica			
Dose CSI <=750 µg PF ou eq >750 µg PF ou eq	15(44.1) 19(55.9)	28(73.7) 10(26.3)	$\chi^2(1)=6.52$; p=0.011
Terapêutica <Step3 Step3 Step4 Step5	2(5.9) 7(20.6) 23(67.6) 2(5.9)	1(2.6) 11(28.9) 24(63.2) 2(5.3)	
CS nasal	16(47.1) 18(52.9)	7(18.4) 31(81.6)	$\chi^2(1)=6.77$; p=0.009
Função pulmonar			
FENO (ppb) <35 =>35	8(53.3) 7(46.7)	21(77.8) 6(22.2)	
Obstrução fixa Não Sim	20(58.8) 14(41.2)	30(78.9) 8(21.1)	
Reversibilidade brônquica Não Sim	16(48.5) 17(51.5)	16(42.1) 22(57.9)	
FEV ₁ basal (% previsto)	92.4±27.2	94.3±26.1	
FEV ₁ (Δ)	5.7±5.6	8.1±8.3	
FEV ₁ /FVC basal(% previsto)	72.9±15.8	79.0±16.8	
FEV ₁ /FVC (Δ)	1.5±3.5	1.3±8.6	
FEV ₂₅₋₇₅ basal (% previsto)	46.7±30.7	62.9±36.3	
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ)	9.0±27.6	25.6±27.7	t(66)=-2.64 p=0.016
Volume Residual basal (% previsto)	125.2±28.8	120.9±35.8	
Volume Residual (Δ)	-3.7±10.6	.5.2±10.8	
DLCO (% previsto)	103.6±18.0	104.4±24.6	
Biomarcadores sangue			
Eosinófilos (%)	4.3±4.1	2.5±2.0	t(70)=2.38 p=0.020
IgEt sérica (mmol/L)	253.0±300.8	519.4±861.9	
Biomarcadores expectoração			
Categoria fenótipo Eosinofílico Neutrofílico Misto Paucigranulocítico	10(52.6) 2(10.5) 6(31.6) 1(5.3)	8(44.4) 2(11.1) 6(33.3) 2(11.1)	
Eosinófilos (%)	32.6±31.1	14.1±20.3	t(35)=2.13 p=0.041
Neutrófilos (%)	48.6±32.7	55.7±29.7	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig:Imunoglobulina; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score* VR: volume residual; WHO: *World Health Organization* *p<0.05

Quadro VI-S – Caracterização da amostra consoante existência de HS AINE's

Variáveis	HS AINE's		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Escalas			
WHO			
Não	25(42.4)	5(41.7)	
Sim	34(57.6)	7(58.3)	
ATS			
Não	33(55.9)	5(41.7)	
Sim	26(44.1)	7(58.3)	
Demografia			
Género			
Feminino	48(81.4)	7(58.3)	
Masculino	11(18.6)	5(41.7)	
Início da doença antes 12 anos			
Não	29(49.2)	5(41.7)	
Sim	39(50.8)	7(58.3)	
Hospitalização no último ano			
Não	38(64.4)	8(66.7)	
Sim	21(35.6)	4(33.3)	
Exacerbação grave no último ano			
Não	31(52.5)	4(33.3)	
Sim	28(47.5)	8(66.7)	
IMC (≥ 25 Kg/m ²)			
Não	15(25.4)	5(41.7)	
Sim	44(74.6)	7(58.3)	
IMC (≥ 30 Kg/m ²)			
Não	40(67.8)	11(91.7)	
Sim	19(32.2)	1(8.3)	
Idade (anos)	47.1 \pm 16.9	38.7 \pm 21.4	
IMC (Kg/m ²)	28.2 (5.93)	26.4 (4.52)	
Anos de doença (anos)	24.6 \pm 15.2	16.7 \pm 8.5	t(69)=2.52 p=0.018
Controlo da doença, qualidade de vida, risco de eventos adverso			
Controlo da doença			
Sim	10(17.2)	4(33.3)	
Não	48(82.2)	8(66.7)	
Doentes em risco			
Não	10(16.9)	3(25.0)	
Sim	49(83.1)	9(75.0)	
ACT	19.4 \pm 4.5	18.3 \pm 5.7	
CARAT (Rinite)	6.9 \pm 3.4	5.8 \pm 2.2	
CARAT (Asma)	11.8 \pm 4.3	11.8 \pm 6.0	
ALQ	11.8 \pm 3.5	12.7 \pm 4.8	t(62)=2.66 p=0.010
SOA	10.0 \pm 3.5	11.8 \pm 5.1	

Quadro VI-S (continuação) – Caracterização da amostra consoante existência de HS AINE´s

Variáveis	HS AINE´s		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Comorbilidades			
Atopia			
Não	20(33.9)	3(25.0)	
Sim	39(66.1)	9(75.0)	
Rinite			
Não	12(20.3)	0(0.0)	
Sim	47(79.7)	12(100)	
Polipose			
Não	55 (93.2)	8(66.7)	$\chi^2(1)=7.03;$ $p=0.008$
Sim	4(6.8)	4(33.3)	
Sinusite			
Não	34(57.6)	5(41.7)	
Sim	25(42.4)	7(58.3)	
Qualquer exposição tabágica			
Não	41(69.5)	6(50.0)	
Sim	18(30.5)	6(50.0)	
História pneumonia			
Não	39(66.1)	7(58.3)	
Sim	20(33.9)	5(41.7)	
Ansiedade			
Não	40(69.0)	11(91.7)	
Sim	18(31.0)	1(8.3)	
Depressão			
Não	51(87.9)	11(91.7)	
Sim	7(12.1)	1(8.3)	
Défice α 1-AT			
Não	57(96.6)	10(83.3)	
Sim	2(3.4)	2(16.7)	
Bronquiectasias			
Não	53(89.8)	12(100)	
Sim	6(10.2)	0(0.0)	
DPOC			
Não	55(93.2)	11(91.7)	
Sim	4(6.8)	1(8.3)	
Outra doença obstrutiva			
Não	50(84.7)	10(83.3)	
Sim	9(15.3)	2(16.7)	
Sensibilização a <i>Aspergillus fumigatus</i>			
Não	58(98.3)	11(91.7)	
Sim	1(1.7)	1(8.3)	
Terapêutica			
Dose CSI			
<=750 μ g PF ou eq	37(62.7)	6(50.0)	
>750 μ g PF ou eq	22(37.3)	6(50.0)	

Quadro VI-S (continuação) – Caracterização da amostra consoante existência de HS AINE's

Variáveis	HS AINE's		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Terapêutica			
Terapêutica <Step3	3(5.1)	0(0.0)	
Step3	14(23.7)	4(33.3)	
Step4	41(69.5)	6(50.0)	
Step5	1(1.7)	2(16.7)	
Função pulmonar			
FeNO (ppb)			
<35	21 (65.6)	7(77.8)	
=>35	11(34.4)	2(22.2)	
Obstrução fixa			
Não	40(67.8)	9(75.0)	
Sim	19(32.2)	3(25.0)	
Reversibilidade brônquica			
Não	26(44.8)	5(41.7)	
Sim	32(55.2)	7(58.3)	
FEV ₁ basal (% previsto)	93.0±25.0	94.6±30.2	
FEV ₁ (Δ)	7.2±7.5	5.8±6.7	
FEV ₁ /FVC basal(% previsto)	75.9±16.6	77.4±17.5	
FEV ₁ /FVC (Δ)	1.3±6.9	1.4±6.0	
FEV ₂₅₋₇₅ basal (% previsto)	54.1±34.3	61.9±38.2	
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ)	18.8±28.0	16.8±32.9	
Volume Residual basal (% previsto)	123.0±28.8	121.3±48.8	
Volume Residual (Δ)	-4.8±11.1	-2.9±9.3	
DLCO (% previsto)	103.2±18.6	109.0±37.9	
Biomarcadores sangue			
Eosinófilos (%)	3.1±2.6	4.4±5.6	
IgEt sérica (mmol/L)	384.2±713.9	432.2±374.5	
Biomarcadores expectoração			
Categoria fenótipo			
Eosinofílico	16(55.2)	2(28.6)	
Neutrofílico	2(6.9)	2(28.6)	
Misto	8(27.6)	3(42.9)	
Paucigranulocítico	3(10.3)	0(0.0)	
Eosinófilos (%)	27.2±29.8	10.8±13.0	t(34)=2.2 p=0.037
Neutrófilos (%)	48.5±32.5	63.7±23.3	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig: imunoglobulina; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score* VR: volume residual; WHO: *World Health Organization* *p<0.05

Quadro VII-5 - Caracterização da amostra consoante IMC ≥ 30 kg/m²

Variáveis	IMC ≥ 30 kg/m ²		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Escalas			
WHO			
Não	23(45.1)	7(33.3)	
Sim	28(54.9)	14(66.7)	
ATS			
Não	29(56.9)	9(42.9)	
Sim	22(43.1)	12(57.1)	
Demografia			
Género			
Feminino	37(72.5)	19(90.5)	
Masculino	14(27.5)	2(9.5)	
Início da doença antes 12 anos			
Não	24(47.1)	10(47.6)	
Sim	27(52.9)	11(52.4)	
Hospitalização no último ano			
Não	34(66.7)	13(61.9)	
Sim	17(33.3)	8(38.1)	
Exacerbação grave no último ano			
Não	25(49.0)	11(52.4)	
Sim	26(51.0)	10(47.6)	
Idade (anos)	45.0 \pm 18.9	47.4 \pm 14.7	
IMC (Kg/m ²)	25.0 \pm 3.04	35.0 \pm 4.1	
Anos de doença (anos)	23.4 \pm 14.3	23.3 \pm 15.0	
Controlo da doença, qualidade de vida, risco de eventos adverso			
Controlo da doença			
Sim	13(26.0)	1(4.8)	
Não	37(74.0)	20(95.2)	
Doentes em risco			
Não	10(19.6)	3(14.3)	
Sim	41(80.4)	18(85.7)	
ACT	19.0 \pm 5.1	19.1 \pm 4.9	
CARAT (Rinite)	6.8 \pm 3.2	6.2 \pm 3.6	
CARAT (Asma)	12.0 \pm 4.9	11.0 \pm 4.2	
ALQ	11.4 \pm 3.7	13.4 \pm 3.5	
SOA	10.0 \pm 4.2	11.0 \pm 2.7	
Comorbilidades			
Atopia			
Não	15(29.4)	8(38.1)	
Sim	36(70.6)	13(61.9)	
HS a AINE's			
Não	40(78.4)	19(95.0)	
Sim	11(21.6)	1(5.0)	
Rinite			
Não	6(11.8)	6(28.6)	
Sim	45(88.2)	15(71.4)	

Quadro VII-5 (continuação) – Caracterização da amostra consoante IMC ≥ 30 kg/m²

Variáveis	IMC ≥ 30 kg/m ²		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Comorbilidades			
Polipose			
Não	47(92.2)	17(81.0)	
Sim	4(7.8)	4(19.0)	
Sinusite			
Não	30(58.8)	9(42.9)	
Sim	21(41.2)	12(57.1)	
Qualquer exposição tabágica			
Não	32(62.7)	16(76.2)	
Sim	19(37.3)	5(23.8)	
História pneumonia			
Não	34(66.7)	13(61.9)	
Sim	17(33.3)	8(38.1)	
Ansiedade			
Não	35(68.6)	16(80.0)	
Sim	16(31.4)	4(20.0)	
Depressão			
Não	46(90.2)	17(85.0)	
Sim	5(9.8)	3(15.0)	
Défice α 1-AT			
Não	47(92.2)	21(100)	
Sim	4(7.8)	0(0.0)	
Bronquiectasias			
Não	46(90.2)	20(95.2)	
Sim	5(9.8)	1(4.8)	
DPOC			
Não	47(92.2)	20(95.2)	
Sim	4(7.8)	1(4.8)	
Outra doença obstrutiva			
Não	42(82.4)	19(90.5)	
Sim	9(17.6)	2(9.5)	
Sensibilização a <i>Aspergillus fumigatus</i>			
Não	49(96.1)	21(100.0)	
Sim	2(3.9)	0(0.0)	
Terapêutica			
Dose CSI			
≤ 750 μ gPF ou eq	33(64.7)	10(47.6)	
> 750 μ g PF ou eq	18(35.3)	11(52.4)	
Terapêutica			
<Step3	3(5.9)	0(0.0)	
Step3	14(27.5)	4(19.0)	
Step4	31(60.8)	16(76.2)	
Step5	3(5.9)	1(4.8)	
Função pulmonary			
FeNO (ppb)			
<35	20(69.0)	9(69.2)	
≥ 35	9(31.0)	4(30.8)	

Quadro VII-S (continuação) – Caracterização da amostra consoante IMC ≥ 30 kg/m²

Variáveis	IMC ≥ 30 kg/m ²		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Função pulmonary			
Obstrução fixa			
Não	33(64.7)	17(81.0)	
Sim	18(35.3)	4(19.0)	
Reversibilidade brônquica			
Não	21(42.0)	11(52.4)	
Sim	29(58.0)	10(47.6)	
FEV ₁ basal (% previsto)	90.6 \pm 27.7	100.4 \pm 22.1	
FEV ₁ (Δ)	7.7 \pm 8.2	5.2 \pm 3.6	
FEV ₁ /FVC basal(% previsto)	73.8 \pm 16.6	81.9 \pm 15.0	
FEV ₁ /FVC (Δ)	2.1 \pm 4.6	-0.4 \pm 10.0	
FEV ₂₅₋₇₅ basal (% previsto)	52.7 \pm 36.8	62.4 \pm 28.3	
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ)	18.9 \pm 28.7	15.8 \pm 26.8	
Volume Residual basal (% previsto)	127.7 \pm 32.3	111.7 \pm 30.8	
Volume Residual (Δ)	-5.6 \pm 11.3	-2.0 \pm 8.6	
DLCO (% previsto)	102.2 \pm 23.6	107.7 \pm 16.0	
Biomarcadores sangue			
Eosinófilos (%)	3.2 \pm 3.4	3.7 \pm 2.9	
IgE sérica (mmol/L)	437.7 \pm 760.0	282.6 \pm 340.9	
Biomarcadores expectoração			
Categoria fenótipo			
Eosinofílica	13(50.0)	5(45.5)	
Neutrofílica	4(15.4)	0(0.0)	
Misto	7(26.9)	5(45.5)	
Paucigranulocítico	2(7.7)	1(9.1)	
Eosinófilos (%)	25.0 \pm 30.2	20.3 \pm 21.1	
Neutrófilos (%)	50.5 \pm 32.6	55.8 \pm 28.3	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig:Imunoglobulina; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score* VR: volume residual; WHO: *World Health Organization* *p<0.05

Quadro VIII-S – Caracterização de doentes consoante existência de obstrução persistente

Variáveis	Obstrução fixa		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Escalas			
WHO			
Não	29(58.0)	0 (0.0)	$\chi^2(1)=17.96;$ $p<0.001$
Sim	21(42.0)	22(100.0)	
ATS			
Não	33(66.0)	5(22.7)	$\chi^2(1)=11.48;$ $p=0.001$
Sim	17(34.0)	17(77.3)	
Demografia			
Género			
Feminino	44(78.0)	12(54.5)	$\chi^2(1)=9.89;$ $p=0.002$
Masculino	12(12.0)	10(45.5)	
Início da doença antes 12 anos			
Não	20(40.0)	14(63.6)	
Sim	30(60.0)	8(36.4)	
Hospitalização no último ano			
Não	34(68.0)	13(59.1)	
Sim	16(32.0)	9(40.9)	
Exacerbação grave no último ano			
Não	24(48.0)	12(54.5)	
Sim	26(52.0)	10(45.5)	
Idade (anos)	41.4±17.8	55.6±13.4	$t(70)=-3.35$ $p=0.001$
Anos de doença (anos)	20.0±12.9	31.0±15.2	$t(70)=-3.17$ $p=0.002$
IMC (Kg/m ²)	28.1±6.5	27.8±3.6	
IMC (≥25 Kg/m ²)			
Não	16(32.0)	4(18.2)	
Sim	34(68.0)	18(81.8)	
IMC (≥30 Kg/m ²)			
Não	33(66.0)	18(81.8)	
Sim	17(34.0)	4(18.2)	
Controlo da doença, qualidade de vida, risco de eventos adverso			
Controlo da doença			
Sim	13(26.0)	1(4.8)	$\chi^2(1)=4.21;$ $p=0.040$
Não	37(74.0)	20(95.2)	
Doentes em risco			
Não	12(24.0)	1(4.5)	$\chi^2(1)=3.90;$ $p=0.048$
Sim	38(76.0)	21(95.5)	
ACT	19.2±5.0	18.7±5.2	
CARAT (Rinite)	6.2±3.0	7.7±3.7	$U=350$ $P=0.043$
CARAT (Asma)	11.6±4.6	11.9±4.9	
ALQ	12.1±3.6	11.8±4.1	
SOA	9.6±3.8	12.0±3.4	$t(68)=-2.51$ $p=0.014$

Quadro VIII-5 (continuação) – Caracterização de doentes consoante existência de obstrução persistente

Variáveis	Obstrução fixa		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Comorbilidades			
Atopia			
Não	17(34.0)	6(27.3)	
Sim	33(66.0)	16(72.7)	
HS a AINE's			
Não	40(67.8)	19(32.2)	
Sim	9(75.0)	3(25.0)	
Rinite			
Não	5 (10.0)	7(31.8)	$\chi^2(1)=5.24;$ $p=0.022$
Sim	45 (90.0)	15(68.2)	
Polipose			
Não	45(90.0)	19(86.4)	
Sim	5(10.0)	3(13.6)	
Sinusite			
Não	23(46.0)	16(72.7)	$\chi^2(1)=4.40;$ $p=0.036$
Sim	27(54.0)	6(27.3)	
Qualquer exposição tabágica			
Não	36(72.0)	12(54.4)	
Sim	14(28.0)	10(45.5)	
História pneumonia			
Não	35(70.0)	12(54.5)	
Sim	15(30.0)	10(45.5)	
Ansiedade			
Não	32(65.3)	19(86.4)	
Sim	17(34.7)	3(13.6)	
Depressão			
Não	42(85.7)	21(95.5)	
Sim	7(14.3)	1(4.5)	
Défice α 1-AT			
Não	49 (98.0)	19(86.4)	$\chi^2(1)=3.94;$ $p=0.047$
Sim	1(2.0)	3(13.6)	
Bronquiectasias			
Não	46 (92.0)	20(90.9)	
Sim	4(8.0)	2(9.1)	
DPOC			
Não	50 (100)	17(77.3)	$\chi^2(1)=12.21;$ $p<0.001$
Sim	0 (0.0)	5(22.7)	
Outra doença obstrutiva			
Não	46(92.0)	15(68.2)	$\chi^2(1)=6.70;$ $p=0.010$
Sim	4(8.0)	7(31.8)	
Sensibilização a <i>Aspergillus fumigatus</i>			
Não	50(100.0)	20(90.9)	$\chi^2(1)=4.68;$ $p=0.031$
Sim	0(0.0)	2(9.1)	

Quadro VIII-5 (continuação) – Caracterização de doentes consoante existência de obstrução persistente

Variáveis	Obstrução fixa		Valor estatístico* de p
	Não	Sim	
Terapêutica			
Dose CSI <=750 µg PF ou eq >750 µg PF ou eq	34(68.0) 16(32.0)	9(40.9) 13(59.1)	$\chi^2(1)=4.66$; p=0.031
Terapêutica <Step3 Step3 Step4 Step5	3(6.0) 16(32.0) 30(60.0) 1(2.0)	0(0.0) 2(9.1) 17(77.3) 3(13.6)	
Função pulmonar			
Reversibilidade brônquica Não Reversibilidade brônquica Sim	27(55.1) 22(44.9)	5(22.7) 17(77.3)	$\chi^2(1)=6.43$; p=0.011
FEV1 basal (% previsto)	105.4±21.5	66.1±12.5	t(67)=7.81 p<0.001
FEV ₁ (Δ)	6.0±5.0	9.3±10.7	
FEV ₁ /FVC basal(% previsto)	84.4±12.1	57.4±7.2	t(67)=9.49 p<0.001
FEV ₁ /FVC (Δ)	0.8±7.4	2.6±4.3	
FEV25-75 basal (% previsto)	69.7±31.7	23.4±13.3	t(66)=6.37 p<0.001
FEV ₂₅₋₇₅ (Δ)	23.6±27.2	5.4±28.7	t(69)=2.51 p=0.015
Volume Residual basal (% previsto)	116.7±28.3	137.1±37.3	t(69)=-2.54 p=0.013
Volume Residual (Δ)	-3.0±10.5	-8.0±10.3	
DLCO (% previsto)	105.4±21.8	100.3±20.7	
Biomarcadores sangue			
Eosinófilos (%)	2.7±2.0	4.7±4.8	t(70)=-2.5 p=0.015
IgE sérica (mmol/L)	409.2±763.1	353.1±377.2	
Biomarcadores expectoração			
Categoria fenótipo Eosinofílico Neutrofílico Misto Paucigranulocítico	13(52.0) 3(12.0) 6(24.0) 3(12.0)	5(41.7) 1(8.3) 6(50.0) 0(0.0)	
Eosinófilos (%)	23.1±30.8	24.7±20.6	
Neutrófilos (%)	45.4±31.9	66.1±25.1	

ACT: *Asthma Control Test*; AINE's: anti-inflamatórios não esteróides; ALQ: *Asthma Life Quality Questionnaire*; AT: antitripsina; ATS: *American Thoracic Society*; BD: broncodilatação; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; FVC: forced vital capacity; CSI: corticoterapia inalada; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; eq: equivalente; FeNO: *Fraction of exhaled nitric oxide*; FEV₁: *Forced expiratory volume in the first second*; FEV₂₅₋₇₅: *Forced expiratory flow at 25% point to the 75% point of Forced vital capacity*; IMC: Índice de massa corporal; Ig: imunoglobulina; RGE: refluxo gastro-esofágico; SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; SOA: *Severity of Asthma Score* VR: volume residual; WHO: *World Health Organization* *p<0.05

Informação suplementar 5

Caracterização da população submetida a colheita da expectoração

As características deste sub-grupo estão detalhadas no *Quadro IX-S* constante deste anexo.

A idade média da população foi de 48 anos (17.6), sendo o sexo feminino mais prevalente (76%). O excesso de peso foi sobreponível ao da população total do estudo (IMC médio 29 Kg/m² (6.1)).

Na história da evolução da doença, 51% tinha idade de início de doença após os 12 anos de idade, com média 29 anos (6.1) de evolução da doença; história de exacerbações graves e de hospitalizações no último ano, respectivamente em 60% e em 32% dos doentes; e história de pneumonia reportada em 46% dos doentes.

Em relação às comorbilidades, 95% dos doentes apresentaram pelo menos uma, com destaque para a rinite (89%), o excesso de peso (76%) e a atopia (65%). Ressalta-se ainda que 19% tinha HS AINE's e 16% outra doença obstrutiva para além da asma.

Apenas 17% dos doentes apresentavam controlo da doença, com as seguintes pontuações nos questionários utilizados: ACT de 17 (5.7); CARAT 17 (6.7) e ALQ 13 (3.8). Faziam CSI em altas doses 46% dos doentes e 86% estava no grau 4 ou 5 de terapêutica (GINA).

O questionário de gravidade SOA apresentou um valor médio de 12 (3.5).

Quanto à avaliação da função respiratória, o valor médio de FEV₁ basal foi de 95% (29.3) com ΔFEV₁ de 8% (9.2); o de VR de 125% (33.5) e em 32% dos doentes havia obstrução persistente da via aérea.

Relativamente aos restantes biomarcadores, 1/3 dos doentes apresentou valores de FeNO superiores a 35 ppb, com valor médio de 36 ppb (27.0); o valor médio de percentagem de eosinófilos no sangue foi de 4% (3.9) e da IgE total sérica de 380 mmol/L (854.5).

Na comparação entre grupos de gravidade, o sexo feminino foi prevalente em ambos, o IMC médio discretamente mais elevado no grupo dos doentes graves (29 Kg/m², (5.0) Vs 27 kg/m² (7.8)), que eram também mais velhos.

Na história da evolução da doença, a história de exacerbações graves, de hospitalizações no último ano e de pneumonia foi mais frequente nos doentes graves (63 Vs 54%, 38 Vs 23%, 58 Vs 23%, respectivamente).

Quanto às comorbilidades, mais de 90% dos doentes de ambos os grupos reportaram pelo menos uma. O excesso de peso foi mais frequente nos doentes graves (88% Vs 54%), bem como a história de exposição tabágica (38% Vs 8%) e da co-existência de outra doença obstrutiva para além da asma (21% Vs 8%).

Em relação ao controlo da doença, foi naturalmente pior nos graves, tendo a pontuação nos questionários de controlo ACT, CARAT e ALQ, mostrado diferenças significativas, (p= 0.018, p= 0.22 e p=0.002, respectivamente). Igualmente, foi verificada diferença estatística nas pontuações do questionário SOA (p=0.000)

O valor médio de FEV₁ basal foi significativamente inferior no grupo dos graves (84% (24.8) Vs 117% (25.7), p= 0.001) sendo também superior a labilidade brônquica (ΔFEV₁ de 10% (10.2) Vs 5% (6.0)). Para os parâmetros laboratoriais eosinofilia periférica (% eosinófilos), Ig E sérica (mmol/L) e FeNO (<35ppb), não se encontraram diferenças significativas.

Quadro IX-S – Características demográficas e clínicas da população submetida a colheita da expectoração (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	Total (n=37)	ATS			WHO		
		Grave (n=20)	Não grave (n=17)	Valor estatístico de p	Grave (n=24)	Não grave (n=13)	Valor estatístico de p
Género							
Feminino	28(75,7)	14 (70,0)	14(82,4)	$\chi^2(1)=0.76$; p=0.462	16(66,7)	12(92,3)	$\chi^2(1)=3.01$; p=0.119
Masculino	9(24,3)	6(30,0)	3(17,6)		8(33,3)	1(7,7)	
Idade (anos)	47,6±17,6 (n=37)	48,8±15,8 (n=20)	46,3±19,9 (n=17)	t(35)=-0.4; p=0.691	50,0±15,7 (n=24)	43,3±20,5 (n=13)	t(35)=-1.1; p=0.275
IMC (Kg/m²)	28,7±6,1 (n=37)	29,3±5,4 (n=20)	27,9±7,0 (n=17)	t(35)=-0.7; p=0.522	29,3±5,0 (n=24)	27,4±7,8 (n=13)	t(35)=-0.9; p=0.361
Início da doença antes 12 A							
Sim	18(48,6)	7(35,0)	11(64,7)	$\chi^2(1)=0.76$; p=0.103	9(37,5)	9(69,2)	$\chi^2(1)=3.40$; <u>p=0.091</u>
Não	19(51,4)	13(65,0)	6(35,3)		15(62,5)	4(30,8)	
Atopia							
Sim	24(64,9)	12(60,0)	12(70,6)	$\chi^2(1)=0.45$; p=0.731	14(58,3)	10(76,9)	$\chi^2(1)=1.28$; p=0.305
Não	13(35,1)	8(40,0)	5(29,4)		10(41,7)	3(23,1)	
Controlo doença							
Sim	6(16,7)	0(0,0)	6(35,3)	$\chi^2(1)=8.05$; p=0.006	0(0,0)	6(46,2)	$\chi^2(1)=12.74$; p=0.001
Não	30(83,3)	19(100,0)	11(64,7)		23(100,0)	7(53,8)	
FEV₁ (%)							
Basal	94,8±29,3 (n=37)	84,0±25,4 (n=20)	108,3±29,0 (n=16)	t(34)=2.7; p=0.011	83,8±24,8 (n=24)	116,7±25,7 (n=12)	t(34)=3.7; p=0.001
Após BD	104,1±27,0 (n=36)	97,7±23,3 (n=20)	116,4±26,4 (n=17)		t(35)=2.8; p=0.009	97,6±22,9 (n=24)	
Δ variação	8,3±9,2 (n=36)	9,7±10,9 (n=20)	6,6±6,3 (n=16)	t(34)=-1.0; p=0.315	9,8±10,2 (n=24)	5,3±6,0 (n=12)	t(34)=-1.4; p=0.173

Quadro IX-5 (continuação)– Características demográficas e clínicas da população submetida a colheita da expectoração (População total, Grupo Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵), Grupo Não Grave (Classificação ATS⁴ e WHO⁵))

Variáveis qualitativas (n, %) quantitativas (M, SD)	Total (n=37)	ATS			WHO		
		Grave (n=20)	Não grave (n=17)	Valor estatístico de p	Grave (n=24)	Não grave (n=13)	Valor estatístico de p
FEV₁/FVC (%):							
Basal	75,6±17,8 (n=36)	70,3±18,4 (n=20)	82,4±14,9 (n=16)	t(34)=2.1; p=0.04	71,0±16,8 (n=24)	84,9±16,5 (n=12)	t(34)=2.4; p=0.024
Após BD	76,4±13,5 (n=37)	71,3±12,1 (n=20)	82,5±12,7 (n=17)	t(35)=2.7; p=0.01	72,0±11,1 (n=24)	85,1±13,5 (n=13)	t(35)=3.2; p=0.03
Δ após BD	0,8±8,7 (n=36)	1,1±10,9 (n=20)	0,4±5,3 (n=16)	t(34)=-0.2; p=0.822	0,8±10,0 (n=24)	0,8±6,0 (n=12)	t(34)=0.0; p=0.999
FEV₂₅₋₇₅ (%):							
Basal	53,0±35,7 (n=35)	38,8±26,1 (n=19)	69,9±39,0 (n=16)	t(33)=2.8; p=0.008	38,9±25,3 (n=23)	80,1±38,0 (n=12)	t(33)=3.8; p=0.001
Após BD	76,6±44,2 (n=36)	61,5±45,1 (n=19)	91,2±38,6 (n=17)	t(34)=2.1; p=0.042	62,7±41,9 (n=23)	98,4±40,0 (n=13)	t(34)=2.5; p=0.017
Δ após BD	22,4±32,9 (n=35)	22,7±37,0 (n=19)	22,1±28,6 (n=16)	t(33)=-0.1; p=0.961	23,7±35,7 (n=23)	19,9±28,2 (n=12)	t(33)=-0.3; p=0.750
Eosinófilos sangue (%)	4,0±3,9 (n=37)	4,8±4,7 (n=20)	3,0±2,4 (n=17)	t(35)=-1.4; p=0.164	4,5±4,4 (n=24)	3,0±2,5 (n=13)	t(35)=-1.1; p=0.275
IgE sérica Log((mmol/L)+1)	2.1±0.6 (n=36)	2.1±0.5 (n=19)	2.2±0.7 (n=17)	t(34)=0.1; p=0.907	2.1±0.5 (n=23)	2.2±0.7 (n=13)	t(34)=1.8; p=0.857
IgE total (mmol/L)	380,5±854,5 (n=36)	238,1±278.3 (n=19)	539,7±1207,9 (n=17)	t(34)=1.1; p=0.297	249,1±293,6 (n=23)	612,9±1371,9 (n=13)	t(34)=1.2; p=0.363
FeNO (ppb)							
<35	16(66.7)	8(50.0)	8(50.0)	χ ² (1)=0.0; p=1.0	11(68.8)	5(31.3)	χ ² (1)=0.09; p=1.00
≥35	8(33.3)	4(50.0)	4(50.0)		5(62.5)	3(37.5)	

BD: broncodilatação; FVC: forced vital capacity; DLCO: difusão livre do monóxido de carbono; FeNO; Fração exalada de óxido nítrico; FEV₁: Volume forçado expirado no 1º segundo; FEV₂₅₋₇₅: volume forçado expiratório entre 25-27% da forced vital capacity; IMC: Índice de massa corporal; VR: Volume residual

Informação suplementar 6

Quadro X-S – Dados em falta para análise *cluster* (Com dados em falta, N=72; Sem dados em falta, N=57)

Variáveis	Valores totais em falta	Padrão de dados em falta										
Comorbilidades	1				1							
Controlo da doença e doente em risco	1											1
Medicação	1		1									
SOA	2										1	1
ACT	1											1
CARAT (Rinite)	3									1	1	1
CARAT (Asma)	3									1	1	1
ALQ	8	5								1	1	1
Labilidade brônquica	1								1			
FEV ₁ basal (%previsto)	3						1	1	1			
FEV ₁ /FVC Basal (%previsto)	3						1	1	1			
FEV _{25%-75%} (%previsto) Basal	4					1	1	1	1			
VR Basal (%previsto)	1							1				
IgE Sérica (mmol/L):	1			1								

ACT: *Asthma Control Test*; ALQ: *Asthma Life Quality*; CARAT: *Control of Allergic Rhinitis and Asthma Test*; SOA: *Severity Asthma Score*

VIII.

ÍNDICE

VIII.

VIII.1 ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I	Níveis de controlo da asma	15
Quadro II	Categorias funcionais dos genes associados à asma	16
Quadro III	Critérios de classificação de asma refractária, segundo ATS	19
Quadro IV	Critérios de classificação de asma grave/difícil, segundo a WHO	20
Quadro V	Vantagens e desvantagens das matrizes utilizadas para o estudo da asma	29
Quadro VI	Folha protocolar – visitas e procedimentos	36
Quadro VII	Variáveis independentes usadas nos modelos de regressão	40
Quadro VIII	Variáveis contínuas, binárias e compostas, seleccionadas para a análise <i>cluster</i>	41
Quadro IX	Classificação de concordância entre as escalas ATS e WHO	46
Quadro X	Caracterização da população asmática (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	49
Quadro XI	Distribuição de comorbilidades (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	50
Quadro XII	Controlo da doença, Qualidade de vida, Risco de eventos adversos (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	53
Quadro XIII	Terapêutica (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	55
Quadro XIV	Função pulmonar (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	57
Quadro XV	Biomarcadores no sangue periférico e ar exalado (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	59
Quadro XVI	Distribuição dos doentes graves pelos critérios WHO	60
Quadro XVII	Correlações com significado estatístico estabelecidas entre os parâmetros avaliados na população estudada	63
Quadro XVIII	Correlações com significado estatístico estabelecidas na população grave (WHO)	66
Quadro XIX	Classificação de concordância entre as classificações WHO e ATS baseada nos resultados da expectoração induzida	68
Quadro XX	Distribuição dos fenótipos celulares da expectoração, globalmente e por grupos de gravidade (População total, Grupo Grave	

	(Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	69
Quadro XXI	Contagem diferencial de células na expectoração induzida (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	70
Quadro XXII	Correlações das características imunocelulares da expectoração com outros parâmetros clínicos	71
Quadro XXIII	Caracterização de fenótipos segundo características clínicas, funcionais e laboratoriais	73
Quadro XXIV	Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com atopia	76
Quadro XXV	Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com idade de início de asma após os 12 anos de idade ($p < 0.05$)	80
Quadro XXVI	Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com HS a AINEs ($p < 0.05$)	83
Quadro XXVII	Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo obesidade ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$)	86
Quadro XXVIII	Modelo de regressão logística para a predição do fenótipo com obstrução persistente da via aérea ($p < 0.05$)	90
Quadro XXIX	Modelo de regressão logística para a predição de doentes graves segundo a WHO ($p < 0.05$)	93
Quadro XXX	Comparação das metodologias de análise <i>cluster Ward e two-step clustering</i>	98
Quadro XXXI	Caracterização da população asmática e da história da doença, nos 5 <i>clusters</i>	107
Quadro XXXII	Controlo da doença, qualidade de vida e risco de eventos adversos, nos 5 <i>clusters</i>	108
Quadro XXXIII	Distribuição das comorbilidades nos 5 <i>clusters</i>	109
Quadro XXXIV	Distribuição da terapêutica pelos 5- <i>clusters</i>	110
Quadro XXXV	Função pulmonar nos 5 <i>clusters</i>	111
Quadro XXXVI	Metabolitos urinários VIP e predição de parâmetros clínicos	123
Quadro I-S	Aldeídos e alcanos urinários identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS seleccionados para análise multivariada	205
Quadro II-S	Caracterização da amostra consoante ocorrência de episódio de hospitalização no último ano	207
Quadro III-S	Caracterização da amostra por género	210
Quadro IV-S	Caracterização da amostra consoante existência de atopia	223
Quadro V-S	Caracterização da amostra consoante idade início de doença após 12 anos	226
Quadro VI-S	Caracterização da amostra consoante existência de HS AINEs	230
Quadro VII-S	Caracterização da amostra consoante $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$	233
Quadro VIII-S	Caracterização de doentes consoante existência de obstrução persistente	236
Quadro IX-S	Características demográficas e clínicas da população submetida a colheita da expectoração (População total, Grupo Grave (Classificação ATS e WHO), Grupo Não Grave (Classificação ATS e WHO))	241
Quadro X-S	Dados em falta para análise <i>cluster</i>	243

VIII.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Interações da vias citocínicas na asma grave	12
Figura 2	Agrupamento teórico de fenótipos asmáticos emergentes, baseados na distinção Th2	26
Figura 3	Estudo imunofenotípico das células da expectoração	38
Figura 4	Distribuição dos fenótipos celulares da expectoração, por grupos de gravidade	69
Figura 5	Dendrograma obtido por análise <i>cluster</i> hierárquica, segundo método Ward	97
Figura 6	Gráfico de aglomeração	98
Figura 7	Variável <i>início de asma antes dos 12 anos</i> nos 5 <i>clusters</i>	99
Figura 8	Variável qualitativa de gravidade (<i>classificação WHO</i>) nos 5 <i>clusters</i>	100
Figura 9	Variável quantitativa de gravidade (<i>Severity of Asthma Score</i>) nos 5 <i>clusters</i>	100
Figura 10	Variável <i>IMC (Kg/m²)</i> nos 5 <i>clusters</i>	101
Figura 11	Variável <i>inflamação eosinofílica no sangue periférico (% eosinófilos)</i> nos 5 <i>clusters</i>	101
Figura 12	Variável <i>qualidade de vida (ALQ)</i> nos 5 <i>clusters</i>	105
Figura 13	Variável <i>controlo da asma (CARATasma)</i> nos 5 <i>clusters</i>	106
Figura 14	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves	114
Figura 15	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, com < 21 anos de idade	115
Figura 16	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, entre 22-40 anos de idade	116
Figura 17	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, entre 41-60 anos de idade	117
Figura 18	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos graves e não graves, para indivíduos com mais de 60 anos de idade	118
Figura 19	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina dos 52 indivíduos, distribuídos pelos 5 <i>clusters</i>	119
Figura 20	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos detectados na urina de indivíduos dos <i>clusters</i> C1, C3 e C5	121
Figura 21	Análise PLS-DA aplicada às áreas de pico de aldeídos e alcanos alifáticos detectados na urina de indivíduos dos <i>clusters</i> C2 e C4	122
Figura 22	Curvas previstas Vs curvas medidas e respectivos modelos estatísticos de PLS para a predição de parâmetros clínicos usando metabolitos urinários	124
Figura 23	Adaptação esquemática dos nossos <i>clusters</i> à representação esquemática de Wenzel	168
Figura S-1	Correlação FEV ₁ (%) com Género (população total)	213
Figura S-2	Correlação FEV ₁ (%) com Controlo da doença (população total)	213
Figura S-3	Correlação FEV ₁ (%) com História de pneumonia (população total)	214

Figura S-4	Correlação FEV1(%) com Obstrução persistente (população total)	214
Figura S-5	Correlação FEV1(%) com Reversibilidade brônquica (população total)	215
Figura S-6	Correlação FEV ₁ (%) com Classificação de grave (pela WHO) (população total)	215
Figura S-7	Correlação FEV ₂₅₋₇₅ (%) com Classificação de grave (WHO) (população total)	216
Figura S-8	Correlação VR (%) com Obstrução persistente (população total)	216
Figura S-9	Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com início de asma antes dos 12 anos (população total)	217
Figura S-10	Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com dose de CSI >750 µg de PF ou equivalente (população total)	217
Figura S-11	Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com reversibilidade brônquica (população total)	218
Figura S-12	Correlação eosinófilos expectoração (%) com início da doença antes dos 12 anos (população total)	218
Figura S-13	Correlação neutrófilos expectoração(%) com exacerbação grave no último ano (população total)	219
Figura S-14	Correlação eosinófilos sangue periférico (%) com dose de CSI >750 µg de PF ou equivalente (população grave)	220
Figura S-15	Correlação IgE sérica (mmol/L) com atopia (população grave)	220
Figura S-16	Correlação neutrófilos na expectoração (%) com exacerbação grave no último anos (população grave)	221
Figura S-17	Correlação neutrófilos na expectoração (%) com género (população submetida a colheita de expectoração)	222

VIII. 3 ÍNDICE GERAL

SUMÁRIO	Xiii
AGRADECIMENTOS	xv
NOTA PRÉVIA	xvii
ABREVIATURAS	xix
RESUMO/SUMMARY	xxiii
I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	1
I.1 INTRODUÇÃO	3
I.2 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA NA ASMA	4
I.2.1 Definição da asma enquanto doença	4
I.2.2 Epidemiologia em Portugal	4
I.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA ASMA	6
I.3.1 Células envolvidas nos diferentes mecanismos fisiopatológicos da asma	6
I.3.2 Resposta imuno-inflamatória	8
I.3.3 Particularidades da patogénese da asma grave	11
I.4 DEFINIÇÕES DE CONTROLO DA ASMA E DE EXACERBAÇÕES	14
I.5 FACTORES DE RISCO	15
I.6 COMORBILIDADES	17
I.7 CONCEITO DE GRAVIDADE – DEFINIÇÃO DA ASMA DE DIFÍCIL TRATAMENTO E DE ASMA GRAVE	19
I.8 FENÓTIPOS E ENDÓTIPOS DA ASMA – O QUE SE CONHECE	22
I.8.1 Endótipo asma grave. Existe ?	26
I.9 NOVOS MÉTODOS PARA IDENTIFICAR FENÓTIPOS	27
II. INVESTIGAÇÃO REALIZADA FACE AOS OBJECTIVOS	31
II.1 OBJECTIVOS GERAIS	33
II.2 MÉTODOS	34
II.2.1 Sujeitos e critérios de selecção	34
II.2.2 Desenho do estudo	35
II.2.2.1 Protocolo de visitas	36
II.2.2.2 Questionários	37
II.2.2.3 Procedimentos	37
II.2.2.4 Metodologia para a construção de modelos de predição de fenótipos asmáticos	40
II.2.2.5 Metodologia para análise <i>cluster</i>	42
II.2.2.6 Análise estatística	43
II.3 RESULTADOS	45
II.3.1 Considerações prévias	45
II.3.2 Caracterização da população global com enfoque nos doentes graves, suportada em parâmetros funcionais respiratórios e laboratoriais imunoinflamatórios	46
II.3.2.1 Caracterização demográfica e clínica	47
II.3.2.2 Classificação de gravidade	60
II.3.2.3 Correlações entre os parâmetros avaliados na caracterização da população	60
II.3.3 Identificação de fenótipos celulares da expectoração numa	

população de asmáticos e suas correlações com parâmetros clínicos, funcionais e laboratoriais	68
II.3.3.1 Considerações prévias	68
II.3.3.2 Contagem diferencial de células da expectoração	68
II.3.3.3 Correlações das características imunocelulares da expectoração com outros parâmetros clínicos avaliados	70
II.3.4 Caracterização dos fenótipos clínicos da população. Identificação de factores de risco/protecção de fenótipo, com base em modelos de predição	71
II.3.4.1 Fenótipo de atopia	75
II.3.4.2 Fenótipo com idade de início de asma após os 12 anos de idade	78
II.3.4.3 Fenótipo de HS e AINE`s	82
II.3.4.4 Fenótipo de obesidade	85
II.3.4.5 Fenótipo obstrução persistente	88
II.3.4.6 Fenótipo grave	92
II.3.5 Agrupamento da população em <i>clusters</i> e suas características	96
II.3.5.1 Identificação de <i>clusters</i>	96
II.3.5.2 Caracterização dos <i>clusters</i> identificados	99
II.3.6 A metabolómica na asma grave e na identificação de características específicas da asma (grupos de gravidade, fenótipos e <i>clusters</i>)	113
II.3.6.1 Asma grave	113
II.3.6.2 <i>Clusters</i>	119
II.3.6.3 Relação entre as características fenotípicas e os <i>clusters</i> encontrados com os biomarcadores urinários identificados	122
III. DISCUSSÃO GLOBAL DOS RESULTADOS	125
III.1 CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS	127
III.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO GLOBAL COM ENFOQUE NOS DOENTES GRAVES, SUPORTADA EM PARÂMETROS FUNCIONAIS RESPIRATÓRIOS E LABORATORIAIS IMUNOINFLAMATÓRIOS	131
III.2.1 Características demográficas e clínicas (população total)	131
III.2.2 Classificação de gravidade	135
III.2.3 Características demográficas e clínicas (considerando o grupo de gravidade)	136
III.2.4 Correlações entre parâmetros avaliados	140
III.2.4.1 Correlações entre parâmetros avaliados na população total	140
III.2.4.2 Correlações entre parâmetros avaliados na população grave	142
III.2.4.3 Importância clínica dos resultados e limitações	143
III.3 IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS CELULARES DA EXPECTORAÇÃO NUMA POPULAÇÃO DE ASMÁTICOS, COM ENFOQUE NOS DOENTES GRAVES, E CORRELAÇÕES COM PARÂMETROS CLÍNICOS, FUNCIONAIS E LABORATORIAIS.	145
III.3.1 Contagem diferencial de células nos fenótipos celulares da expectoração	145
III.3.2 Correlações das características imunocelulares da expectoração com outros parâmetros clínicos	148
III.3.3 Importância clínica dos resultados e limitações	149

III.4	CARACTERIZAÇÃO DOS FENÓTIPOS CLÍNICOS DA POPULAÇÃO. IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE RISCO/PROTECÇÃO DE FENÓTIPO, COM BASE EM MODELOS DE PREDIÇÃO	149
III.4.1	Fenótipo atopia	150
III.4.2	Fenótipo idade de início de asma após os 12 anos de idade	151
III.4.3	Fenótipo HS a AINE's	153
III.4.4	Fenótipo obesidade	154
III.4.5	Fenótipo obstrução persistente da via aérea	157
III.4.6	Fenótipo grave	159
III.4.7	Importância clínica dos resultados e limitações	161
III.5	AGRUPAMENTO DA POPULAÇÃO EM <i>CLUSTERS</i>	162
III.5.1	Discussão dos <i>clusters</i> identificados	163
III.5.1	Importância clínica dos resultados e limitações	168
III.6	A METABOLÓMICA NA ASMA E NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES URINÁRIOS DE ASMA (grupos de gravidade, fenótipos e <i>clusters</i>)	169
III.6.1	Gravidade da asma	169
III.6.2	<i>Clusters</i>	170
III.6.3	Relação entre características fenotípicas/ <i>clusters</i> encontrados com os biomarcadores urinários identificados	170
III.6.4	Importância clínica dos resultados e limitações	171
IV.	CONCLUSÕES	173
IV.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO GLOBAL COM ENFOQUE NOS DOENTES GRAVES, SUPOSTADA EM PARÂMETROS FUNCIONAIS RESPIRATÓRIOS E LABORATORIAIS IMUNOINFLAMATÓRIOS	175
IV.2	IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS CELULARES DA EXPECTORAÇÃO NUMA POPULAÇÃO DE ASMÁTICOS E SUAS CORRELAÇÕES COM PARÂMETROS CLÍNICOS, FUNCIONAIS E LABORATORIAIS	177
IV.3	CARACTERIZAÇÃO DOS FENÓTIPOS CLÍNICOS DA POPULAÇÃO E POTENCIAIS FACTORES DE RISCO E DE PROTECÇÃO, COM BASE EM MODELOS DE PREDIÇÃO	177
IV.4	AGRUPAMENTO DA POPULAÇÃO EM <i>CLUSTERS</i> E SUAS CARACTERÍSTICAS	178
IV.5	A METABOLÓMICA NA ASMA GRAVE E NA IDENTIFICAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DA ASMA (grupos de gravidade, fenótipos e <i>clusters</i>)	178
V.	PUBLICAÇÕES	181
VI.	BIBLIOGRAFIA	185
VII.	INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR	203
VIII.	ÍNDICE	245