



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA MARGARIDA LEITÃO DA SILVA SANTOS

***O PAPEL DO ESTUDO METABOLÓMICO NA DOENÇA
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DRA. DANIELA SOFIA MADAMA SANTOS SILVA

PROFESSOR DOUTOR CARLOS MANUEL SILVA ROBALO CORDEIRO

MARÇO/2019

O papel do estudo metabólico na Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

Ana Margarida Leitão da Silva Santos¹

Dra. Daniela Sofia Madama Santos Silva²

Prof. Doutor Carlos Manuel Silva Robalo Cordeiro³

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

amlss@hotmail.com

**² Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal – Centro Hospitalar e
Universitário de Coimbra, Portugal**

madama.daniela@gmail.com

**³Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal – Centro Hospitalar e
Universitário de Coimbra, Portugal**

carloscrobalo@gmail.com

ÍNDICE GERAL

RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	9
MÉTODOS	10
METABOLÓMICA	11
MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADAS EM ESTUDOS METABOLÓMICOS	13
Desenho Experimental	13
Amostras biológicas	14
Técnicas Analíticas	15
Análise e interpretação dos dados metabolômicos	17
A METABOLÓMICA EM CONTEXTO CLÍNICO	19
OS DESAFIOS DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA	20
ESTUDOS METABOLÓMICOS NA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA	21
Etiologia e Patogénese	22
A procura de biomarcadores na DPOC	26
Diagnóstico e Diagnósticos Diferenciais	28
Progressão e Exacerbações	29
Terapêutica	32
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	38
BIBLIOGRAFIA	41

RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica é uma das doenças respiratórias mais prevalentes em todo o mundo e de acordo com a Organização Mundial de Saúde prevê-se que seja a terceira causa de morte a nível mundial em 2030. É uma doença complexa, multifactorial e heterogénea associada a uma elevada taxa de mortalidade e morbilidade, em que a sua prevenção, diagnóstico precoce e abordagem terapêutica são grandes desafios na medicina atual.

A área científica da metabolómica e os seus estudos permitem a análise sistemática imparcial, qualitativa e quantitativa dos metabolitos num determinado sistema biológico, recorrendo a técnicas analíticas como espectrometria por Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogénio ou espectrometria de massa. Estes estudos têm contribuído com dados sobre a patogénese e etiologia da DPOC e com propostas de biomarcadores de doença, de progressão e exacerbação. Tem igualmente demonstrado ser um potencial instrumento no diagnóstico diferencial entre a DPOC e outras doenças respiratórias através da distinção dos perfis metabolómicos, assim como na monitorização da terapêutica e identificação de possíveis novos alvos terapêuticos na DPOC. Esta revisão pretende sistematizar o conhecimento atual fornecido pelos mais recentes estudos metabolómicos realizados na área da DPOC, compreendendo o seu papel e o potencial futuro nas diferentes áreas desta patologia.

Palavras-Chave: Metabolómica, metabolitos, metaboloma, Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease is one of the most prevalent lung diseases worldwide and according to the World Health Organization is predicted to be the third leading cause of death throughout the world by 2030. It is a complex, multifactorial and heterogeneous disease associated to a high morbidity and high mortality rate in which its prevention, early diagnosis and therapeutic approach is a major challenge in current medicine.

Metabolomics and their studies allow an unbiased, qualitative and quantitative systematic analysis of the metabolites in a given biological system, using analytical techniques such as Proton Nuclear Magnetic Resonance spectrometry or Mass Spectrometry. These studies have contributed with important data on the pathogenesis and etiology of COPD, as well as in establishing biomarkers of disease, progression and exacerbation. They also have been shown to be a potential tool in the differential diagnosis between COPD and other respiratory diseases, by distinguishing metabolic profiles, as well as the monitoring therapy response and the identification of new therapeutic targets in COPD.

This review intends to systematize current knowledge provided by the most recent metabolomic studies performed in the area of COPD, including the understanding of its role and potential future in the different areas of this pathology.

Keywords: Metabolomics, metabolome, metabolites, Chronic Obstructive Pulmonary Disease

LISTA DE ABREVIATURAS

1H-RMN	Ressonância Magnética de próton
ACO	Síndrome de Sobreposição Asma-DPOC
ACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
BJF	Bufei Jianpi formula
cAMP	Adenosina de monofosfato cíclico
CFRT	Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Quística
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa associada a Espectometria de Massa
CL	Cromatografia Líquida
CL-EM	Cromatografia Líquida associada a Espectometria de Massa
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de desidroepiandrosterona
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
EBC	Ar condensado exalado
EC	Electroforese Capilar
ECLIPSE	<i>Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints</i>
EETs	Ácidos Epoxieicosatrienoicos
EM	Espectometria de Massa
FEV1	Volume expiratório máximo no primeiro segundo
FVC	Capacidade vital forçada
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
HRM	Metabolómica de alta resolução
ICS	Corticóides inalados
IMC	Índice de Massa Corporal
LABA	Agonistas β_2 de longa duração de acção inalatório
LAMA	Antagonistas muscarínicos de longa acção inalatório
LBA	Lavado broncoalveolar
LPC	Lisofosfatidilcolina
MMPs	Metaloproteinases
MOLT	<i>Multi-organ loss of tissue</i>
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintetase do Óxido Nítrico

OLD	Oxigenoterapia de longa duração
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDE4	Fosfodiesterase 4
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SABA	Agonista β 2 de curta duração de acção
SAMA	Antagonista muscarínico de curta duração de acção inalatório
SAOS	Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono
sEH	Hidrolase Epóxido solúvel
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
UPLC	Cromatografia líquida de ultra pressão
VIH	Vírus Imunodeficiência Humana
VOCs	Compostos orgânicos voláteis

INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma doença que afeta mais de 10% da população com mais de 40 anos. Dado o aumento da sua prevalência prevê-se que seja a 3ª causa de morte, a nível mundial, em 2030. É uma doença complexa, heterogênea, irreversível e progressiva, com um diagnóstico inicial muitas vezes tardio, baseado no estudo funcional ventilatório. O recurso isolado ao estudo espirométrico não descreve o impacto clínico no doente e os seus efeitos sistémicos. Em 2011 foi introduzida, pela *Global Initiative for COPD (GOLD)*, a estratificação dos doentes quanto à severidade (I-IV) e em categorias (A-D) englobando uma visão abrangente através dos sintomas respiratórios e exacerbações, com vista a uma melhor abordagem terapêutica. No entanto, existe a necessidade de uma medicina mais precisa, com terapêutica personalizada e fenótipo-dirigida. Existe igualmente a necessidade de um diagnóstico mais precoce, deteção da sua progressão, assim como de novos alvos terapêuticos.

A metabolómica é uma parte do campo das -ómicas que se foca numa grande variedade de moléculas de baixo peso molecular, metabolitos, presentes nas amostras biológicas. Estes refletem estados metabólicos celulares na saúde e na doença, assim como identificam “marcadores” de resposta a fármacos, podendo ser uma ferramenta para conseguir compreender os mecanismos biológicos subjacentes e caracterização de fenótipos da doença. Na medicina os dados provenientes dos estudos metabolómicos têm-se mostrado promissores na procura de novos marcadores que permitam estabelecer um diagnóstico precoce, fazer diagnóstico diferencial e a monitorizar e a descobrir de novas abordagens terapêuticas.

Assim, este trabalho tem por objetivo uma revisão teórica sobre os mais recentes estudos metabolómicos na DPOC, compreendendo o seu papel e os seus contributos na doença.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a realização de uma revisão teórica sobre os estudos metabolómicos na DPOC, compreendendo o seu papel, baseada numa investigação bibliográfica de artigos recentes, indexados e com interesse inequívoco para a dissertação.

Os autores visam abordar aspetos da metabolómica na medicina, as suas metodologias e técnicas, a sua aplicação nas doenças respiratórias, assim como compreender o papel e os contributos mais recentes dos estudos metabolómicos sobre etiologia e patogénese, possíveis biomarcadores, diagnóstico diferencial, progressão/exacerbações e terapêutica da DPOC.

MÉTODOS

Foi efetuada uma investigação bibliográfica na literatura científica sobre os estudos metabolômicos e a DPOC. Foram utilizadas as bases de dados Pubmed, EMBASE e Cochrane Library usando palavras-chave relevantes. A pesquisa foi realizada usando as seguintes palavras-chave: “*metabolomics*”, “*metabolome*”, “*metabolites*” e “*chronic obstructive pulmonary disease*” com a equação de pesquisa “*metabolomics OR metabolome OR metabolites AND obstructive pulmonar disease*”. Subsequentemente a pesquisa foi restrita a publicações em inglês, dos últimos 5 anos. Durante a seleção dos artigos foram favorecidos artigos originais, estudos clínicos randomizados e revisões sistemáticas. Usando os critérios de busca descritos, foram analisados 129 artigos dos quais foram excluídos 56 artigos por irrelevância ou acesso impossibilitado. O número final de artigos selecionados foi de 73.

METABOLÓMICA

A metabolómica, ou metabonómica, é um ramo científico recente que permite a análise sistemática imparcial, qualitativa e quantitativa, de pequenas moléculas, metabolitos, de um sistema biológico (células, tecidos, biofluido) em determinado tempo e condições, assim como também permite o estudo da totalidade de metabolitos endógenos de um sistema biológico e dos que surgem em resposta a determinados estímulos internos ou externos. (1) Os metabolitos são pequenas moléculas (<1000 Da) que participam em reações químicas dentro de um ser vivo, incluindo peptídeos, aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis, alcalóides ou compostos inorgânicos que agem como pequenas moléculas biomarcadoras que refletem um determinado estado funcional da célula, tecido ou organismo. (1,2)

O metaboloma é o conjunto de todas as pequenas moléculas expressas num determinado organismo. O conceito de metaboloma aparece inicialmente na literatura por Oliver Fiehn, em 1998, tendo este definido a metabolómica como a análise compreensiva e quantitativa da máxima quantidade possível de metabolitos, com recurso a técnicas analíticas, com o objetivo de obter uma fotografia instantânea do metabolismo. (3)

O conceito chave da metabolómica é de que as alterações que ocorrem a nível do transcriptoma, genoma ou proteoma, estão refletivas no metaboloma, que por sua vez irão resultar em alteração nas concentrações dos metabolitos nas amostras biológicas. (4) Enquanto a genómica e a proteómica preveem o que acontecerá, a metabolómica diz-nos o que aconteceu. (1)

Apesar de ser uma área científica recente, a quantificação de metabolitos em amostras biológicas não é um conceito novo, tendo sido desde a antiguidade utilizado como marcadores de diagnóstico de várias doenças. O diagnóstico de Diabetes mellitus tipo I era baseado no sabor doce da urina causado pela excessiva excreção de glicose como um pequeno metabolito. Isto conduziu ao desenvolvimento de ferramentas analíticas que foram implementadas ao longo de 100 anos na quantificação de pequenos metabolitos, em vários tipos de amostras biológicas, ainda utilizadas na atualidade. (3) Muitos estudos envolvendo noções de metabolómica estão reportados na literatura, no entanto apenas nos anos noventa foram propostos os termos metaboloma, metabolómica e metabonómica. (3,5)

O conceito de metaboloma, em comparação com o genoma ou transcriptoma, é muito mais dinâmico, porque a metabolómica deteta alterações dos metabolitos resultantes das alterações fisiológicas e do próprio ambiente em determinado período. (5) O maior desafio da metabolómica prende-se com a extrema diversidade e complexidade dos compostos a analisar. Os metabolitos são um grupo de biomoléculas que apresentam um

grande espectro de concentrações e características físico-químicas, como a massa e a polaridade. (6)

A lipidômica é uma subdivisão da metabolômica definida como a caracterização completa das espécies moleculares relativas aos lípidos e o seu papel biológico em relação à expressão proteica envolvida na função e metabolismo lipídico, assim como na sua regulação genética. Este termo foi proposto em 2003 por Hans e Gross para definir uma área de investigação focada na identificação de alterações do metabolismo lipídico e processos de sinalização celular mediados por lípidos, envolvidos na regulação dos processos de homeostasia celular na saúde e na doença. (5,7)

Outro campo dos estudos metabolômicos que se tem desenvolvido muito na última década é a *breathomica*. É definida como o estudo metabolômico de ar exalado do ser humano. Esta área tem como um dos seus maiores objetivos conseguir de forma não invasiva a procura de moléculas biomarcadoras de doença. (8) A deteção de VOCs, compostos voláteis orgânicos, através da análise do ar exalado, reflete alterações do metabolismo que esteja afetado. No entanto, a *breathomica* salienta que os VOCs do ar exalado não representam exclusivamente o metabolismo pulmonar. (9)

A metabolômica é uma área muito abrangente que tem sofrido um rápido desenvolvimento. A partir das pesquisas metabolômicas a nível clínico, poder-se-ão alcançar valiosos instrumentos para a deteção de alterações fisiológicas, monitorização de possíveis alterações decorrentes de insultos ambientais, diagnóstico precoce, progressão de doença e resposta terapêutica. (1)

MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADAS EM ESTUDOS METABOLÓMICOS

Os estudos metabolômicos têm dois tipos de abordagem. A abordagem dirigida, *targeted metabolomics*, quando a pesquisa se propõe a pesquisar um pequeno número de determinados metabolitos, previamente conhecidos. Neste contexto, realiza-se uma análise quantitativa de determinados metabolitos e/ou substratos de reações metabólicas que poderão estar associadas a uma classe química comum ou ligada a determinada via metabólica selecionada. Este tipo de abordagem analisa um perfil metabolômico – *metabolic profiling*, que permite testar hipóteses mais específicas. (4,5).

Outro tipo de abordagem é a não dirigida, *untarged metabolomics*, baseia-se numa análise qualitativa e quantitativa do maior número possível de metabolitos de uma determinada classe química ou biológica de uma amostra biológica, sejam estes metabolitos intracelulares (*fingerprinting*) ou extracelulares (o que a célula ou sistema excreta em condições controladas – *footprinting*). Este tipo de abordagem permite explorar e identificar substâncias desconhecidas, sendo útil na procura de possíveis biomarcadores. (5)

Os estudos metabolômicos respeitam importantes passos sequenciais subjacentes a ambos os tipos de abordagem *targeted* ou *untargeted*.

Desenho Experimental

O passo inicial de um estudo metabolômico consiste na formulação clara do problema/questão científica ou experimental colocada no qual este assentará. É um passo crucial, pois define o desenho experimental a ser utilizado. De acordo com a questão formulada, o tipo de abordagem metabolômica (*targeted vs untargeted*) é definida. Define-se igualmente o tipo, tamanho e as condições experimentais relativamente à colheita das amostras biológicas, as suas condições de armazenamento, assim como quais as plataformas analíticas e metodologias estatísticas dos dados, a serem utilizadas. Os estudos metabolômicos têm um carácter comparativo, existindo amostras biológicas de um grupo controlo (grupo que não submetido à condição investigada) e amostras teste (com informação sobre a condição em investigação). Todas as variáveis clínicas devem ser definidas e controladas, assim como o tamanho e seleção da amostra caso/controlo, de modo a conferir validade interna e externa do estudo metabolômico, evitando “falsas descobertas” em metabolômica. (3,4,10)

Amostras biológicas

Os estudos metabolômicos utilizam nas suas investigações vários tipos de amostras biológicas como urina, plasma, líquido cerebrospinal, bÍlis, líquido seminal, amniótico, sinovial, aspirado gástrico, ar condensado exalado (EBC), lavado broncoalveolar (LBA), expetoração, saliva, suor, tecidos, células *in vivo* ou seus extratos. A urina e sangue são os biofluidos mais utilizados em estudos metabolômicos, apresentando milhares de metabolitos detetáveis e podendo ser obtidos de forma não invasiva ou minimamente invasiva. (4,10,11)

A urina é uma excelente amostra biológica com várias vantagens. Apresenta uma concentração baixa de células e proteínas, a sua colheita é fácil e não invasiva. O metaboloma urinário tem sido utilizado para investigar as consequências metabólicas de doença, atendendo a que esta é uma via principal de excreção de metabolitos solúveis e de compostos químicos estranhos ao organismo, xenobióticos. A presença, tanto de metabolitos endógenos como exógenos, torna a urina uma boa amostra biológica para implementação de estudos metabolômicos na procura de biomarcadores de doenças, caracterização e descoberta de medicamentos, determinação de *status* nutricional e efeitos ambientais no organismo. (2,4,10)

O sangue e o seu perfil metabolômico reflete a homeostasia corporal através dos seus constantes mecanismos reguladores, permitindo uma visão global instantânea do estado metabólico do organismo. (2,10)

A colheita de EBC é um método simples, não invasivo, importante no estudo de compostos bioquímicos e moléculas inflamatórias ao nível do fluido de revestimento das vias aéreas, sendo a sua maior vantagem a análise de metabolitos voláteis e não voláteis. No entanto, a sua análise apresenta indesejavelmente grande variabilidade, com dificuldades de standardização da colheita e controlo de fatores como, consumo tabágico e álcool, do equipamento, exercício, frequência e amplitude respiratória, contaminação das vias aéreas superiores, temperatura ambiental, compostos de amónia e enxofre presentes na cavidade oral. (2,12,13) Acredita-se que a análise de ar exalado, através das técnicas metabolômicas, no estudo das doenças respiratórias seja promissora na procura de importantes marcadores biológicos. Têm sido desenvolvidos esforços, relativamente a instrumentos e metodologias mais sensíveis para o estudo deste tipo de amostra atendendo a que a maioria dos compostos exalados se encontram em concentrações extremamente baixas e com uma complexa mistura de compostos endógenos e exogéneos. (13,14)

O LBA é um fluido fisiologicamente importante principalmente no estudo de doenças respiratórias, no entanto a sua maior limitação é a sua colheita ser invasiva com recurso a

broncofibroscopia. Outra limitação é a necessidade de diluição da amostra biológica, inerente à técnica, que dificulta a análise metabolômica. (2)

A saliva tem sido um fluido biológico negligenciado nas análises metabolômicas, mas acredita-se que reflita com precisão o metaboloma plasmático. É uma amostra de fácil colheita, não invasiva, sem constrangimento ou desconforto, com protocolos de colheita pré-definidos e instrumentos que possibilitam a reprodutibilidade da colheita. No entanto é uma amostra suscetível à influência de vários fatores externos, sendo necessários métodos de detecção mais sensíveis e que permitam estabelecer as correlações biológicas da saliva e os outros biofluidos. (6,10)

Existem vários protocolos standardizados, consoante o tipo de amostras biológica, para colheita, manipulação, armazenamento e preparação das amostras, necessários para assegurar o controlo da qualidade do estudo. (2,5) A preparação da amostra dependerá do tipo da amostra mas também do tipo de abordagem metabolômica selecionada e da técnica analítica eleita para a realização do estudo. (2)

Técnicas Analíticas

A metabolômica apresenta um grande desafio analítico, em comparação com as outras ciências das -ómicas, atendendo ao elevado número de compostos químicos com diferentes propriedades químicas, funções e estruturas moleculares, presentes nas amostras biológicas. Os metabolitos podem ser quantificados por diferentes técnicas analíticas mas as mais utilizadas são a espectrometria por ressonância magnética de prótão ($^1\text{H-RMN}$) e a espectrometria de Massa (EM). Nenhuma técnica isolada consegue identificar todos os metabolitos presentes no metaboloma simultaneamente. A escolha da técnica analítica é influenciada por vários fatores, incluindo o tipo de amostra biológica a ser utilizado no estudo. Cada técnica analítica apresenta determinadas vantagens e desvantagens. (3,4)

A espectrometria por $^1\text{H-RMN}$ utiliza um poderoso campo magnético para alinhar prótões presentes na amostra. Vários campos magnéticos podem ser utilizados, entre 400 a 900MHz. Quanto mais alto este valor, mais sensível é o campo magnético para baixas concentrações de metabolitos ou proteínas. Os prótões de hidrogénio ligados a diferentes moléculas têm diferentes frequências de ressonância de acordo com a posição do hidrogénio nesta molécula. De maneira análoga, cada metabolito terá um espectro característico de acordo com as frequências de ressonância de seus prótões, o que permite sua pronta e inequívoca identificação pela posição dos picos num gráfico, como uma

"impressão digital", uma verdadeira "assinatura" espectroscópica. A cada metabolito corresponderá um único espectro de RMN. (4,6)

É uma técnica de detecção de metabolitos universal, onde muitas classes de metabolitos podem ser quantificadas simultaneamente e cujas amostras necessitam de pré-tratamento mínimo. A detecção de metabolitos por RMN é a única técnica não destrutiva para a amostra biológica e em alguns casos, como na urina, permite o retorno inalterado da amostra ao investigador para outros ensaios diferentes, permitindo a confirmação por outras técnicas e ter a possibilidade de voltar a testar a amostra. No entanto, apresenta pouca sensibilidade e devido à complexidade do espectro alguns sinais podem-se sobrepor e comprometer a clara identificação dos metabolitos. (3,4-6) A análise de biofluidos por espectrometria por RMN é uma abordagem robusta e precisa que consegue superar outras tecnologias “-ómicas” em termos de reprodutibilidade. A metabolómica baseada em espectrometria por RMN tem sido utilizada com sucesso para caracterizar várias patologias e a sua progressão ao longo do tempo. (15)

A EM é mais sensível e específica em comparação com a RMN, no entanto normalmente necessita de um passo de separação prévio, acoplado-se por isso, a técnicas como a cromatografia de gás (CG) ou líquida (LG) ou electroforese capilar (EC). Essas técnicas de separação acopladas permitem reduzir a complexidade da amostra, minimizam os efeitos de ionização e aumentam a capacidade de identificação e cobertura do metaboloma. (2,4) A EM é uma técnica analítica física que permite, através da razão massa/carga e intensidade relativa que caracterizam a estrutura da molécula, gerar um espectro de dados de metabolitos. Apresenta uma elevada sensibilidade intrínseca que a torna um instrumento importante na quantificação de metabolitos em biofluidos complexos. Recentemente a Cromatografia líquida de ultra pressão, ULPC, técnica de cromatografia mais recente, permitiu melhorar a resolução da cromatografia e aumentar o limiar de detecção de metabolitos. Apesar de RMN, GC-MS, LC-MS e UPLC-MS serem as técnicas mais utilizadas para análises de larga escala, os estudos metabolómicos não se limitam somente a estas plataformas analíticas. (2,5)

Outra plataforma analítica recente que tem sido utilizada na área “*breathomica*”, área dos estudos metabolómicos baseado em amostras ar exalados, em doenças respiratórias, são os narizes eletrónicos (*E-noses*). São um sistema sensorial artificial, com sensores para vários compostos químicos. Detetam determinados metabolitos, VOCs do ar exalado, cujos dados são comparados com várias amostras prévias que dão um determinado padrão dos componentes. Podem assim, comparar uma “pegada respiratória” com a pegada controlo, comparando patológico/saudável. Poderá acrescentar informação a determinados testes diagnósticos como à espirometria. Apesar de ser uma nova tecnologia, tem sido utilizado em vários estudos com o objetivo de diagnosticar doenças respiratórias como DPOC, asma e

cancro do pulmão, diagnóstico diferencial entre doenças respiratórias ou deteção de atividade inflamatória das vias aéreas. (6,13,16,17)

Análise e interpretação dos dados metabolómicos

A análise dos dados metabolómicos envolve vários passos desde o processamento inicial, identificação de dados perdidos, normalização, análise estatística e posterior interpretação biológica dos dados, assegurando a qualidade e controlo do estudo. Num estudo metabolómico *targeted* os dados são mais diretos enquanto num estudo *untargeted* os dados são muito mais complexos e por vezes nem todos os metabolitos são possíveis de identificar. (5)

O processamento inicial dos dados é específico consoante a técnica analítica utilizada. Muitos dos instrumentos têm o seu próprio *software* informático para o processamento de dados não tratados, que habitualmente incluem opções para a normalização e análise estatística. O processamento de dados das técnicas de LC-MS, GC-MS e RMN são extensamente revistos, permitindo recentemente o aumento da garantia e da reprodutibilidade da LC-MS e GC-MS e processamento automático dos dados em RMN. Esses dados após informaticamente tratados são submetidos a outras análises estatísticas. (4-6)

Nos estudos metabolómicos, como em qualquer estudo experimental, os métodos estatísticos são fundamentais. A maioria das análises estatísticas, inerentes a estes estudos, tem como objetivo encontrar diferentes características/metabolitos entre grupos experimental/controlo ou estabelecer associações entre os metabolitos e determinadas variáveis fenóticas ou clínicas da população em estudo. A análise estatística pode ser utilizada nas concentrações/intensidades de picos da espectrometria, não havendo a necessidade da identificação prévia dos metabolitos, como ocorre numa abordagem *untargeted*. Isso permite identificar múltiplas características desconhecidas que poderão estar fortemente relacionadas com a condição biológica ou doença em estudo. (4,6)

Com o avanço tecnológico da metabolómica, várias plataformas informáticas (base de dados online) como a *human metabolome database*, *HMBD* (base de dados clínicos online, atualmente com mais de 10000 metabolitos) permitem sumariar e organizar os dados metabolómicos dispersos (provenientes de várias técnicas analíticas), permitindo a sua categorização e diferenciação. (3,18) O *human metabolome project* foi criado em 2007 permitindo uma base de dados acessível e gratuita de dados metabolómicos. Outros dois grandes reportórios de dados incluem a *BioMagResBank* (BMRB) para dados de espectrometria por RMN e a *Scripps Research Institute's METLIN*. A partir destas bases de

dados, relações qualitativas e quantitativas entre dados podem ser estabelecidas, biologicamente interpretados, descritas vias metabólicas e posteriormente exploradas hipóteses e a sua viabilidade para aplicações clínicas. (18)

A METABOLÓMICA EM CONTEXTO CLÍNICO

Do início da metabolômica aos dias hoje, as aplicações da metabolômica foram sendo redirecionadas para outros campos de investigação, pois inicialmente eram essencialmente centradas na botânica. No entanto, com o enfâse na medicina de precisão ou personalizada, o recente interesse pelos estudos metabolômicos, no contexto clínico, aumentou. Com a fenotipagem molecular de biofluidos, células ou tecidos, os estudos metabolômicos podem gerar dados que permitam compreender e identificar mecanismos de doenças, diagnósticos, identificar novos alvos terapêuticos, personalizar e monitorizar terapêuticas. (5)

A medicina personalizada é um modelo de prática médica que integra a caracterização fenotípica e genotípica do individuo, tendo em conta os dados sociodemográficos, ambientais, estilos de vida, informação clínica e imagiológica, assim como informação genética e metabolômica, de forma a estimar a predisposição individual para a doença e definir estratégias preventivas e terapêuticas para cada individuo. A medicina de precisão, utilizada quase como sinónimo da medicina personalizada, envolve o acesso ao genótipo e ao fenótipo do individuo, antes e após o tratamento, através de métodos analíticos, permitindo direcionar a terapêutica. (19)

Neste contexto, é importante determinar biomarcadores subjacentes aos mecanismos patogénicos para que possamos compreender a etiologia da doença e deste modo determinar o seu tratamento preciso. (5) Os biomarcadores são definidos como uma característica, objetivamente avaliada e quantificável, inerente a um processo biológico normal, patológico ou de resposta a uma intervenção terapêutica farmacológica. (5,20,21) Os estudos metabolômicos têm sido um instrumento de extrema importância para a descoberta de biomarcadores em medicina. Atualmente a falta de biomarcadores adequados tem sido um dos fatores impeditivos para a mais ampla implementação da medicina personalizada. (19)

As mudanças patológicas resultam habitualmente em alterações do metabolismo que correspondem a alterações do tipo e concentração de pequenos metabolitos. Existem assim, diferenças entre o espectro metabolômico num individuo doente e saudável. Essas diferenças poderão aparecer antes dos sintomas clínicos, podendo a aplicação da metabolômica ser uma abordagem muito útil na descoberta de marcadores de diagnóstico precoce de determinadas doenças. Desta forma, compreende-se que a informação biológica derivada destes estudos metabolômicos seja útil quer na abordagem clínica, quer na compreensão de mecanismos de doenças, descoberta de novos biomarcadores, abordagem diagnóstica e terapêutica e monitorização da progressão da doença. (1,4)

OS DESAFIOS DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA

As doenças respiratórias são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade global que afetam todas as faixas etárias da população e que têm aumentado a sua incidência nos últimos anos. As doenças respiratórias crónicas, tais como asma, DPOC, patologia ocupacional, SAOS (Síndrome de apneia obstrutiva do sono) e hipertensão pulmonar afetam centenas de milhares de pessoas, sendo as mais prevalentes as doenças pulmonares obstrutivas como a asma e a DPOC. (20)

A DPOC é uma das doenças respiratórias mais prevalentes em todo o mundo e estima-se que afete 300 milhões de pessoas no mundo, com grande impacto económico, social e uma das principais causas de internamentos hospitalares. (2,18)

É uma doença complexa, multifatorial e heterogénea, caracterizada por uma limitação do fluxo aéreo, parcialmente reversível, que inclui a componente de bronquite crónica e enfisema pulmonar, caracterizado pela destruição e aumento dos alvéolos do parênquima pulmonar. É uma síndrome sistémica, com envolvimento pulmonar mas com repercussões multiorgânicas, clinicamente caracterizada por dispneia, tosse e expectoração crónica. (2,20,22) Essa complexidade e heterogeneidade justificam a necessidade de personalizar a avaliação dos doentes com DPOC, assim como o seu tratamento, tendo-se demonstrado como uma das maiores barreiras na abordagem da DPOC. (18,21) Doenças cardiovasculares, diabetes, anemia, osteoporose ou cancro do pulmão, são altamente prevalentes nos doentes com DPOC e contribuem para um prognóstico mais reservado. (21,23)

Quando falamos em complexidade e em heterogeneidade da DPOC significa que as suas componentes não têm uma interação dinâmica linear em todos os doentes e que nem todos os componentes estão presentes em todos os doentes ou num determinado doente em todos os momentos. (21) A grande heterogeneidade tanto a nível dos fenótipos patofisiológicos, como na sua progressão, leva a que a DPOC seja subdiagnosticada, subtratada e insuficientemente prevenida. (20)

O principal fator de risco associado à DPOC é o tabagismo, ativo ou passivo. Também a exposição a poeiras ocupacional e ambientais interiores e exteriores são fatores de risco que estão na origem da lesão progressiva e irreversível pulmonar na DPOC. (20) No entanto, nem todos os fumadores desenvolvem DPOC e a sua severidade varia entre indivíduos fumadores e não fumadores. Outros fatores de risco incluindo a genética, asma, exposições ambientais, prematuridade ou infeções respiratórias recorrentes na infância têm

sido associados à DPOC. A DPOC é o resultado final de um conjunto complexo de interações entre genética-ambiente. (20,24)

A progressão da doença é lenta e maioritariamente assintomática até que a limitação do fluxo aéreo se torne clinicamente aparente e as exacerbações frequentes, normalmente por volta dos 40 anos de idade. Compreende-se que o aumento da esperança de vida e o aumento da exposição a fatores de risco tem conduzido ao aumento da prevalência da doença. (20)

O seu diagnóstico é caracterizado pela limitação do fluxo aéreo, classicamente pela redução permanente do volume expiratório máximo no primeiro segundo (FEV1) e redução da razão FEV1/FVC (capacidade vital forçada) avaliada em estudo funcional respiratório através da espirometria. (2,7,20) O FEV1 é o único marcador aceite na DPOC. Os testes de função respiratória dão informação limitada relativamente à previsão, prevenção, diagnóstico, tratamento e monitorização da DPOC. Nenhuma destas informações são específicas sobre processo biológico responsáveis pelos fenótipos da doença. (7) O diagnóstico precoce da DPOC é um desafio clínico e esforços consideráveis tem sido feitos na procura de marcadores preditivos sensíveis e específicos. (2)

O recurso comum a broncodilatadores e corticoterapia é apenas terapêutica de controlo de sintomas. (7,20) Os gastos económicos com fármacos na DPOC são enormes e os seus benefícios têm-se demonstrado modestos. Nenhuma dessas medicações demonstrou impacto significativo no número de hospitalizações e na mortalidade dos doentes com DPOC. (18) Apenas três intervenções terapêuticas se mostraram capazes de influenciar a história natural da doença, a cessação tabágica, a oxigenoterapia de longa duração (OLD) e a cirurgia de redução de volume pulmonar. Atualmente não existe nenhum tratamento que previna ou trave a progressão da DPOC. (25)

O diagnóstico e tratamento precoce são cruciais para melhores resultados na doença e para a redução dos seus custos inerentes. (14)

ESTUDOS METABOLÓMICOS NA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA

Etiologia e Patogénese

A limitação do fluxo aéreo é a principal alteração fisiológica da DPOC, podendo ser proveniente da obstrução crónica das pequenas vias respiratórias (estreitamento por hiperplasia, muco e fibrose) e do enfisema (destruição e dilatação dos espaços alveolares com redução da área de trocas gasosas). No entanto, muitos dos aspetos da patofisiologia da DPOC são pouco claros e compreendidos. (14,25)

A exposição crónica ao tabaco é o fator de risco mais importante no desenvolvimento da DPOC, assim como tem um grande contributo nas doenças cardiovasculares. Vários efeitos provocados pelo tabaco são comuns a todos os fumadores mas está estimado que apenas 15 a 30% dos fumadores venham a desenvolver DPOC. (22,26,27) Além disso, nem todos os fumadores desenvolverão DPOC e a progressão da doença pode persistir após a cessação tabágica. Isto indica a existência de uma complexa predisposição genética e ambiental com um importante papel na patogénese da doença. (27) Assim, houve a necessidade de realizar estudos para compreender a relação entre o tabaco e a doença, na sua progressão e severidade e a relação com os seus diferentes fenótipos. (22)

Estudos iniciais exploraram principalmente as alterações do metaboloma relacionadas com o tabagismo e a identificação de componentes no tabaco através de técnicas analíticas como CL-EM, outros procuraram metabolitos específicos do tabaco em biofluidos como marcadores de exposição tabágica, enquanto outros se focaram em compreender a atividade enzimática e a biossíntese da nicotina na planta do tabaco. (22,28) Estudos metabolómicos experimentais, com modelos animais, demonstraram que após a exposição crónica ao tabaco, existia alteração de metabolitos plasmáticos a nível do metabolismo das purinas, aminoácidos e dos lípidos. (23,26,28,29) Detetaram igualmente, altos níveis de metabolitos de pirimidina (uridina) e elevados níveis de metabolitos de triptofano, envolvidos na resposta inflamatória. (23)

Após a cessação tabágica, 40% persistiram com as mesmas alterações e 60% regrediram. (12) As alterações fisiológicas induzidas pelo tabaco podem ser compreendidas numa abordagem conjunta entre a genética, a transcriptómica e a metabolómica permitindo elucidar sobre os mecanismos subjacentes à doença. (22)

A fenotipagem metabolómica é uma abordagem que permite uma coleção abrangente do perfil metabólico do ser humano, que pode ser alterado por fatores como

estilos de vida, dieta, intervenções terapêuticas ou doenças. Este paradigma é adequado a um fator de risco como o tabagismo.

Para determinar as perturbações bioquímicas associadas à exposição tabágica, tentado estabelecer uma relação causal entre exposição e doença, um estudo com abordagem metabolómica com recurso a múltiplas plataformas analíticas (contraponto com estudos metabolómicos anteriores apenas com uma ou duas técnicas analíticas), combinaram vários ensaios de RMN e de EM, tentando estabelecer perturbações metabolómicas. Comparando amostras de soro plasmático de 67 fumadores e 61 não fumadores determinaram o metaboloma/lipidoma de cada grupo. A partir destas diferentes análises metabolómicas, compreendeu-se que as vias e categorias bioquímicas que tinham sofrido maior impacto no soro dos tabagistas foi ao nível do metabolismo dos esfingolípidos, glicerofosfolípidos e aminoácidos (D-glutamato, glicina, serina, lisina, arginina e treonina). Estes metabolismos são modificados pelo stress oxidativo, que está envolvido em processos de inflamação subjacentes a doenças cardiovasculares e ao enfisema. (30)

Outro estudo de coorte com indivíduos fumadores saudáveis e indivíduos com DPOC em estádios iniciais (grupo de DPOC fumadores e individuo com DPOC não fumadores) efetuou, numa abordagem metabolómica *untargeted*, uma análise plasmática dos metabolitos por CL-EM, identificando um grupo de 23 metabolitos que não se relacionavam diretamente com a função pulmonar mas com alterações da sinalização celular, coagulação e trombogênese. (28)

As alterações patológicas da DPOC têm sido associadas a mecanismos fisiológicos como ao stress oxidativo, resposta inflamatória, aumento da senescência celular e desequilíbrio entre apoptose/ proliferação celular. A desregulação destes processos fisiológicos está presente na patogénese de várias doenças respiratórias crónicas, incluindo a DPOC. (27,31,32)

Historicamente mecanismos subjacentes ao enfisema eram atribuídos ao desequilíbrio entre protease/antiprotease que resultavam da perda da matriz extracelular dos alvéolos pulmonares e de facto os doentes com défice de α 1-antripsina apresentavam um risco aumentado de desenvolver enfisema pulmonar. No entanto outros estudos, incluindo com abordagem metabolómica, têm vindo a demonstrar o envolvimento de outros processos celulares no desenvolvimento da doença. (32)

Foi demonstrada a existência de uma disrupção do metabolismo lipídico nos doentes com DPOC, assim como em ratos com enfisema pulmonar induzido pela exposição ao tabaco. (30-33) Mais de 1500 moléculas lipídicas foram identificadas numa abordagem metabolómica na expetoração de doentes com DPOC, concluindo que a expressão de lípidos da via metabólica dos esfingolípidos estava aumentada nos doentes fumadores com DPOC em comparação com os doentes fumadores sem DPOC. (7) Os lípidos exercem

múltiplos papéis no corpo humano e muitos parecem ser relevantes na patogénese da DPOC. Muitas espécies de moléculas lipídicas encontram-se num equilíbrio dinâmico, no entanto permanece algo obscuro a sua relação precisa na patogénese da DPOC. (34)

Os metabolitos mediadores lipídicos são os principais fatores da polarização Th1 (linfócitos CD4 helper 1) na resposta inflamatória e imune, uma marca fundamental na patogénese da DPOC. A inflamação e o stress oxidativo, envolvido igualmente na patogénese da DPOC, partilham metabolitos lipídicos regulares chave neste processo patogénico. (27)

Tem sido referida a existência de relação entre a suscetibilidade à DPOC e as alterações no metabolismo dos esfingolípidos. Alterações essas igualmente identificadas relativamente ao desenvolvimento do enfisema pulmonar. (33) Existem mais de 100 espécies de esfingolípidos no ser humano e múltiplas enzimas que regulam o seu metabolismo. São primariamente encontrados nas membranas plasmáticas celulares mas também a nível plasmático e têm sido implicados em várias doenças respiratórias incluindo na DPOC. Estes estão implicados em diversos mecanismos biológicos como morte celular, proliferação, diferenciação, autofagia, senescência, migração celular e eferocitose. Desse modo compreende-se a sua importância na homeostasia celular. (33,35)

Através de estudos metabolómicos com abordagem *targeted* com recurso a EM, foram identificadas e quantificadas múltiplas classes de esfingolípidos em amostras plasmáticas de doentes com DPOC em diferentes fenótipo de doentes (bronquite crónica, enfisema, exacerbação) permitindo demonstrar que específicos esfingolípidos, como as ceramidas, esfingomielina e gangliosídeo poderão estar envolvidos, não só na patogénese da doença, como serem possíveis candidatos a biomarcadores dos determinados subfenótipos da DPOC, como enfisema e as frequentes exacerbações. (7,31-34) A maioria dos estudos têm-se centrado nas ceramidas, reconhecidas como um metabolito intermediário central no metabolismo dos esfingolípidos e a molécula chave de sinalização proapoptótica e um mediador crucial da apoptose das células epiteliais alveolares. As ceramidas encontram-se marcadamente elevadas em amostras plasmáticas e expectoração de doentes com enfisema pulmonar. (7,33)

A hidrólise de esfingolípidos da membrana plasmática em ceramida, após N-desacetilação forma a esfingosina que, após fosforilação se torna em esfingosina-1-fosfato (S1P). A S1P é um metabolito que tem um papel fundamental na sinalização celular ao nível da proliferação, sobrevivência, adesão, mobilidade celular e inibição das enzimas envolvidas na produção das ceramidas. (27,30,32) A redução da produção de S1P nas amostras poderá estar associada à diminuição da sobrevivência celular e proliferação e ao aumento da apoptose das células epiteliais e endoteliais alveolares. (33)

Diferenças no perfil metabólico dos esfingolípidos e ácidos gordos plasmáticos foram igualmente identificadas num estudo de coorte entre doentes com VIH-DPOC e com DPOC com recurso a EM, evidenciando a necessidade de conhecer mais sobre as vias metabólicas que contribuem para VIH/DPOC e possíveis intervenções terapêuticas relacionadas com a alteração da expressão dos esfingolípidos na redução do risco de DPOC em doentes com VIH. (36)

Uma abordagem metabólica incluída num coorte do estudo ECLIFE, *Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points*, com recurso a espectrometria por RMN e confirmados por CL-EM, comparam dados metabólicos de amostras plasmáticas entre indivíduos saudáveis e doentes com DPOC GOLD II,III e IV. Identificaram diminuição das concentrações de lipoproteínas e N,N-demetilglicina. Por outro lado, constataram um aumento das concentrações de glutamina, fenilalanina, 3-metilhistidina e corpos cetónicos no grupo GOLD IV, assim como também uma diminuição dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR). Diferenças ao nível de vários aminoácidos e outras pequenas moléculas foram demonstradas entre os diferentes grupos GOLD, assim como entre os grupos de doentes com e sem enfisema, com ou sem caquexia. (37)

A carnitina é um composto quaternário de amónio, sintetizado no fígado e rim a partir dos aminoácidos lisina e metionina. Tem um papel major no ciclo ácido cítrico, ligando e transportando vários grupos acilo para serem metabolizados através da β -oxidação. Estudo metabólico com recurso a UPLC acoplada a EM identificou diminuição da concentração de carnitina livre/acetilcarnitina. Este estudo refere que essa diminuição, possivelmente, poderá indicar uma maior predisposição dos doentes com DPOC à aterosclerose como resultado da inadequada β -oxidação dos ácidos gordos e do aumento do stress oxidativo. Foram igualmente identificadas outras alterações relacionadas com o metabolismo dos aminoácidos (como da alanina), assim como também alterações do metabolismo energético ao nível da glicólise, neoglicogénese e ciclo de ácido cítrico. A diminuição de níveis de alanina, fenilalanina e carnitinas, que se relacionam com o metabolismo energético, podem estar subjacentes a fenómenos como desnutrição, disfunção músculo esquelética e incapacidade funcional. (37-39)

Outro fator de risco que tem sido enfatizado na DPOC é o género, tendo sido evidenciadas diferenças entre géneros, com o sexo feminino a apresentar maior mortalidade mesmo após a cessação tabágica. O tabagismo tem grande impacto na função pulmonar em mulheres, principalmente na pós-menopausa. A partir do estudo de coorte COMIC (*Clinical and Systems Medicine Investigations of Smoking-related Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) foi realizada uma análise metabólica *untargeted* com recurso a CL-EM com o objetivo de identificar os marcadores moleculares subjacentes à desregulação metabólica na DPOC em estádios precoces, com particular foco na avaliação do papel do

sexo na etiologia da DPOC. Nesta abordagem foram identificadas mudanças significativas em oito vias bioquímicas nas amostras plasmáticas de doentes com DPOC relativamente a indivíduos saudáveis não fumadores, com aumento dos metabolitos do Ciclo de Krebs, glicerofosfolípidos, via de sinalização do cAMP, endocanabinóides, esfingolípidos e metabolismo dos ácidos gordos. A estratificação do género permitiu estabelecer que as vias dos ácidos gordos e esfingolípidos tinham menos alterações no género feminino e que no género masculino havia menos alterações no cAMP e metabolismo do triptofano. Esta análise evidenciou que as alterações de metabolitos mais relevantes estavam relacionadas com o stress oxidativo. Os metabolitos relacionados com o stress oxidativo apresentavam uma supra-regulação no género feminino. (24)

A procura de biomarcadores na DPOC

Atualmente não existe nenhum biomarcador que identifique o diagnóstico da DPOC, o risco do seu desenvolvimento, progressão e os fenótipos da doença. (40) Para dar resposta aos desafios e problemas subjacente à abordagem clínica da DPOC, os estudos metabolómicos com abordagem *untargeted*, têm contribuído para fornecer informação pertinente para a descoberta e implementação de biomarcadores que, com precisão, detetem a atividade da doença, antecipem a resposta e monitorizem a terapêutica na DPOC. (18,40) Muitos dos biomarcadores propostos estariam especificamente associados aos diferentes aspetos da patofisiologia da DPOC. Apesar do estudo desses diferentes aspetos e dos esforços no sentido de rapidamente encontrar um biomarcador na DPOC, especialmente proteínas plasmáticas, nenhum marcador tem sido adotado até à data na prática clínica. (28)

É clara e urgente a necessidade de biomarcadores na DPOC que guiem o tratamento individual, possibilitem com sucesso o desenvolvimento de novos fármacos. A utilização de plataformas analíticas que caracterizem o perfil “-ómico” dos fenótipos da DPOC têm-se demonstrado com grande potencial no avanço do diagnóstico laboratorial da DPOC e na tentativa de “personalização” da terapêutica. Outra grande premissa da procura de biomarcadores na DPOC é que estes possam prever o desenvolvimento da doença. (18)

No entanto, em toda a medicina, são poucos os biomarcadores com impacto a nível clínico e de monitorização farmacológica. Projetos para a procura de biomarcadores, através da análise metabolómica, têm largamente falhado devido às comuns limitações do desenho experimental, incluindo o pequeno número de amostras. Acrescenta-se a isso o baixo desempenho que caracteriza os possíveis biomarcadores descobertos, a incapacidade de replicação dos estudos de coorte e de incorporar os biomarcadores na heterogeneidade da

doença em causa. A escolha de plataformas analíticas subótimas e o viés estatístico que conduz a uma pobre reprodutibilidade são outras limitações. (12,18)

A procura de possíveis biomarcadores voláteis na DPOC, através de estudos metabolómicos, têm ganho relevância recente com vista à deteção precoce, diagnóstico e prognóstico. (12,28) O *volatitoma* é uma fração do metaboloma que contém todos os VOCs gerados no organismo e a sua análise reflete os processos metabólicos no organismo, ficando alterados em condições de doença. (12) Esses VOCs, como possíveis biomarcadores da DPOC, têm despertado grande interesse particularmente pelo seu potencial no diagnóstico, de forma não invasiva, através da análise de ar exalado. (41)

Através de amostras de EBC, com o objetivo de estabelecer o perfil metabolómico dos doentes com DPOC, com recurso à espectrometria por H-RMN, foram identificados baixos níveis de acetona, valina e lisina e níveis significativamente elevados de lactato, acetato, propionato, serina, prolina e tirosina em comparação com o grupo controlo. (15)

Estudos metabolómicos com GC-MS, com ar exalado de doentes, identificaram como possíveis biomarcadores o isoprene, ácido succínico e o sulfito de pentametileno na DPOC. Estes também têm sido identificados em outras doenças e não são exclusivos desta. (12) Nenhum marcador VOCs, seja no diagnóstico ou no risco de desenvolvimento da DPOC, tem-se mostrado completamente satisfatório, existindo a necessidade de mais estudos. No entanto, os estudos metabolómicos através da análise de ar exalado têm-se revelado um instrumento com grande potencial. (42)

Mais recentemente recorreram à espectrometria de massa em tempo-real (espectrometria de massas com ionização por *electrospray*), que se demonstrou ser uma técnica analítica mais sensível, com maior especificidade e com grande potencial na análise de ar exalado, permitindo detetar compostos altamente voláteis (13,14,43). Com base nesta técnica analítica, numa abordagem metabolómica *untargeted*, estudos de coorte mais recentes compararam padrões metabolómicos do EBC de indivíduos com DPOC e indivíduos saudáveis, identificando alterações nos metabolitos dos indivíduos com DPOC relacionados com as classes químicas dos ácidos gordos, aldeídos e aminoácidos. (13,14,42,43) Identificaram uma diminuição de alguns ácidos gordos no ar exalado e um aumento dos compostos de aldeído, que poderiam ser explicados pelo processo de peroxidação lipídica secundária ao stress oxidativo e inflamação, processos que têm sido demonstrados como caraterísticos da DPOC. (43)

Diagnóstico e Diagnósticos Diferenciais

As doenças respiratórias obstrutivas, por vezes, apresentam sintomas sobrepostos que dificultam o diagnóstico correto e atempado. Além disso, os testes diagnósticos disponíveis nestas doenças apresentam uma inadequada especificidade principalmente para faixa etárias como crianças e idosos. (44)

Pela apresentação clínica algo sobreponível da DPOC com a asma o diagnóstico diferencial pode ser difícil, havendo a necessidade de exames auxiliares de diagnósticos mais objetivos do que os disponíveis. Estudos metabolômicos têm tentado demonstrar ser um potencial instrumento clínico na distinção entre a asma e a DPOC. (9,45-47) Atendendo a que patogénese da asma é diferente da DPOC tanto ao nível grau de inflamação como da lesão celular e que esta varia consoante a gravidade da doença, surge a hipótese de que a atividade metabólica dos asmáticos seja diferente da dos doentes com DPOC. Através de uma abordagem *untargeted* com recurso espectrometria de H-RMN, com amostras de urina de doentes com DPOC e asma, foram demonstradas diferenças nos perfis metabolômicos e a possibilidade de os diferenciar. (45)

Apesar da maioria dos estudos metabolômicos no campo da “*breathomica*” se focarem em identificar o perfil metabolômico da DPOC no contexto da procura de biomarcadores para o seu diagnóstico, alguns também se focaram em serem um possível instrumento para o diagnóstico diferencial entre a asma e a DPOC. Alguns estudos demonstraram que os narizes eletrónicos conseguem classificar o ar exalado dos asmáticos versus doentes com DPOC com uma precisão moderada a boa. (9)

Além do diagnóstico diferencial entre a asma e a DPOC, a metabolômica tem procurado ser um possível instrumento para diagnóstico diferencial com a ACO, síndrome de sobreposição asma-DPOC. A ACO é a combinação das duas síndromes com diferentes endótipos e fenótipos com diferente patogénese. Um estudo de coorte multicêntrico com grupos de doentes com asma, DPOC e ACO com uma abordagem metabolômica, com amostras de urina, recorreu à metabolômica de alta resolução (HRM) acoplada a CG-EM e demonstrou diferenças do metaboloma entre os três grupos. Posteriormente numa abordagem *targeted* foi quantificado o metabolito L-histidina, precursor da histamina, que se encontrava claramente aumentada nos indivíduos com ACO, identificando-a como um potencial biomarcador urinário da ACO. Os níveis de L-histamina não foi significativamente diferente entre o grupo da DPOC e asmáticos. A histidina é um aminoácido essencial e um potencial metabolito inflamatório e tem sido relacionado com o stress oxidativo e com processo inflamatório. Os níveis de L-histidina encontram-se elevados em doentes com patologia respiratória obstrutiva severa, com elevados níveis de eosinofilia, com sintomas

severos e nas exacerbações. Estudos anteriores demonstraram que os níveis se encontravam mais elevados em patologias com perfil inflamatório Th2. (46)

O Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono, SAOS, encontra-se conjuntamente com a DPOC em cerca de 10 a 20% dos casos, partilharem as mesmas comorbidades especialmente a nível cardiovascular mas têm fatores patogénicos distintos. A possibilidade de distinguir a DPOC da SAOS através de um conjunto de metabolitos presentes em várias amostras biológicas (soro plasmático, EBC e urina) foi avaliada, num estudo metabolómico com recurso a espectrometria por H RMN, que concluiu que apenas 10 metabolitos separavam a DPOC do SAOS e que as diferenças da concentração nos metabolitos do EBC não eram suficientemente específicas para uma correta diferenciação entre as duas patologias. (48,49)

A DPOC e o cancro do pulmão têm o fator de risco do tabagismo em comum, assim a inflamação crónica está envolvida em ambas as patogénese. Pensa-se que a DPOC aumenta o risco de desenvolver cancro do pulmão, sendo importante distinguir entre estas duas patologias, principalmente no estágio precoce de neoplasia do pulmão. Na procura de metabolitos biomarcadores, um estudo metabolómico, através da análise plasmática, com recurso à espectrometria de ¹H-RMN, comparou doentes com DPOC e com Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células, reportando pela primeira vez alterações metabolómicas entre as duas patologias, referindo como possíveis biomarcadores a isoleucina, acetoacetato, a creatina (metabolitos apenas relacionados com o cancro), o glicerol e duas N-acetil-glicoproteínas como possíveis biomarcadores da DPOC com estádios iniciais de cancro do pulmão. Este estudo refere que, apesar de necessitar de mais estudos de validação, os seus resultados podem ser úteis para distinguir estas duas entidades, que apresentam sintomas e fatores de risco similares. (50)

Progressão e Exacerbações

As exacerbações da DPOC permanecem como uma das maiores causas de mortalidade. Estudos metabolómicos têm procurado marcadores agudos de identificação das exacerbações da DPOC, que permitam iniciar o tratamento atempado. Estudos recentes revelam que a via metabólica da L-Arginina se encontra alterada na exacerbação e identificaram potenciais marcadores (51-53)

O óxido nítrico, NO, sintetizado a partir da L-Arginina através da sintetase do óxido nítrico, NOS, é vasodilatador e broncodilatador. A deficiência de NO resulta numa hiperreatividade brônquica e disfunção endotelial. Além disso, a NO inibe a adesão plaquetar e é considerado que tem algum envolvimento na imunidade inata. A dimetilarginina assimétrica

(ADMA) é um derivado da proteólise de argininas metiladas de várias proteínas. A ADMA é um metabolito que atua como um inibidor competitivo da NOS e da sua elevação plasmática resulta uma diminuição dos níveis de NO do qual resultam mecanismos de vasoconstrição, agregação plaquetar e adesão celular endotelial. Esta causa não só disfunção endotelial como também tolerância à hipóxia. A ADMA encontra-se elevada em múltiplas patologias com disfunção endotelial, em doenças respiratórias sistémicas e na sépsis. Tem sido demonstrado que os níveis de ADMA estão aumentados em doentes com exacerbações da DPOC em comparação com os doentes estáveis. Assim como, nos doentes com DPOC, encontram-se níveis superiores de ADMA e L-Arginina em comparação com os indivíduos saudáveis. (53)

A análise da expetoração e do plasma sanguíneo com recurso a CL-EM tem sugerido alterações do metabolismo da L-Arginina e a ADMA como um marcador de exacerbação da DPOC. Sugerem ainda, ser importante realizar estudos metabolómicos relativamente aos efeitos de terapêuticas dirigidas ao metabolismo da L-Arginina na DPOC (51-53)

Com a mesma tentativa de identificação de biomarcadores de exacerbação da DPOC, foram quantificados os metabolitos, através de EM, no plasma de 33 doentes com DPOC hospitalizados por exacerbação no dia 0 e 30 (pós exacerbação) e 65 doentes com DPOC estável (grupo controlo). Evidenciaram alterações nos metabolitos relacionados com o catabolismo de um aminoácido, o triptofano. O principal metabolito do triptofano é a quinurenina, utilizada na produção de niacina, O triptofano é um aminoácido essencial e a sua deficiência limita a síntese proteica, resultando na disfunção celular e diminuição da proliferação. O estudo refere a necessidade de mais investigação sobre o papel do catabolismo do triptofano durante as exacerbações da DPOC. (54)

Num estudo de coorte com o objetivo de discriminar entre um quadro de insuficiência respiratória por exacerbação de DPOC com um quadro por insuficiência cardíaca e pneumonia através da análise metabolómica baseada em RMN, constataram a existência de claras diferenças do perfil metabolómico, em amostras de sangue e urina, entre os grupo de doentes com insuficiências respiratórias e o grupo de doentes com DPOC estável, no entanto não foi identificado um marcador único de exacerbação da DPOC. (55)

Outro estudo metabolómico sobre a exacerbação da DPOC, demonstrou a associação entre os metabolitos das hormonas da glândula suprarrenal, incluindo glucocorticóides, mineralocorticóides e androgénio, e a mortalidade a curto e a longo prazo. Estudo multicêntrico englobou 172 doentes com DPOC ao longo de 6 anos. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal é um pivot essencial em doenças agudas ou crónicas como é o caso das exacerbações da DPOC. A glândula suprarrenal modela a produção e libertação de glucocorticóides, mineralocorticóides e androgénio. Os glucocorticóides são

hormonas de stress com efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, protegendo assim contra resposta inflamatória excessiva, fornecendo energia e melhorando o estado hemodinâmico. Vários estudos correlacionaram os níveis de cortisol com a severidade e efeito na sepsis e na pneumonia adquirida na comunidade. Os andrógenos, como desidroepiandrosterona, DHEA, e sulfato de desidroepiandrosterona, DHEA-S, tem uma função moduladora do sistema imunológico. Os doentes com DPOC são recorrentemente submetidos a tratamentos com corticóides inalados e orais, que podem influenciar estes níveis hormonais e promover alterações dinâmicas deste eixo hormonal e dos seus metabolitos, principalmente após tratamentos de exacerbações agudas da DPOC. Os resultados apontam que níveis elevados de androgénios iniciais preveem menos mortalidade a longo prazo, principalmente, DHEA e DHEA-S. A ativação de hormonas de stress, como o cortisol, demonstrou uma relação dependente do tempo, em que níveis elevados apontavam para maior mortalidade a curto prazo mas menor mortalidade a longo prazo. A ativação do eixo dos mineralocorticóides estava associada a um aumento da mortalidade a curto prazo. Estas alterações destes metabolitos e a sua relação com a mortalidade demonstraram ser independentes da idade, género ou exposição à corticoterapia. (56)

Evidenciando mais uma vez o envolvimento do metabolismo proteico na DPOC, foi identificado o perfil metabolómico no LBA de 56 doentes com DPOC e 20 indivíduos saudáveis para determinar a correlação entre os metabolitos e a função pulmonar, *status* funcional e o grau de enfisema pulmonar. Foram identificados 3900 moléculas por EM, sendo a maioria peptídeos, existindo maiores concentrações de peptídeos em doentes com DPOC com pior função pulmonar, mas sem relação com o enfisema ou com o status funcional. (40)

Atendendo a que doentes com maior grau de enfisema pulmonar apresentam um declínio mais acelerado do FEV1, do índice de massa corporal (IMC) e da massa muscular, um estudo testou a progressão do enfisema na DPOC, a partir dos 1817 doentes a partir do estudo coorte ECLIPSE DPOC, e incluiu uma abordagem metabolómica para identificação o perfil metabolómico dos aminoácidos, no plasma, de 41 doentes com DPOC sem enfisema pulmonar e 77 enfisematosos, comparando os resultados com os diferentes graus de enfisema pulmonar. Neste estudo foram observadas diferenças dos perfis metabolómicos entre os doentes com maior grau de enfisema e os de menor grau de enfisema pulmonar. Corroborando outros estudos identificaram no perfil metabolómico plasmático diminuição de ACR em doentes com enfisema pulmonar. O estudo indicou que doentes com DPOC com grau severo de enfisema apresentam uma perda de tecido em múltiplos órgãos, não só pulmonar como também ósseo, esquelético, muscular e adiposo, propondo um novo fenótipo de DPOC *multi-organ loss of tissue*, MOLT. (57)

Para elucidar o mecanismo de progressão do enfisema na DPOC, outro estudo com abordagem metabolômica *targeted* baseada em EM, quantificaram o metaboloma de tecido pulmonar, LBA e soro plasmático de modelos animais, em três pontos de progressão de enfisema pulmonar induzido farmacologicamente, demonstrando alterações do metaboloma em que concluíram que a progressão do enfisema era acompanhada pela redução L-carnitina no tecido pulmonar. (31,38) A L-carnitina tem como principal função o transporte de ácidos gordos de cadeia longa para dentro da mitocôndria para a sua β -oxidação e produção de energia, sendo conhecido como antioxidante e proteção contra a apoptose. (38) Isto sugere que o comprometimento da β -oxidação de ácidos gordos é importante no desenvolvimento do enfisema/DPOC. (31)

Terapêutica

A terapêutica farmacológica da DPOC é utilizada para redução de sintomas, frequência e severidade das exacerbações, assim como melhorar a tolerância ao exercício e qualidade de vida. Atualmente, o tratamento terapêutico convencional da DPOC segue as indicações da GOLD. Não existe nenhum estudo científico conclusivo que evidencie a existência de medicação para a DPOC que modifique a longo prazo o declínio da função pulmonar. Apesar de alguns progressos no tratamento da DPOC, as terapêuticas farmacológicas não se têm modificado significativamente. Os estudos metabolômicos neste âmbito têm permitido identificar e quantificar alterações dos metabolitos induzidas por uma determinada intervenção terapêutica, contribuindo para descobrir novos alvos terapêuticos, monitorizar e personalizar a terapêutica.

Enquanto que na asma a corticoterapia inalada é geralmente eficaz, na DPOC a sua eficácia anti-inflamatória não está claramente estabelecida, daí que alguns estudos tem demonstrado que a metabolômica poderá ser um possível instrumento para avaliar algumas terapêuticas farmacológicas utilizadas na DPOC. (58,59)

Num estudo, 50 doentes com DPOC estável, foram divididos em 2 grupos com diferentes fenótipos definidos por tomografia computadorizada de alta resolução pulmonar. Fenótipo E com enfisema pulmonar e sem espessamento da parede brônquica e Fenótipo M com enfisema e espessamento da parede brônquica. Através de uma abordagem metabolômica com recurso a espectrometria por H-RMN identificaram o perfil metabolômico plasmático de cada grupo e exploraram o resultado da inalação de Budesonida+Formoterol nos diferentes grupos investigando as diferenças dos perfis metabolômicos antes e após o tratamento entre o fenótipo E e M. Os perfis metabolômicos plasmáticos de ambos os fenótipos demonstraram diferenças significativas antes e depois do tratamento. As

alterações metabólicas dos perfis metabólicos após terapêutica relacionavam-se com perturbações do metabolismo energético, aminoácidos, lipídico que se relacionam com a melhoria da função pulmonar, redução dos sintomas e efeitos anti-inflamatórios. As diferenças metabólicas entre fenótipos estavam associadas a metabolitos relacionados com proliferação e supressão inflamatória. Demonstraram que os perfis metabólicos em amostras de sangue podem ser instrumento clínico valioso para diferenciar possíveis fenótipos de DPOC e avaliação da terapêutica. (58)

Além do perfil metabólico plasmático, também as técnicas analíticas na área da *breathomica* têm sido utilizadas para monitorizar o tratamento de doentes com DPOC sob corticoterapia inalada e no desmame dessa terapêutica. Com recurso a análises do ar exalado na fase gasosa com dois diferentes narizes eletrónicos e RMN dirigida para análise de EBC, um estudo prospetivo farmacológico demonstrou que a *breathomica* pode ser uma ferramenta utilizada com sucesso para aferir os efeitos de terapêuticas com corticoterapia inalada associada a agonistas beta2 de longa ação, ICS/ LABA, nos doentes com DPOC. Estas técnicas permitem uma abordagem integrada multidimensional conseguindo melhorar a capacidade para identificar os efeitos das medicações nos doentes com DPOC comparativamente a uma abordagem monodimensional baseada apenas em testes de função respiratória. (59)

Além dos efeitos farmacológicos nos doentes, a abordagem metabólica tem sido igualmente utilizada a nível do metabolismo farmacológico, para compreender a eficiência e a segurança de determinado fármaco. As técnicas analíticas metabólicas têm sido consideradas como um método robusto para a identificação de possíveis metabolitos de fármacos nos humanos, permitindo um estudo compreensivo da sua ação em diferentes vias metabólicas. Análises metabólicas de sangue e urina, com recurso CL de ultra performance acoplada a EM, demonstraram ser um instrumento preciso e sensível para compreender o metabolismo do (R)-bambuterol in vivo. O (R)-bambuterol é agonista seletivo β_2 , em ensaios clínicos de fase I, que tem demonstrado elevados efeitos broncodilatadores. (60)

Um dos fármacos mais recentes para a DPOC, aprovado em 2010 pela Agência Europeia do Medicamento, o Roflumilast, de acordo com a GOLD, encontra-se indicado para doentes do grupo D que mantenham exacerbações mesmo medicados com LABA/LAMA/ISC e com VEMS <50% após broncodilatação, com uma pelo menos uma hospitalização por exacerbação no último ano. (61). Este tem o objetivo de reduzir o risco de exacerbações nos doentes com DPOC severa e com história de exacerbações recorrentes. O seu metabolito ativo é o N-óxido roflumilaste, um inibidor seletivo da 4-fosfodiesterase, PDE4, apresenta efeito anti-inflamatório inibindo os mediadores anti-inflamatórios dos neutrófilos, monócitos e citocinas dos linfócitos CD4 e CD8, reduz o stress oxidativo e

apresenta uma ação contra a remodelação fibrótica pulmonar. (61,62) O recurso a análises metabolómicas permitiram explorar os efeitos do Roflumilast. Foram estudadas as alterações do metaboloma com amostras de tecido pulmonar com recurso a espectrometria por H-RMN, em modelos murinos, antes e após indução de fibrose pulmonar com bleomicina, assim como na administração do Roflumilast como preventivo desse processo. Os espectros dos perfis metabolómicos demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os modelos controlo e os modelos com fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, estes com consequências dramáticas metabólicas. Alterações relativamente à glicina e prolina, aminoácidos envolvidos na formação e estrutura do colagénio, foram as mais evidentes, assim como alterações a nível do equilíbrio oxidativo, aumento da via glicolítica anaeróbia (aumento do lactato) e diminuição da síntese proteica (uracil e aminoácidos ramificados). Os animais tratados preventivamente com Roflumilast apresentaram níveis de glicina e prolina perto dos do grupo controlo, assim como se verificou efeitos anti-inflamatórios e capacidade de inibir o processo de fibrose e de stress oxidativo. (63)

Para compreender os produtos de degradação e as potenciais toxicidade deste fármaco, estudos com recurso a CL de alta precisão e RMN ajudaram a identificar quais os compostos de degradação deste fármaco, dos quais alguns potencialmente hepatotóxicos, demonstrando o seu interesse também na área de estudos farmacológicos. (61)

Outra estratégia farmacológica neste grupo de doentes, além de se considerar o roflumilast, é a de considerar a utilização de um macrólito. A azitromicina reduz a inflamação pulmonar e o número de exacerbações no doente com DPOC com enfisema. A identificação dos metabolitos microbianos no LBA em doentes tratados com azitromicina, permitiram compreender que a azitromicina afeta o microbioma pulmonar e que conduz ao aumento das concentrações de metabolitos induzidos por bactérias na via aérea inferior e à diminuição de níveis de citocinas inflamatórias. (64)

A antibioterapia com doxicilina, uma tetraciclina, é reportada como utilizada em várias patologias respiratórias. O seu papel anti-inflamatório nas bronquiectasias, no Síndrome de Dificuldade Respiratório Agudo e na Fibrose Quística é reconhecido. Os estudos científicos com tratamento com doxicilina na DPOC são limitados e a sua ação não foi elucidada. Independentemente da sua atividade anti-bacteriana, é reconhecida na doxicilina a redução da atividade da síntese e atividade das metaloproteinasas, MMPs, que promovem a degradação da matrix extracelular, que está conhecidamente elevada na DPOC. Um estudo metabolómico com recurso a espectrometria por H-RMN analisou o perfil metabolómico de amostras de sangue de doentes com DPOC, antes e após o tratamento com doxiciclina, submetidos a terapêutica de base com SABA+ SAMA+LABA+ICS de base, demonstrou alterações em 6 metabolitos. O lactato e ácidos gordos significativamente

diminuídos e o formato, citrato, imidazole e L-arginina aumentados pós tratamento. A doxiciclina, possivelmente, potencia a sua ação anti-inflamatória através da diminuição dos níveis de lactato, inibindo a atividade da arginase e diminuindo os níveis de ácidos gordos, evidenciando que dados provenientes da espectrometria de H-RMN podem ser úteis como informação complementar sobre as alterações metabólicas induzidas pela doxiciclina. (65)

A hidrolase epóxido solúvel, sEH, é um potencial alvo terapêutico identificado em modelos animais, ratos, com DPOC. A inibição farmacológica do sEH, aumenta os níveis plasmáticos dos ácidos epoxieicosatrienoicos, EETs, produtos da epoxigenação do ácido araquidónico através da monooxigenase do citocromo P450. Os EETs possuem propriedades anti-inflamatórias, pertencem aos eicosanóides, uma classe de lípidos reguladores, derivados do ácido araquidónico incluindo mediadores inflamatórios importantes, como as prostaglandinas e os leucotrienos, produzidos na via da cicloxigenase e lipoxigenase respetivamente. Outros compostos provenientes de outros ácidos gordos como ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, entre outros, são também eicosanóides colectivamente denominados oxilipinas. Com recurso a CL-EM foi identificado o perfil metabolómico das oxilipinas no LBA de ratos com DPOC, com administração de inibidores de sEH, demonstrando ser um potencial alvo farmacológico para o desenvolvimento de terapêuticas na prevenção e tratamento da DPOC. (66)

Na China, com altos níveis de poluição atmosférica nas cidades, estima-se que, entre 2003 e 2033, cerca de 65 milhões de mortes estejam relacionadas com a DPOC. A Medicina Tradicional Chinesa, MTC, tem sido utilizada como alternativa ao longo de séculos na Ásia Oriental no tratamento da DPOC. Alguns estudos metabolómicos têm sido incluídos em estudos farmacológicos como instrumento para elucidar mecanismos de ação, efeitos, eficácia e vantagens de determinados compostos utilizados na MTC no tratamento da DPOC. (67-73)

O bergenin é um composto polifenol, citoprotetor e antioxidante, que se encontra em várias plantas e presente num medicamento da MTC, *Bergenia*. O seu mecanismo de ação subjacente e efeitos não são muito compreendidos. Com recurso a espectrometria de RMN uma abordagem metabolómica com amostras de LBA de modelos animais, com bronquite crónica induzida pelo tabaco, explorou potenciais biomarcadores da DPOC e os potenciais mecanismos terapêuticos da dexametasona em comparação com o bergenin. Foram identificados 18 metabolitos potencialmente relacionados, incluindo aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina), serina, alanina, glutamina, prolina, treonina, glicina, glutamato, lactato, creatina fosfato, glucose, acetona, acetoacetato, piruvato, glicerol e isobutirato. Os resultados após tratamento, sugeriram que o mecanismo anti-inflamatório da dexametasona pode estar associado a alterações no metabolismo dos ACR e glicólise

enquanto o bergenin pode alterar o metabolismo dos ACR, glicina, serina e no metabolismo da treonina e glicólise. (73)

A *Bufei Jianpi fórmula* (BJF), um conjunto de 12 plantas medicinais da MTC, tem sido extensivamente utilizado na Ásia Oriental na DPOC e durante séculos com efeitos efetivos no alívio dos sintomas dos doentes. No entanto, os mecanismos de ação dos efeitos benéficos destas terapêuticas da MTC estão por elucidar. (67) Acredita-se que os múltiplos compostos desta fórmula atuem em vários alvos terapêuticos com efeito sinérgico e com eficácia terapêutica a longo prazo. Estudos clínicos anteriores demonstram os seus extensos efeitos farmacológicos incluindo no alívio de sintomas nos doentes com DPOC estável, na redução da frequência das exacerbações, no atraso das agudizações e na melhoria da função pulmonar e capacidade de exercício. Para a compreensão do seu sistema farmacológico, estudos experimentais demonstraram nesta fórmula, a presença de 145 ingrediente bioativos e 175 potenciais alvos terapêutico, com efeitos inibitórios inflamatório ao nível das citoquinas, expressão de fatores hipertróficos, equilíbrio protease-antiprotease e deposição de colagénio. (71)

Estudo experimental com abordagem metabolómica, em modelos animais, ratos, com DPOC, recorreram à CL-EM, com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares e vias metabólicas desta formula e explorar os seus alvos moleculares. Foram identificadas diferenças significativas no espectro de metabolitos no tecido pulmonar do grupo não tratado e grupo tratado com esta fórmula. (69,70) Os dados da análise metabolómica identificaram 30 metabolitos fortemente relacionados com o tratamento, identificando alvos e vias moleculares relacionadas com o metabolismo dos ácidos gordos, especialmente relacionados com o metabolismo do ácido araquidónico. O ácido araquidónico e seus derivados estão envolvidos no processo inflamatório da DPOC. A fórmula poderá melhorar a capacidade antibacteriana pulmonar através de alterações identificadas no metabolismo da fenilalanina e dos esfingolípidos. (70)

Posteriormente, uma abordagem integrada baseada em genómica-proteómica-metabolómica para aprofundar os mecanismos moleculares terapêuticos do BJF em ratos com DPOC, demonstrou que a perturbação do metabolismo lípido pode ter um papel crítico no desenvolvimento da DPOC e na intervenção da BJF no ambiente pré clínico. Foi demonstrado que os efeitos protetores e terapêuticos da BJF se relacionam com a regulação de múltiplas funções biológicas como metabolismo lipídico, stress oxidativo, resposta inflamatória e adesão focal celular. (67-69,72)

As técnicas metabolómicas têm sido instrumentos para o estudo de possíveis novos alvos terapêuticos na DPOC. A mutação do gene do regulador de condutância transmembranar da fibrose quística (CFRT) é conhecida na Fibrose Quística mas na sua relação com a exposição ao tabaco tem sido observada. Na exposição ao tabaco existe

disfunção CFTR, com a redução da sua atividade, respetivo aumento de muco e pronunciada disfunção do transporte mucociliar, pouco explicado a nível bioquímico e molecular. A redução da atividade do CFTR foi observada nos doentes com DPOC nas vias aéreas superiores, inferiores, glândulas sudoríparas e intestino. Com recurso à nano CG-EM detetaram alterações de resíduos proteicos relacionadas com modificações induzidas pela acroleína, um aldeído presente no fumo do tabaco, confirmando modificações induzidas pela acroleína na proteínas do CFTR, justificando a redução da atividade deste na exposição ao tabaco. Estes efeitos são reversíveis *in vitro* pelo ivacaftor, um potenciador do CFTR, representando uma potencial estratégia terapêutica na DPOC com bronquite crónica. (63)

O papel de intervenções nutricionais e suplementação nutricional na DPOC é controverso. A investigação dos efeitos da suplementação nutricional com Creatina e Coenzima Q10 (antioxidante com poder de redução do stress oxidativo e melhor a função mitocondrial) no perfil metabolómico de doentes com DPOC com OLD, com uma abordagem *targeted* com EM, focada nos esfingolípidos, aminoácidos e acetilcarnitinas (identificados como parte chave das vias bioquímicas na DPOC) identificou um aumento no perfil metabolómico de níveis de espécies de Lisofosfadilcolina (LPC). A LPC, atua como um produto inibidor na secreção das fosfolipase A2, podendo ajudar a aliviar as condições inflamatórias. Foi demonstrado ainda uma diminuição das espécies de esfingomielinas, cujo aumento foi associado à maior progressão de enfisema pulmonar. O aumento de acetilcarnitinas no perfil metabolómico dos indivíduos com suplementação não foi estatisticamente significativo. (39)

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A utilização da metabolómica no estudo de doenças respiratórias encontra-se ainda numa fase de crescimento e desenvolvimento, mas os seus estudos têm revelado ser um instrumento potencialmente importante no diagnóstico precoce, monitorização de terapêutica e na compreensão da patogénese de algumas doenças com o objetivo de uma medicina mais personalizada.

O número de estudos metabolómicos na DPOC tem aumentado nos últimos anos, com recurso a diferentes tecnologias, com a maioria dos dados proveniente da metabolómica baseada em técnicas analíticas como a H-RMN e EM, igualmente em evolução, nos mais diversos biofluidos como urina, EBC, soro ou plasma sanguíneo, saliva, expetoração ou LBA, com intuito de explorar e contribuir com dados relativos à compreensão da sua patogénese, biomarcadores, diagnóstico diferencial, monitorização da progressão e exacerbação da doença e sobre a sua abordagem terapêutica.

Os metabolitos são os produtos finais dos processos celulares e devem ser encarados como a última resposta do nosso sistema, desde a genética ao ambiente, compreendendo-se que a sua análise no ser humano possa ser uma fonte de informação muito válida no estudo de doenças. Os estudos metabolómicos têm contribuído para compreender as alterações metabolómicas entre indivíduos saudáveis comparativamente a indivíduos doentes. O primeiro esforço da metabolómica é adquirir o máximo de informação química possível para obter uma visão global da doença. Numa fase posterior, os estudos metabolómicos apresentam abordagens mais direcionadas, permitindo complementar os dados globais com uma pesquisa de metabolitos mais específica.

O interesse revelado pelos estudos metabolómicos na procura de marcadores metabolómicos na DPOC é evidente. Estes têm-se demonstrado ser um potencial instrumento para o diagnóstico precoce e diferencial entre a DPOC e outras doenças respiratórias.

Os estudos metabolómicos recentes na DPOC reportados, identificaram metabolitos relacionados com alterações ao nível do catabolismo dos aminoácidos, principalmente ARC (leucina, isoleucina e valina), estas mencionadas tanto nos estudos relativamente à exposição tabágica, como associado com a severidade da doença, progressão e enfisema pulmonar. Alterações das concentrações de alanina, fenilalanina, glutamina, tirosina, N,N – dimetilglicina, 3-metilhistidina, metionina, lisina, taurina são referidas nos vários estudos. A modificação do metabolismo dos aminoácidos pode ser o resultado da atrofia muscular, fadiga, fraqueza, perda significativa de peso que caracteriza os doentes com DPOC.

A ADMA e a L-Arginina, como um metabolito que reflete alteração do metabolismo da Arginina, assim como a quinurenina, principal metabolito do catabolismo do triptofano, são identificados como potenciais marcadores de exacerbação da DPOC.

A carnitina, carnitina livre, as acetilcarnitinas, o acetato ou o lactato são metabolitos reportados, associados à disfunção do metabolismo energético podendo explicar fenómenos de desnutrição, disfunção muscular e incapacidade funcional na DPOC.

A redução da L-Carnitina foi identificada na progressão da DPOC, metabolito com propriedades antiapoptóticas e antioxidantes. Apesar da necessidade de mais estudos, a sua suplementação é vista como uma possibilidade para atrasar a progressão da doença. Alterações do metabolismo lipídico, principalmente dos esfingolípido, estão igualmente reportadas nestes estudos metabolómicos na DPOC. As ceramidas, a esfingomielina e gangliosídeo e a S1P, metabolitos intermediários dos esfingolípido, são propostos como possíveis candidatos a biomarcadores na DPOC, estando envolvidos em vários processos biológicos, como o stress oxidativo ou inflamação, inerentes à DPOC.

O Isoprene, o succinato e o sulfito de pentametileno são os compostos voláteis mais recentemente referidos como putativos biomarcadores na DPOC, apesar de não exclusivos e se encontrarem igualmente referidos noutras doenças respiratórias crónicas. Outros compostos voláteis como terpineol, nitrilas, aldeídos, undecano, hidrocarbono, hexanal são igualmente referidos como aumentados na DPOC.

Os estudos metabolómicos têm-se demonstrado como um potencial instrumento para o diagnóstico diferencial entre a DPOC e outras doenças respiratórias como a asma. Níveis de 3-hidroxyisovalerato, metabolito do catabolismo da leucina, encontraram-se consistentemente mais elevados na asma do que na DPOC, enquanto a betaina e colina encontram-se mais elevados na DPOC do que na Asma. Níveis de 1-metihistadina, do catabolismo na histidina, são superiores nos doentes asmáticos. A L-histidina é um metabolito identificado como um potencial biomarcadores da ACO.

Importante realçar que, estes estudos permitiram detetar e comparar os diferentes perfis metabolómicos destas doenças através da análise de amostras biológicas não invasivas, como é o caso da urina ou EBC.

Têm igualmente demonstrado ter um papel na monitorização das terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas (como suplementação nutricional) na DPOC, conseguindo aferir os efeitos de determinadas terapêuticas em diferentes fenótipos da DPOC, assim como têm sido um instrumento de monitorização da segurança e eficiência do metabolismo farmacológico em ensaios clínicos dirigidos ao tratamento da DPOC. O seu papel tem sido igualmente importante na procura de potenciais alvos farmacológicos e desenvolvimento de terapêuticas na prevenção e tratamento da DPOC, assim como também

na elucidação dos mecanismos de certos compostos de plantas medicinais utilizadas na Medicina Oriental na DPOC.

Tal como as outras “ômicas” ricas em dados, a metabolômica nos humanos é influenciada por inúmeras variáveis, de difícil controlo, como a idade, género, etnia ou estilos de vida, incluindo dieta, que tornam difíceis as validações de estudos de grandes dimensões. Apesar da presença de alguns estudos clínicos, a maioria foram realizados a nível experimental, realizados com modelos animais. Os estudos efetuados a nível clínico apresentam amostras pequenas referindo a necessidade de continuação e validação dos resultados com mais estudos e com novas plataformas metabolômicas. É realçado a importância de um desenho experimental bem formulado para a validação dos estudos metabolômicos e para a veracidade dos seus dados.

Atendendo à importância da DPOC na saúde global, pela sua elevada incidência, morbidade e mortalidade, diagnóstico tardio e escassas opções terapêuticas atuais compreende-se a importância da área da metabolômica no estudo desta doença. Entende-se assim o seu papel e contributo atual que, apesar da escassa aplicabilidade em termos clínicos, aparenta ser um instrumento extremamente promissor, atendendo aos poucos anos da metabolômica como ciência, ao grande número de dados fornecidos até hoje e à constante evolução tecnológica ao nível das suas plataformas analíticas.

BIBLIOGRAFIA

1. Liu Q. Application of metabonomics in early diagnosis of disease. *Journal of Translational Medicine*. 2015. 3(2):136-144.
2. Nobakht M.Gh., Aliannejad R., Rezaei-Tavirani M., Taheri S., Oskouie AA. The metabolomics of airway, including COPD, asthma and cystic fibrosis. *Biomarkers*. 2015. 20(1):5-16.
3. Maguire M. *An Metabolomics and Systems Biology in Human Health and Medicine: An Introduction to Metabolomics and Systems Biology*. CAB International. 2014. 20: 1-5.
4. Stringer K.A, McKay R.T., Kamovsky A., Quémerais B., Lacy P. Metabolomics and its applications to acute lung diseases. *Frontiers in Immunology*. 2016.7:44.
5. Aline K., Andréa T.F., Gisele C., Pedro C., Henrique C.R., Marina F.T, et al, *Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. 965: 3-13.
6. Beale D.J., Jones O.A.H., Karpe A.V., Davalan S., Oh.D.Y., Kouremenos K.A et al. A review of analytical techniques and their application in disease diagnosis in breathomics and salivaomics research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.18 (24): 1-26.
7. Ghosh N., Dutta M., Singh B., Banerjee R., Bhattacharyya P., Chaudhury K. Transcriptomics, proteomics and metabolomics driven biomarker discovery in COPD:an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2016.16 (8): 897-913.
8. Hauschild AC, Frisch T., Baumbach JI, Baumbach . Carrota: Revealing Hidden Confounder Markers in Metabolic Breath Profiles. *Metabolites*. 2015. 10;5(2):344-63.
9. Bos L.D, Sterk P.J.,Fowler S.J. Breathomics in the setting of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016. 138(4): 970-976.
10. Chetwynd A.J., Dunn W.B., Rodriguez-Blanco G. Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017.965: 19-37.
11. Kan M.,Shumyatcher M,, Himes BE. Using omics approaches to understand pulmonary diseases. *Respiratory Research*. 2017. 3;18(1):149.
12. Rodríguez-Pérez R, Cortés R, Guamán A, Pardo A, Torralba Y, Gómez F et al. Instrumental drift removal in GC-MS data for breath analysis: the short-term and long-term temporal validation of putative biomarkers for COPD. *Journal of Breath Research*. 2018.12(3): 1-16.
13. Martinez-Lozano Sinues P, Meier L, Berchtold C, Ivanov M, Sievi N, Camen G et al. Breath analysis in real time by mass spectrometry in chronic obstructive pulmonary disease. *. Respiration*. 2014. 87(4):301-31.

14. Gaugg MT. On-line Breath Metabolomics in Respiratory Diseases using Secondary Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Chimia*. 2018. 72(4):184-188.
15. Bertini I., Luchinat C., Miniati M., Monti S., Tenori L. Phenotyping COPD by ¹H NMR metabolomics of exhaled breath condensate. *Metabolomics*. 2014. 10(2): 302-311.
16. Wilson A.D. Advances in electronic-nose technologies for the detection of volatile biomarker metabolites in the human breath. *Metabolites*. 2015. 5(1):140-163.
17. Fitzgerald J., Fenniri H. Cutting edge methods for non-invasive disease diagnosis using e-tongue and e-nose devices. *Biosensors*. 2017. 7(59): 3-39.
18. Sin DD, Hollander Z, DeMarco ML, McManus BM, Ng RT. Biomarker Development for Chronic Obstructive Pulmonary Disease: From Discovery to Clinical Implementation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015. 192(10):1162-70.
19. Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in personalized world. *New Horizons in Translational Medicine*. 2017. 3(6):294-305.
20. Mastrangelo A., Barbas C. Chronic diseases and lifestyle biomarkers identification by metabolomics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. 965 (235-263).
21. Agusti A., Gea J., Faner R. 22. Biomarkers, the control panel and personalized COPD medicine. *Respirology*. 2016. 21(1):24-33.
22. Ross C.L., Galloway-Phillipps N., Armstrong P.C., Mitchell J.A., Warner T.D., Brearley C. et al. Protocol for a human in vivo model of acute cigarette smoke inhalation challenge in smokers with COPD: Monitoring the nasal and systemic immune response using a network biology approach. *BMJ*. 2015. 5(1):2-9.
23. Ren X, Zhang J, Fu X, Ma S, Wang C, Wang J et al. LC-MS based metabolomics identification of novel biomarkers of tobacco smoke-induced chronic bronchitis. *Biomed Chromatogr*. 2016. 30(1):68-74.
24. Naz S., Kolmert J., Yang M., Reinke S.N., Kamleh M.A., Snowden S et al. Metabolomics analysis identifies sex-associated metabolotypes of oxidative stress and the autotaxin-lysoPA axis in COPD. *The European respiratory journal*. 2017. 49(6).
25. Li J., Zhao P., Yang L., Li Y., Tian Y., Li S., Bai Y. Integrating 3-omics data analyze rat lung tissue of COPD states and medical intervention by delineation of molecular and pathway alterations. *Bioscience Reports*. 2017. 37(3).
26. Cruickshank-Quinn CI, Mahaffey S, Justice MJ, Hughes G, Armstrong M, Bowler RP et al. Transient and persistent metabolomic changes in plasma following chronic cigarette smoke exposure in a mouse model. *PLoS One Journal*. 2014. 9(9).
27. Jamalkandi S.A., Mirzaie M., Jafari M., Mehrani H., Shariati P., Khodabandeh M. Signaling network of lipids as a comprehensive scaffold for omics data integration in sputum of COPD patients. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015. 1851(10):1383-1393.

28. Chen Q, Deeb RS, Ma Y, Staudt MR, Crystal RG, Gross SS. Serum Metabolite Biomarkers Discriminate Healthy Smokers from COPD Smokers. *PLoS One Journal*. 2015. 16;10(12):e0143937.
29. Miller M.A., Danhorn T., Cruickshank-Quinn C.I., Leach S.M., Jacobson S., Strand M.J. et al. Gene and metabolite time-course response to cigarette smoking mouse lung and plasma. *PLoS ONE Journal*. 2017.12(6).
30. Kaluarachchi M.R., Boulangé C.L., Garcia-Perez I., Lindon J.C., Minet E.F. Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. *Bioanalysis*. 2016.8(19):2023-2043.
31. Zhao H, Dennery PA, Yao H. Metabolic reprogramming in the pathogenesis of chronic lung diseases, including BPD, COPD, and pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018.314(4):L544-L554.
32. Lee J, Yeganeh B, Ermini L, Post M. Sphingolipids as cell fate regulators in lung development and disease. *Apoptosis*. 2015.20(5):740-57.
33. Bowler RP, Jacobson S, Cruickshank C, Hughes GJ, Siska C, Ory DS et al. Plasma sphingolipids associated with chronic obstructive pulmonary disease phenotypes. *American Journal of respiratory and Critical Care Medicine*. 2015.1(191):275-84.
34. Kilk K., Aug A., Ottas A., Soomets U., Altraja S., Altraja A. Phenotyping of chronic obstructive pulmonary disease based on the integration of metabolomes and clinical characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. 19(3)-666.
35. Navarrete A, Rupérez FJ, Mendes TO, Pérez-Rial S, Girón-Martínez A, Terrón-Expósito R et al. A metabolomic approach shows sphingosine 1-phosphate and lysophospholipids as mediators of the therapeutic effect of liver growth factor in emphysema. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017. 30(139):238-246.
36. Hodgson S., Griffin T.J., Reilly C., Harvey S., Witthuhn B.A., Sandri B.J. et al. Plasma sphingolipids in HIV-associated chronic obstructive pulmonary disease. *BMJ Open Respiratory Research*. 2017.4(1)- e000180.
37. Novotna B., Abdel-Hamid M., Koblizek V., Svoboda M., Hejduk K., Rehacek V. et al. A pilot data analysis of a metabolomic HPLC-MS/MS study of patients with COPD. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2018. 27(4):531-539.
38. Conlon T.M., Bartel J., Ballweg K., Göunter S., Prehn C., Krumsiek J. et al. Metabolomics screening identifies reduced L-carnitine to be associated with progressive emphysema. *Clinical Science*. 2016.130(4):273-287.
39. De Benedetto F., Pastorelli R., Ferrario M., Blasio F., Marinari S., Brunelli L., et al. Supplementation with Qter® and Creatine improves functional performance in COPD patients on long term oxygen therapy. *Respiratory Medicine*. 2018. 142:86-93.

40. Wendt C.H., Nelsestuen G., Harvey S., Gulcev M., Stone M., Reilly C. Peptides in bronchoalveolar lavage in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE*. 2016. 11(5)-e0155724.
41. Phillips C, Mac N, Syed Y, Deganello D, Claypole T, Lewis K. Short-Term Intra-Subject Variation in Exhaled Volatile Organic Compounds (VOCs) in COPD Patients and Healthy Controls and Its Effect on Disease Classification. *Metabolites*. 2014.9; 4(2):300-18.
42. Christiansen A., Davidsen J.R., Titlestad I., Vestbo J., Baumbach J. A systematic review of breath analysis and detection of volatile organic compounds in COPD. *Journal of Breath Research*.2016. 10(3).034002.
43. Bregy L.,Nussbaumer-Ochsner Y., Sinues P.M., García-Gómez D., Suter Y., Gaisl T. et al. Real-time mass spectrometric identification of metabolites characteristic of chronic obstructive pulmonary disease in exhaled breath,*Clinical. Mass Spectrometry*. 2018.(7): 29-35.
44. Khamis M.M., Adamko D.J., El-Aneed A. Development of a validated LC- MS/MS method for the quantification of 19 endogenous asthma/COPD potential urinary biomarkers. *Analytica Chimica Acta*. 2017. 989:45-58.
45. Adamko D.J., Nair P., Mayers I., Tsuyuki R.T., Regush S., Rowe B.H. Metabolomic profiling of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A pilot study differentiating diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015. 136(3) :571-580.e3.
46. Oh J.Y., Lee Y.S., Min K.H., Hur G.Y., Lee S.Y., Kang K.H et al. Increased urinary l-histidine in patients with asthma-COPD overlap: A pilot study. *International Journal of COPD*. 2018.13:1809-1818.
47. Khamis M.M., Holt T., Awad H., El-Aneed A., Adamko D.J. Comparative analysis of creatinine and osmolality as urine normalization strategies in targeted metabolomics for the differential diagnosis of asthma and COPD. *Metabolomics*. 2018. 14(9): 115.
48. Ząbek A., Stanimirova I., Deja S., Barg W., Kowal A., Korzeniewska A., et al. Fusion of the ¹H NMR data of serum, urine and exhaled breath condensate in order to discriminate chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea syndrome. *Metabolomics*. 2015.11(6):1563-1574.
49. Maniscalco M., Motta A. Metabolomics of chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea syndrome. *Metabolomics*. 2016.12(2):1-2.
50. Deja S, Porebska I, Kowal A, Zabek A, Barg W, Pawelczyk K et al. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*. 2014.100:369-380.
51. Scott JA, Duongh M, Young AW, Subbarao P, Gauvreau GM, Grasmann H. Asymmetric dimethylarginine in chronic obstructive pulmonary disease (ADMA in COPD). *International Journal of Molecular Sciences*. 2014.10;15(4):6062-71.

52. Ruzsics I, Nagy L, Keki S, Sarosi V, Illes B, Illes Z. et al. L-Arginine Pathway in COPD Patients with Acute Exacerbation: A New Potential Biomarker. *COPD:Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2016.13(2):139-45.
53. Vögeli A, Ottiger M, Meier MA, Steuer C, Bernasconi L, Huber A. et al. Asymmetric Dimethylarginine Predicts Long-Term Outcome in Patients with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung*. 2017.195(6):717-727.
54. Gulcev M., Reilly C., Griffin T.J., Broeckling C.D., Sandri B.J., Witthuhn B.A. et al. Tryptophan catabolism in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of COPD*.2016.11(1):2435-2446.
55. Fortis S., Luszczyk E.R., Weinert C.R., Beilman G.J. Metabolomics in COPD Acute Respiratory Failure Requiring Noninvasive Positive Pressure Ventilation. *Canadian Respiratory Journal*. 2017.(2017): 9480346.
56. Zurfluh S., Nickler M., Ottiger M., Steuer C., Kutz A., Christ-Crain M. et al. Association of adrenal hormone metabolites and mortality over a 6-year follow-up in COPD patients with acute exacerbation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2018. 56(4):669-680.
57. Celli BR, Locantore N, Tal-Singer R, Riley J, Miller B, Vestbo J. et al. . Emphysema and extrapulmonary tissue loss in COPD: a multi-organ loss of tissue phenotype. *European Respiratory Journal*. 2018.7;51(2).
58. Wang C., Li J.-X., Tang D., Zhang J.-Q., Fang L.-Z., Fu W.-P. et al. Metabolic changes of different high-resolution computed tomography phenotypes of COPD after budesonide-formoterol treatment. *International Journal of COPD*. 2017.(12):3511-3521.
59. Montuschi P., Santini G., Mores N., Vignoli A., Macagno F., Shoreh R. et al. Breathomics for assessing the effects of treatment and withdrawal with inhaled beclomethasone/formoterol in patients with COPD. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. 258(9): 1-13.
60. Zhou T, Zeng D, Zhao T, Yang Y, Liu S, Wu J. et al. In vivo metabolism study of (R)-bambuterol in humans using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal Separation Science*. 2016. 39(15):2896-906.
61. Pinheiro MS, Viana GM, Vieira BA, de Souza AM, Rodrigues CR, Marins RC, Cabral LM et al. Identification, characterization and in silico ADMET prediction of Roflumilast degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017.10(138):126-133.
62. Milara J, Morcillo E, Monleon D, Tenor H, Cortijo J. Roflumilast Prevents the Metabolic Effects of Bleomycin-Induced Fibrosis in a Murine Model. *PLoS One*. 2015.20;10(7):e0133453.
63. Raju SV, Lin VY, Liu L, McNicholas CM, Karki S, Sloane PA. et al. . The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiator Ivacaftor Augments Mucociliary

Clearance Abrogating Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Inhibition by Cigarette Smoke. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*.2017.56(1):99-108.

64. Segal LN, Clemente JC, Wu BG, Wikoff WR, Gao Z, Li Y. et al. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial with azithromycin selects for anti-inflammatory microbial metabolites in the emphysematous lung. *Thorax*.2017.72(1):13-22.

65. Singh B, Jana SK, Ghosh N, Das SK, Joshi M, Bhattacharyya P. et al. Metabolomic profiling of doxycycline treatment in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.2017. 5;132:103.

66. Nording ML, Yang J, Hoang L, Zamora V, Uyeminami D, Espiritu I et al. Bioactive lipid profiling reveals drug target engagement of a soluble epoxide hydrolase inhibitor in a murine model of tobacco smoke exposure. *Journal Metabolomics*.2015.1:1-23.

67. Zhao P., Li J., Yang L., Li Y., Tian Y., Li S. Integration of transcriptomics, proteomics, metabolomics and systems pharmacology data to reveal the therapeutic mechanism underlying Chinese herbal Bufeiyishen formula for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Molecular Medicine Reports*. 2018. 17(4): 5247-5257.

68. Zhao P, Li J, Li Y, Tian Y, Yang L, Li S. Integrating Transcriptomics, Proteomics, and Metabolomics Profiling with System Pharmacology for the Delineation of Long-Term Therapeutic Mechanisms of Bufeiyishen Formula in Treating COPD. *Biomed Research International*. 2017.(2017):7091087.

69. Li J., Yang L., Li Y., Tian Y., Li S., Jiang S. et al. . Metabolomics study on model rats of chronic obstructive pulmonary disease treated with BuFeiyishen. *Journal Molecular Medicine Reports*.2014.11(2):1324-1333.

70. Yang L, Li J, Li Y, Tian Y, Li S, Jiang S. et al. Metabolites and Metabolic Pathways Related to Treatment with Bufeiyishen Formula in a Rat COPD Model Using HPLC Q-TOF/MS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015. 956750 (2015):2-9.

71. Zhao P., Yang L., Li J., Li Y., Tian Y., Li S. Combining systems pharmacology, transcriptomics, proteomics, and metabolomics to dissect the therapeutic mechanism of Chinese herbal Bufeiyishen formula for application to COPD. *International Journal of COPD*.2016.11(1):553-566.

72. Li J., Zhao P., Yang L., Li Y., Tian Y., Li S. System biology analysis of long-term effect and mechanism of Bufeiyishen on COPD revealed by system pharmacology and 3-omics profiling. *Scientific reports* 2016. 6. (25492).

73. Ren X, Ma S, Wang J, Tian S, Fu X, Liu X. et al. Comparative effects of dexamethasone and berberine on chronic bronchitis and their anti-inflammatory mechanisms based on NMR metabolomics. *Molecular Biosystems*.2016. 24;12(6):1938-47.