



**Jéssica Eufémia
Pereira Marques**

**Metabolitos alvo da urina com potencial impacto na
compreensão da asma**



**Jéssica Eufémia
Pereira Marques**

**Metabolitos alvo da urina com potencial impacto na
compreensão da asma**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e sob a co-orientação da Doutora Sónia Andreia Oliveira Santos, Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais...

o júri

presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço (Orientadora)
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Marcela Alves Segundo
Professora auxiliar do Departamento de Ciências Químicas da Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto

agradecimentos

Um sincero agradecimento às minhas orientadoras, Professora Sílvia Rocha e Doutora Sónia Santos pelos ensinamentos transmitidos, pelo acompanhamento, e por todo o apoio e dedicação ao longo da minha tese. Um agradecimento também ao Professor Pedro Domingues pelos conselhos e pela disponibilidade sempre prestada.

Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório, pela boa disposição, pelos desabafos, pelas palavras motivacionais e pelo espírito de ajuda sempre demonstrado. Magda, Ângelo, Ricardo, Cátia, Carla, Inês, Francisca e em especial Carina, é muito bom poder trabalhar e conviver com pessoas como vocês.

Aos meus grandes amigos de longa data. À minha melhor amiga, Renata, ao Rodrigo e ao Pedro, obrigada pela presença constante apesar da distância. Obrigada pela preocupação, compreensão, palavras de apoio e pelos (possíveis) fins de semana passados juntos. O que é verdadeiro vence sempre.

À minha eterna família Aveirense. Ao meu melhor amigo, Tiago, à Joana, à Guida, ao Rúben, à Sara, à Tita, ao João, à Liliana, ao Celso e ao Filipe. Este percurso não teria sido a mesma coisa sem vocês. Fizeram parte dos melhores momentos e contribuíram imenso para a pessoa que sou hoje. Levo-vos no coração para onde quer que vá. Vocês são os melhores! Ao António, pelo otimismo tantas vezes transmitido. É para mim um orgulho ver o teu percurso e poder fazer parte dele. Ao João e ao Rui, por principalmente no último ano terem sido apoios incansáveis. Agradeço por todos os momentos, apoio e desabafos.

Ao Simão, pela presença diária apesar dos quilómetros de distância, pela constante força transmitida, pela preocupação e dedicação.

À Bárbara, que é como uma irmã mais nova. Ao afilhado de sorriso contagiante, Rodrigo, e à Beatriz. Ao Lucas, a melhor prenda que podia ter recebido, e ao Dany.

Um obrigado muito especial às duas pessoas que diariamente são a minha fonte de inspiração. Mana e padrinho, não poderia ter melhores exemplos a seguir.

Por fim, agradeço aos meus pais, por todo o esforço diário, pelo apoio, pela confiança que depositam em mim e pelo olhar de orgulho quando me veem.

Habituo-nos a ver a vida passar num piscar de olhos, mas é mais suportável quando o fazemos acompanhados pelos melhores!

Obrigada!

palavras-chave

Asma, urina, metabolómica, derivatização, cromatografia em fase gasosa, espectrometria de massa, parâmetros de normalização

Resumo

A asma é uma doença inflamatória, crónica e heterogénea, das vias respiratórias, com elevado impacto socioeconómico e crescente incidência e prevalência. O principal objetivo desta tese foi a implementação de uma metodologia que permita a análise simultânea do perfil metabólico urinário de famílias químicas com potencial relevância na compreensão da asma, nomeadamente aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares. Primeiramente procedeu-se à implementação da metodologia, testando diferentes condições de sililação, seguido de análise por GC-qMS (cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa com quadrupolo). Foram analisadas amostras de urina recolhidas em contexto hospitalar, incluindo 37 indivíduos asmáticos, 19 com diversas alergias e 17 saudáveis, usados como controlo. O grupo de indivíduos com asma e alergias era constituído por 34 mulheres e 22 homens, dos 3 os 79 anos de idade, e em que 59% tomava medicação e 36% tinha co-patologias associadas. Inicialmente, as amostras de urina foram caracterizadas relativamente à condutividade e teor de creatinina. Verificou-se uma grande dispersão dos resultados dentro de cada grupo, com valor mediano de 11 ± 6 mS/cm nos controlos e 17 ± 4 mS/cm nos indivíduos asmáticos para a condutividade, e 612 ± 195 µg/mL nos controlos e 842 ± 211 µg/mL nos indivíduos asmáticos para a creatinina, demonstrando que ambos os parâmetros são estatisticamente diferentes entre grupos. De seguida, foram identificados 35 metabolitos pertencentes às famílias químicas alvo: 4 aminoácidos, 6 ácidos orgânicos, 2 ácidos gordos e 23 açúcares. Com o

objetivo de comparar diferentes abordagens de normalização, as concentrações dos metabolitos (expressas em equivalentes de padrão interno) foram normalizadas pelos respectivos valores de condutividade e teor de creatinina. No entanto, estas abordagens não permitiram incrementar o número de metabolitos diferenciadores entre os grupos. Assim, a concentração dos metabolitos alvo, expressa em equivalentes de padrão interno, foi a estratégia selecionada para uma melhor identificação de alterações estatisticamente significativas entre os grupos objeto de estudo. Efetuou-se uma análise estatística a uma matriz que incluiu todas as idades (3 aos 79 anos), tendo-se observado significância estatística em 19 metabolitos (3 aminoácidos, 6 ácidos orgânicos e 10 açúcares). Para minimizar a influência de potenciais fatores de confusão, nomeadamente a idade, realizou-se um estudo focado nos indivíduos de 10 a 30 anos (19 mulheres e 16 homens, 59% tomava medicação e 20% tinha comopatologias). Ao estudar uma população alvo menor, a distinção entre as amostras aumentou, sendo que se obtiveram 28 metabolitos (4 aminoácidos, 6 ácidos orgânicos, 2 ácidos gordos e 16 açúcares) estatisticamente diferentes entre os grupos objeto de estudo. Assim, mais 9 metabolitos (L-5-oxoprolina, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, treitol, ribose, frutose, manitol, sorbose e galactose) permitem fazer a distinção entre os grupos. Apesar da dispersão observada nos valores dentro de cada grupo, que pode ser explicada pela heterogeneidade da doença, nomeadamente a existência de vários fenótipos e endótipos dentro da asma, foi possível identificar um conjunto de metabolitos nos quais se observaram diferenças estatisticamente significativas. Estes metabolitos estão associados a fenómenos de stress oxidativo, relacionando o metabolismo dos aminoácidos, metabolismo lipídico, metabolismo energético e metabolismo dos hidratos de carbono de forma integrada.

keywords

Asthma, urine, metabolomics, derivatization, gas chromatography, mass spectrometry, normalization parameters

abstract

Asthma is an inflammatory, chronic and heterogeneous, disorder of the respiratory pathways, with high socioeconomic impact and growing incidence and prevalence. The main objective of this master thesis was the implementation of a methodology that allows the simultaneous study of the urinary metabolic profile of chemical families with potential relevance in the understanding of asthma, namely amino acids, organic acid, fatty acids and sugars. Firstly, we implemented the methodology, testing different silylation conditions, followed by GC-qMS analysis (gas chromatography - mass spectrometry with quadrupole). Were analysed urine specimens, collected in hospital context, which included a group of 37 asthmatic subjects, 19 individuals with various allergies and 17 healthy subjects, used as control. Asthma and allergies group was consisted by 34 women and 22 men, from 3 to 79 years old, in which 59% took medication and 36% had associated co-pathologies. Initially, urine samples were characterized for conductivity and creatinine content. There was a large dispersion of the results within each group, with a median value of 11 ± 6 mS/cm in the controls and 17 ± 4 mS/cm in the asthmatic individuals for conductivity, and 612 ± 195 $\mu\text{g/mL}$ in the controls and 842 ± 211 $\mu\text{g/mL}$ in the asthmatic individuals for creatinine, showing that both parameters are statistically different between groups. Then, 35 metabolites belonging to target families were identified: 4 amino acids, 6 organic acids, 2 fatty acids and 23 sugars. In order to compare different normalization approaches, the concentrations of metabolites, expressed as equivalent of internal standard

were normalized by their respective values of conductivity and creatinine content. However, these approaches didn't allow to increase the number of differentiating metabolites between the groups. Thus, the concentration of the target metabolites, expressed as equivalent of internal standard, was the strategy selected for a better identification of statistically significant changes among the groups under study. A statistical analysis was performed to a matrix that included all ages (3 to 79 years) where it was observed statistical significance in 19 metabolites (3 amino acids, 6 organic acids and 10 sugars). In order to minimize the influence of potential confounding factors, namely age, a study focused on individuals aged 10 to 30 years (19 women and 16 men, 59% taking medication and 20% pathologies). By studying a smaller target population, the distinction between the samples increased, and we obtained 28 metabolites (4 amino acids, 6 organic acids, 2 fatty acids and 16 sugars) statistically different among the study groups. Thus, a further 9 metabolites (L-5-oxoproline, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, treitol, ribose, fructose, mannitol, sorbose and galactose) allow to distinguish between groups. Despite the dispersion observed in the values within each group, which can be explained by the disease heterogeneity, namely the existence of several phenotypes and endotypes within the asthma, it was possible to identify a set of metabolites in which statistically significant differences were observed. These metabolites were associated to oxidative stress phenomena, relating amino acid metabolism, lipid metabolism, energy metabolism and carbohydrate metabolism in an integrated way.

Índice

Abreviaturas	ii
Introdução	1
1.1 Asma.....	1
1.1.1 Definição, sintomas e diagnóstico	1
1.1.2 Fisiopatologia da asma e alterações metabólicas.....	2
1.2 O papel da metabólômica no estudo da asma	8
1.2.1 Conceito.....	8
1.2.2 Alterações em perfis metabolômicos da fração não volátil da urina	10
1.2.3 A urina como matriz de estudo	12
1.3 Estabelecimento de perfis metabolômicos da fração não volátil da urina por GC-MS.....	16
1.4 Enquadramento do estudo e objetivos	20
Materiais e Métodos	23
2.1. Materiais e reagentes.....	23
2.2 Amostragem de urinas	23
2.3 Caracterização de amostras de urina e de padrões	29
2.3.1. Determinação da condutividade das amostras de urina	29
2.3.2. Determinação da fração não volátil da urina: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares	29
2.3.2.1. Implementação do processo de sililação.....	29
2.3.2.2. Estudo de amostras de urinas e de padrões por sililação seguida de análise cromatográfica	30
2.4. Tratamento de dados.....	32
Resultados e Discussão	33
3.1 Implementação da metodologia de análise da fração não volátil da urina: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares	33
3.1.1. Seleção da condição de sililação.....	33
3.1.2. Estratégias para identificação de metabolitos	35
3.1.3. Análise da variabilidade da metodologia implementada	40
3.2 Caracterização das amostras de urina.....	42
3.2.1. Análise da condutividade e teor de creatinina	42
3.2.2. Análise da fração não volátil das urinas	49
Conclusões	75
Referências Bibliográficas	75
Anexo I.....	87
Anexo II	101
Anexo III.....	101

Abreviaturas

Abreviatura	Designação em Português	Designação em Inglês
AC	Adenilil ciclase	Adenylyl cyclase
ADP	Adenosina difosfato	Adenosine diphosphate
AK	Adenosina cinase	Adenosine kinase
AMP	Adenosina monofosfato	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP cinase	AMP kinase
APC	Células apresentadoras de antigénio	Antigen-presenting cell
ATP	Adenosina trifosfato	Adenosine triphosphate
BSTFA	N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida	N, O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide
DHA	Ácido docosahexaenóico	Docosahexaenoic acid
EPA	Ácido eicosapentaenóico	Eicosapentaenoic acid
GC×GC– ToFMS	Cromatografia de gás bidimensional abrangente-espectrometria de massa com tempo de voo	Comprehensive twodimensional gaschromatography–time of flight mass spectrometry
HPLC	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência	High-performance liquid chromatography
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa	Gas chromatography-mass spectrometry
GC-qMS	Cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa com quadrupolo	Gas chromatography–quadrupole mass spectrometry
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IgE	Imunoglobulina E	Immunoglobulin E
IL-2	Interleucina 2	Interleukin 2
LC-MS	Cromatografia em fase líquida- espectrometria de massa	Liquid chromatography-mass spectrometry
LTh	Linfócitos T auxiliares	T helper cells
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade	Major histocompatibility complex
MOX	Metoxamina	Methoxamine
MSTFA	N-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida	N-ethyltrimethylsilyltrifluoroacetamide
NOS	Óxido nítrico sintase	Nitric oxide synthase
RMN	Ressonância magnética nuclear	Nuclear magnetic resonance
ROS	Espécies reativas de oxigénio	Reactive oxygen species
TMS	Trimetilsilano	Trimethylsilane

Introdução

1.1 Asma

1.1.1 Definição, sintomas e diagnóstico

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas, caracterizada por sintomas variáveis e recorrentes (1,2), obstrução do fluxo aéreo e hiper-reatividade brônquica, a qual determina a inflamação e contração dos músculos que envolvem os brônquios. A sintomatologia associada é dispneia, sibilância, tosse seca e sensação de aperto torácico, a qual varia de pessoa para pessoa ao nível de severidade e frequência (1,3). Estes sintomas estão associados a uma obstrução das vias aéreas, a qual pode ser reversível espontaneamente ou através de tratamento. A asma é uma doença com implicações na qualidade de vida e provocando sofrimento tanto no próprio doente como nos seus familiares (4). Esta patologia é associada a elevados custos de saúde, particularmente no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento. Globalmente, estima-se que o custo total associado a questões de saúde com pacientes com asma é quatro vezes superior ao da população em geral (5). Particularmente na Europa, estima-se que estes custos representam cerca de 72 biliões de euros (6). Assim, a asma tem um impacto socioeconómico significativo, estando os seus custos relacionados com cuidados primários, cuidados hospitalares, tratamento, bem como com a perda de produtividade por parte de indivíduos que ficam incapacitados de exercer o seu trabalho profissional devido à sua condição (6).

Sendo considerada uma doença multifatorial, a asma depende de uma interação entre fatores genéticos e ambientais. É desencadeada por uma resposta imunitária que pode ser provocada por reações alérgicas, isto é, reações de hipersensibilidade imunológica mediadas por anticorpos contra um antigénio estranho ao organismo, mais concretamente um alergénio. Estão habitualmente envolvidos na origem da reação alérgica certas substâncias inaladas (ácaros, pólen, bolores, pelo de animais, perfumes), ingeridas na alimentação (nozes, marisco, chocolate, amêndoa, trigo) ou em medicamentos (aspirina, ibuprofeno). O desenvolvimento da doença, bem como o agravar da mesma, pode também ser desencadeado por fatores genéticos, fatores ambientais (exposição a poluição atmosférica e alterações de temperatura), fatores neuro-hormonais (emoções fortes, ansiedade e stress), desregulação do sistema imunitário (infecções virais), esforço físico, fumo de tabaco, entre outros (7). Todos estes fatores subjacentes à asma têm um papel determinante na fisiopatologia e na evolução da doença.

Sendo a asma uma doença extremamente heterogénea, torna-se difícil definir o tipo de asma vs fenótipo para cada indivíduo (8,9), no entanto, estabelecer esta relação é fundamental para um diagnóstico correto (10). Este é largamente baseado em características subjetivas, nomeadamente os sintomas clínicos de cada indivíduo, no entanto, são igualmente necessários critérios objetivos para avaliar as principais características da fisiopatologia da doença: a hiper-reatividade brônquica e a reversibilidade, pelo menos parcial, da obstrução do fluxo aéreo (11). Deste modo, para estabelecer o diagnóstico, o médico tem como método recomendado (10,11):

- O histórico clínico do indivíduo (sinais e sintomas que surgem de maneira repetida), sendo que as manifestações clínicas mais importantes são os sibilos, a dispneia, a tosse e a sensação de aperto torácica;
- Um exame físico focado no trato respiratório superior, tórax e pele;
- O exame de avaliação da função pulmonar, através da espirometria, que mede a quantidade e a velocidade com que o ar entra e sai dos pulmões, permitindo avaliar a presença de sinais de obstrução do fluxo aéreo;
- Os testes cutâneos de alergia por picada (*skin prick tests*), que permitem identificar uma sensibilização do tipo IgE a alérgenos específicos que possam contribuir para os sintomas de asma;
- A radiografia ao tórax para avaliação da patologia a nível pulmonar e exclusão de outras patologias com sintomas semelhantes à asma;
- Estilo de vida e stress físico do indivíduo;
- Resposta aos tratamentos ao longo do tempo;
- Estudos adicionais, se assim for necessário, para despistar diagnósticos alternativos.

1.1.2 Fisiopatologia da asma e alterações metabólicas

Apesar da sua heterogeneidade, as alterações fisiopatológicas associadas à asma caracterizam-se essencialmente por inflamação e hipersecreção da mucosa brônquica. A inflamação dos brônquios faz com que estes fiquem edemaciados e conseqüentemente mais estreitos. Assim, a passagem de ar fica comprometida uma vez que o tamanho interno dos brônquios fica diminuído (**Figura 1**).

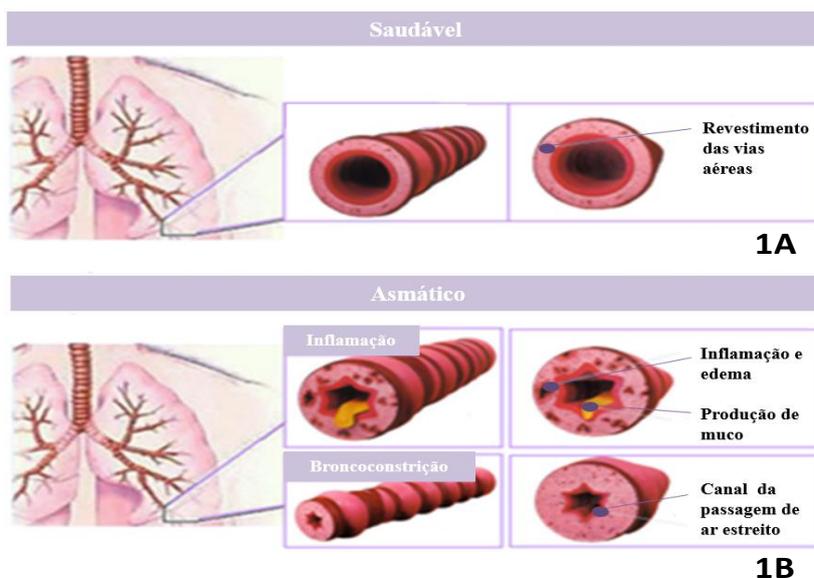


Figura 1 - Comparação entre brônquios de um indivíduo saudável e brônquios de um indivíduo asmático (12).

As vias aéreas ao nível pulmonar são constituídas pela traqueia, sendo esta sustentada por anéis cartilagosos, revestida por células caliciformes e por epitélio ciliado. Os brônquios derivam da traqueia, dividem-se em ramos de menor dimensão, que por sua vez se dividem em brônquios cada vez mais pequenos até se tornarem bronquíolos respiratórios. Estes são responsáveis pelo transporte do ar até aos alvéolos, local onde se realiza a hematose pulmonar. Os brônquios e bronquíolos de um indivíduo saudável são estruturas tubulares com paredes musculares, (**Figura 1A**), revestidos por uma membrana interna que contém células produtoras de muco, e células com três tipos de recetores de superfície, que estimulam o relaxamento e contração dos músculos subjacentes. Quando estas células recebem estímulos, os recetores β -adrenérgicos promovem o relaxamento muscular, o alargamento das vias aéreas inferiores e facilitam a entrada e saída do ar. Por sua vez, os recetores colinérgicos, estimulados pela acetilcolina, e os recetores peptidérgicos, estimulados pela neurocinina, promovem a contração dos músculos e o estreitamento das vias aéreas inferiores, dificultando assim a ventilação (13). Num paciente com asma, num estado não controlado observa-se obstrução da via aérea pulmonar (**Figura 1B**), que se deve a um conjunto de fatores, que incluem o espasmo do músculo liso da via aérea, o edema da mucosa, o aumento da secreção de muco, a infiltração celular das paredes da via aérea e a lesão do epitélio respiratório.

A inflamação na asma resulta de uma resposta inflamatória, em que participam principalmente eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos (14). A patogénese da asma associa-se assim a mecanismos moleculares e celulares da inflamação das vias aéreas. Essa inflamação é em larga medida dependente da sensibilização pela IgE (15,16) (**Figura 2**).

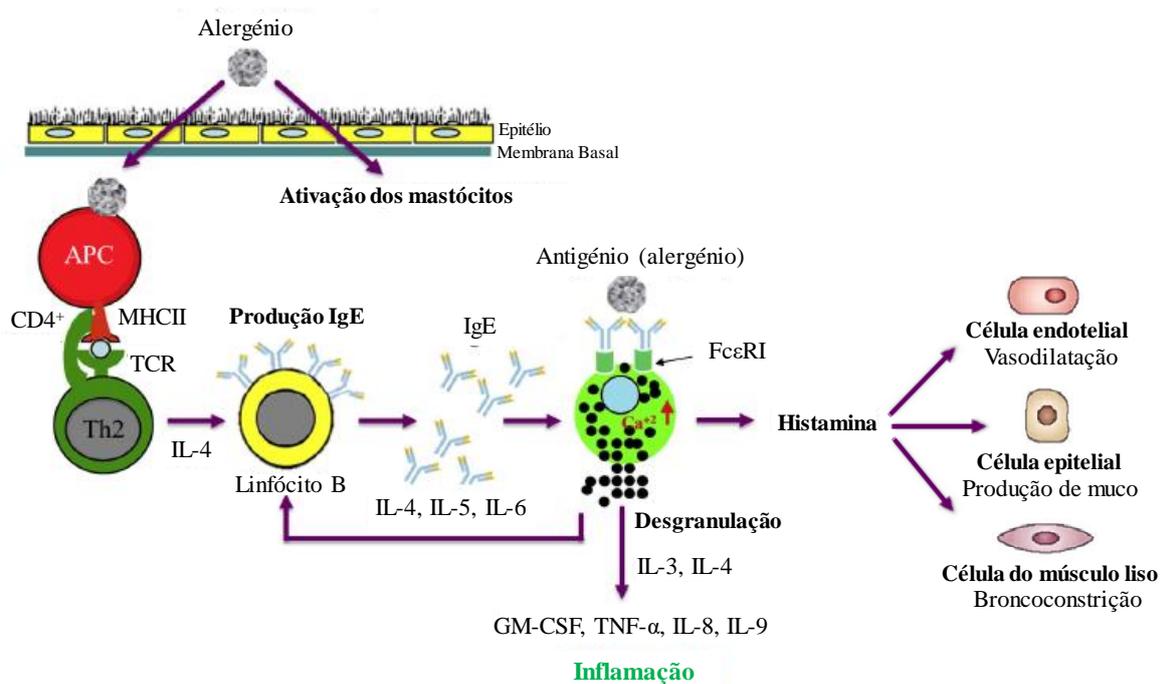


Figura 2 - Fisiopatologia da asma. Representação clássica da resposta imunológica ao antígeno. Várias células inflamatórias são ativadas nas vias aéreas pulmonares, libertando uma variedade de mediadores inflamatórios e resultando em inflamação (15,17).

A resposta inflamatória inicia-se com o contacto do alérgeno, com a mucosa respiratória ou oral (fase de sensibilização). O alérgeno é endocitado por células apresentadoras de antígeno (APC), particularmente macrófagos e células dendríticas (14). Neste primeiro contacto do alérgeno com o organismo, este é apresentado no contexto do MHC (*major histocompatibility complex*) aos linfócitos T auxiliares (LT helper - LTh), especificamente aos linfócitos Th2. Estes ficam ativados e iniciam a produção de citocinas, que por sua vez promovem a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE específica do alérgeno (16). Posteriormente, as IgE produzidas ligam-se aos recetores de alta afinidade para a IgE (FcεRI), que estão presentes na membrana celular de mastócitos e basófilos, ricos em mediadores da inflamação (14,18). Num segundo contacto do mesmo alérgeno com a submucosa, este liga-se às IgE presentes na superfície dos mastócitos e basófilos através de uma reação antígeno-anticorpo (16). Tal facto leva à desgranulação destas células e à libertação de mediadores pré-formados, destacando-se a histamina e derivados dos fosfolípidos de membrana (leucotrienos, prostaglandinas, ácido araquidónico), suscetíveis de causar contração do músculo liso brônquico e inflamação da mucosa respiratória, ou seja, provocar broncoespasmo e edema. Conjuntamente ocorre uma rápida ativação dos macrófagos presentes nas vias aéreas, bem como produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). A resposta tardia ocorre assim como consequência de uma regulação positiva de citocinas, quimiocinas e de

moléculas de adesão que motivam a ativação e o recrutamento de células inflamatórias, em particular dos linfócitos Th2, basófilos e eosinófilos e, ainda, neutrófilos e macrófagos para o local onde ocorre o contacto com o alérgeno (13,19).

Atualmente, um dos grandes desafios na compreensão da asma é o estudo do papel dos mediadores inflamatórios e mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença, isto é, a relação entre a doença e as alterações do metabolismo visíveis na análise de biofluidos. As alterações provocadas pela asma levam a que o perfil metabólico de um indivíduo asmático seja diferente do de um indivíduo saudável. A complexidade desta patologia reflete-se nas inúmeras vias bioquímicas envolvidas, como se observa na **Figura 3**. Vários compostos e as vias metabólicas associadas aos mesmos foram identificados, nomeadamente o stress oxidativo, peroxidação lipídica, acidose láctica, ciclo do ácido cítrico, ciclo da ureia, metabolismo dos aminoácidos e proteínas, metabolismo lipídico e metabolismo energético. Seguidamente será explorado o envolvimento destas vias metabólicas na asma.

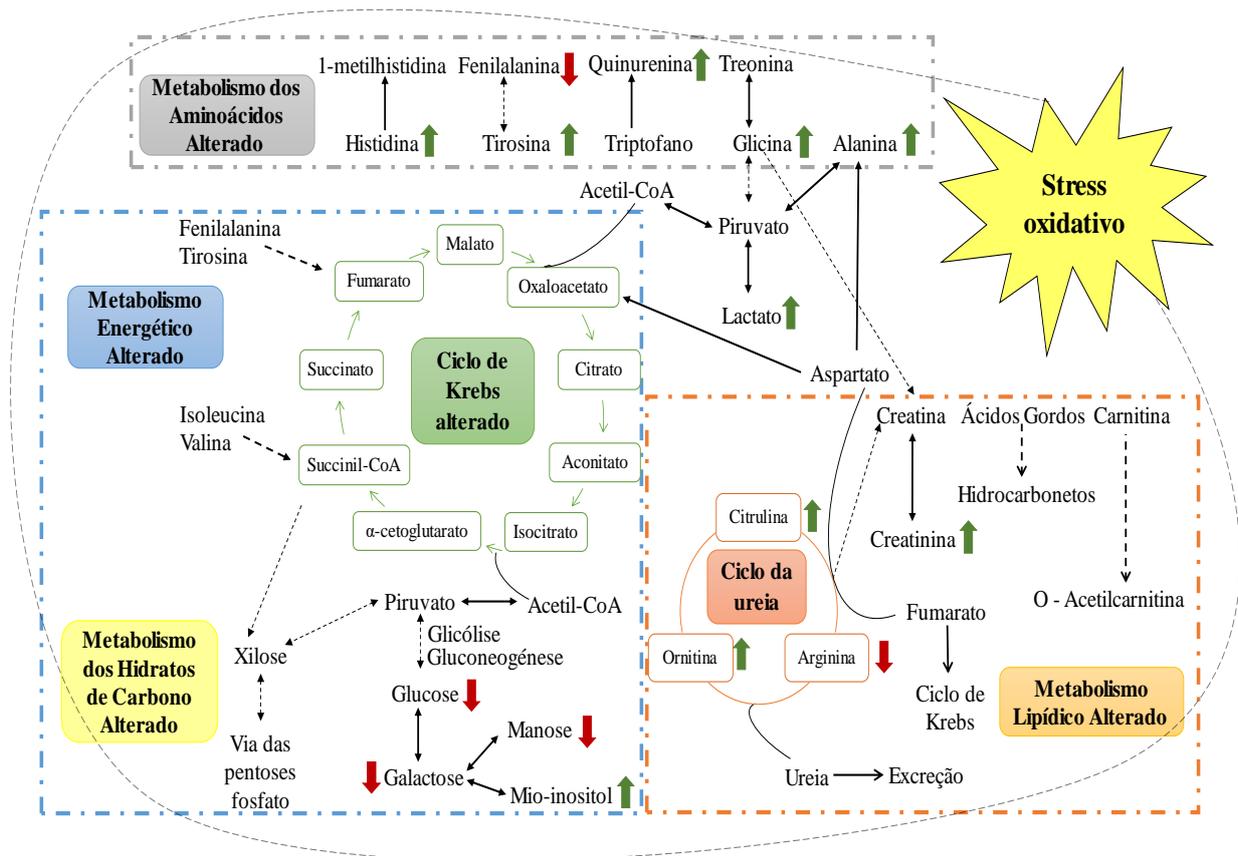


Figura 3 – Alterações metabólicas associadas à asma e o envolvimento dos metabolitos em diferentes vias metabólicas com relevância para a compreensão da patologia (Adaptada das referências (20,21)).

Como já foi referido anteriormente, existe produção de ROS durante os processos inflamatórios associados à asma, devido ao influxo de leucócitos (22) e aos períodos de hipoxia. Os sistemas biológicos estão continuamente expostos a oxidantes, sendo que estes podem ser gerados endogenamente, pelas vias metabólicas como a cadeia transportadora de elétrons - principal fonte de ROS - ou exogenamente, por inalação de poluentes (23). Assim, as ROS podem ter origem ambiental (poluição atmosférica, fumo de tabaco, entre outros) ou origem celular, através da respiração mitocondrial, do sistema NADPH-oxidase ou do sistema da xantina oxidase (**Figura 4**) (24). O stress oxidativo é uma condição biológica que surge devido a um desequilíbrio onde predomina a ação dos oxidantes (sobrepõe-se à ação dos antioxidantes endógenos) (23). De modo a contrariar este desequilíbrio, as células produzem antioxidantes (superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase).

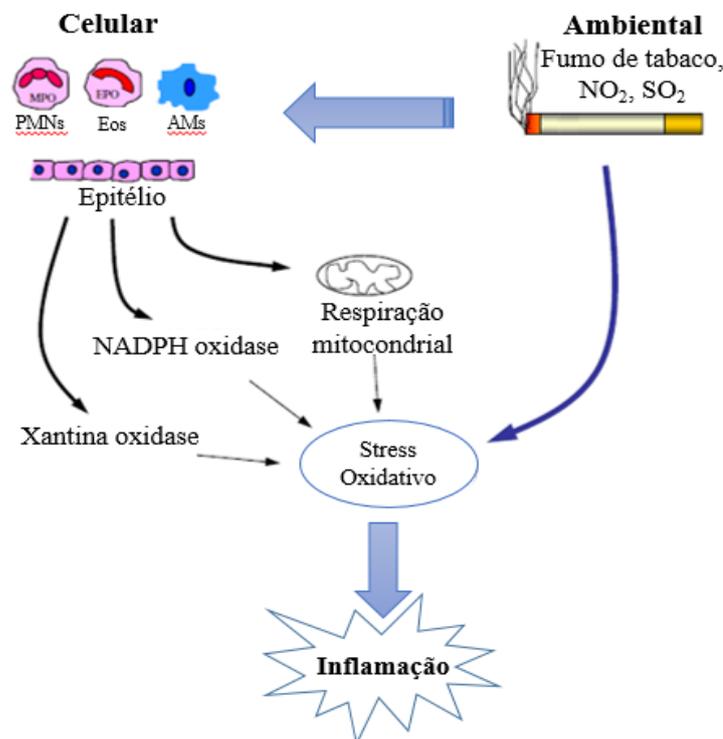


Figura 4 - Fontes de ROS, as quais podem ter origem ambiental ou celular. A produção de ROS causa stress oxidativo, resultando posteriormente em inflamação. Esta pode desencadear células inflamatórias a produzir ainda mais ROS, aumentando o nível de stress oxidativo e intensificando a resposta inflamatória (Adaptada da referência(24)). MPO – mieloperoxidase, EPO – eritropoietina, PMNs – polimorfonucleócitos, Eos – eosinófilos, AMs – macrófagos alveolares.

O stress oxidativo afeta a resposta inflamatória, uma vez que a maior produção de ROS leva à ativação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, à regulação das moléculas de adesão e ao aumento da libertação de mediadores pró-inflamatórios, os quais medeiam a resposta inflamatória. Esta maior produção de ROS afeta ainda a contração do músculo liso, estimula a

libertação de histamina por parte dos mastócitos, induz a hiper-reatividade das vias aéreas e o aumento da secreção de muco devido ao dano oxidativo das células epiteliais e dos receptores β -adrenérgicos e à diminuição da depuração mucociliar, promovendo assim a inflamação das vias aéreas (23).

A predominância da ação dos oxidantes provoca ainda a oxidação de lípidos, lesando a membrana das vias aéreas (oxidação dos ácidos gordos) através do processo de peroxidação lipídica (23). Há cada vez mais evidências de que a inflamação resulta num aumento do *stress* oxidativo nas vias aéreas (23,25), ocorrendo particularmente grande libertação de ROS pelas células inflamatórias (como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) de indivíduos asmáticos (26,27). Recentemente, foi demonstrado que o nível de *stress* oxidativo é mais elevado em indivíduos asmáticos, promovendo danos nos lípidos, alterações na estrutura do DNA, modificações nas proteínas e hidratos de carbono e produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (28).

A peroxidação lipídica é considerada uma disfunção do metabolismo dos lípidos. *Ho et al* (20), *Jung et al* (29) e *Saude et al* (30) demonstraram que este metabolismo também é afetado pela asma. Em particular, *Ho* (20) descreveu alterações no metabolismo dos lípidos, nomeadamente uma diminuição nos níveis de fosfatidilcolinas, diglicerídeos e triglicerídeos e um aumento nos níveis de colina. Os triglicerídeos são reportados pelo seu efeito citoprotector contra as lesões provocadas pelas ROS (31). Por sua vez, a colina possui efeitos protetores na asma, sendo capaz de suprimir a inflamação e o *stress* oxidativo (32). *Saude et al* (30) também verificou que os níveis urinários de carnitina são mais elevados em indivíduos asmáticos. Este metabolito desempenha um papel no processo de produção de energia, facilitando a entrada dos ácidos gordos na mitocôndria. Através do seu efeito protetor, torna as membranas das células mais resistentes aos radicais livres, desempenhando assim um papel no metabolismo oxidativo (33). As ROS também reagem com os lípidos de forma a libertar isoprostano. *Montuschi et al* (34) reportou os níveis elevados de 8-isoprostano no ar exalado condensado de indivíduos asmáticos. Este composto é uma prostaglandina formada pela peroxidação do radical livre do ácido araquidónico, sendo considerado um biomarcador da peroxidação lipídica causada pelas espécies reativas de oxigénio (34).

As alterações no metabolismo dos aminoácidos e proteínas relacionam-se com a sua contribuição para várias actividades antioxidantes e imunológicas relevantes para a patogénese da asma (35). *Jung et al* (29) e *Saude et al* (30) verificaram alterações nos níveis de vários metabolitos, os quais permitiram corroborar a hipótese anterior, nomeadamente triptofano, metionina, histidina e treonina. Mais concretamente, *Jung et al* (29) verificou que indivíduos

asmáticos apresentavam níveis mais elevados de histidina, precursora da histamina, a qual se encontra envolvida na resposta imune, contribuindo para a resposta inflamatória e constrição do músculo liso e verificou ainda elevados níveis de metionina, a qual está envolvida na biossíntese de cisteína, glutatona e fosfatidilcolina e no processo de metilação do DNA (36).

Ho et al (20) observou em indivíduos asmáticos um aumento significativo na concentração de metabolitos como o malato e o lactato, os quais estão relacionados com o metabolismo energético. Lactato e malato são produzidos especialmente sob condições de elevada inflamação ou hipoxia, onde a mitocôndria se encontra incapaz de produzir ATP a uma taxa suficiente para fornecer à célula (37). Além disso, as situações de hipoxia provocam a metabolização anaeróbica da glucose, sendo o excesso de piruvato produzido convertido em lactato, o que resulta em acidose láctica (acumulação de ácido láctico e baixo pH nos tecidos) (38). A acidose láctica é mais frequente em adultos com asma grave (39) mas também ocorre na população pediátrica (40). *Saude et al (30)* verificou ainda níveis elevados de creatina em indivíduos asmáticos. Este composto participa no fornecimento de energia aos músculos, nomeadamente, aos músculos das vias aéreas, e a alteração da sua concentração com a patologia deve-se ao aumento da necessidade respiratória.

1.2 O papel da metabolómica no estudo da asma

1.2.1 Conceito

A metabolómica consiste no estudo do conjunto de metabolitos (metaboloma) presentes numa dada matriz biológica (biofluido ou tecido), com vista a detetar alterações nos níveis desses metabolitos em função de um dado estímulo ou perturbação, como uma doença ou um tratamento (41). Os metabolitos são pequenas moléculas não peptídicas, com massas moleculares inferiores a 1 kDa e são os produtos finais da actividade metabólica celular (42). O metaboloma reflete a interação complexa entre fatores genéticos e múltiplos fatores ambientais (tais como dieta, exercício físico, medicação), permitindo observar as alterações qualitativas e quantitativas provocadas por estes estímulos genéticos e/ou ambientais (41). A metabolómica é complementar à proteómica e à transcriptómica, no entanto, é provavelmente o nível de organização biológica que mais diretamente traduz o estado fisiológico global do organismo, uma vez que reflete mais de perto as atividades das células a nível funcional (41). Assim, quando o estado fisiológico do organismo é alterado por uma doença, um tratamento ou outra perturbação externa ou interna, o metaboloma também se altera e a medição dessas alterações poderá fornecer informação sobre vias metabólicas alteradas e possíveis

biomarcadores da condição em estudo. A metabolômica permite o estudo do metaboloma como um todo, bem como uma análise direcionada ao estudo de compostos alvo, ou seja, o estudo das alterações de um determinado conjunto de metabolitos específicos com base numa condição/patologia. Do ponto de vista clínico, a metabolômica apresenta várias aplicações, nomeadamente o diagnóstico precoce, acompanhamento do estado da doença, monitorização do efeito de terapias, caracterização de fenótipos da doença (conjunto de características físicas, morfológicas e fisiológicas que possam ser observadas por um doente) (9) e ainda a identificação de características individuais metabolômicas capazes de prever, por exemplo, a eficácia de uma dada terapia e/ou a sua toxicidade, o que implica a possibilidade concreta de uma abordagem personalizada no tratamento (10).

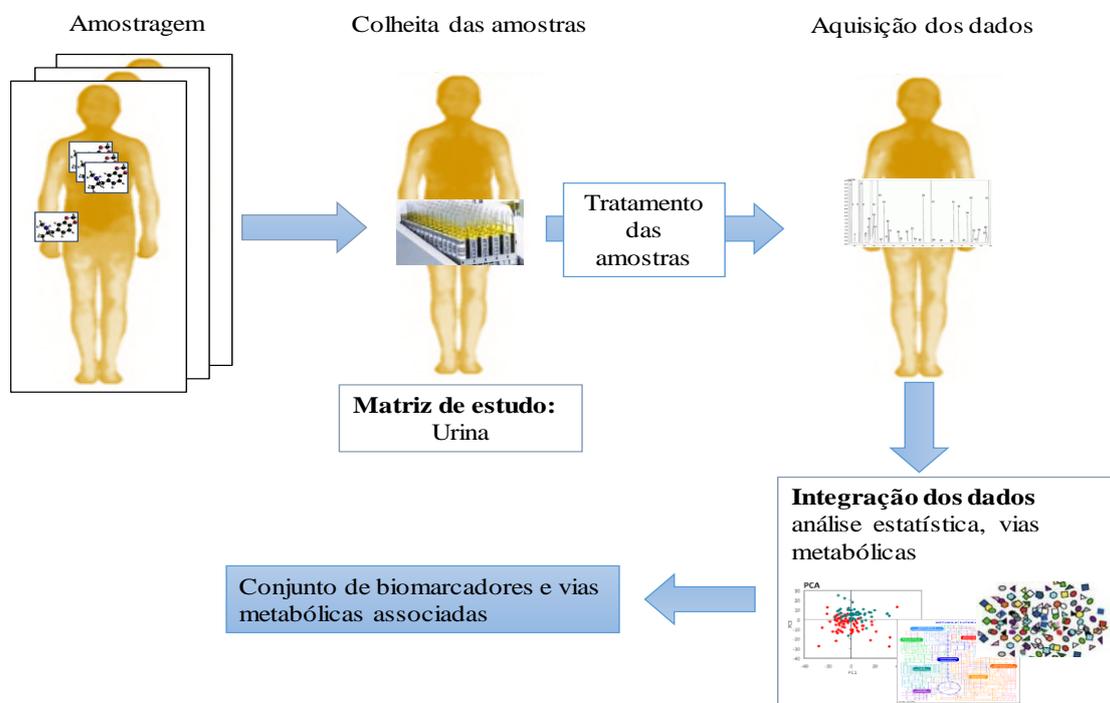


Figura 5 - Fluxograma da análise metabolômica (Adaptada da referência (41)).

A **Figura 5** apresenta os vários passos envolvidos numa análise metabolômica, os quais incluem a seleção da matriz biológica a ser estudada, a preparação da amostra e a subsequente aquisição dos dados utilizando as técnicas analíticas necessárias. Os resultados obtidos são tratados (processados e normalizados) de modo a se obter uma matriz de dados para a análise estatística. Posteriormente, os compostos são identificados e a sua relevância biológica é interpretada de acordo com as vias metabólicas associadas.

A avaliação de todo, ou até de um subconjunto, do metaboloma baseia-se no uso de tecnologias reprodutíveis e robustas com elevada sensibilidade e resolução (43). As principais

técnicas analíticas utilizadas em metabolômica são a espectrometria de massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN), pois ambas são capazes de fornecer informação qualitativa e/ou quantitativa sobre várias dezenas ou mesmo centenas de metabolitos de forma rápida. Da aplicação de qualquer uma destas técnicas analíticas a amostras biológicas resultam, geralmente, perfis complexos. A comparação destes perfis entre diferentes amostras ou grupos de amostras requer a utilização da análise estatística multivariada. No entanto, o pré-tratamento dos dados obtidos é um passo essencial antes da aplicação de métodos estatísticos multivariados, uma vez que existem variações inerentes às matrizes biológicas, nomeadamente as diferentes diluições de amostra que provocam inevitáveis variações de concentração de metabolitos. Assim, surge a necessidade de recorrer a parâmetros de normalização que corrijam estas variações e permitam a comparação robusta dos dados, atribuindo a mesma importância a todas as variáveis. Este procedimento consiste em dividir cada linha da matriz pelo valor do fator escolhido para normalizar.

1.2.2 Alterações em perfis metabolômicos da fração não volátil da urina

A análise metabolômica que se pretende realizar no âmbito desta tese envolve a comparação de dezenas de amostras, de modo a poder detetar um padrão de metabolitos que discrimine grupos de indivíduos saudáveis e indivíduos com determinada patologia, neste caso a asma. Esta abordagem tem vindo a ser explorada no contexto do estudo da asma, nomeadamente o estudo dos compostos não voláteis como potenciais marcadores do stress oxidativo e da inflamação do trato respiratório (44). A **Tabela 1** apresenta alguns dos metabolitos não voláteis de particular interesse no estudo da asma.

Tabela 1 - Metabolitos não voláteis com concentrações alteradas em indivíduos asmáticos.

Metabolito	Via metabólica associada	Sentido de variação ^a	Referência
Arginina	Catabolismo da arginina	↓	(42,45)
Ornitina	Catabolismo da arginina	↑	(42,45)
Citrulina	Catabolismo da arginina	↑	(45)
Alanina	Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato/ Gluconeogénese	↑	(30,42)
Glicina	Metabolismo da glicina, serina e treonina/ Metabolismo da glutathione	↑	(35,42)
Valina	Biossíntese da valina, leucina e isoleucina	---	(42)
Leucina	Biossíntese da valina, leucina e isoleucina	---	(42)
Isoleucina	Biossíntese da valina, leucina e isoleucina	---	(42)
Cisteína	Metabolismo da glutathione	↓	(46)
Prolina	Biossíntese da prolina	---	(42)
Serina	Metabolismo da glicina, serina e treonina	---	(42)
Treonina	Metabolismo da glicina, serina e treonina	---	(42)

Metabolito	Via metabólica associada	Sentido de variação ^a	Referência
Fenilalanina	Biossíntese da fenilalanina e triptofano	↓	(30,42)
Triptofano	Catabolismo do triptofano	↑	(30,42)
Lisina	Biossíntese da lisina	---	(42)
Asparagina	Metabolismo do aspartato	---	(42)
Tirosina	Biossíntese da tirosina, fenilalanina e triptofano	↑	(30,42)
Glutamina	Metabolismo do glutamato	---	(42)
Aspartato	Biossíntese da arginina/ Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	---	(42)
Glutamato	Biossíntese da arginina/ Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	---	(42)
Histidina	Metabolismo da histamina	↑	(30,42)
Ácido palmítico	Biossíntese dos ácidos gordos	↑	(47)
Ácido esteárico	Biossíntese dos ácidos gordos	↑	(47)
Ácido linoleico	Biossíntese dos ácidos gordos	↓	(48)
Ácido linolénico	Biossíntese dos ácidos gordos	↑	(48)
Ácido araquidónico	Biossíntese dos eicosanóides	↑	(48–50)
Ácido docosahexaenóico	Biossíntese dos ácidos gordos	↓	
Glucose	Glicólise/ via das pentoses fosfato	↓	(20,42,51)
Galactose	Metabolismo da galactose	↓	(20)
Manose	Metabolismo da galactose/ Metabolismo da frutose e manose	↓	(20)
Arabinose	Metabolismo da arabinose	↓	(20)
Xilose	Interconversão de pentoses	---	(42)
Lactato	Acidose metabólica	↑	(20,30,42)
Malato	Ciclo do ácido cítrico	↑	(20)
Creatinina	Metabolismo da creatina	↑	(20)
Mio-inositol	Metabolismo da galactose	↑	(30,42)

^a em relação a indivíduos saudáveis

Os metabolitos reportados na **Tabela 1** estão envolvidos em três processos metabólicos principais: metabolismo dos aminoácidos, dos lípidos e o metabolismo energético. A hipótese de que os aminoácidos podem modular o risco de asma com base nas suas propriedades biológicas tem sido testada (35). Por exemplo, a arginina, precursora na síntese de óxido nítrico (NO) e um intermediário chave no ciclo da ureia, está ligada à respiração celular, metabolismo e inflamação (45). É um aminoácido semi essencial usado na síntese proteica, mas também um substrato importante para enzimas como a NO sintase (NOS) e arginase (52,53). Estas enzimas intracelulares são induzidas espontaneamente em várias condições de inflamação, mas a atividade das mesmas é regulada pela disponibilidade de arginina. As arginases convertem arginina em ornitina e ureia, enquanto que NOS converte arginina em citrulina, numa reação que simultaneamente produz NO. Estudos prévios revelaram alterações nas vias metabólicas da *L*-arginina e do óxido nítrico que têm um papel na patofisiologia da asma (52,54–56). Assim, indivíduos com asma apresentam maior atividade da arginase e níveis mais baixos de arginina quando comparados com indivíduos controlo (56), o que relaciona a asma com o aumento do catabolismo da arginina. De particular interesse são também os aminoácidos cisteína,

metionina, glicina e ácido glutâmico, os quais contribuem conjuntamente para o metabolismo da glutathione (57), molécula esta que regula o estado oxidativo intracelular estando a emergir como um importante antioxidante com influência na suscetibilidade à asma (58). Por sua vez, alterações no catabolismo do triptofano são verificadas através do seu intermediário – quinurenina. A elevada excreção urinária deste composto foi demonstrada em crianças com asma comparativamente a crianças saudáveis (59).

O metabolismo lipídico relaciona-se em grande parte com a resposta inflamatória. O ácido araquidónico, presente nos fosfolípidos das membranas celulares do organismo, é precursor na produção de eicosanóides e é considerado um dos mais importantes intermediários na resposta inflamatória, podendo agir como um vasodilatador (44). Os ácidos gordos, nomeadamente o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), são necessários ao ser humano, não só como componentes estruturais das membranas celulares, mas também como precursores de mediadores bioquímicos de respostas inflamatórias e imunológicas, os eicosanóides, como as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos. Além disso, têm ainda um papel importante na diminuição da produção de proteínas inflamatórias, como as citocinas e as quimiocinas. Um estudo recente, verificou uma associação positiva entre os níveis séricos de ácido araquidónico e a asma (48). Também no local de inflamação crónica das vias aéreas, estão reportados níveis de ácido araquidónico mais elevados em indivíduos asmáticos (50).

O metabolismo energético é maioritariamente associado aos açúcares. A glucose resulta de compostos não-carboidratos, como o piruvato e o lactato, e a sua concentração urinária em indivíduos asmáticos está reportada como sendo menor em relação a indivíduos saudáveis (51). Num estudo de *Ho et al* (20), açúcares como a manose, galactose e arabinose revelaram concentrações mais baixas em indivíduos asmáticos. Os autores sugerem a hipótese de que estes compostos podem ser usados para a produção de lactato e malato de forma a fornecer energia extra. Ainda relativamente ao metabolismo energético, surge o aumento dos níveis de creatinina nos indivíduos asmáticos, os quais advêm da grande necessidade de energia das vias aéreas inflamadas, promovendo o metabolismo energético através do ciclo da ureia (20).

1.2.3 A urina como matriz de estudo

Têm sido utilizados vários biofluidos no estudo da asma, sendo a urina de particular interesse devido à sua recolha de forma não invasiva. A urina é um fluido biológico de cor amarelada com uma abundante composição em metabolitos. É secretada pelos rins e excretada

pela uretra, sendo constituída principalmente por 95% de água, elevadas quantidades de ureia (metabolismo dos aminoácidos - produto final da excreção do azoto), sais inorgânicos (cloreto, sódio e potássio), creatinina (produto do metabolismo muscular), ácidos orgânicos, toxinas solúveis em água e produtos pigmentados resultantes da degradação da hemoglobina (urobilina – responsável pela cor característica da urina) (60). A urina é considerada um biofluido por excelência para estudos na área da metabolómica. A sua análise tornou-se numa nova abordagem com potencial para fornecer informações sobre várias doenças (incluindo as respiratórias) que podem conduzir a um conhecimento mais detalhado das vias metabólicas envolvidas, através do estudo da fração volátil e não volátil (30,61), abrindo novas perspetivas no diagnóstico, prognóstico e controlo da doença. Na **Tabela 2** estão sumariadas as vantagens e desvantagens da utilização da urina como matriz de estudo (41,60), com aplicabilidade na pesquisa de biomarcadores com relevância clínica na asma.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da utilização da urina como matriz de estudo, em relação a matrizes como o ar exalado condensado ou o plasma (41,60).

Biofluido	Vantagens	Desvantagens
Urina	<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de recolha das amostras (não invasiva e em grandes quantidades - mL); - Existência de protocolos <i>standard</i> de recolha e análise de urina; - Maior margem de manobra em termos laboratoriais, nomeadamente possibilidade de congelação; - Um dos fluidos do corpo humano mais informativos devido à sua riqueza em metabolitos, uma vez que é a principal via de excreção; - Reflete alterações localizadas e sistémicas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Existência, durante o dia, de variações relacionadas com a dieta, exercício físico, uso de medicamentos e concentração da urina; - Possibilidade de distância do tecido de interesse; - Dificuldade na determinação da origem das alterações metabólicas, uma vez que podem ser reflexo de alterações sistémicas; - Excreção dos metabolitos pode ser alterada por doenças renais ou hepáticas.

Bouatra et al (62) compilou toda a informação sobre os estudos já realizados para a identificação de biomarcadores da asma utilizando como matriz de estudo a urina, demonstrando que a asma afeta o corpo como um todo e que alterações no metabolismo podem ser refletidas na urina. Na **Tabela 3** apresentam-se alguns estudos relativos a alterações metabólicas associadas à asma, tendo a urina como matriz de estudo. Foram utilizadas várias técnicas de análise que permitiram estudar diferentes metabolitos.

Tabela 3 - Alterações metabólicas associadas à asma usando a urina como matriz de estudo (8,30,51,63).

Técnica utilizada	Via metabólica alterada	Metabolitos envolvidos	Referência
¹ H-RMN	Ciclo de Krebs, metabolismo dos lípidos, aminoácidos e oxidativo	Adenosina Alanina Carnitina Cis-aconitato Fumarato Histidina Quinurenina Succinato Treonina Triptofano 3-Metiladipato 2-Oxaloglutarato 3-Hidroxi butirato 2-Hidroxiisobutirato	(30)
¹ H-RMN	Metabolismo dos lípidos, aminoácidos e oxidativo	Carnitina Creatina Glucose Mio-inositol Tirosina Fenilacetilglutamina 3-Metiladipato 3-Hidroxi butirato 2-Hidroxiisobutirato	(51)
UPLC - qTOFMS	Metabolismo da histamina	Ácido urocânico Ácido metil-imidazol acético	(8)
GC×GC - TOFMS e ¹ H-RMN	Ciclo de Krebs, metabolismo oxidativo e peroxidação lipídica	Acetilcarnitina Alanina Alcanos e aldeídos Carnitina Citrate Hipurato	(63)

¹H-RMN – Ressonância magnética nuclear de próton

UPLC – qTOFMS –Cromatografia líquida de alta eficiência -espectrometria de massa com tempo de voo

GC×GC - TOFMS - Cromatografia de gás bidimensional abrangente- espectrometria de massa com tempo de voo

Os estudos reportados na **Tabela 3** demonstraram que metabolitos envolvidos em várias vias metabólicas podem ser usados para discriminar indivíduos asmáticos de indivíduos saudáveis, bem como indivíduos asmáticos em diferentes fases (estável ou exacerbação). O recurso a múltiplas técnicas analíticas, nomeadamente RMN, cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), permitiu identificar vários metabolitos, os quais estão associados maioritariamente a alterações já mencionadas anteriormente, quer ao nível do stress oxidativo e peroxidação lipídica (30,51,63), como do ciclo do ácido cítrico (30) e do metabolismo da histamina (8). Um dos estudos realizados por Saude et al (30), que envolveu uma população pediátrica de asmáticos, obteve taxas de classificação elevadas (>

90%) na discriminação entre essa população e um grupo controle de indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos permitiram identificar algumas vias metabólicas afetadas pela asma, nomeadamente o ciclo do ácido cítrico, o metabolismo dos lípidos e dos aminoácidos. Um outro estudo aplicado também à urina de crianças asmáticas e saudáveis conseguiu, por LC-MS, discriminar ambos os grupos e identificar uma redução nos níveis de ácido urocânico e ácido metil-imidazol acético, os quais estão correlacionados com doenças inflamatórias através do metabolismo da histamina (8). Com o objetivo de avaliar as alterações metabólicas urinárias associadas a exacerbações da asma, foi efetuado um estudo em 10 adultos asmáticos em diferentes fases da doença (estáveis ou em exacerbação). Com recurso ao GC×GC - TOFMS e ¹H-RMN foi possível verificar que durante exacerbações os níveis de aldeídos e alcanos estavam mais elevados, assim como vários metabolitos não voláteis, nomeadamente alanina, treonina, lactato, carnitina e acetil-carnitina (63).

Como referido anteriormente, uma das desvantagens da utilização da urina como matriz de estudo é o elevado número de fatores que podem influenciar consideravelmente o metaboloma urinário, nomeadamente a existência de variações na excreção ao longo do dia relacionadas com a dieta, a idade e o exercício físico, provocando variações no efeito de diluição da urina e conseqüentemente na concentração urinária dos metabolitos (64). De forma a tentar minimizar esta variação é comum recorrer a parâmetros de normalização que não variem entre os grupos em estudo, de modo a permitir a comparação entre si. Os parâmetros mais comuns e já reportados na literatura são a utilização da concentração da ureia (65), da creatinina (30,64,66,67) e o valor de condutividade (68). No entanto, o recurso a estes parâmetros não é consensual, particularmente no caso da creatinina.

A creatinina é um metabolito encontrado comumente e em grande quantidade na urina, sendo facilmente mensurável (66), pelo que a normalização de concentrações de outros metabolitos excretados usando a concentração urinária de creatinina é passível de executar. No entanto, a eliminação deste subproduto do metabolismo muscular é influenciada por fatores endógenos (variação na excreção diária, idade, género, massa muscular e possíveis doenças) e exógenos (dieta, prática de exercício físico, uso de medicação, tabaco e drogas) (69). Grande parte da variação diária da excreção de creatinina, a qual já se verificou ser estatisticamente diferente entre o dia e a noite ($p < 0,001$) (70), deve-se a alterações na taxa de filtração glomerular, as quais podem advir de uma maior ingestão de proteína e sal e do balanço hídrico (71,72). Tal como *Waikar et al* (64) refere, essas alterações associadas à taxa de filtração glomerular conduzem a uma variabilidade na taxa de excreção de creatinina, influenciando as concentrações urinárias dos restantes metabolitos excretados. A excreção de creatinina diminui

com a idade (73), provavelmente devido à diminuição significativa da taxa de filtração glomerular e à diminuição da musculatura (74), o que permite esperar que um indivíduo mais velho, quando comparado a um jovem, apresente uma menor excreção urinária de creatinina (69). Esta também varia consoante o género, sendo mais elevada em homens (400-3000 µg/mL) do que em mulheres (370-2500 µg/mL) (73). Uma vez que a eliminação de creatinina está relacionada com a massa muscular, uma possível explicação é o facto de as mulheres apresentarem menor massa muscular e esta diminuir ao longo da idade (73). Ainda referente à influência dos fatores endógenos, deve-se ter presente que a excreção de creatinina também é afetada pela existência de doenças, principalmente quando associadas à função renal e à filtração glomerular (66). Os estudos reportados na literatura em que se utilizou a concentração de creatinina como parâmetro de normalização, foram aplicados a amostras de indivíduos com diferentes patologias: asma (30), fibrose cística (67) e fosfolipidose (66). Também aqui se verifica alguma disparidade nos estudos reportados, uma vez que este método de normalização pela concentração de creatinina já foi várias vezes aplicado a amostras de urina de indivíduos com fibrose cística e nem sempre se revelou um bom parâmetro de normalização, precisamente devido à possibilidade de ser influenciada por algum comprometimento renal, o que leva muitas vezes à visualização de diferenças significativas na concentração de creatinina dos diferentes grupos em estudo. Em 2010, Wagner et al (67) utilizou esta abordagem para uma população de indivíduos hospitalizados com fibrose cística e chegaram à conclusão que, embora seja bastante comum recorrer a este tipo de normalização (75,76), é necessário avaliar a necessidade de fatores de correção para determinadas características como a função renal ou as diferenças de idade e género entre indivíduos (67). Relativamente aos fatores exógenos, sabe-se que a influência da dieta na eliminação de creatinina passa maioritariamente pela ingestão de carnes vermelhas, sendo que indivíduos com uma maior ingestão deste tipo de carnes apresentam uma concentração urinária de creatinina mais elevada (74). Já a influência do exercício físico está relacionada com o facto de que este, a longo prazo, leva a um aumento da massa muscular, o que irá resultar num aumento da excreção diária de creatinina.

Relativamente à ureia e à condutividade, estes são parâmetros que não estão tão bem estudados comparativamente à creatinina, no entanto sabe-se que são também influenciados por várias doenças metabólicas, nomeadamente a doença renal, e pela dieta.

1.3 Estabelecimento de perfis metabolómicos da fração não volátil da urina por GC-MS

Sabe-se que atualmente existem metodologias de elevado rendimento para a maior parte dos domínios “ómicos”: genómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica. Hoje em dia,

é possível medir rapidamente centenas de metabolitos simultaneamente, a partir de quantidades mínimas de amostra. Considerando o grande número de metabolitos presentes numa amostra e a sua diversidade química, não existe uma técnica analítica única que possa atingir uma cobertura completa de todo o metaboloma. No entanto, as técnicas mais utilizadas são LC-MS, GC-MS e RMN. Em especial, as técnicas acopladas à espectrometria de massa têm vindo a ganhar interesse pela maior sensibilidade e seletividade e menor tempo de análise que tais técnicas podem oferecer, além do menor custo quando comparado a um equipamento de RMN de alta resolução.

Tal como referido anteriormente (**Tabela 3**), tem-se recorrido a diferentes abordagens metodológicas para o estudo da urina. No entanto, no estudo da fração não volátil da urina por GC, os compostos apresentam uma limitação que se prende com a sua baixa volatilidade associada aos grupos funcionais que fornecem interações polares (77). Assim, a análise cromatográfica pode resultar na obtenção de picos distorcidos ou até na acumulação dos compostos na coluna (77). De modo a ultrapassar esta limitação, recorre-se à modificação química dos grupos funcionais de modo a produzir derivados suficientemente voláteis (78), ou seja, os compostos passam por um processo denominado de derivatização (79,80).

A derivatização química tem então como objetivo reduzir a polaridade dos grupos funcionais (81), isto é, tornar os metabolitos mais voláteis, menos reativos e assim melhorar a sua estabilidade térmica e o seu comportamento cromatográfico (82–84) através de uma melhor separação e resolução dos picos (85), obtendo-se metabolitos para os quais a sensibilidade e seletividade do detetor é maior. Existem vários métodos de derivatização descritos na literatura, nomeadamente a sililação, acilação e alquilação (82,86–93), sendo que o mais utilizado em análises metabolómicas por GC-MS é a sililação (79,82,88–90,94–98). Os reagentes mais comumente utilizados nas reações de sililação são N-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), os quais reduzem a polaridade dos compostos através da substituição dos grupos polares (OH, SH, NH, COOH) por grupos não polares trimetilsilano (TMS) (84), produzindo derivados com as propriedades adequadas à análise por GC (**Figura 6**). Para classes específicas de compostos (ex: cetoácidos) é necessário adicionar previamente metoxamina (MOX), de forma a converter o grupo carbonilo num derivado inerte (90). A necessidade desta conversão deve-se ao facto de por vezes a presença do grupo carbonilo num composto causar a sua instabilidade, provocando o aparecimento de picos assimétricos (85). A piridina também é frequentemente adicionada ao meio reacional, no entanto o seu pico cromatográfico pode sobrepor-se ao de alguns derivados mais pequenos (85). Existem ainda reagentes, utilizados como catalisadores, que aumentam a reatividade dos

reagentes de sililação, como é o caso do trimetilclorosilano (TMCS). A sililação é particularmente eficiente para a análise de açúcares, fenóis, ácidos carboxílicos simples (mono e dicarboxílicos) e ácidos gordos (89).

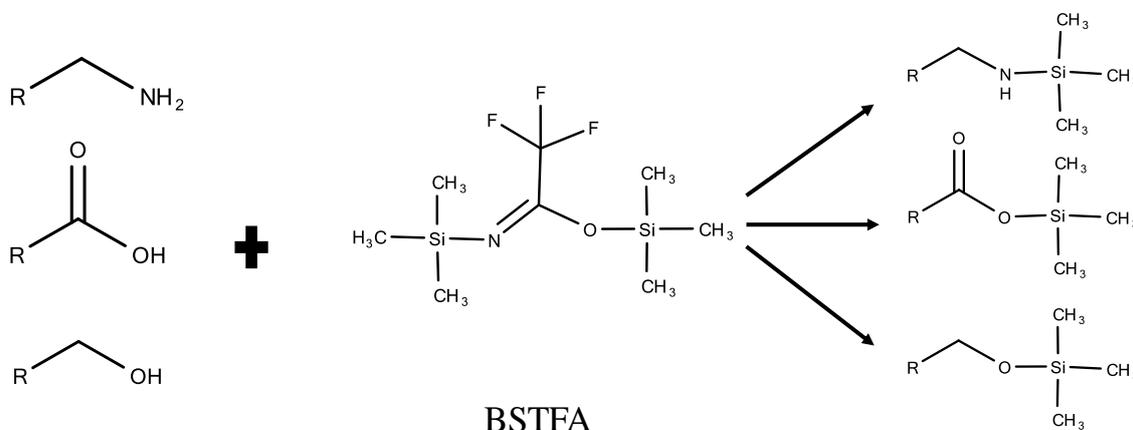


Figura 6 – Processo de derivatização por sililação, usando derivados trimetilsilil, mais concretamente o BSTFA. A formação dos derivados voláteis envolve a substituição dos grupos polares dos metabolitos por grupos trimetilsilano (TMS) (Adaptada da referência (89)).

Na preparação das amostras para obtenção dos derivados voláteis deve ter-se em atenção um conjunto de fatores que podem influenciar os resultados, nomeadamente a pureza dos solventes e reagentes (qualquer impureza irá provocar picos interferentes no cromatograma, o que dificultará a análise), a estabilidade dos derivados formados (possível decomposição devido ao calor, humidade, luz) e as condições da reação (temperatura, tempo, volume de reagente) (85). As reações de sililação devem ser realizadas sob condições anidras, de modo a garantir a completa substituição dos grupos polares e de forma a evitar eventuais produtos de degradação (83). Devem ainda ser realizadas sob controlo da temperatura bem como do tempo de reação, pois a diminuição de qualquer um destes parâmetros pode reduzir significativamente a concentração dos produtos formados, além de aumentar a possibilidade de formação de interferentes. É de salientar que nem todos os derivados formados são estáveis, uma vez que já se verificou a possibilidade do processo de sililação causar reações de conversão, como por exemplo, a conversão da arginina em ornitina através da reação com BSTFA ou MSTFA (82,99). A **Tabela 4** apresenta vários estudos já efetuados para a análise da fração não volátil da urina, recorrendo aos métodos de derivatização acima mencionados. Verifica-se que a sililação permite a modificação de compostos pertencentes a um maior número de famílias químicas, sendo o método que permite uma deteção mais abrangente de metabolitos presentes nas amostras.

Tabela 4 – Sistematização das metodologias usadas no estudo da fração não volátil da urina: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos, açúcares e purinas.

Preparação da amostra	Derivatização	Famílias detetadas	Análise Instrumental	Referência
Adição de urease Extração com metanol	MOX em piridina MSTFA + 1% TMCS	Ácidos Orgânicos Açúcares	GC-MS	(79)
Extração com metanol	BSTFA + 1% TMCS	Ácidos Orgânicos Açúcares Aminoácidos Ácidos Gordos Purinas	GC-MS	(97)
Adição de urease Extração com metanol	MOX em piridina BSTFA ou MSTFA	Aminoácidos Ácidos Orgânicos Ácidos Gordos	GC-MS	(98)
Extração com clorofórmio	Álcool-piridina Cloroformato de etilo	Aminoácidos	GC-MS	(91)
Extração com clorofórmio	Álcool-piridina Cloroformato de etilo	Aminoácidos Ácidos Gordos	GC-TOFMS	(92)
Extração com clorofórmio	Cloroformato de metilo	Ácidos Orgânicos Aminoácidos	GC-MS	(93)

MOX – Metoxamina

TMCS – Trimetilclorosilano

MSTFA – N-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida

BSTFA - N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

A técnica de cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massa com quadrupolo (GC-qMS) é a combinação de duas ferramentas analíticas: a cromatografia em fase gasosa (GC) usada como técnica separativa dos componentes de misturas complexas, e a espectrometria de massa (MS) que permite a identificação e quantificação destes componentes. É uma técnica aplicável à análise de compostos voláteis, termicamente estáveis, e a compostos não voláteis que possam ser transformados em compostos voláteis através de reações de derivatização, como explicado anteriormente. Deste modo, a separação por GC é determinada por dois fatores: a volatilidade dos compostos e as interações dos mesmos com a fase estacionária (85). O sistema de GC-qMS (**Figura 7**) é constituído por um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa. O cromatógrafo de gás é constituído por um injetor, uma coluna revestida por uma fase estacionária específica e um detetor (78). A fase móvel é um gás de arraste (hélio, azoto ou hidrogénio), que não interage com a amostra e provoca o arrastamento dos compostos ao longo da coluna e a diferentes temperaturas, ocorrendo assim o processo cromatográfico. Os compostos mais voláteis ou com menor afinidade com a fase estacionária são eluídos em primeiro lugar. No espectrómetro de massa do tipo quadrupolo (qMS), ocorre a ionização das moléculas, processo este que se dá sob vácuo e permite a produção de iões com diferentes razões massa/carga, ou seja, diferentes fragmentos moleculares. Para a formação destes iões a partir da molécula original é necessário o fornecimento de energia (78). Existem vários processos de ionização usados rotineiramente em GC-MS, sendo que no caso do equipamento

utilizado nesta tese, este opera em modo impacto eletrônico. Posteriormente, os fragmentos formados são separados por diferentes campos elétricos do quadrupolo em direção ao detetor (78). Esta separação é levada a cabo através da passagem do feixe de iões emergente da câmara de ionização pelo centro de um conjunto de quatro barras metálicas paralelas (78). Obtêm-se assim espectros de massa específicos para cada composto, os quais são representados pela abundância relativa em função da razão massa/carga (m/z).

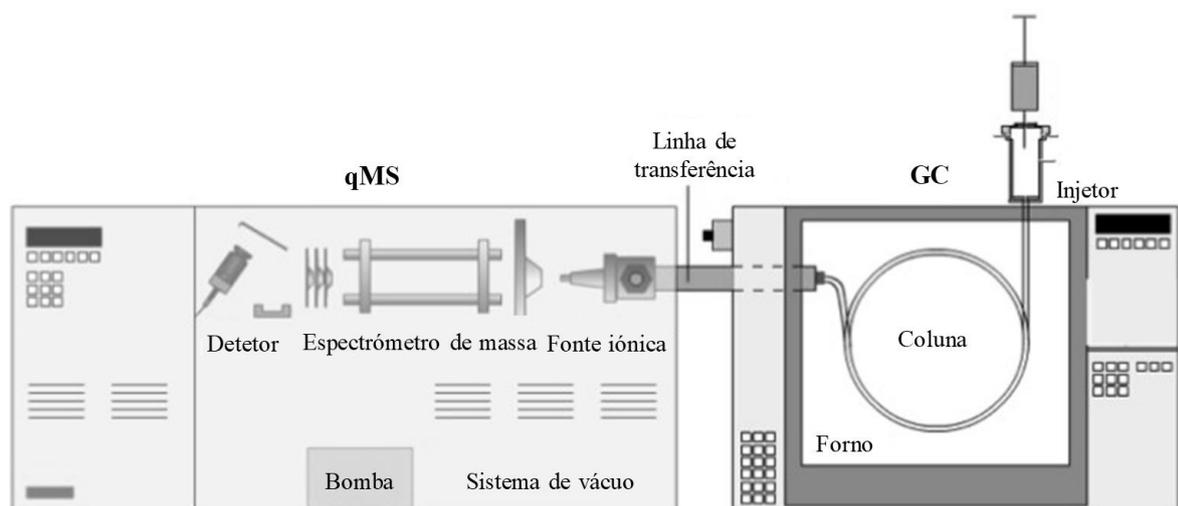


Figura 7 - Cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa e os seus principais componentes.

Esta técnica tem sido amplamente utilizada em análises de urina (79,80,86,99) e, apesar da desvantagem associada à incapacidade de detetar metabolitos que não sejam voláteis, requerendo preparações de amostra (derivatização/hidrólise), possuiu vantagens relativamente a outros equipamentos ao nível do aumento de sensibilidade, elevada eficiência na separação de misturas complexas, instrumentação amplamente disponível a um custo relativamente baixo (comparado com outros equipamentos) e elevada reprodutibilidade (83,89).

1.4 Enquadramento do estudo e objetivos

De acordo com a GINA (Global Initiative for Asthma) (100), existem mais de 300 milhões de indivíduos com asma a nível mundial (101), em especial na América do Norte, América do Sul, Austrália e alguns países da Europa, nomeadamente Escócia e Inglaterra, sendo esta a doença crónica mais comum entre as crianças (100). Em Portugal, estima-se que cerca de 6,8% da população seja asmática (102).

Atualmente, a asma é considerada um problema de saúde pública, com grande impacto na qualidade de vida dos doentes e das suas famílias e com elevados custos financeiros associados. Nas últimas décadas, têm-se observado inúmeros progressos no conhecimento desta patologia,

no desenvolvimento de fármacos cada vez mais específicos e seguros e numa forte interação de natureza educacional entre os vários atores do sistema de saúde e os pacientes e suas famílias. Assim, nos últimos anos tem-se verificado uma tendência decrescente na taxa de mortalidade associada à asma e melhoria da qualidade de vida dos asmáticos, no entanto a incidência e prevalência desta patologia continuam a aumentar, como resultado de inúmeros fatores, nomeadamente de natureza ambiental e estilo de vida, incluindo a dieta. A gestão racional da doença deve assentar no seu diagnóstico precoce e na melhor compreensão dos mecanismos associados, de onde se destaca as alterações metabólicas. Assim, no âmbito desta tese de mestrado pretende-se implementar uma metodologia para o estudo integrado do perfil metabólico urinário de famílias químicas com potencial relevância na compreensão da asma, nomeadamente aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares. A utilização deste biofluido como matriz de estudo tem-se revelado promissora na pesquisa de biomarcadores com relevância em várias patologias, dada a existência de protocolos *standard* de recolha da urina e o facto de ser recolhida de forma não invasiva, em quantidades apreciáveis (mL).

Para atingir o objetivo principal, foram definidas etapas com objetivos mais específicos, nomeadamente:

- i)* Implementação de uma metodologia para a análise simultânea de aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares em urinas, por GC-qMS, combinado com tratamento da amostra por sililação, cujas condições experimentais foram previamente estudadas.
- ii)* Análise de amostras recolhidas em contexto hospitalar de indivíduos com asma ($n = 37$), com diversas alergias ($n = 19$) e indivíduos saudáveis, usados como controlo ($n = 16$).
- iii)* Avaliação do efeito de parâmetros de normalização, i. e. condutividade, e teor urinário de creatinina, no estabelecimento dos perfis urinários em estudo.
- iv)* Processamento estatístico dos dados e interpretação dos perfis urinários de indivíduos asmáticos e saudáveis, com vista à compreensão das alterações metabólicas associadas à asma.

Materiais e Métodos

2.1. Materiais e reagentes

O procedimento experimental envolveu o uso dos seguintes compostos: metanol (99,9%) da VWR International (Fontenay-sous-Bois, France), metil-D₃-ácido mirístico (98%), usado como padrão interno, da Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA), NaOH (98,8%) de José Manuel Gomes dos Santos, Lda (Odivelas, Portugal) N, O-bis(trimetil)silil trifluoroacetamida (BSTFA) ($\geq 99\%$) e trimetilclorosilano (TMCS) ($\geq 99\%$) da Sigma Aldrich (St Louis, USA). A série de alcanos (C₈-C₂₀), com C₆ como solvente, foi adquirida à Sigma Aldrich (St Louis, USA).

Foram, ainda, usados os seguintes compostos como **padrões para confirmação da identificação dos analitos detetados na urina**: ácido hexanóico (99,5%), ácido trans-2-hexenóico (99%), L-ácido aspártico ($\geq 98\%$), ácido laurico (99,5%), ácido mirístico ($\geq 99\%$), ácido pentadecanóico (99%), ácido palmitoleico ($\geq 99\%$), ácido palmítico (99%), triptofano ($\geq 98\%$), D-sorbitol ($\geq 98\%$) creatinina ($\geq 98\%$), manose ($\geq 98\%$), ácido decanóico ($\geq 99,5\%$), L-arabinose ($\geq 99\%$), D-ribose ($> 99\%$), D-frutose ($\geq 99\%$), galactose ($\geq 99\%$), D-altrose ($\geq 97\%$), D-alose (98%), D-talose ($\geq 99\%$), ácido esteárico ($\geq 99\%$), ácido erúico ($\geq 99\%$) e ácido nervónico ($\geq 99\%$) da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany); ácido oxálico (99%), L-valina ($> 99\%$), L-iso-leucina (99%), L-serina (99%), L-arginina ($> 99\%$), manose ($\geq 98\%$), D-manitol ($\geq 98\%$) da Merck (Darmstadt, Germany); L-leucina ($\geq 98,5\%$) e ácido 2,3-dihidroxi-butanedióico ($\geq 99,5\%$) da Panreac (Barcelona, Spain); ácido butanedióico ($\geq 99,5\%$) e ácido glutâmico ($\geq 98,5\%$) da Carlo Erba reagentes (Milano, Italy); L-metionina ($\geq 98\%$), ácido cítrico ($> 99\%$), DL-tirosina (99%), D-ácido galacturónico ($\geq 93\%$) e D-xilose ($\geq 99\%$) da Fluka (Buchs, Switzerland); lactose ($\geq 99\%$) e maltose ($\geq 99\%$) da Riedel-de Haen (Seelze, Germany) e glucose ($\geq 99,5\%$) da Scharlau (Sentmenat, Spain).

2.2 Amostragem de urinas

O trabalho experimental envolveu duas etapas: *i*) uma primeira correspondente à implementação da metodologia de análise das urinas e *ii*) a segunda fase correspondente à aplicação da metodologia a amostras recolhidas em contexto hospitalar (amostras de pacientes com asma e de indivíduos saudáveis, usados como controlo).

Na primeira fase do trabalho, para a implementação da metodologia de determinação da fração não volátil de urina foi utilizada a urina de um indivíduo com 23 anos, saudável e do sexo feminino. Nesta fase foi sempre utilizada a urina deste indivíduo de modo a eliminar fontes

de variabilidade. A urina foi recolhida uma única vez, dividida em várias alíquotas e foi congelada, sendo posteriormente descongelada apenas uma alíquota em cada dia de análise. Esta urina foi também utilizada para avaliar a reprodutibilidade e repetibilidade da metodologia. Para avaliação da repetibilidade, uma alíquota da amostra de urina foi derivatizada e injetada no GC-qMS cinco vezes consecutivas. Para avaliar a reprodutibilidade, alíquotas dessa mesma amostra de urina foram derivatizadas e injetadas no GC-qMS em duplicado, ao longo de cinco dias. Foram, ainda, recolhidas quatro vezes ao dia, durante um período de 44 dias, amostras de urina de 2 indivíduos saudáveis (23 e 27 anos), do sexo feminino, para avaliar a possível variação de condutividade.

Para a segunda parte do trabalho foram recolhidas no Serviço de Imunoalergologia, do Centro Hospitalar Baixo Vouga, em Aveiro, um conjunto de 37 amostras de urina de indivíduos com asma (**A**), 19 amostras de indivíduos com diversas alergias (**AL**) e 16 amostras de indivíduos saudáveis, usados como controlo (**C**). As amostras objeto deste estudo foram recolhidas ao abrigo de um protocolo aprovado pelo Conselho de Ética do hospital, de acordo com a Declaração de Helsínquia. Todos os voluntários foram informados da natureza deste estudo, e de cada um foi obtido um consentimento informado. A atribuição dos grupos foi realizada pela equipa médica que acompanha os pacientes, tendo por base o seu histórico clínico, sintomatologia e análises clínicas de rotina. Na **Tabela 5** estão reportados os dados disponíveis dos indivíduos em estudo. As amostras foram colocadas em frascos de vidro e armazenadas a -80°C até ao momento de análise.

Tabela 5 - Lista de indivíduos envolvidos no estudo realizado no âmbito desta tese, com indicação de informação sobre género, idade, patologia, alergénios associados, medicação e possíveis co-patologias existentes.

Amostra (data de recolha)	Género	Idade	Condição	Alergénios	Medicação diária	Medicação SOS (última noite)	Co-Patologias
C1(03.09.2014)	M	54	Controlo	----	----	----	----
C2 (04.09.2014)	F	43	Controlo	----	----	----	----
C3 (04.09.2014)	F	17	Controlo	----	----	----	----
C4 (03.09.2014)	F	37	Controlo	----	----	----	----
C5 (01.09.2014)	F	48	Controlo	----	----	----	----
C6 (10.09.2014)	M	43	Controlo	----	----	----	----
C7 (01.09.2014)	F	43	Controlo	----	----	----	----
C8 (06.09.2016)	F	24	Controlo	----	----	----	----
C9 (06.09.2016)	F	27	Controlo	----	----	----	----
C10 (06.09.2016)	M	30	Controlo	----	----	----	----
C11 (06.09.2016)	F	24	Controlo	----	----	----	----
C12 (06.09.2016)	F	23	Controlo	----	----	----	----
C13 (06.09.2016)	M	24	Controlo	----	----	----	----
C14 (06.09.2016)	F	22	Controlo	----	----	----	----
C15 (06.09.2016)	M	23	Controlo	----	----	----	----
C16 (06.09.2016)	M	22	Controlo	----	----	----	----
	10F/6M	[17-54] 26±11			----		
AL1 (01.09.2014)	F	57	Alergia	Corticoides, AINEs		----	Doença oncológica
AL2 (03.09.2014)	M	11	Alergia	Imunodeficiência IgA	Eustidil Xyzal	----	----
AL3 (04.09.2014)	F	66	Alergia	Urticária, angioedema para AINEs	----	----	Hipertensão e colesterol elevado
AL4(04.09.2014)	M	17	Alergia	Ácaros, gramíneas	----	----	----
AL5 (03.09.2014)	F	23	Alergia	Ácaros, pó	----	----	Rinite alérgica
AL6 (03.09.2014)	F	57	Alergia	Ácaros, pó, pólen, penicilina	Ebastina Aerius	----	----
AL7 (04.09.2014)	F	21	Alergia	Dermatite de contacto alérgica	----	----	----

Amostra (data de recolha)	Género	Idade	Condição	Alergénios	Medicação diária	Medicação SOS (última noite)	Co-Patologias
AL8 (04.09.2014)	M	43	Alergia	Gramíneas	-----	-----	Enfisema pulmonar e rinite alérgica
AL9 (04.09.2014)	F	18	Alergia	Ácaros, pó, pólen	-----	-----	Rinite alérgica
AL10 (04.09.2014)	F	58	Alergia	Urticária	Rinialer (<i>não cumpre</i>)	-----	Colesterol elevado
AL11 (04.09.2014)	F	3	Alergia	Alimentos (peixe)	-----	-----	-----
AL12 (04.09.2014)	M	16	Alergia	Gramíneas	-----	-----	Rinite alérgica
AL13 (03.09.2014)	M	76	Alergia	Vespas	-----	-----	Colesterol elevado e diabetes
AL14 (04.09.2014)	F	33	Alergia	Medicamentos (*)	-----	-----	-----
AL15 (10.09.2014)	F	7	Alergia	Alimentos (cajus)	-----	-----	-----
AL16 (04.09.2014)	F	69	Alergia	Urticária	-----	Avamys	Doença cardiovascular e diabetes
AL17 (01.09.2014)	F	17	Alergia	Ácaros, pelo de gato,	-----	-----	-----
AL18 (01.09.2014)	M	37	Alergia	Ácaros, medicamentos (*)	Telfast Zaditen (<i>não cumpre</i>)	-----	Rinite Alérgica
AL19 (01.09.2014)	F	51	Alergia	Produtos químicos (*)	Singulair Symbicort Bilaxten	-----	-----
	13F/6M	[3-76] 33±23					
A1 (01.09.2014)	M	18	Asma	Ácaros, pó, pelo	Faz ImunoT SC Aerius	-----	-----
A2 (03.09.2014)	M	11	Asma	Ácaros, pó, pólen	Singulair Seretaide	-----	-----
A3 (01.09.2014)	F	11	Asma	Ácaros, pó	Maizar Lukair	-----	-----
A4 (03.09.2014)	F	40	Asma	Ácaros	Bilaxten	Avamys	-----
A5 (01.09.2014)	F	37	Asma	Ácaros, pólen, pelo de animais, gramíneas	Asmatil	-----	-----
A6 (03.09.2014)	F	73	Asma	Ácaros, pelo de animais	Singulair Brisomax Bilaxten	-----	Insuficiência cardíaca
A7 (04.09.2014)	M	12	Asma	Ácaros, pó, pólen, pelo de animais	Singulair	-----	-----

Amostra (data de recolha)	Género	Idade	Condição	Alergénios	Medicação diária	Medicação SOS (última noite)	Co-Patologias
					Aerius Symbicort		
A8 (01.09.2014)	F	30	Asma	Pó, pólen, pelo de animais	Assieme Singulair	-----	Sinusite, rinite e depressão
A9 (01.09.2014)	F	9	Asma	Ácaros, pó, pelo de animais	Seretaide	-----	-----
A10 (01.09.2014)	M	10	Asma	Ácaros, pó	Seretaide Singulair	-----	Depressão
A11 (01.09.2014)	F	11	Asma	Gramíneas selvagens e cultivadas	Seretaide	-----	-----
A12 (03.09.2014)	F	11	Asma	Ácaros, pó, pólen, gramíneas, alimentos (ovo)	Singulair Seretaide (<i>não cumpre</i>)	Anapen	-----
A13 (01.09.2014)	F	10	Asma	Ácaros	-----	-----	-----
A14 (04.09.2014)	M	13	Asma	Ácaros, pó	-----	-----	-----
A15 (04.09.2014)	F	8	Asma	Ácaros, pó	Singulair Xyzal (<i>não cumpre</i>)	-----	-----
A16 (04.09.2014)	F	3	Asma	-----	Singulair Flixotide	-----	Rinite alérgica e anemia
A17 (01.09.2014)	F	42	Asma	Ácaros, pó, pelo de animais	Assieme Aerius	-----	-----
A18 (04.09.2014)	M	11	Asma	Ácaros, pó, pólen	Seretaide Bilaxten	-----	-----
A19 (04.09.2014)	F	52	Asma	Ácaros, pelo de animais	Singulair	-----	Colesterol elevado
A20 (04.09.2014)	F	10	Asma	Ácaros, pó, pólen, pelo de animais	Seretaide Singulair (<i>não cumpre</i>)	-----	-----
A21 (01.09.2014)	M	8	Asma	Pó	Singulair Aerius	-----	-----
A22 (01.09.2014)	M	14	Asma	Pólen, pelo de animais	Aerius Singulair Avamys Maxair	-----	-----
A23 (03.09.2014)	M	79	Asma	Ácaros	Seretaide	-----	Teve enfarte

Amostra (data de recolha)	Género	Idade	Condição	Alergénios	Medicação diária	Medicação SOS (última noite)	Co-Patologias
A24 (10.09.2014)	F	13	Asma	Ácaros, pelo de animais	Singulair Symbicort	-----	-----
A25 (10.09.2014)	F	9	Asma	Ácaros	-----	-----	-----
A26 (10.09.2014)	F	12	Asma	Ácaros, pólen, pelo de gato	Singulair Pulmicort	-----	-----
A27 (10.09.2014)	M	8	Asma	Ácaros	Singulair Aerius Nasomet	-----	-----
A28 (03.09.2014)	M	15	Asma	Ácaros, pó, pólen	Assieme Singulair Rosilan	Bricanyl	-----
A29 (01.09.2014)	M	45	Asma	Pó	Singulair Symbicort (1ª consulta)	-----	Epilepsia
A30 (01.09.2014)	F	39	Asma	Pó, pólen, pelo de animais, gramíneas	Assieme Aerius	-----	Psoríase (mãos, pés e couro cabeludo)
A31 (01.09.2014)	M	18	Asma	Pó, pólen, fungos	Aerius Singulair	-----	-----
A32 (01.09.2014)	F	15	Asma	Pó, pólen, pelo de animais	Aerius Singulair	-----	Anemia
A33 (04.09.2014)	M	66	Asma	Urticária, pelo de gato	Singulair (até agosto)	-----	Rinite alérgica, diabetes e hipertensão
A34 (01.09.2014)	F	36	Asma	Ácaros, pó	-----	-----	-----
A35 (10.09.2014)	M	6	Asma	Ácaros, pó, pólen, pelo de animais	Singulair Seretaide	-----	-----
A36 (10.09.2014)	F	37	Asma	Ácaros, pólen	Maizar Filotempo Aerius Singulair	-----	-----
A37 (10.09.2014)	M	14	Asma	-----	-----	-----	-----
	21F/16M	[3-79] 13±20					

AINEs - anti-inflamatórios não esteroides
* informação não disponível

2.3 Caracterização de amostras de urina e de padrões

2.3.1. Determinação da condutividade das amostras de urina

De modo a avaliar a variabilidade da condutividade da urina de um indivíduo ao longo do dia e entre dias, foi determinada a condutividade de amostras de urina recolhidas em 4 fases do dia (8 h, 12 h, 14 h e 17 h) durante um período de 44 dias. Para cada amostra foram realizadas 3 medições, à temperatura ambiente (25 °C) e os dados foram expressos em mS/cm, utilizando-se um condutímetro TetraCon 325 da Inolab (Benito Juárez, México). Foi ainda determinada a condutividade de todas as amostras da **Tabela 5**.

2.3.2. Determinação da fração não volátil da urina: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares

A determinação de metabolitos pertencentes às famílias químicas alvo (aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares) envolveu a implementação das condições de sililação, as quais foram posteriormente aplicadas a amostras de urina. Esta metodologia foi também aplicada na análise dos padrões com o objetivo de criar uma base de dados de espectros de massa e índices de retenção para posterior identificação dos metabolitos detetados nas amostras de urina.

2.3.2.1. Implementação do processo de sililação

A metodologia usada para determinar os aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares na urina foi baseada num trabalho reportado na literatura (97). Com o objetivo de aumentar o número de metabolitos pertencentes às famílias químicas alvo deste estudo, foram testadas diferentes condições de sililação. Assim, uma alíquota de 5 mL de urina foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 min (97). Posteriormente, a 1 mL de urina adicionaram-se 800 µL de metanol, levando a solução ao vórtex (5 min) e seguidamente ao banho de ultrassom (5 min), à temperatura ambiente. Após o ajuste do pH a *ca.* 9,5, usando NaOH (0,5 mol/L), a solução foi filtrada com um filtro de Nylon (SMI-LabHut, Gloucester, UK) de porosidade 0,45 µm. De seguida, 100 µL do filtrado de urina foram evaporados em corrente de azoto, seguidamente, adicionaram-se 100 µL de BSTFA, 20 µL de TMCS (catalisador) e colocaram-se os frascos a 70 °C durante 30 min. Esta metodologia base corresponde à condição 1 reportada na **Tabela 6**, a partir da qual foram testadas alterações no volume de filtrado de urina, volume de reagente de sililação e de catalisador (condições 2 a 4). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado ($n = 4$).

Tabela 6 - Condições de sililação testadas na análise de urina com base na metodologia previamente reportada na literatura (condição 1) (97) e variando volume de filtrado de urina, volume de reagente de sililação e de catalisador (condições 2 a 4).

Condições de sililação	
1-	100 µL filtrado de urina + 100 µL BSTFA + 20 µL TMCS (97)
2-	200 µL filtrado de urina + 100 µL BSTFA + 20 µL TMCS
3-	200 µL filtrado de urina + 200 µL BSTFA + 40 µL TMCS
4-	200 µL filtrado de urina + 200 µL piridina + 200 µL BSTFA + 40 µL TMCS

2.3.2.2. Estudo de amostras de urinas e de padrões por sililação seguida de análise cromatográfica

Após a análise dos resultados obtidos na secção anterior (2.3.2.1), foram selecionadas as condições de sililação a usar na análise das amostras de urina recolhidas em contexto hospitalar, a qual se encontra representada na **Figura 7A**, assim como a metodologia adaptada à análise dos 41 padrões de aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares listados na secção 2.1 (**Figura 7B**). Adicionaram-se ainda 50 µL de metil-D₃-ácido mirístico (1 mg/mL), usado como padrão interno. De cada amostra de urina foram preparadas 3 alíquotas e a cada uma foi aplicado o procedimento indicado na **Figura 7A**. Cada uma das alíquotas foi injetada no GC-MS em duplicado.

As condições cromatográficas foram adaptadas de um estudo prévio (97). Para a realização deste trabalho foi utilizado um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa com quadrupolo (Shimadzu, modelo QP2010 Ultra), equipado com uma coluna DB-1 30 m × 0,25 µm, com 0,25 mm de espessura (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). Foi injetada, em modo *splitless*, 1 µL de amostra derivatizada, com um *solvent delay* de 180 s. O hélio foi usado como gás de arraste, com um fluxo constante de 1 mL/min. O programa de temperatura de forno utilizado foi: temperatura inicial de 80 °C (3 min), com um aumento de 5 °C/min até 320 °C (3 min). A temperatura da linha de transferência foi de 250 °C e a temperatura da fonte do espectrómetro de massa foi de 300 °C. Este operou em modo de impacto eletrónico (EI), a 70 eV, numa gama de 30-800 *m/z*.

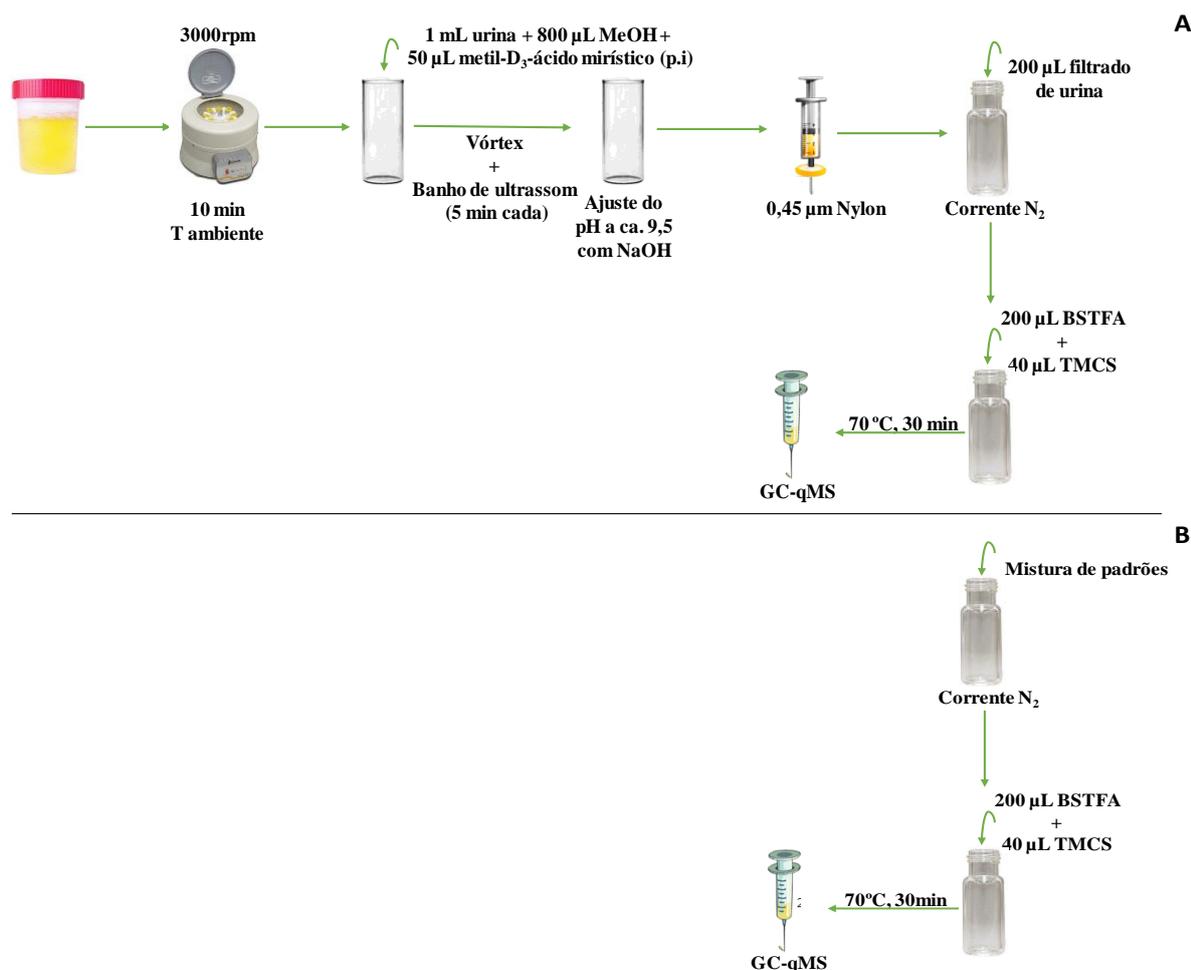


Figura 7 - Procedimento experimental aplicado às amostras de urina (A) e aos padrões (B) para posterior análise por GC-qMS.

A identificação dos metabolitos da urina foi realizada por comparação dos seus espectros de massa com os espectros de massa de uma base de dados construída com a informação obtida a partir dos 42 padrões utilizados e de bases de dados comerciais (*Wiley 229 Library e US National Institute of Science and Technology (NIST) 147 Library*). Foram ainda calculados os índices de retenção (RI), os quais se obtiveram através da injeção de padrões puros de uma série de alcanos (C₈-C₂₀, correspondendo a valores de I entre 800-2000), sendo calculados de acordo com a equação de *van Den Dool e Kratz* (103), cuja fórmula aparece representada na **Equação 1**. Estes valores foram comparados com os valores disponíveis na literatura para colunas cromatográficas semelhantes (77,104-111).

$$I = 100[z + (\log X_s - \log X_z / \log X_{(z+1)} - \log X_z)]$$

Equação 1 - Equação de van den Dool e Kratz, onde X é o tempo de retenção, s é o metabolito a identificar, z é o alcano linear com z átomos de carbono, eluindo antes de s e z+1 é o alcano linear com z+1 átomos de carbono, eluindo após s (112).

2.4. Tratamento de dados

Foram analisadas amostras de urina de 16 indivíduos saudáveis (controles), 19 indivíduos com diversas alergias e 37 indivíduos com asma. Foi construída uma matriz que inclui 432 observações (72 amostras de urina analisadas, sendo que da amostra de cada indivíduo foram preparadas 3 alíquotas, cada uma injetada em duplicado: $n = 3 \times 2$) e 35 variáveis (metabolitos detetados). De forma a estimar o teor de cada metabolito, foram extraídas as suas áreas cromatográficas e utilizou-se a área e a concentração de padrão interno adicionado, obtendo as concentrações expressas em equivalentes de padrão interno. A concentração calculada para cada metabolito foi ainda normalizada pela concentração determinada para a creatinina, igualmente expressa em equivalentes de padrão interno, e pelo valor de condutividade de cada amostra de urina. À matriz de dados obtida foram realizadas duas abordagens diferentes com vista a extrair informação relevante relativamente aos dados disponíveis:

- i) organização das amostras de urina em dois grupos - controlo (**C**) e asma + alergia (**A+AL**);
- ii) organização das amostras de urina em três grupos - controlo (**C**), alergia (**AL**) e asma (**A**).

Primeiramente avaliaram-se as amostras em relação ao teor de creatinina e ao valor de condutividade e de seguida avaliaram-se as diferenças nas concentrações dos metabolitos entre os vários grupos. Para tal, a significância estatística entre os dados dos dois e três grupos foi calculada utilizando a ANOVA unidirecional. Estes testes foram realizados com um nível de confiança de 99%, indicando significância estatística se $p < 0,01$, e usando o MATLAB R2015a, The MathWorks Inc., Natick, MA, 2015. Para visualizar a distribuição dos dados entre os grupos recorreu-se a um tipo de gráfico denominado *boxplot*, obtido também através do MATLAB. O *boxplot* é formado pelo primeiro e terceiro quartil - onde estão localizadas 50% das concentrações - pela mediana e pelos limites extremos (mínimo e máximo), estando também representados possíveis valores atípicos. O *boxplot* é uma ferramenta de análise univariada que além de permitir visualizar a mediana, que representa o centro dos dados e informa sobre a simetria ou assimetria da distribuição, fornece ainda informação sobre a dispersão dos dados em cada grupo, representada pela amplitude do gráfico.

Resultados e Discussão

3.1 Implementação da metodologia de análise da fração não volátil da urina: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares

A primeira fase da implementação da metodologia a aplicar na análise das amostras de urina foi a seleção da condição de sililação mais adequada. De seguida, aplicou-se a metodologia selecionada a todas as amostras e padrões e procedeu-se à identificação dos metabolitos detetados com base na combinação de vários parâmetros, desde a comparação dos seus espectros de massa com os espectros de massa de bases de dados comerciais e com a base de dados de espectros de massa e índices de retenção construída pela co-injecção de padrões. Seguiu-se a avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade do método através das concentrações dos 35 metabolitos detetados na urina.

3.1.1. Seleção da condição de sililação

A estratégia para a seleção da metodologia passou pela escolha da condição que permitisse a deteção do maior número de metabolitos das famílias químicas alvo. A apresentação dos resultados relativos à implementação da metodologia encontra-se na **Figura 8**.

Na primeira fase deste trabalho foram testadas quatro condições de sililação tendo por base o trabalho de *Wu et al (97)* designado por condição 1. Nas restantes condições testaram-se pequenas alterações relativamente à condição base, sendo que na condição 2 duplicou-se o volume de filtrado de urina, na condição 3 duplicou-se o volume de reagente de sililação e de catalisador e na condição 4 foi adicionada piridina ao meio reacional. Cada uma das condições foi testada em 4 alíquotas de uma amostra de urina ($n = 4$).

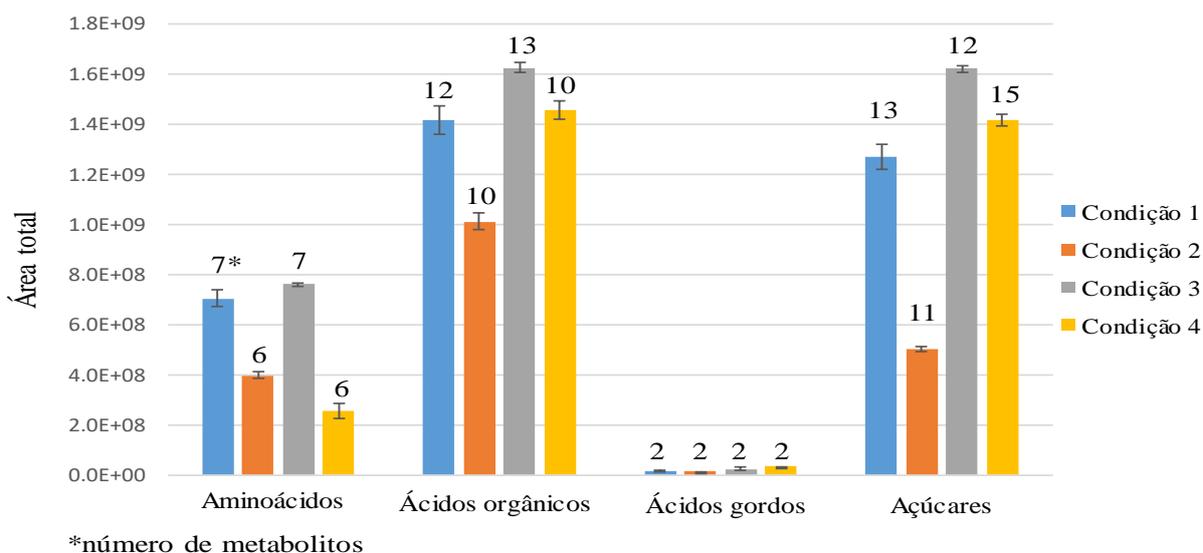


Figura 8 – Área total e número de metabolitos detetados por família química (aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares) na urina em função de diferentes condições de sililação. **Condição 1** - 100 μ L filtrado de urina + 100 μ L BSTFA + 20 μ L TMCS; **Condição 2** - 200 μ L filtrado de urina + 100 μ L BSTFA + 20 μ L TMCS; **Condição 3** - 200 μ L filtrado de urina + 200 μ L BSTFA + 40 μ L TMCS; **Condição 4** - 200 μ L filtrado de urina + 200 μ L piridina + 200 μ L BSTFA + 40 μ L TMCS

Com base nos resultados da **Figura 8**, observam-se diferenças no número de metabolitos detetados por família química entre as várias condições testadas, à exceção da família dos ácidos gordos, onde foram detetados 2 metabolitos independentemente da condição usada. Com a condição 1 detetaram-se 7 aminoácidos, 12 ácidos orgânicos, 2 ácidos gordos e 13 açúcares. Na condição 2 duplicou-se o volume de urina recolhido do filtrado, possibilitando que metabolitos cuja concentração fosse inferior ao limite de deteção (LOD) pudessem ser detetados. No entanto, não se observou um aumento do número de metabolitos em nenhuma das famílias, mas sim uma diminuição em todas as famílias, à exceção dos ácidos gordos. O reagente de sililação nunca pode ser o passo limitante de uma reação, ou seja, tem que estar sempre em excesso para garantir que todos os compostos presentes na mistura sejam sililados. Assim, uma provável explicação para este resultado é o facto dos volumes de reagente de sililação e catalisador não terem sido suficientes para o volume de urina, encontrando-se em defeito na mistura. Deste modo, na condição 3, para o mesmo volume de urina usado na condição 2, foram duplicados os volumes de reagente de sililação e catalisador. Comparando com os resultados da condição 1, verificou-se um aumento no número de ácidos orgânicos e uma diminuição no número de açúcares, mantendo-se o número de metabolitos observados nas restantes famílias. Por fim, a quarta condição experimental incluiu a adição de piridina no meio reacional. Estudos prévios permitiram observar um maior rendimento no processo de derivatização com a adição da piridina (90,113), no entanto o resultado deste ensaio mostra que de uma maneira geral a piridina não surtiu num efeito positivo para o aumento do número de

metabolitos detetados, uma vez que apenas se verificou uma alteração positiva na família dos açúcares, tendo-se mantido e até diminuído o número de metabolitos observados nas restantes famílias. Relativamente à variabilidade associada a cada condição, verifica-se através da análise da **Figura 8** que, globalmente, as condições 1 e 4 apresentam maior variabilidade nas diferentes famílias, seguidas da condição 2 e por fim da condição 3, sendo esta última a que apresentou menor variabilidade. Assim, a condição selecionada foi a condição 3 (200 µL filtrado de urina + 200 µL BSTFA + 40 µL TMCS), uma vez que permitiu detetar um número similar de compostos relativamente à condição de referência (97) (aminoácidos (7), ácidos orgânicos (13), ácidos gordos (2) e açúcares (12)), uma área cromatográfica mais elevada para aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares e uma menor variabilidade, expressa em RSD, quando comparada com todas as condições testadas.

3.1.2. Estratégias para identificação de metabolitos

A identificação dos metabolitos deve ser confirmada por, pelo menos, dois parâmetros diferentes (112). Apesar da possibilidade em identificar diferentes metabolitos com base nos seus padrões de fragmentação, a identificação inequívoca é por vezes complicada, em parte devido às semelhanças nos espectros de massa observados (principalmente na família dos açúcares) (114). A existência de padrões para a confirmação da identificação é o critério mais fiável, no entanto, nem sempre é possível seguir esta estratégia para todos os metabolitos devido à falta do padrão correspondente. Deste modo, com vista a incrementar a robustez da identificação dos metabolitos, recorreu-se a uma estratégia que combina o uso de vários parâmetros:

- Comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa das bases de dados comerciais (*Wiley 229 Library* e *US National Institute of Science and Technology (NIST) 147 Library*), com base nos seus padrões de fragmentação;
- Determinação experimental dos índices de retenção (RI) dos metabolitos e comparação, quando disponível, com os valores reportados na literatura para colunas cromatográficas iguais ou equivalentes à utilizada neste trabalho;
- Co-injecção de padrões puros e comparação dos seus espectros de massa e tempos de retenção com os dos metabolitos em estudo;

O tempo de retenção de um metabolito é caracterizado maioritariamente pela sua interação com a fase estacionária da coluna. No entanto, também é influenciado por outros

parâmetros como o comprimento da coluna, volatilidade e o programa de temperatura usado e o fluxo aplicado (112). Neste caso, a coluna utilizada neste trabalho, DB-1 30 m × 0,25 µm, é uma coluna apolar constituída por uma fase estacionária - 100% de dimetilpolisiloxanos - com polaridade similar à polaridade dos compostos a separar. Como resultado, os compostos mais apolares interagem mais fortemente com a fase estacionária, resultando num tempo de retenção mais longo para estes compostos. Por sua vez, os compostos polares terão tempos de retenção mais curtos, surgindo no início do cromatograma. Em relação à temperatura da coluna, deve-se ter em conta que embora uma temperatura mais elevada resulte em tempos de retenção mais curtos e, portanto, menores tempos de análise, também resulta numa separação menos eficiente, uma vez que as diferenças observadas nos tempos de retenção dos diferentes compostos deixam de estar tão pronunciadas, podendo até resultar na co-eluição de alguns compostos. Por isso, as separações mais eficientes são observadas quando se usam gradientes de temperatura, uma vez que estão inerentes à separação a polaridade e volatilidade dos compostos (115). O mesmo acontece com o uso de um caudal mais elevado do gás de arraste, pois implica que os compostos não interajam o suficiente com a fase estacionária, resultando numa menor separação. Por sua vez, o comprimento da coluna também influencia o tempo de retenção, uma vez que este aumenta proporcionalmente ao comprimento da coluna, gerando também uma melhor separação (78). Como resultado dos parâmetros mencionados anteriormente, verifica-se que o tempo de retenção, por si só, não é suficiente para uma clara identificação de metabolitos (116), tornando-se necessário recorrer a sistemas que permitam a comparação interlaboratorial, como é o caso do sistema de Kovats.

Além da comparação com os espectros de massa das bases de dados comerciais e com valores de índice de retenção reportados na literatura, criou-se uma base de dados de espectros de massa e índices de retenção, resultante da injeção dos padrões puros listados na secção 2.1. Na **Tabela 7**, estão listados dados sobre os padrões puros injetados, nomeadamente os tempos de retenção, os iões mais abundantes característicos do respetivo composto sililado e os índices de Kovats (RI) calculados e reportados na literatura para colunas cromatográficas iguais ou equivalentes à utilizada. Comparando os valores de RI obtidos com os disponíveis na literatura, obteve-se um coeficiente de variação entre 0% e 6%. A base de dados criada, apresentada no Anexo I, contém informação relativamente aos espectros de massa de cada composto sililado e índices de retenção de padrões pertencentes às quatro famílias químicas em estudo nesta tese. A criação desta base de dados foi extremamente útil para a correta identificação dos metabolitos detetados neste trabalho e pode ser consultada em trabalhos futuros de identificação de metabolitos sililados.

Tabela 7 – Lista de padrões analisados, com indicação da respectiva fórmula do padrão sililado, iões mais abundantes e RIs calculado e da literatura para uma coluna DB-1 ou equivalente.

Composto sililado	Fórmula	Iões mais abundantes ^a (m/z)	RI calculado	RI literatura
AMINOÁCIDOS				
<i>L</i> -Valina	C ₁₁ H ₂₇ NO ₂ Si ₂	144,73,218,145	1240	1234(104)
<i>L</i> -Leucina	C ₁₂ H ₂₉ NO ₂ Si ₂	158,73,159,147	1297	1284(104)
<i>L</i> -Isoleucina	C ₁₂ H ₂₉ NO ₂ Si ₂	158,73,218,159	1314	1306(104)
<i>L</i> -Serina	C ₁₂ H ₃₁ NO ₃ Si ₃	73,204,75,218	1384	1380(104)
<i>L</i> -Ácido aspártico	C ₁₀ H ₂₃ NO ₄ Si ₂	73,160,130,75	1424	1427(105)
<i>L</i> -Metionina	C ₁₁ H ₂₇ NO ₂ SSi ₂	176,128,73,147	1518	1530(104)
<i>L</i> -Arginina	C ₁₅ H ₃₈ N ₄ O ₂ Si ₃	142, 73, 70, 102	1635	-----
Ácido glutâmico	C ₁₄ H ₃₃ NO ₄ Si ₃	246,73,128,147	1635	1629(104)
<i>DL</i> -Tirosina	C ₁₈ H ₃₅ NO ₃ Si ₃	218,73,280,219	1944	1952(104)
Triptofano	C ₂₀ H ₃₆ N ₂ O ₂ Si ₃	202,73,203,45	2139	2215(104)
ÁCIDOS ORGÂNICOS				
Ácido oxálico	C ₈ H ₁₈ O ₄ Si ₂	73,147,45,148	1165	1125(106)
Ácido butanedióico	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂	147,73,75,148	1317	1312(106)
Creatinina	C ₁₀ H ₂₃ N ₃ OSi ₂	115,73,143,100	1429	-----
Ácido 2,3-dihidroxibutanedioico	C ₁₆ H ₃₈ O ₆ Si ₄	73,147,292,219	1670	1658(107)
Ácido cítrico	C ₁₈ H ₄₀ O ₇ Si ₄	273,73,147,363	1845	1839(108)
ÁCIDOS GORDOS				
Ácido hexanóico	C ₉ H ₂₀ O ₂ Si	75,73,173,117	1105	1071(77)
Ácido <i>trans</i> -2-hexenóico	C ₉ H ₁₈ O ₂ Si	171,75,73,143	1138	-----
Ácido decanóico	C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si	229,117,73,75	1457	1446(106)
Ácido láurico	C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si	117,257,73,75	1651	1654(106)

Composto sililado	Fórmula	Iões mais abundantes^a (m/z)	RI calculado	RI literatura
Ácido mirístico	C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si	73,117,75,132	1844	1844(109)
Ácido pentadecanóico	C ₁₈ H ₃₈ O ₂ Si	117,73,75,299	1947	1942(109)
Ácido palmitoleico	C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si	117,73,75,129	2014	2017(108)
Ácido palmítico	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	117,73,75,313	2034	2041(108)
Ácido esteárico	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	117,73,341,75	2201	2238(108)
Ácido erúxico	C ₂₅ H ₅₀ O ₂ Si	73,75,129,55	2491	-----
Ácido nervónico	C ₂₇ H ₅₄ O ₂ Si	73,75,55,129	2637	-----
AÇÚCARES				
<i>L</i> -Arabinose	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	73,217,204,191	1657	1748(110)
<i>D</i> -Ribose	C ₁₈ H ₄₅ NO ₅ Si ₄	73,217,204,191	1691	-----
Manose	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	73,204,191,147	1859	-----
<i>D</i> -Frutose	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	73,217,204,147	1869	1864(111)
Galactose	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	73,204,191,147	1910	1910(111)
Glucose	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	204,73,191,147	1938	1930(110)
<i>D</i> -Manitol	C ₂₄ H ₆₂ O ₆ Si ₆	73,147,319,205	2000	1993(104)
<i>D</i> -Sorbitol	C ₂₄ H ₆₂ O ₆ Si ₆	73,147,205,217	2002	-----
<i>D</i> - Ácido galacturónico	C ₂₁ H ₅₀ O ₇ Si ₅	73,204,217,147	2004	2020(106)
<i>D</i> -Xilose	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	204,73,147,191	2039	-----
<i>D</i> -Altrose	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	217,73,191,147	2148	-----
<i>D</i> -Alose	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	204,73,191,217	2185	-----
<i>D</i> -Talose	C ₂₀ H ₅₀ O ₆ Si ₅	204,73,191,217	2194	-----
Lactose	C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈	204,73,217,191	2559	-----
Maltose	C ₃₇ H ₈₉ NO ₁₁ Si ₈	204,73,191,147	2619	-----

^a 4 iões mais abundantes de cada espectro de massa, organizados por ordem decrescente de abundância

Para cada família de compostos, à exceção dos aminoácidos, verifica-se a existência de um padrão de fragmentação característico. A **Figura 9** apresenta o padrão de fragmentação típico de um composto exemplo de ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares. Relativamente aos aminoácidos não é possível apresentar um padrão de fragmentação característico pois esta família de compostos possui estruturas químicas muito diferentes entre si.

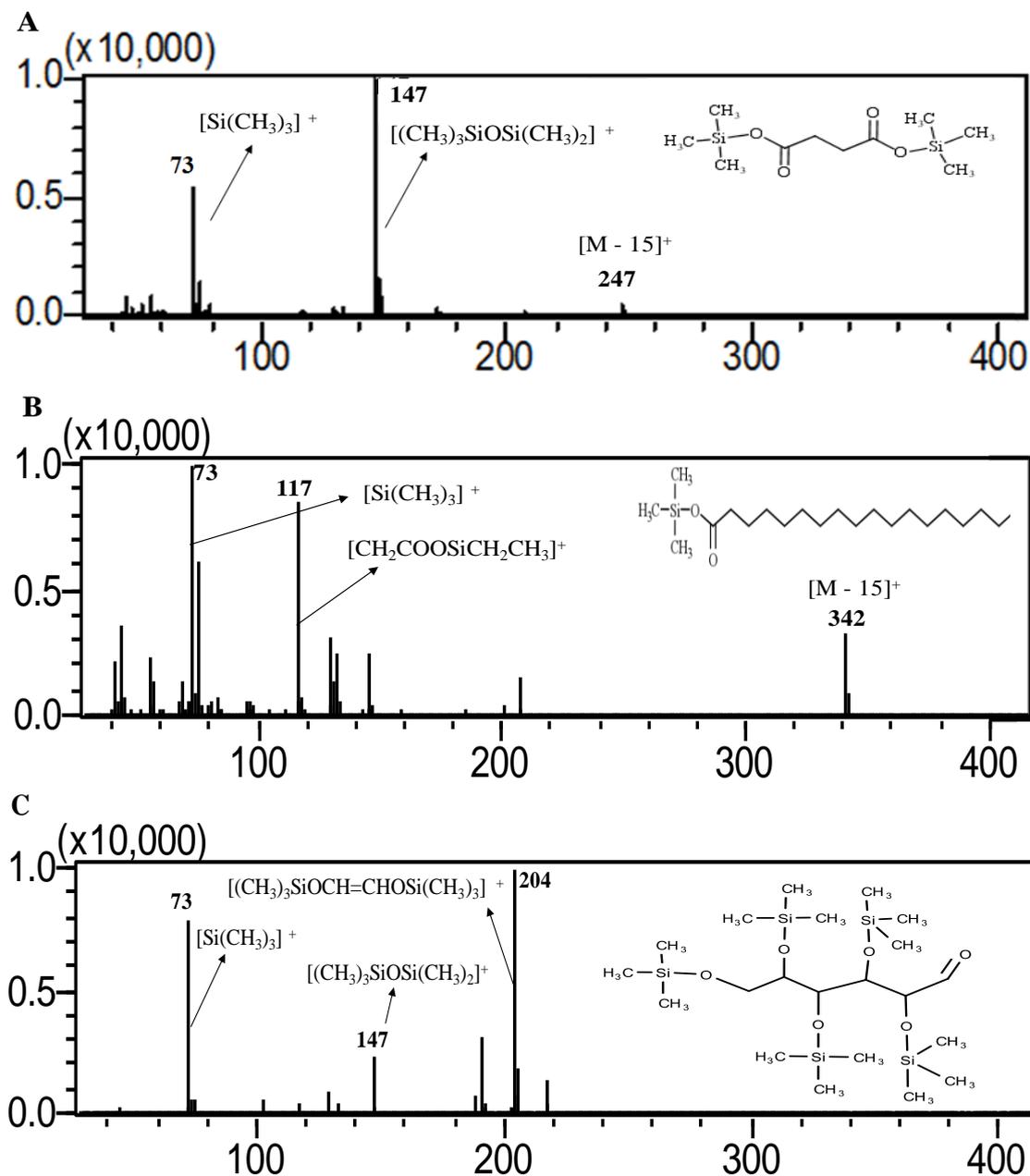


Figura 9 - Padrão de fragmentação característico de (A) ácidos orgânicos (ácido 3,4 - dihidroxibutanóico), (B) ácidos gordos (ácido octadecanoico), (C) açúcares (glucose).

Os mecanismos envolvidos na origem dos iões representados encontram-se no Anexo II, nomeadamente os processos de fragmentação que originam os iões m/z 73, m/z 147, m/z 117 e

m/z 204. Com base na **Figura 9** verifica-se que além de existir um padrão de fragmentação característico por família química, existe também um íon comum a todos os espectros de massa, o íon m/z 73, o qual corresponde ao fragmento do grupo trimetilsilil $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ da molécula. Não é um íon que forneça qualquer informação útil para a confirmação da identificação dos metabolitos, no entanto é o íon que está presente em todos os espectros de massa de derivados de TMS, pelo que é o íon indicador de que a reação de sililação ocorreu e que estamos perante compostos que têm grupos TMS (117).

O íon m/z 147 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_2]^+$, abundante maioritariamente nos espectros de massa dos ácidos orgânicos (**Figura 9A**), resulta da perda de um radical metilo de um dos grupos silil com posterior rearranjo da molécula (118). No caso do ácido orgânico representado - ácido 3,4-dihidroxi-butanóico – a perda de um radical metilo do grupo TMS resulta no fragmento m/z 247, o qual é útil para atribuir o peso molecular do derivado TMS do ácido 3,4-dihidroxi-butanóico, uma vez que o íon molecular (m/z 262) pode não estar presente no espectro de massa, como é o caso deste exemplo. O mesmo acontece no caso do ácido octadecanóico (**Figura 9B**), onde o m/z 342 corresponde ao íon molecular após a perda de um radical metilo. Um dos fragmentos mais abundantes nos ácidos gordos corresponde ao m/z 117 $[\text{CH}_2\text{COOSiCH}_2\text{CH}_3]^+$, que envolve a perda de um radical metilo após rearranjo de McLafferty (117,118). Por fim, os fragmentos m/z 204 e m/z 217 são os mais utilizados como íões chave na identificação de açúcares. O íon m/z 204 é característico dos espectros de massa de açúcares com 5 átomos de carbono, como é o caso da glucose (**Figura 9C**), e resulta da perda de $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOCH}=\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, e o m/z 217 é característico de açúcares com 4 átomos de carbono (114,118).

3.1.3. Análise da variabilidade da metodologia implementada

A repetibilidade e reprodutibilidade são parâmetros amplamente utilizados para avaliação da variabilidade de um dado sistema de medição e foram utilizados para a análise da variabilidade associada à metodologia implementada neste trabalho. A repetibilidade traduz-se na variação dos resultados de leituras sucessivas de uma mesma amostra, utilizando o mesmo método, o mesmo equipamento e o mesmo operador. A reprodutibilidade avalia a variabilidade dos resultados em função de alguma alteração de condição, nomeadamente, mudança de equipamento, de operador ou de momento de análise (119). Os resultados relativamente à repetibilidade e reprodutibilidade do método foram expressos em RSD e estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Repetibilidade e reprodutibilidade para 35 metabolitos detetados na urina. Médias da concentração expressas em µg/mL.

Metabolito	Repetibilidade (n = 5)		Reprodutibilidade (n = 11)	
	Concentração (µg/mL) ^a	RSD (%)	Concentração (µg/mL) ^a	RSD (%)
Alanina	22,57	9	21,90	10
Glicina	92,15	18	76,24	26
L-treonina	25,23	10	27,99	15
Ácido 3,4-dihidroxiбутanóico	41,75	6	44,69	20
L-5-Oxoprolina	159,08	4	162,91	19
Creatinina	499,62	11	493,16	12
Treitól	149,01	3	151,32	21
Ácido treónico	135,67	1	139,37	18
Arabinose	10,72	21	14,90	42
Ácido 2,3-dihidroxiбутanedióico	19,54	4	19,54	40
Ribose	22,27	3	26,99	21
Ácido 3,4,5- trihidroxipentanóico	54,34	3	54,70	21
Xilopirranose	60,58	4	71,85	21
Ácido aconítico	89,51	4	91,82	20
Arabitol	95,90	2	100,88	18
Ribitol	39,45	2	45,38	43
Ácido ribónico	52,32	3	63,16	36
Ácido cítrico	431,20	3	416,66	15
Manose	79,30	2	83,42	18
Frutose	24,07	4	26,94	27
Galactose	61,22	3	69,66	28
Tagatose	14,12	6	15,88	28
Sorbose	19,18	4	20,80	21
Glucose	17,47	4	16,28	12
Manitol	78,33	3	85,19	22
Sorbitol	30,66	5	33,21	21
Ácido galacturónico	33,94	3	36,59	10
Ácido glucónico	18,09	3	18,53	15
Ácido hexadecanóico	27,68	4	24,15	15
Xilose	54,53	3	61,09	16
Ácido galactónico	100,38	6	99,53	13
Inositol	56,42	3	59,26	8
Mio-inositol	46,01	5	49,85	19
Ácido octadecanóico	6,74	5	6,29	19
Maltose	8,65	33	8,17	38
Ácido mirístico (padrão interno)	50,00	5	50,00	18

^a equivalentes de padrão interno

ⁿ número total de amostras

Com base na tabela anterior e observando os resultados da repetibilidade, verifica-se que à exceção da maltose, todos os restantes metabolitos apresentam um valor de RSD entre 1% e 21%, sendo que 75% apresenta um $RSD \leq 5\%$. No entanto, analisando os resultados da reprodutibilidade, estes revelam uma maior variabilidade nos resultados. Todos os metabolitos apresentam um RSD superior ao obtido para a repetibilidade, sendo que 5 dos metabolitos

detetados apresentam um RSD $\geq 30\%$ (arabinose, ácido 2,3-dihidroxitributanóico, ribitol, ácido ribónico e maltose), os quais foram excluídos para os ensaios seguintes de análise da urina.

3.2 Caracterização das amostras de urina

Analisaram-se os valores de condutividade e teor de creatinina nas amostras de urina, com vista a avaliar a sua variabilidade dentro de cada grupo objeto de estudo. Seguiu-se a aplicação da metodologia implementada anteriormente a amostras de urina de indivíduos saudáveis, asmáticos e com diversas alergias, a identificação dos metabolitos detetados e o estudo da relação destes com as diferentes vias metabólicas nas quais podem estar envolvidos de acordo com os mecanismos subjacentes à asma.

3.2.1. Análise da condutividade e teor de creatinina

A condutividade urinária é um parâmetro que permite avaliar a concentração de eletrólitos na urina, sendo determinada com base nas moléculas carregadas em solução (120). Com o objetivo de avaliar a possível variabilidade intra e inter individual da condutividade, determinou-se a condutividade urinária de dois indivíduos saudáveis, em diferentes momentos do dia e entre vários dias, cujos resultados se apresentam na **Figura 10**.

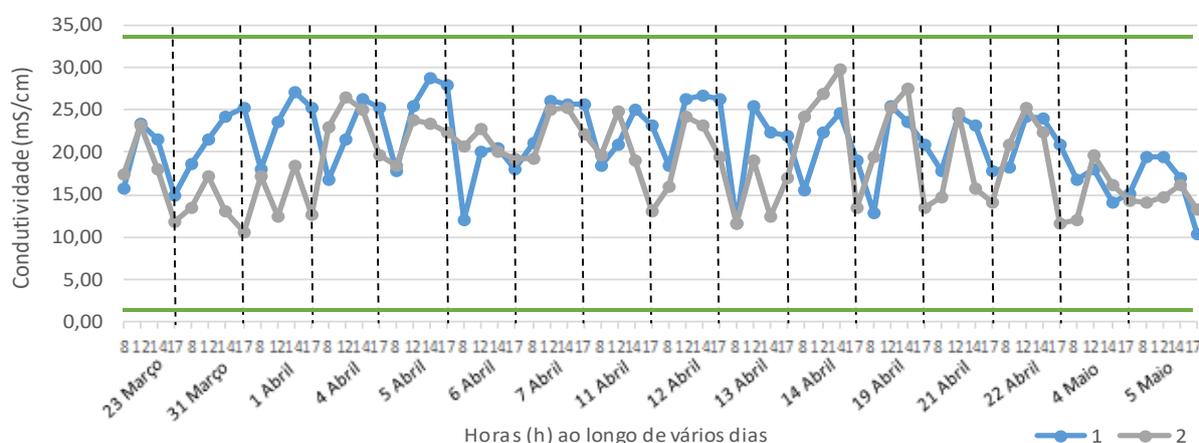


Figura 10 - Variação da condutividade urinária (mS/cm) de 2 indivíduos saudáveis, registados em quatro momentos do dia (8h, 12h, 14h e 17h), ao longo de um espaço temporal de 44 dias. Os valores mínimo e máximo encontrados na literatura (120) aparecem representados na figura por duas linhas horizontais de cor verde.

Os valores de condutividade obtidos permitem verificar que dentro de uma mesma amostra existem diferenças no valor de condutividade nos diferentes momentos do dia e ao longo dos dias. Observa-se que as amostras são muito similares entre si, uma vez que na amostra 1 a condutividade variou entre 10,42 e 28,80 mS/cm, com um valor médio de $21,10 \pm 4,40$

mS/cm e na amostra 2 variou entre 10,54 e 29,90 mS/cm, sendo o seu valor médio de $18,92 \pm 4,94$ mS/cm. Encontram-se também representados os valores mínimo e máximo reportados na literatura para indivíduos saudáveis, 1,10 a 33,90 mS/cm, cujo valor médio é de $21,5 \pm$ mS/cm (120). Comparando com a literatura, verifica-se que todos os valores obtidos nas amostras se encontram dentro dos valores reportados, assim como os seus valores médios se encontram próximos do valor médio indicado na literatura. No entanto, a variabilidade associada aos valores obtidos avaliou-se através do cálculo do RSD para cada momento e para cada dia de análise, representando assim a variabilidade observada entre diferentes momentos do dia e entre vários dias, respetivamente (**Tabelas 10 e 11**).

Tabela 10 - Média e RSD dos valores de condutividade obtidos através da análise de urina de dois indivíduos saudáveis (1 e 2), para avaliação da variabilidade nos diferentes momentos do dia. Médias expressas em mS/cm.

Variabilidade em diferentes momentos do dia ($n = 16$ dias)				
Indivíduo 1			Indivíduo 2	
Horas (h)	Média (mS/cm)	RSD (%)	Média (mS/cm)	RSD (%)
8	16,83	16	17,63	22
12	22,88	12	22,22	20
14	23,01	21	20,35	25
17	21,83	19	15,49	25

Tabela 11 – Média e RSD dos valores de condutividade obtidos através da análise de urina de dois indivíduos saudáveis (1 e 2), para avaliação da variabilidade entre diferentes dias, contemplando os 4 momentos de recolha de urina (8h, 12h, 14h e 17h). Médias expressas em mS/cm.

Variabilidade entre dias ($n = 4$ momentos do dia)				
Indivíduo 1			Indivíduo 2	
Dias	Média (mS/cm)	RSD (%)	Média (mS/cm)	RSD (%)
23 março	18,88	22	17,59	26
31 março	22,37	13	13,54	20
1 abril	23,48	17	15,16	20
4 abril	22,49	19	23,51	13
5 abril	25,05	20	21,97	11
6 abril	17,68	22	20,73	7
7 abril	24,60	10	22,92	12
11 abril	21,88	13	19,19	25
12 abril	24,47	16	20,72	18

Variabilidade entre dias ($n = 4$ momentos do dia)				
Indivíduo 1			Indivíduo 2	
Dias	Média (mS/cm)	RSD (%)	Média (mS/cm)	RSD (%)
13 abril	20,40	30	14,99	24
14 abril	20,40	19	23,64	31
19 abril	20,75	27	21,41	30
21 abril	20,75	17	17,31	28
22 abril	21,88	13	20,01	30
4 maio	16,01	11	15,54	21
5 maio	16,59	26	14,52	9

Com base na análise da **Tabela 10**, que apresenta a variabilidade observada nos diferentes momentos do dia, verifica-se que a amostra 1 apresenta um RSD entre 12 e 21% e a amostra 2 apresenta um RSD entre 20 e 25%. Por sua vez, analisando a **Tabela 11** que apresenta a variabilidade em cada dia de análise, contemplando quatro momentos diferentes do dia, obteve-se um RSD entre 10 e 30% para a amostra 1 e um RSD entre 7 e 31% para a amostra 2. A dispersão de valores, que se reflete nas variabilidades observadas, revela que a concentração urinária de eletrólitos varia quer ao longo do dia, quer em diferentes dias. Embora não se possa definir um claro padrão de variação, verifica-se um valor médio de variabilidade nos dados de cerca de 20%, tanto para a análise ao longo do dia como em diferentes dias. Estes resultados refletem a importância da medição dos valores de condutividade nas amostras de urina a analisar posteriormente. Esta avaliação da variabilidade intra e inter individual não foi estudada para a creatinina, uma vez que este metabolito já está bastante reportado na literatura, nomeadamente a sua gama de concentração (300-3000 $\mu\text{g/mL}$) (74) e os múltiplos fatores que podem influenciar os seus níveis de excreção, nomeadamente a variação diária, género, idade, massa muscular, dieta/estilo de vida e possíveis doenças.

Após esta primeira análise nas amostras de 2 indivíduos saudáveis, foram medidos os valores de condutividade das 72 amostras de urina bem como os teores de creatinina das mesmas, os quais estão apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12 -Valores de condutividade (mS/cm) e teores de creatinina ($\mu\text{g/mL}$) das amostras de urina analisadas.

Amostra	Condutividade (mS/cm)	Creatinina ($\mu\text{g/mL}$)	Amostra	Condutividade (mS/cm)	Creatinina ($\mu\text{g/mL}$)
C1	$5,51 \pm 0,01$	$847,14 \pm 7,61$	A1	$20,34 \pm 0,02$	$757,16 \pm 45,65$
C2	$3,83 \pm 0,01$	$913,91 \pm 2,80$	A2	$14,70 \pm 0,01$	$748,56 \pm 31,71$
C3	$6,82 \pm 0,03$	$387,85 \pm 13,00$	A3	$14,56 \pm 0,05$	$929,14 \pm 4,70$
C4	$6,23 \pm 0,02$	$388,10 \pm 6,55$	A4	$18,04 \pm 0,06$	$977,50 \pm 12,16$
C5	$5,27 \pm 0,01$	$932,98 \pm 3,19$	A5	$10,16 \pm 0,05$	$849,12 \pm 3,52$
C6	$20,43 \pm 0,08$	$454,88 \pm 28,39$	A6	$9,55 \pm 0,01$	$1028,50 \pm 14,39$
C7	$20,07 \pm 0,04$	$760,76 \pm 9,64$	A7	$15,72 \pm 0,01$	$868,67 \pm 39,26$
C8	$10,63 \pm 0,01$	$774,13 \pm 14,82$	A8	$15,57 \pm 0,02$	$943,19 \pm 28,96$
C9	$14,04 \pm 0,04$	$443,78 \pm 34,44$	A9	$16,77 \pm 0,04$	$1147,82 \pm 4,07$
C10	$9,41 \pm 0,06$	$662,06 \pm 43,06$	A10	$16,54 \pm 0,03$	$1171,43 \pm 36,13$
C11	$4,75 \pm 0,04$	$614,87 \pm 1,94$	A11	$21,58 \pm 0,03$	$639,18 \pm 21,23$
C12	$13,22 \pm 0,05$	$424,89 \pm 0,31$	A12	$19,53 \pm 0,03$	$642,61 \pm 19,15$
C13	$11,50 \pm 0,02$	$877,60 \pm 7,73$	A13	$20,88 \pm 0,04$	$1271,89 \pm 13,84$
C14	$12,24 \pm 0,04$	$431,83 \pm 1,20$	A14	$15,59 \pm 0,04$	$740,14 \pm 1,94$
C15	$30,49 \pm 0,02$	$536,84 \pm 26,76$	A15	$21,09 \pm 0,02$	$725,10 \pm 4,73$
C16	$22,82 \pm 0,02$	$555,34 \pm 7,05$	A16	$12,09 \pm 0,03$	$1271,63 \pm 2,70$
AL1	$13,04 \pm 0,04$	$860,71 \pm 3,03$	A17	$15,66 \pm 0,03$	$413,82 \pm 4,01$
AL2	$11,56 \pm 0,06$	$942,18 \pm 35,05$	A18	$20,78 \pm 0,04$	$724,64 \pm 18,91$
AL3	$9,50 \pm 0,03$	$985,37 \pm 5,04$	A19	$9,61 \pm 0,05$	$816,97 \pm 1,49$
AL4	$15,89 \pm 0,05$	$386,36 \pm 4,29$	A20	$14,14 \pm 0,04$	$825,06 \pm 21,79$
AL5	$21,90 \pm 0,05$	$1238,41 \pm 27,56$	A21	$12,29 \pm 0,06$	$753,24 \pm 8,93$
AL6	$12,04 \pm 0,01$	$417,21 \pm 4,19$	A22	$23,89 \pm 0,02$	$737,49 \pm 29,27$
AL7	$18,29 \pm 0,04$	$952,23 \pm 9,21$	A23	$17,31 \pm 0,06$	$818,86 \pm 8,90$
AL8	$17,14 \pm 0,04$	$967,11 \pm 9,53$	A24	$9,94 \pm 0,02$	$1060,01 \pm 32,55$
AL9	$19,74 \pm 0,05$	$730,38 \pm 5,02$	A25	$19,35 \pm 0,03$	$928,28 \pm 4,01$
AL10	$17,00 \pm 0,04$	$742,35 \pm 2,81$	A26	$18,06 \pm 0,08$	$1056,06 \pm 1,08$
AL11	$17,07 \pm 0,02$	$542,83 \pm 7,32$	A27	$17,39 \pm 0,04$	$936,78 \pm 7,49$
AL12	$17,14 \pm 0,03$	$462,98 \pm 33,76$	A28	$16,29 \pm 0,02$	$845,38 \pm 19,94$
AL13	$14,60 \pm 0,03$	$958,19 \pm 24,95$	A29	$22,54 \pm 0,05$	$640,08 \pm 21,39$
AL14	$24,51 \pm 0,01$	$1033,42 \pm 27,56$	A30	$14,90 \pm 0,04$	$1141,56 \pm 35,94$
AL15	$13,51 \pm 0,06$	$756,64 \pm 12,61$	A31	$19,76 \pm 0,06$	$759,44 \pm 29,22$
AL16	$12,17 \pm 0,02$	$746,28 \pm 1,34$	A32	$15,02 \pm 0,06$	$651,75 \pm 38,44$

Amostra	Condutividade (mS/cm)	Creatinina ($\mu\text{g/mL}$)	Amostra	Condutividade (mS/cm)	Creatinina ($\mu\text{g/mL}$)
AL17	15,36 \pm 0,01	561,57 \pm 14,16	A33	19,10 \pm 0,03	747,42 \pm 38,97
AL18	23,21 \pm 0,01	740,74 \pm 21,26	A34	10,01 \pm 0,04	1004,98 \pm 1,05
AL19	17,61 \pm 0,02	1181,82 \pm 12,29	A35	20,92 \pm 0,06	831,39 \pm 6,50
			A36	8,56 \pm 0,04	1027,13 \pm 3,30
			A37	21,72 \pm 0,03	967,71 \pm 20,99

De modo a avaliar a dispersão dos resultados da **Tabela 12**, os valores de condutividade e creatinina foram representados através de *boxplots* e a sua significância estatística foi obtida através do cálculo do *p-value*, determinado com 99% de confiança. Os resultados estão apresentados na **Figura 11**, a qual contempla as amostras organizadas em 2 (controlo vs asma + alergia) (**Figuras 11A e 11B**) e 3 grupos (controlo vs alergia vs asma) (**Figuras 11C e 11D**).

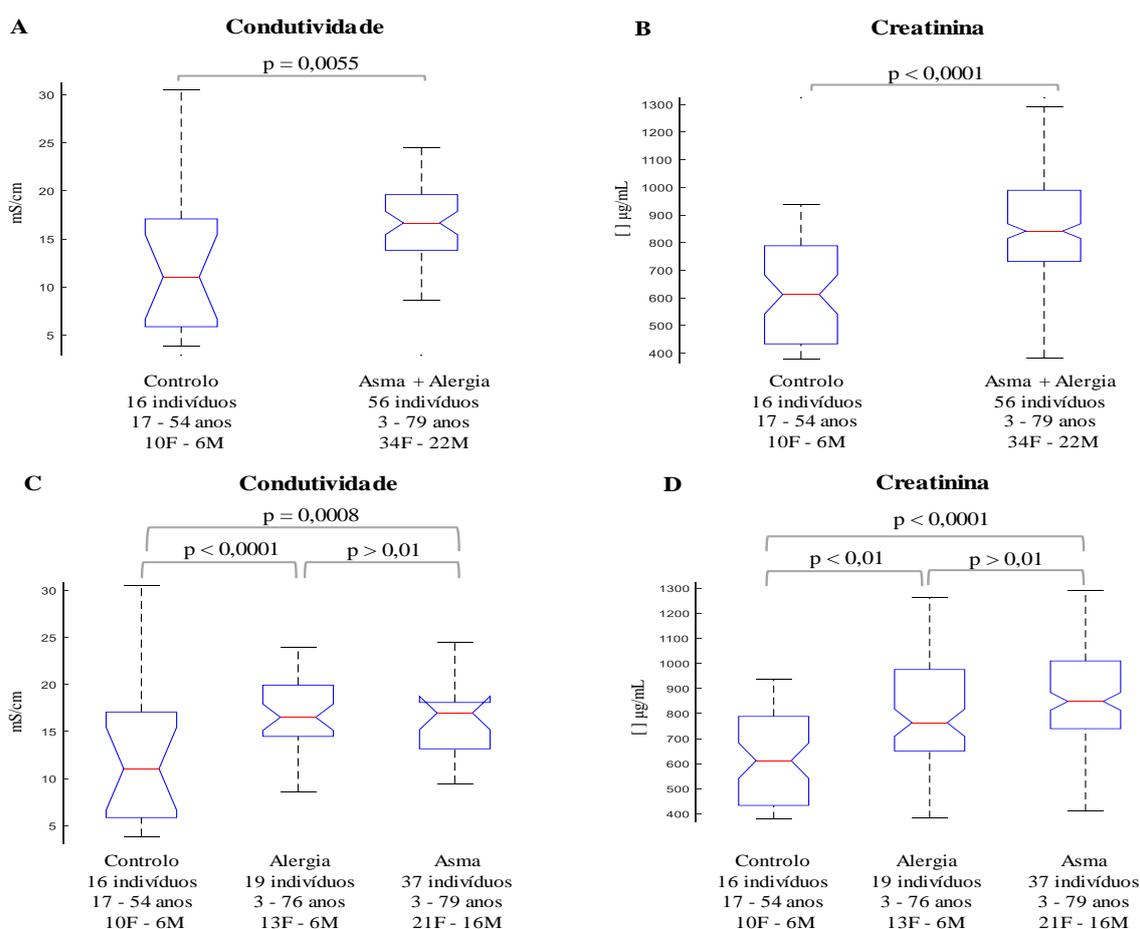


Figura 11 – Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença dos valores de condutividade (mS/cm) quando se comparam (A) 2 grupos e (C) 3 grupos e das concentrações urinárias de creatinina ($\mu\text{g/mL}$) expressas em equivalentes de padrão interno para (B) 2 grupos e (D) 3 grupos de amostras de urina. O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.

Os valores de condutividade relativos aos indivíduos controlo variaram entre aproximadamente 4 e 30 mS/cm, cuja mediana se situa a 11 ± 6 mS/cm e nas amostras de asma + alergia variaram entre 9 e 25 mS/cm, com mediana a 17 ± 4 mS/cm. Comparando com a **Figura 10** verifica-se que os valores relativos aos indivíduos controlo se encontram em concordância. Relativamente aos teores de creatinina, estes variaram entre 388 e 933 $\mu\text{g/mL}$ nos controlos e entre 386 e 1272 $\mu\text{g/mL}$ nas amostras de indivíduos asmáticos e alérgicos, sendo que apresentaram como valores medianos 612 ± 195 $\mu\text{g/mL}$ e 842 ± 211 $\mu\text{g/mL}$ respetivamente. Pela análise das **Figuras 11A** e **11B** verifica-se que o valor de *p-value* entre os grupos é inferior a 0,01 em ambos os casos, tendo-se obtido um $p = 0,0002$ para a condutividade (**Figura 11A**) e um $p < 0,0001$ para a creatinina (**Figura 11B**), o que demonstra que para ambos os parâmetros, os valores medianos obtidos nos indivíduos asmáticos e alérgicos são significativamente mais elevados relativamente aos valores para os indivíduos saudáveis. Nas **Figuras 11C** e **11D** testou-se a separação do grupo com patologia em dois grupos distintos, asma e alergia, no entanto, analisando os *p-values* obtidos, estes dois grupos não se revelaram estatisticamente diferentes. Uma grande percentagem (95%) da população de asmáticos estudada neste trabalho apresenta asma alérgica, o que leva a que as alterações metabólicas envolvidas sejam muito semelhantes entre estes indivíduos e os indivíduos que apresentam apenas alergia, justificando assim o facto de não se observarem diferenças significativas entre os dois grupos.

Com base na **Figura 11A**, verifica-se que os valores mais elevados de condutividade aparecem no grupo de amostras de indivíduos com asma e alergia, mais concretamente, 34% desses indivíduos apresentam um valor de condutividade mais elevado comparativamente aos controlos. A relação entre os valores de condutividade e a asma não está bem elucidada na literatura, no entanto sabe-se que a condutividade é um parâmetro influenciado por várias doenças metabólicas, nomeadamente a doença renal crónica - definida por proteinúria e/ou reduzida taxa de filtração glomerular (GFR) (< 60 mL/min) (121). Relativamente à relação desta patologia com a asma já estão reportados alguns estudos. Desta forma, os valores de condutividade mais elevados em alguns indivíduos asmáticos podem estar associados com algum tipo de comprometimento renal por parte desses mesmos indivíduos. A inflamação inerente à asma não se restringe apenas à área pulmonar, afetando o organismo como um todo (121). Deste modo, a inflamação sistémica na asma pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de outras doenças, onde se inclui a doença renal. Por exemplo, a interleucina-6 (IL-6), produzida por células inflamatórias, também é produzida pelas células epiteliais pulmonares em resposta a diferentes estímulos, nomeadamente alérgenos e vírus, encontrando-se aumentada na circulação sistémica de indivíduos com asma (122). No entanto,

também já foram observados níveis elevados desta interleucina em doentes com insuficiência renal (123). Além da IL-6, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) é também uma citocina envolvida na inflamação das vias aéreas, aumentando a contractilidade das mesmas no caso da asma (124). Ao nível do rim, esta citocina contribui para a inflamação crónica e está envolvida na lesão renal induzida pela obstrução, tendo apresentado elevados níveis séricos em indivíduos com doença renal crónica (125).

Os recentes desenvolvimentos no estudo da proteína de repetição rica em leucina (NLRP3) revelam uma provável relação entre a asma e a doença renal crónica. Espécies reativas de oxigénio, ATP extracelular, ácidos nucleicos, cristais de urato monossódico e componentes da matriz celular são capazes de ativar a NLRP3. Uma vez ativada, esta recruta a caspase-1, formando assim um complexo proteico denominado inflamassoma. A caspase-1 cliva e induz a secreção das citocinas pro-IL-1 β e pro-IL-18 nas suas formas biologicamente ativas (IL-1 β e IL-18) (126). Um estudo efetuado em 2010 (126) verificou que a expressão da proteína NLRP3 surgiu significativamente mais elevada em indivíduos com doença renal crónica, comparativamente a indivíduos saudáveis (126). Por sua vez, *Dong-wei et al* (121) realizou um estudo que tinha como objetivo avaliar se à crescente prevalência de asma se associava um aumento do risco de desenvolver doença renal crónica. Deste modo, contou com a participação de 2354 indivíduos com asma, os quais foram divididos em grupos consoante o histórico de asma (≤ 20 anos ou > 20 anos), o controlo da doença (bem controlada ou mal controlada) e o grau de gravidade (asma persistente ou leve). Observaram que os grupos de indivíduos com histórico de asma > 20 anos, com a doença mal controlada e com asma persistente apresentaram maior incidência de proteinúria e reduzida GFR quando comparados com os restantes grupos (121). Deste modo, concluíram que a asma está associada ao aumento do risco de desenvolver doença renal crónica, pois para além dos resultados obtidos, a asma persistente é inevitavelmente acompanhada por um elevado grau de inflamação sistémica, a qual, como já foi mencionado, pode agravar o desenvolvimento de doença renal. Assim, promovendo a inflamação renal, a NLRP3 contribui para o progresso da doença renal (126,127). Ainda relativamente a esta proteína de repetição, esta desempenha um papel na inflamação de células brônquicas relacionadas com o rinovírus humano, o qual é o vírus respiratório mais comum associado a exacerbações na asma (128). A infeção por rinovírus ativa a NLRP3, a qual leva à ativação da caspase-1 e posterior produção de IL-1 β e IL-18 (128). Um estudo desenvolvido por *Dolinay et al* (129) usando ratinhos, mostrou que as citocinas IL-1 β e IL-18, reguladas pelo inflamassoma NLRP3, são mediadoras da lesão pulmonar, uma vez que a sua secreção foi mais elevada no plasma de indivíduos com síndrome de insuficiência respiratória aguda. Assim,

demonstraram que o inflamassoma e as citocinas associadas desempenham um papel crítico na inflamação respiratória. Apenas em 2014 surgiu o primeiro estudo comparativo entre indivíduos asmáticos e saudáveis em relação à propensão para desenvolver doença renal crónica. *Huang et al (127)*, demonstraram pela primeira vez que indivíduos com asma têm um risco acrescido de desenvolver doença renal crónica em comparação com indivíduos não asmáticos. Além disso, verificaram que os indivíduos que apresentavam co-patologias (hipertensão, doença cardíaca, diabetes e obesidade) foram os que se revelaram mais propensos a desenvolver a doença. No entanto, o uso de medicamentos esteroides e não-esteroides para o tratamento da asma pode atenuar este risco, devido à sua ação anti-inflamatória (127). Este estudo sustenta os resultados apresentados na **Figura 11**, uma vez que as amostras de urina de asmáticos revelaram maiores valores de condutividade e incluídas nessas mesmas amostras está uma percentagem de indivíduos (38%) com várias co-patologias associadas.

No que diz respeito à creatinina, verificam-se valores mais elevados no grupo de indivíduos com asma e alergia, mais concretamente, 57% desses indivíduos apresentam um valor de creatinina mais elevado comparativamente aos controlos. A excreção urinária da creatinina é influenciada por vários fatores endógenos e exógenos. A taxa de excreção é maior em homens do que em mulheres (69,73,74), diminui com a idade (69,73,74) e aumenta com o exercício físico, massa muscular e dieta (69,73,74). Além disso, a excreção pode também ser afetada por algum comprometimento renal, principalmente se este estiver relacionado com a reduzida filtração glomerular (66), a qual se traduz em elevados níveis séricos de creatinina. Como tal, são vários os fatores que influenciam a sua excreção urinária, os quais são de grande influência neste trabalho, uma vez que as amostras analisadas nesta tese abrangem uma ampla gama de idades, ambos os géneros e no caso dos indivíduos asmáticos ainda têm o risco acrescido de desenvolver doença renal crónica. Os valores mais elevados em indivíduos asmáticos advêm também do aumento da necessidade energética por parte das vias aéreas inflamadas.

3.2.2. Análise da fração não volátil das urinas

Com o objetivo de verificar se as concentrações obtidas com o uso da metodologia implementada se encontram dentro das gamas reportadas na literatura, foram comparados os resultados experimentais, obtidos pela análise das 72 amostras de urina com a informação disponível na literatura (30,62,74,130). Não estão reportados muitos dados da relação controlo/asma, pois na maioria dos casos a abordagem utilizada não passa pela determinação

dos teores de cada metabolito, mas sim por uma análise estatística multivariada onde se analisam os sentidos de variação do sinal instrumental, pelo que se obtiveram através da literatura dados de apenas 13 metabolitos. Assim, para efeitos de comparação, calcularam-se as concentrações de cada metabolito, expressas em equivalentes de padrão interno e normalizadas pela concentração determinada para a creatinina. A **Tabela 9** apresenta os teores de 13 metabolitos detetados, bem como os teores reportados na literatura para idades compreendidas entre os 19 e os 67 anos, utilizando a técnica de RMN ou de GC-MS. Com base na análise da tabela verifica-se que, à exceção da manose, os restantes 12 metabolitos se encontram dentro das respetivas gamas reportadas na literatura.

Tabela 9 – Gama de concentrações de 13 metabólitos detetados experimentalmente nas 72 amostras de urina e reportados na literatura. Concentrações expressas em µg/mL e µg/ µg de creatinina.

Metabolito	Valores experimentais ^d				Valores da literatura ^e			Referência
	Concentração (µg/mL) ^a		Concentração (µg/µg creatinina)		Concentração (µg/mL) ^a	Concentração (µg/µg creatinina)		
	Controlo	Asma	Controlo	Asma	Controlo	Controlo	Asma	
Ácido aconítico ^b	16,13 - 108,26	16,41 - 155,51	0,069 - 0,156	0,443 - 1,915	-----	0,001 - 0,147	-----	(62)
Ácido cítrico ^b	124,25-508,18	103,11 - 717,17	0,371 - 0,844	2,535 - 6,151	-----	0,083 - 1,019	-----	(62)
Ácido glucónico ^c	3,69 - 23,20	5,68 - 49,17	0,015 - 0,036	0,150 - 0,315	-----	0,014 - 0,046	-----	(62)
Ácido hexadecanóico ^c	0,80 - 29,59	1,36 - 42,11	0,009 - 0,045	0,343 - 0,867	-----	0,006 - 0,055	-----	(62)
Ácido treónico ^c	23,36 - 197,53	13,46 - 330,65	0,079 - 0,271	1,051 - 2,105	-----	0,010 - 0,043	-----	(62)
Alanina ^{b, c}	10,34 - 42,62	21,79 - 94,88	0,024 - 0,031	0,183 - 0,231	1,74 - 95,56	0,019 - 0,034	0,032 - 0,098	(62,130)
Creatinina ^c	378,65-937,50	383,32 - 1291,00	-----	-----	300,00-3000,00	-----	-----	(74)
Glucose ^c	1,24 - 47,38	1,28 - 135,02	0,026 - 0,057	0,606 - 1,744	-----	0,016 - 0,090	-----	(62)
Manitol ^b	16,27 - 140,79	4,79 - 167,94	0,032 - 0,204	0,486 - 2,478	-----	0,008 - 0,137	-----	(62)
Manose ^c	115,21-203,98	6,54 - 184,68	0,435 - 0,787	0,015 - 0,176	-----	0,000 - 0,004	-----	(62)
Mio-inositol ^{b, c}	5,12 - 51,45	10,14 - 108,48	0,017 - 0,022	0,352 - 1,826	-----	0,008 - 0,024	0,021 - 0,078	(30,62)
Treonina ^{b, c}	3,24 - 52,11	1,62 - 86,17	0,011 - 0,071	0,418 - 1,073	1,23 - 59,35	0,007 - 0,027	-----	(62)
Xilose ^c	12,22 - 87,02	12,40 - 157,37	0,048 - 0,133	0,040 - 0,134	-----	0,004 - 0,135	-----	(62)

^a equivalentes de padrão interno

^b concentrações obtidas por RMN

^c concentrações obtidas por GC-MS

^d idades entre 3 e 79 anos

^e idades entre 19 e 67 anos

A análise das amostras de urina por GC-qMS permitiu detetar e identificar 35 metabolitos pertencentes às famílias alvo em estudo: 4 aminoácidos, 6 ácidos orgânicos, 2 ácidos gordos e 23 açúcares (**Tabela 13**).

Tabela 13 – Metabolitos detetados por GC-qMS, em urinas de indivíduos asmáticos e saudáveis.

TR ^a (min)	Metabolito ^b	Identificação ^c
3,9	Alanina	A
4,2	Glicina	A
10,2	L-Treonina	A
11,3	Ácido 3,4-dihidroxiбутанóico	A
12,4	L-5-Oxoprolina	A
13,5	Creatinina	B
13,6	Treitol	A
14,2	Ácido treónico	A
15,8	Arabinose	B
16,1	Ácido 2,3-dihidroxiбутanedióico	B
16,4	Ribose	B
16,8	Ácido 3,4,5- trihidroxipentanóico	A
17,6	Xilopiranose	A
18,0	Ácido aconítico	A
18,4	Arabitol	A
18,5	Ribitol	A
19,1	Ácido ribónico	A
20,0	Ácido cítrico	B
20,1	Manose	B
20,2	Frutose	B
21,5	Tagatose	A
21,6	Galactose	B
21,8	Sorbose	A
21,9	Glucose	B
22,5	Manitol	B
22,6	Sorbitol	B
23,0	Ácido galacturónico	B
23,1	Ácido glucónico	A
23,4	Ácido hexadecanóico	B
23,6	Xilose	B

TR ^a (min)	Metabolito ^b	Identificação ^c
23,7	Ácido galactónico	A
24,4	Inositol	A
25,3	Mio-inositol	A
26,9	Ácido octadecanóico	B
36,0	Maltose	B

^a tempo de retenção

^b os metabolitos foram identificados como derivados TMS

^c identificação dos metabolitos usando: **A** - bases de dados comerciais + RI; **B** - bases de dados comerciais + RI + co-injeção de padrão

Aos 35 metabolitos detetados realizou-se uma quantificação com os dados expressos em equivalentes de padrão interno. Efetuou-se um teste estatístico através do cálculo do p-value (com 99% de confiança), de modo a avaliar a significância estatística da diferença das concentrações obtidas e o sentido de variação de cada metabolito quando se comparam os grupos controlo *vs* asma + alergia. Os resultados são organizados por família química: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares (**Figuras 12,13,14 e 15**). No Anexo III encontram-se os resultados obtidos quando a abordagem passa pela organização dos indivíduos em três grupos distintos (controlo *vs* alergia *vs* asma).

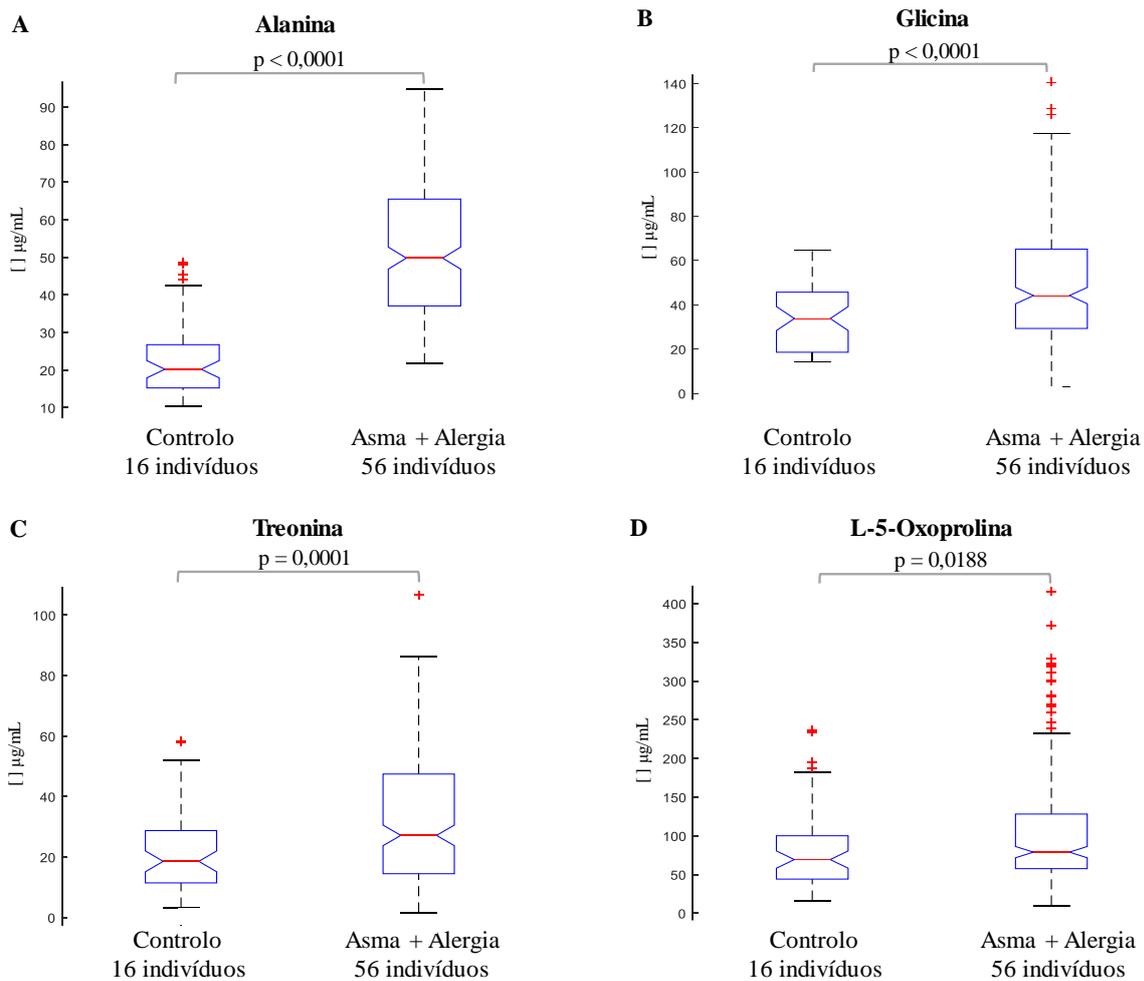


Figura 12 – Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos aminoácidos: **(A)** Alanina; **(B)** Glicina; **(C)** Treonina; **(D)** L-5-oxoprolina. O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.

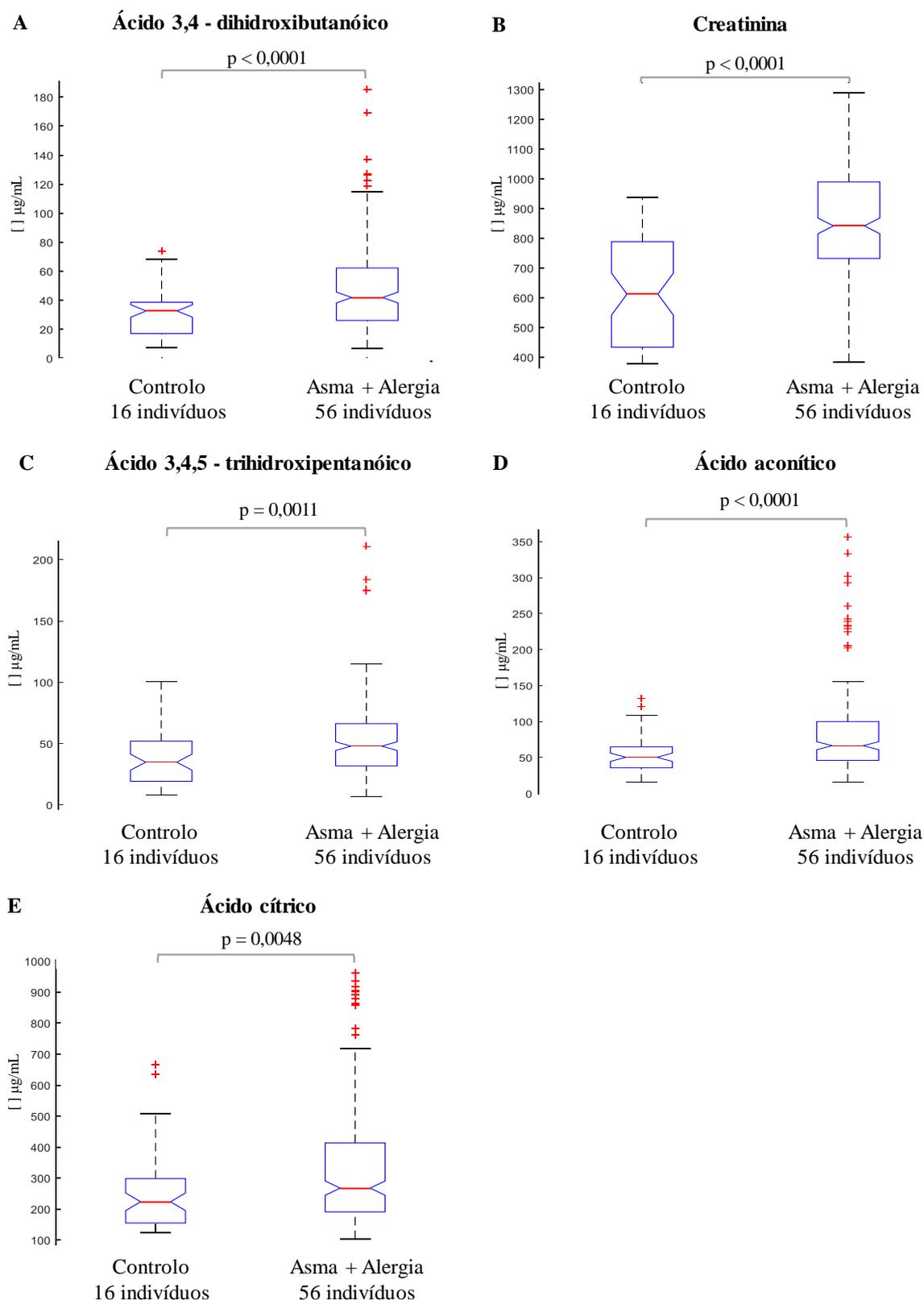


Figura 13 - Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos ácidos orgânicos: **(A)** Ácido 3,4 - dihidroxibutanóico; **(B)** creatinina; **(C)** Ácido 3,4,5 - trihidroxipentanóico; **(D)** Ácido aconítico; **(E)** Ácido cítrico; O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.

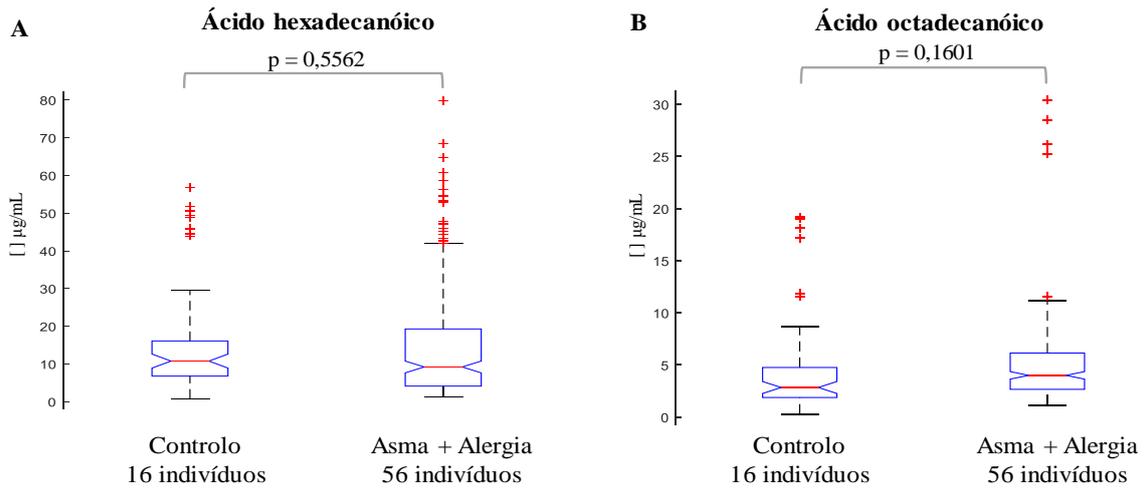
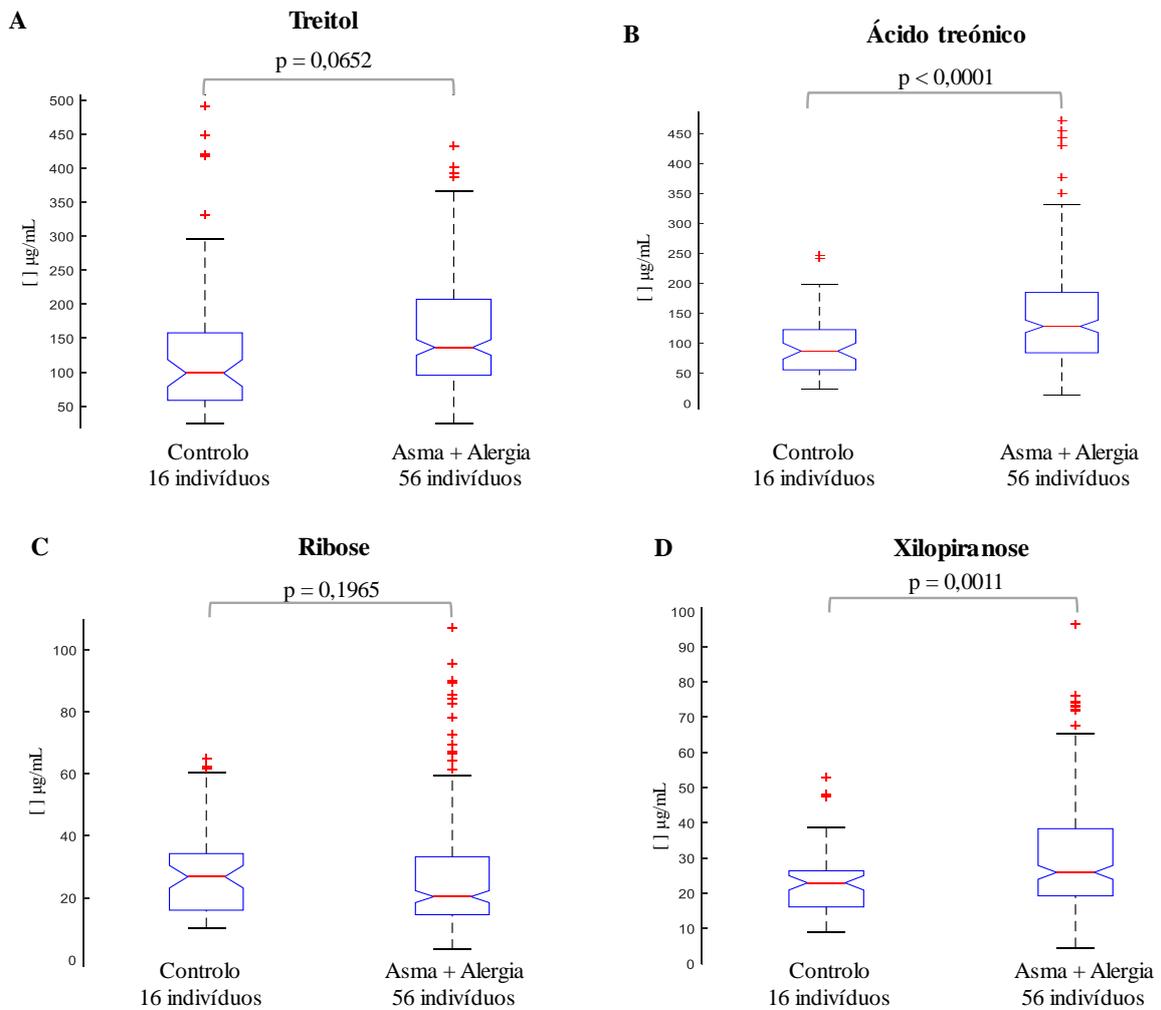
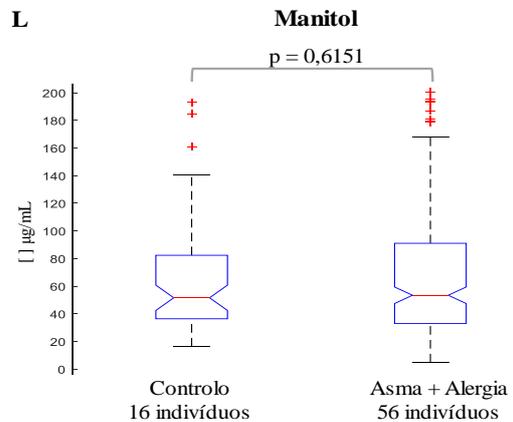
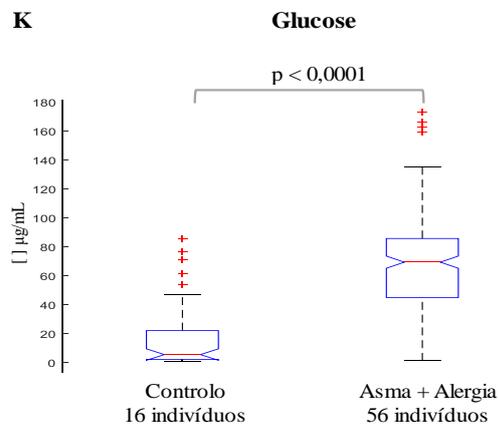
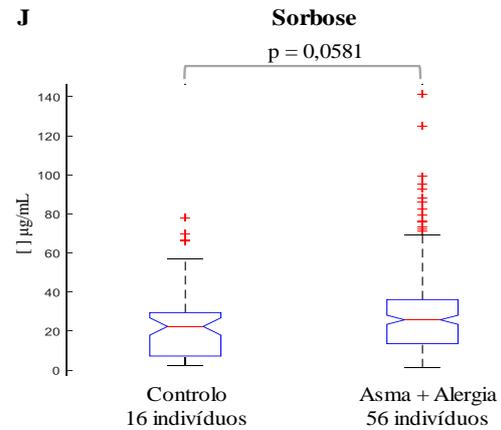
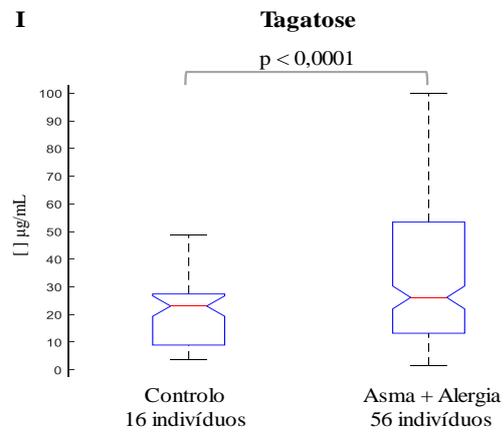
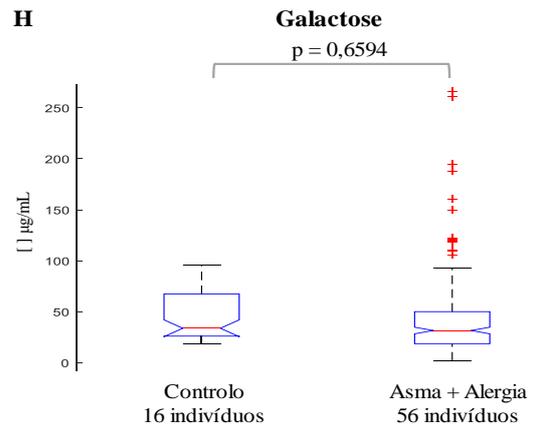
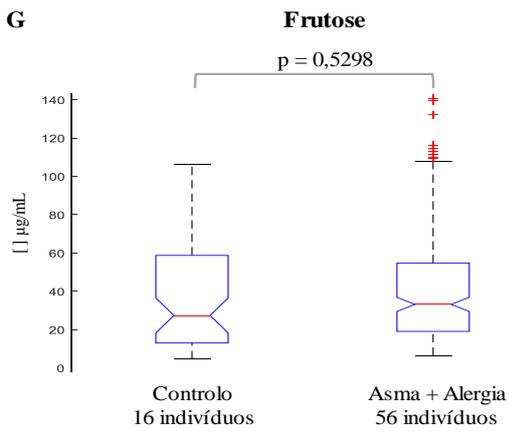
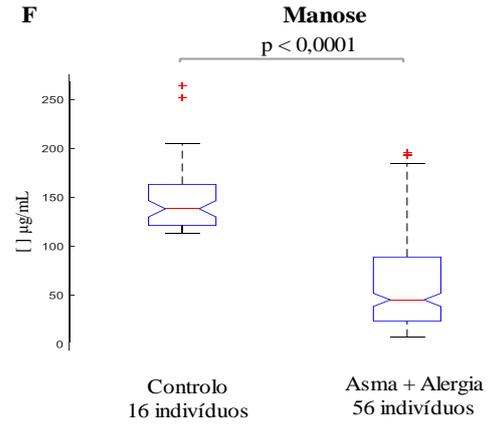
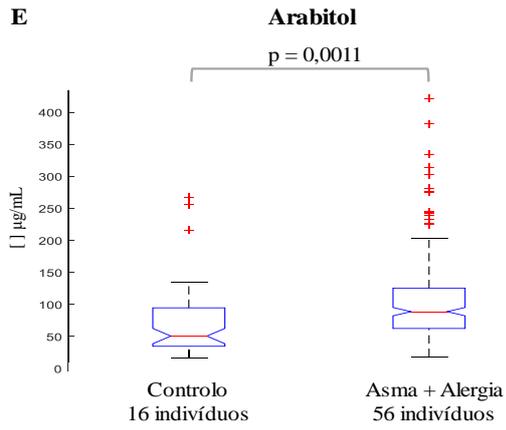


Figura 14 – Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos ácidos gordos: **(A)** Ácido hexadecanoico; **(B)** Ácido octadecanoico. O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.





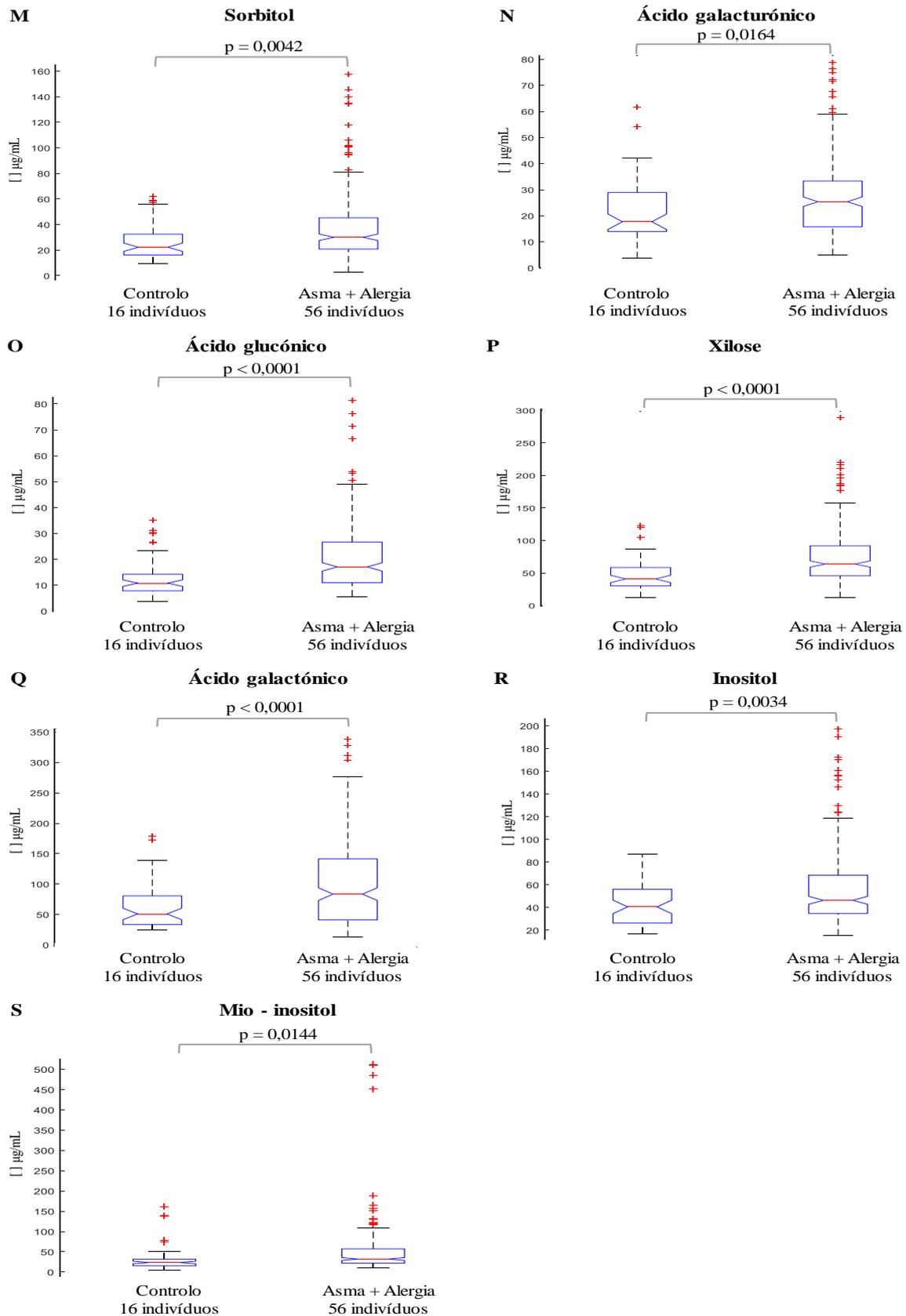


Figura 15 - Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos açúcares: (A) Treitol; (B) Ácido treónico; (C) Ribose; (D) Xilopirranose; (E) Arabitol; (F) Manose; (G) Frutose; (H) Galactose; (I) Tagatose; (J) Sorbose; (K) Glucose; (L) Manitol (M) Sorbitol (N) Ácido galacturónico (O) Ácido glucónico (P) Xilose (Q) Ácido galactónico (R) Inositol (S) Mio-inositol. O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.

Com base na **Figura 12**, relativa à família dos aminoácidos, verifica-se que, à exceção da L-5-oxoprolina, os restantes metabolitos representados surgem significativamente elevados nos indivíduos asmáticos e alérgicos. A mesma tendência é observada na família dos ácidos orgânicos, **Figura 13**, revelando diferenças significativas nos teores de todos os metabolitos entre ambos os grupos de indivíduos. Contrariamente, na **Figura 14**, onde estão representados os ácidos gordos, não se verificaram diferenças significativas em nenhum dos metabolitos. Por fim, a **Figura 15** que contempla a família dos açúcares, demonstra que os metabolitos ácido treónico, xilopirranose, arabitol, manose, tagatose, glucose, sorbitol, ácido glucónico, xilose, ácido galactónico e inositol apresentam concentrações significativamente diferentes entre os grupos em estudo. A manose apresenta concentrações mais baixas nos indivíduos asmáticos, enquanto que os metabolitos ácido treónico, xilopirranose, arabitol, tagatose, glucose, sorbitol, ácido glucónico, xilose, ácido galactónico e inositol surgem com concentrações mais elevadas nos indivíduos asmáticos, independentemente de no grupo de amostras de asma estarem incluídos um grupo de 19 indivíduos apenas com alergia. No anexo III pode-se verificar que ao separar este último grupo de indivíduos em dois grupos distintos (asma e alergia) menos de metade da totalidade de metabolitos detetados revelaram concentrações significativamente diferentes, sendo eles, alanina, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, frutose, manitol, arabitol, sorbose e xilose.

Um dos fatores de confusão presentes neste trabalho é a ampla gama de idades dos indivíduos em estudo, dado que em diferentes fases da vida há um conjunto de alterações metabólicas associadas, independentemente de se tratar de um indivíduo saudável ou com determinada patologia. Estas alterações ocorrem a nível do sistema respiratório, cardiovascular, músculo-esquelético, nervoso, endócrino, imunológico, e ainda ao nível da composição corporal. Por exemplo, ocorrem modificações na função mitocondrial, onde uma redução da integridade funcional das mitocôndrias leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio e conseqüentemente a danos celulares (131). Assim, de modo a minimizar o efeito de fatores de confusão inerentes à amostragem deste trabalho, selecionou-se um conjunto de 34 amostras (9 C e 35 A+AL) de indivíduos com uma gama de idades compreendida entre os 10 e os 30 anos. Esta população era constituída por 19 mulheres e 16 homens, onde 59% tomava medicação e 20% tinha co-patologias. Relativamente ao tratamento estatístico, seguiu-se a mesma abordagem feita previamente para a matriz que incluía todas as idades (ANOVA e cálculo do *p-value* com 99% de confiança, com representação em *boxplots*) (**Figuras 16, 17, 18 e 19**).

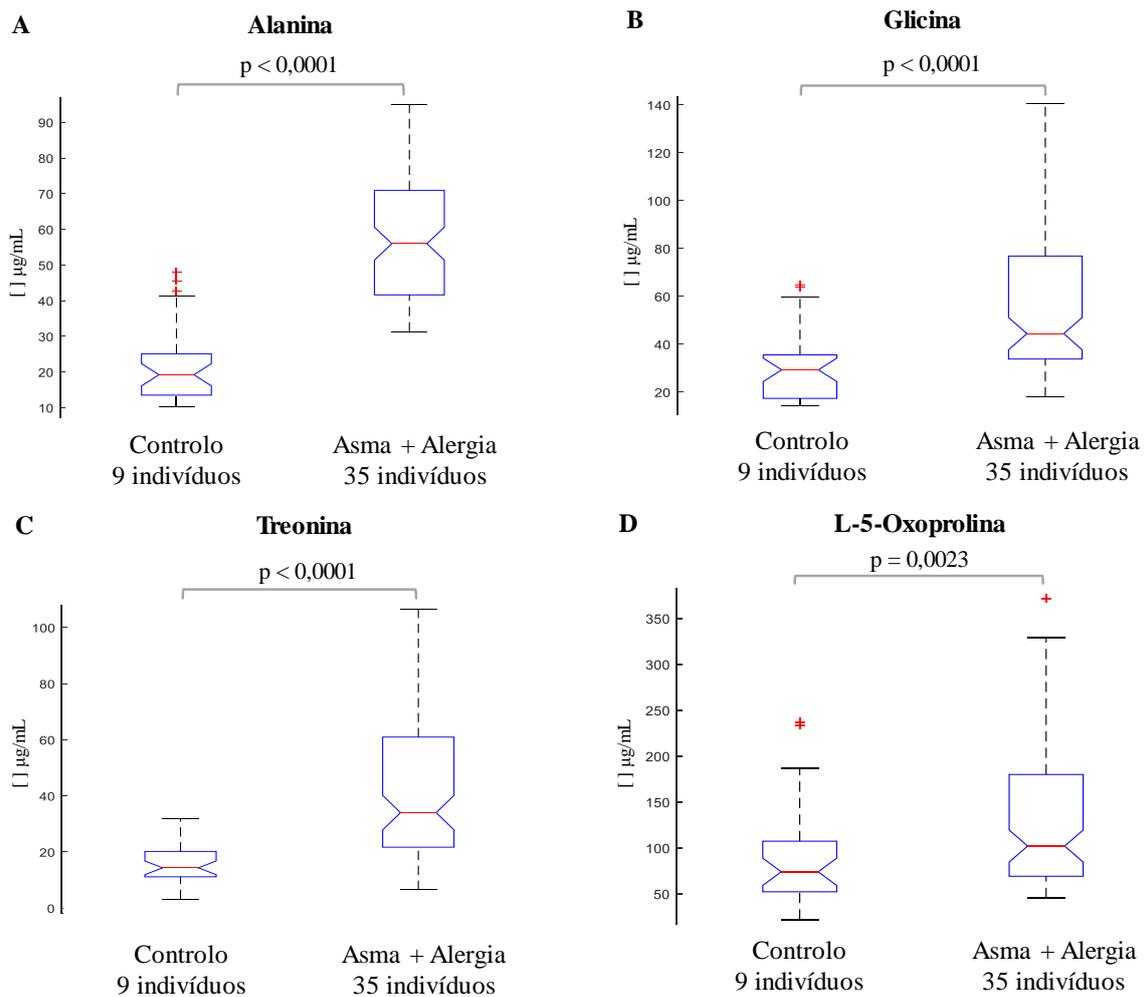


Figura 16 – Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos aminoácidos para idades compreendidas entre os 10 e os 30 anos: (A) Alanina; (B) Glicina; (C) Treonina; (D) L-5-oxoprolina. O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.

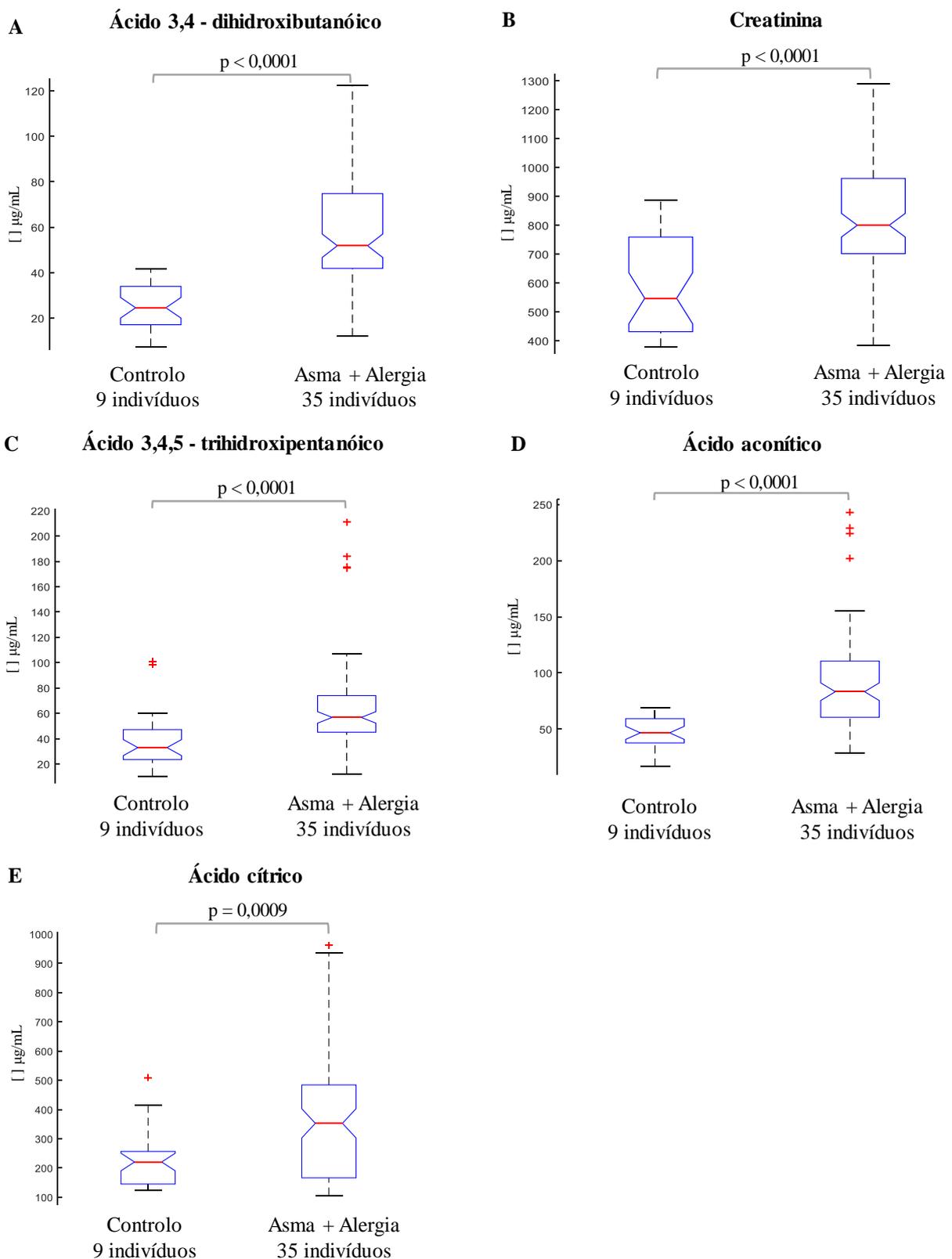


Figura 17 - Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos ácidos orgânicos gordos para idades compreendidas entre os 10 e os 30 anos: **(A)** Ácido 3,4 - dihidroxibutanóico; **(B)** creatinina; **(C)** Ácido 3,4,5 - trihidroxipentanóico; **(D)** Ácido aconítico; **(E)** Ácido cítrico; O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.

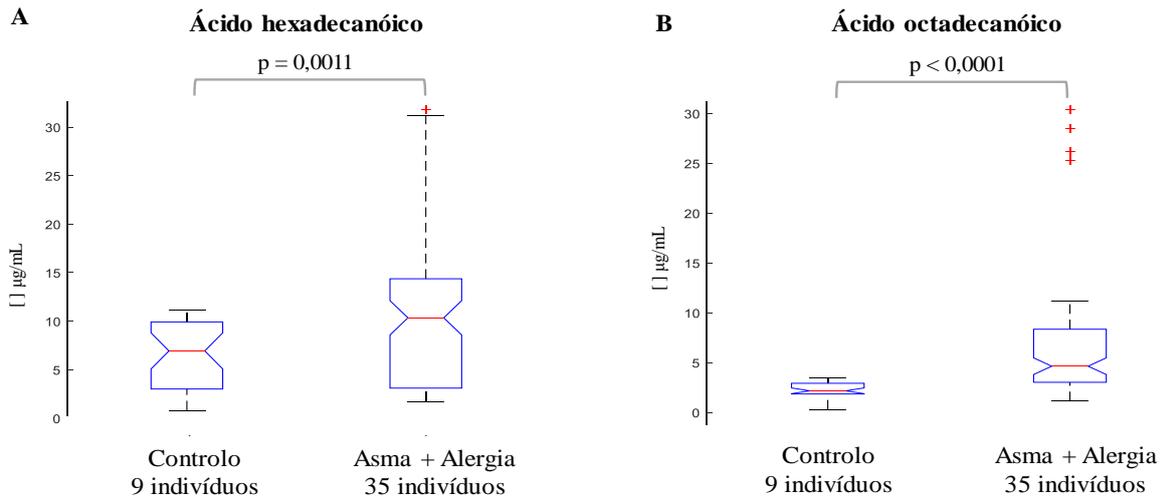
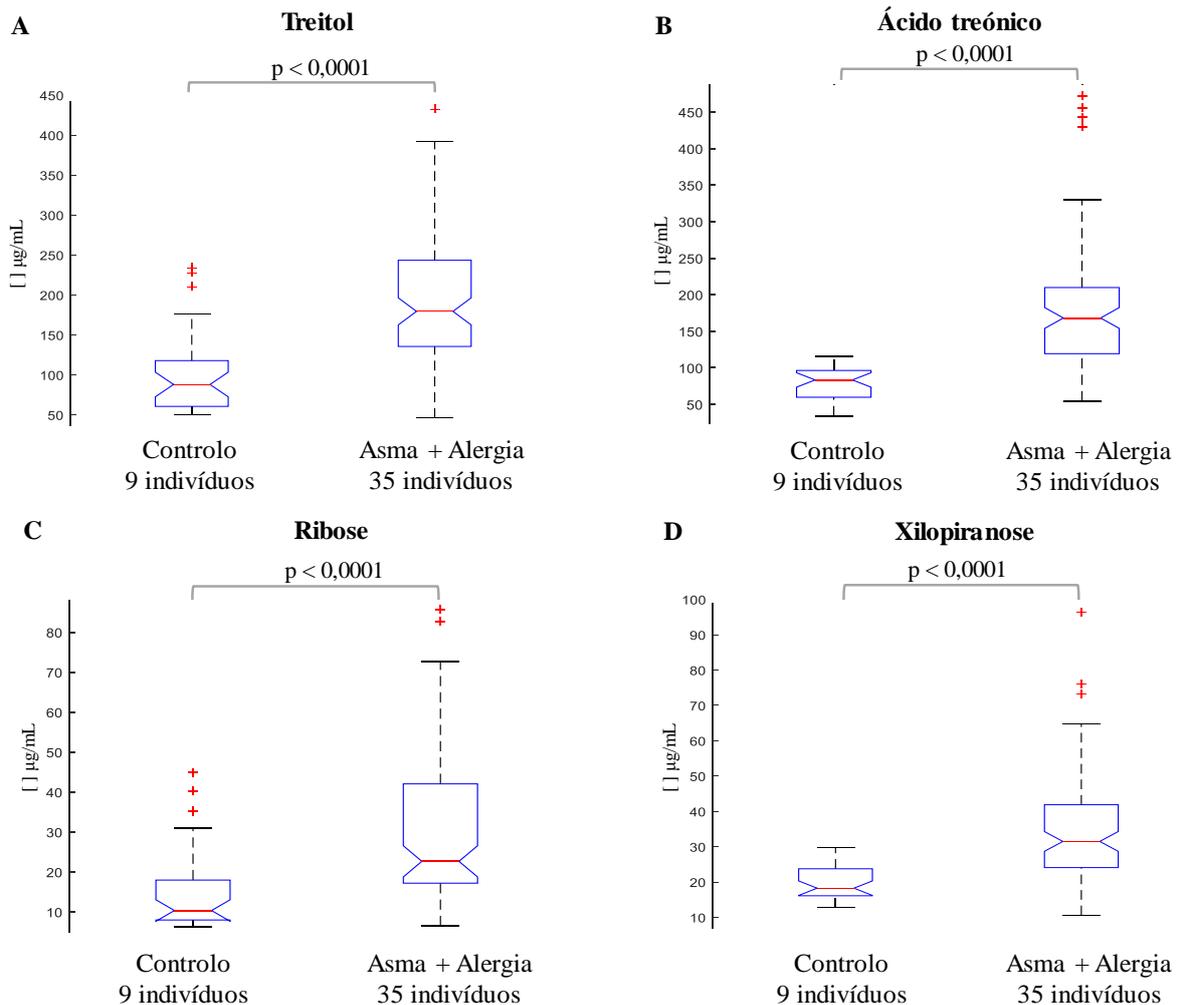
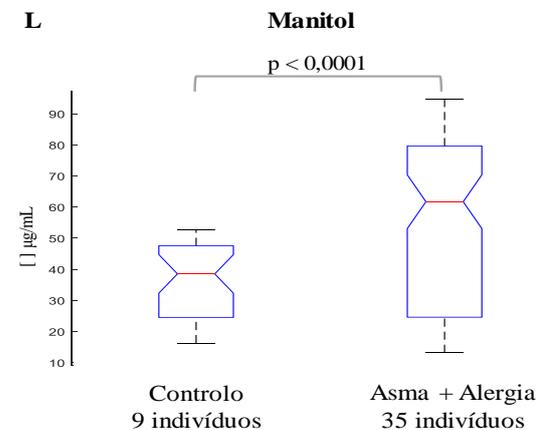
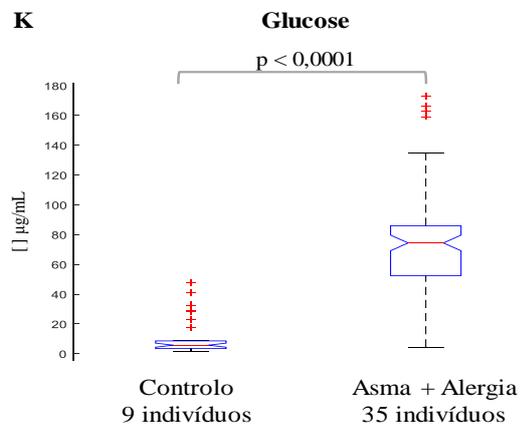
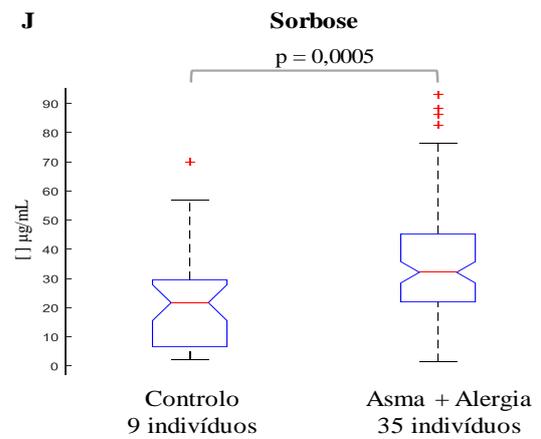
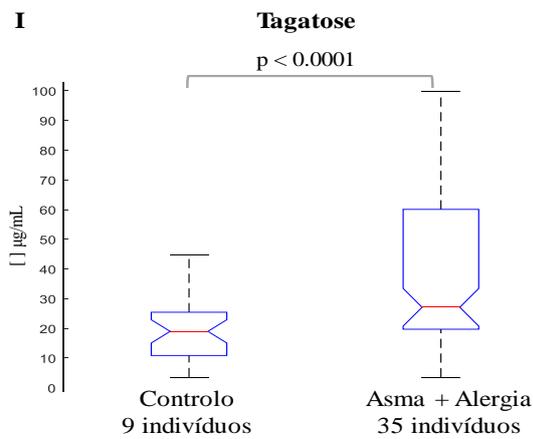
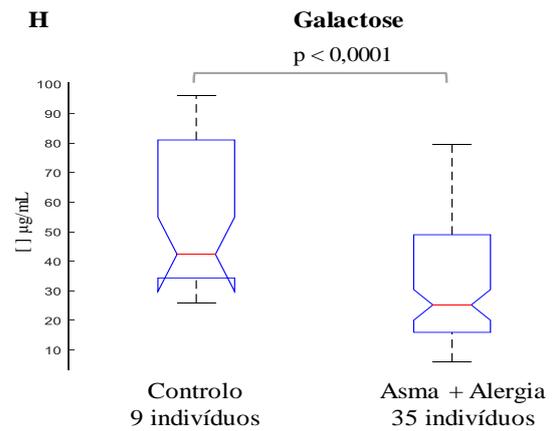
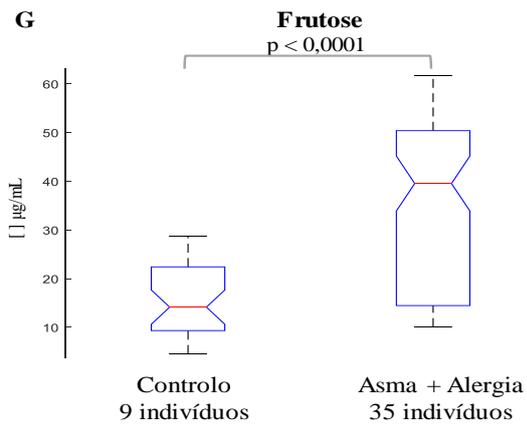
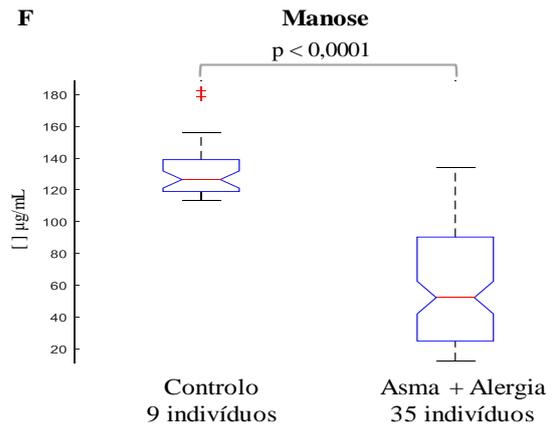
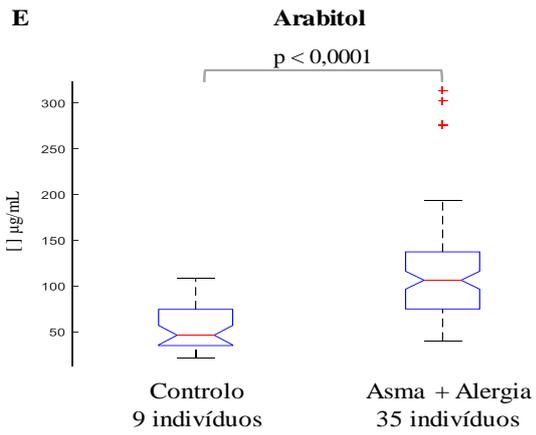


Figura 18 – Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos ácidos gordos para idades compreendidas entre os 10 e os 30 anos: **(A)** Ácido hexadecanóico; **(B)** Ácido octadecanóico. O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.





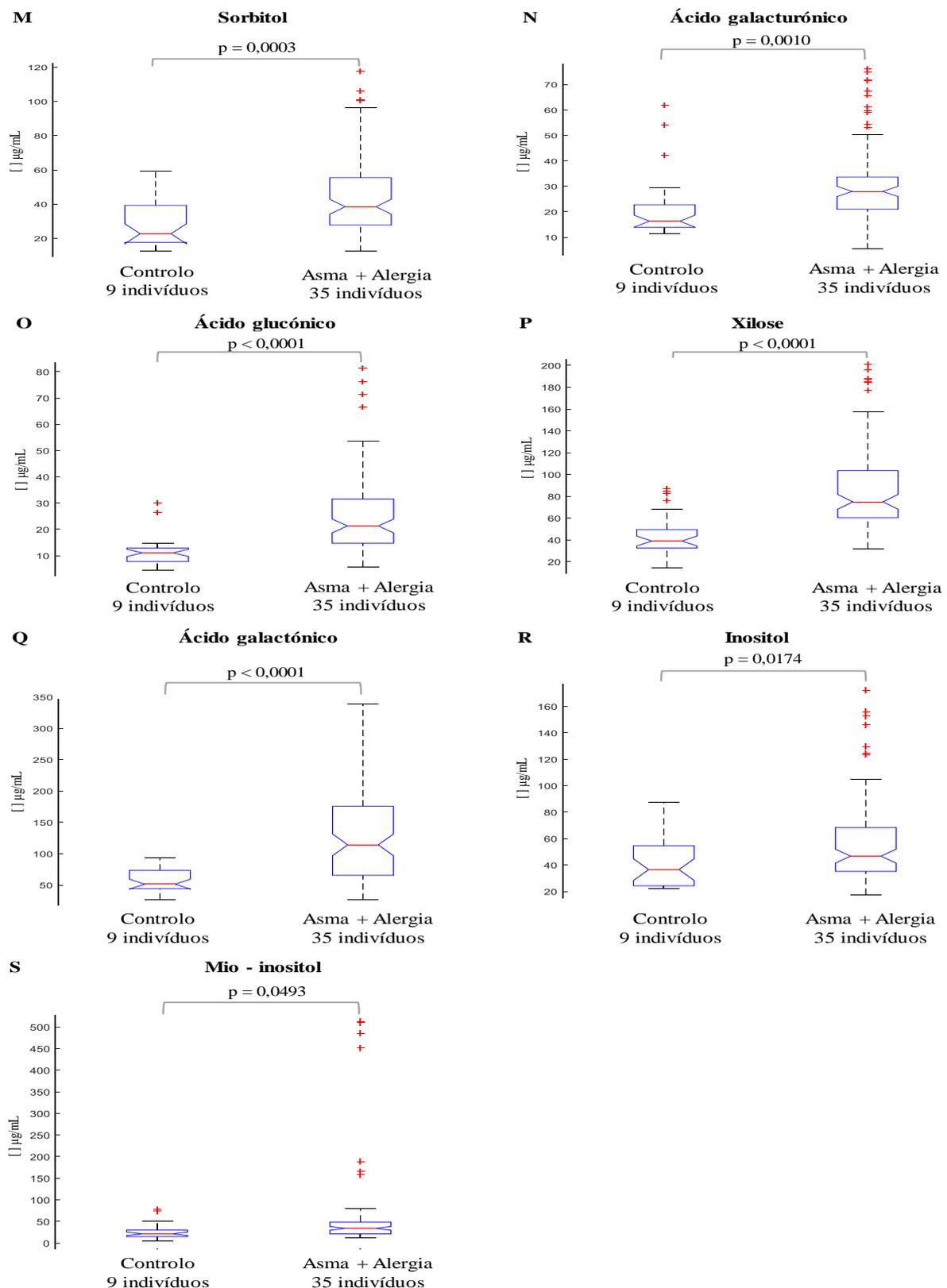


Figura 19 - Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos pertencentes à família dos açúcares para idades compreendidas entre os 10 e os 30 anos: (A) Treitol; (B) Ácido treónico; (C) Ribose; (D) Xilopirranose; (E) Arabitol; (F) Manose; (G) Frutose; (H) Galactose; (I) Tagatose; (J) Sorbose; (K) Glucose; (L) Manitol (M) Sorbitol (N) Ácido galacturónico (O) Ácido glucónico (P) Xilose (Q) Ácido galactónico (R) Inositol (S) Mio-inositol. O valor de *p-value* indica significância estatística se $p < 0,01$.

Pelo facto de a condutividade e a creatinina estarem reportadas na literatura como sendo parâmetros de normalização da urina, as concentrações dos metabolitos foram normalizadas pelos respetivos valores de condutividade e teor de creatinina, com o objetivo de verificar se poderia ou não incrementar as diferenças entre os grupos através do aumento do número de metabolitos diferenciadores entre os grupos.

A **Tabela 14** apresenta de forma sucinta as tendências de variação da concentração de cada metabolito, a significância estatística, a via metabólica associada e a respetiva relevância biológica.

Tabela 14 - Metabolitos com concentrações alteradas em indivíduos asmáticos, sentido de variação observado, significância estatística (*p-value*), via metabólica associada e respetiva relevância biológica.

Metabolito	Via metabólica envolvida	Sentido de variação observado ^a		Significância estatística ^b						Relevância biológica	
				[µg/mL] ^c		[µg/mL], com normalização pela condutividade ^d		[µg/mL], com normalização pela creatinina ^e			
		3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos		
Alanina	Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato/ Gluconeogénese	↑	↑	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	Aumenta como parte da gluconeogénese	(30,132)
Glicina	Metabolismo da glicina, serina e treonina/Metabolismo da glutatona	↑	↑	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	----	----	----	----	Efeito protetor nos níveis de glutatona	(57)
Treonina	Metabolismo da glicina, serina e treonina	↑	↑	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	----	<i>p</i> = 0,0002	----	<i>p</i> < 0,0001	Associada a alterações no metabolismo da glicina	(46)
L-5-Oxoprolina	Metabolismo da glutatona	----	↑	----	<i>p</i> = 0,0023	----	----	----	----	Associada ao aumento do stress oxidativo	(133–135)
Ácido 3,4-dihidroxibutanóico	-----	↑	↑	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	----	<i>p</i> < 0,0001	----	<i>p</i> < 0,0001	-----	-----
Creatinina	Metabolismo da creatina	↑	↑	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> = 0,0009	<i>p</i> < 0,0001	----	----	Aumento da necessidade energética	(20)
Ácido 3,4,5-trihidroxipentanóico	-----	↑	↑	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	----	----	----	----	-----	-----
Ácido aconítico	Ciclo de Krebs	↑	↑	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> < 0,0001	----	<i>p</i> = 0,010	----	----	Associado ao stress hipóxico	(136)
Ácido cítrico	Ciclo de Krebs	↑	↑	<i>p</i> = 0,0048	<i>p</i> = 0,0009	<i>p</i> = 0,0004	<i>p</i> < 0,0001	----	----	Associado ao stress hipóxico	(136)
Ácido hexadecanóico	Metabolismo dos ácidos gordos	----	↑	----	<i>p</i> = 0,0011	----	----	----	<i>p</i> < 0,0001	Peroxidação lipídica	(137)
Ácido octadecanóico	Metabolismo dos ácidos gordos	----	↑	----	<i>p</i> < 0,0001	----	<i>p</i> = 0,0019	----	<i>p</i> < 0,0001	Peroxidação lipídica	(137)

Metabolito	Via metabólica envolvida	Sentido de variação observado ^a		Significância estatística ^b						Relevância biológica
				[µg/mL] ^c		[µg/mL], com normalização pela condutividade ^d		[µg/mL], com normalização pela creatinina ^e		
		3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos	
Treitól	Relacionado com a eritrulose	----	↑	----	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0013$	----	----	-----
Ácido galactónico	Metabolismo da galactose	↑	↑	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0008$	----	----	Associado ao aumento do stress oxidativo (138)
Ácido treónico	Catabolismo do ascorbato	↑	↑	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	----	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0031$	Associado ao aumento do stress oxidativo (139,140)
Ribose	Via das pentoses fosfato	----	↑	----	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0005$	----	----	-----
Xilopirranose	-----	↑	↑	$p = 0,0011$	$p < 0,0001$	$p = 0,0007$	$p < 0,0001$	----	----	-----
Frutose	Metabolismo da frutose e manose/Glicólise	----	↑	----	$p < 0,0001$	----	----	----	----	-----
Arabitol	Interconversão de pentoses	↑	↑	$p = 0,0011$	$p < 0,0001$	----	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0063$	Convertido num intermediário da via das pentoses fosfato
Manitol	Metabolismo da frutose e manose	----	↑	----	$p < 0,0001$	----	----	----	----	-----
Tagatose	Metabolismo da galactose	↑	↑	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0079$	----	----	-----
Sorbose	Metabolismo da frutose e manose	----	↑	----	$p = 0,0005$	----	----	----	----	-----
Glucose	Glicólise/ via das pentoses fosfato	↑	↑	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	Ativação das células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ /necessidade energética (20,132)
Sorbitol	Metabolismo da galactose/ Metabolismo da frutose e manose	↑	↑	$p = 0,0042$	$p = 0,0003$	$p = 0,0074$	$p < 0,0001$	----	----	Aumento da actividade enzimática da aldose redutase (141)
Ácido glucónico	Via das pentoses fosfato	↑	↑	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0046$	----	----	----- (47)

Metabolito	Via metabólica envolvida	Sentido de variação observado ^a		Significância estatística ^b						Relevância biológica	
				[µg/mL] ^c		[µg/mL], com normalização pela condutividade ^d		[µg/mL], com normalização pela creatinina ^e			
		3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos	3-79 anos	10-30 anos		
Xilose	Interconversão de pentoses	↑	↑	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	----	$p < 0,0001$	----	----	Convertido num intermediário da via das pentoses fosfato	-----
Galactose	Metabolismo da galactose	----	↓	----	$p < 0,0001$	----	$p = 0,0038$	----	----	Aumento da necessidade energética	(20)
Manose	Metabolismo da galactose/ Metabolismo da frutose e manose	↓	↓	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,0026$	$p < 0,0001$	----	----	Aumento da necessidade energética	(20,142)

^a em relação aos indivíduos saudáveis (controlo)

^b apenas se indicam os valores de *p-value* para os casos em que se observam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

^c concentrações expressas em equivalentes de padrão interno (metil-D3-ácido mirístico)

^d concentrações expressas em equivalentes de padrão interno normalizadas pela condutividade

^e concentrações expressas em equivalentes de padrão interno normalizadas pela creatinina

Através da análise estatística efetuada para a gama de idades dos 10 aos 30 anos e com base na análise das **Figuras 16 a 19** e na **Tabela 14** verifica-se um aumento do número de metabolitos com concentrações significativamente diferentes entre os grupos em estudo, assim como um maior grau de confiança. Mais concretamente, verifica-se na **Figura 16**, referente aos aminoácidos, que os metabolitos surgem todos significativamente elevados nos indivíduos asmáticos e alérgicos em relação aos controlos, tendo obtido um grau de confiança igual ou superior aos obtidos na análise global. A mesma tendência é verificada na **Figura 17**, relativa aos ácidos orgânicos. Relativamente à **Figura 18** e contrariamente ao que se verificou aquando a análise dos resultados para a gama total de idades, ambos os ácidos gordos revelaram diferenças significativas nas suas concentrações, encontrando-se mais elevados nos indivíduos asmáticos e alérgicos. Por fim, a **Figura 19** referente aos açúcares, demonstra que à exceção do inositol e do mio-inositol, todos os outros metabolitos apresentam diferenças significativas entre os grupos. Os metabolitos manose e galactose surgem com concentrações mais baixas nos indivíduos asmáticos e alérgicos, enquanto que os restantes apresentam concentrações mais elevadas nesses mesmos indivíduos. Relativamente à significância estatística, também neste caso os valores de *p-value* foram significativos, sendo que para os metabolitos que já tinham demonstrado diferenças significativas na análise global, o valor de *p-value* manteve-se igual e em alguns casos (xilopirranose, arabitol e sorbitol) até diminuiu. Verifica-se assim que nesta análise para as idades compreendidas entre os 10 e os 30 anos, além dos 19 metabolitos que já tinham apresentado diferenças significativas, obteve-se significância estatística para mais 9 metabolitos (L-5-oxoprolina, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, treitol, ribose, frutose, manitol, sorbose e galactose). Assim, um total de 28 metabolitos apresentou diferenças significativas entre os grupos objeto de estudo, o que demonstra a influência de potenciais fatores de confusão, neste caso a idade.

Relativamente à normalização das concentrações dos metabolitos pelo respetivo valor de condutividade e teor de creatinina, verifica-se após o cálculo do *p-value* que ambos os parâmetros tiveram como resultado um menor número de metabolitos significativamente diferentes entre os grupos. Ou seja, a combinação destes domínios de informação não permitiu incrementar as diferenças no número de metabolitos diferenciadores entre os grupos, pelo que não se explorou esta abordagem. De modo a estudar esta relação entre a doença e as alterações que conduzem à obtenção de um perfil metabólico diferente do de um individuo saudável, criou-se a **Figura 20** que relaciona os metabolitos detetados com as diferentes vias metabólicas nas quais estão envolvidos, permitindo uma abordagem integrada de várias vias metabólicas.

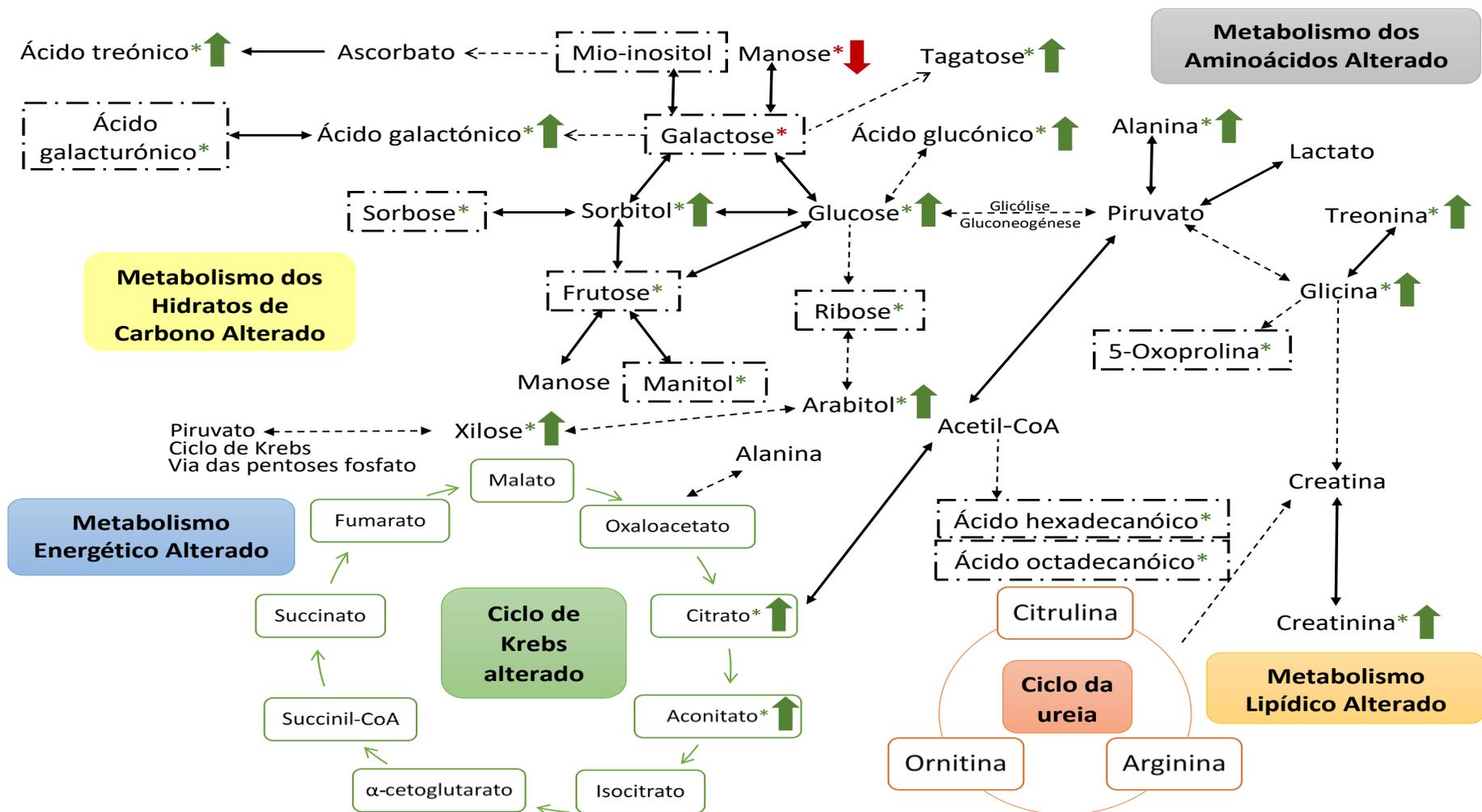


Figura 20 – Principais vias metabólicas associadas aos metabolitos que se revelaram alterados em indivíduos asmáticos em relação a indivíduos saudáveis (controlo). **Seta e * verdes** – concentrações elevadas nos indivíduos asmáticos considerando a gama total de idades e as idades compreendidas entre os 10 e 30 anos, respetivamente; **Seta e * vermelhos** – concentrações diminuídas nos indivíduos asmáticos considerando a gama total de idades e as idades compreendidas entre os 10 e 30 anos, respetivamente. Os metabolitos delimitados a **preto** não apresentaram diferenças significativas nas suas concentrações aquando a análise para a gama total de idades.

Com base na informação compilada na **Tabela 14** e na **Figura 16** verifica-se que as vias metabólicas envolvidas na distinção entre os indivíduos asmáticos e os saudáveis sugerem uma desregulação em vários processos bioquímicos, nomeadamente no metabolismo dos aminoácidos, metabolismo energético, metabolismo lipídico e metabolismo dos hidratos de carbono, associados a fenómenos de stress oxidativo.

Começa-se por verificar o aumento dos níveis de **creatinina** nos indivíduos asmáticos, os quais advêm da grande necessidade de energia das vias aéreas inflamadas, promovendo o metabolismo energético através do ciclo da ureia (20). Já os níveis mais elevados de **ácido treónico** nos indivíduos asmáticos estão relacionados com o facto de este ser um produto da degradação do ascorbato, que a par da glutathione é um dos antioxidantes maioritários presentes no tecido pulmonar. Assim, o ascorbato possui efeito protetor contra danos oxidativos que podem advir da ativação de fagócitos pulmonares pela resposta inflamatória (140). Como já foi referido, o aumento do stress oxidativo provoca alterações nos níveis de antioxidantes (143). Já se encontra reportado na literatura baixas concentrações de ascorbato no fluído de revestimento pulmonar de indivíduos com asma leve, bem como grandes quantidades de glutathione oxidada, revelando a propensão destes indivíduos para o aumento do stress oxidativo (139). Por sua vez, os açúcares atuam como fontes de energia nas células pulmonares, surgindo, em estudos prévios, com concentrações mais reduzidas em indivíduos asmáticos. No caso da **galactose** e da **manose**, que também neste trabalho revelaram menores concentrações nos indivíduos asmáticos, já se observou previamente que estão inversamente relacionadas com os níveis de eosinófilos e neutrófilos, sugerindo que estas células inflamatórias podem estar associadas à redução dos teores de galactose e manose (20). Além disso, a manose demonstrou exercer efeitos anti-inflamatórios nas células pulmonares contra a lesão induzida por lipopolissacarídeos (142). O **inositol** e o **ácido glucónico**, que aparecem mais elevados em indivíduos asmáticos, já estão reportados na literatura como metabolitos que apresentam alterações em vias aéreas com inflamação, no entanto as suas funções em doenças alérgicas ainda não foram bem elucidadas (47). Por sua vez, o **ácido galactónico** encontra-se mais elevado nos indivíduos asmáticos e resulta da oxidação do carbono 6 da galactose. Esta tendência nos indivíduos asmáticos reflete o aumento dos produtos de oxidação dos açúcares que podem advir dos elevados níveis de stress oxidativo que se verificam nestes indivíduos (138). O **arabitol**, formado a partir da redução da arabinose, e a **xilose** podem ser convertidos em xilulose-5-fosfato, composto intermediário da via das pentoses fosfato. Esta via leva à produção de NADPH, que protege contra o stress oxidativo através da regeneração da glutathione reduzida (GSH) a partir da sua forma oxidada (GSSG) (144). Por sua vez, surge o **sorbitol** com a sua concentração mais aumentada em

indivíduos asmáticos comparativamente aos controlos, provavelmente devido à elevada actividade da enzima aldose redutase. Esta possibilita a conversão de glucose em sorbitol pela via dos polióis, mecanismo através do qual os elevados níveis de glucose podem induzir stress oxidativo, levando a uma acumulação excessiva de ROS (141). Tal facto é sustentado pelo mecanismo subjacente à via dos polióis, pois a conversão de glucose em sorbitol implica a depleção de NADPH e uma vez que este é essencial para a produção de GSH, esta diminuição de NADPH pode prejudicar a defesa antioxidante. Além disso, o sorbitol pode ser convertido em frutose, ocorrendo simultaneamente a conversão de NAD^+ em NADH, o que pode levar à produção de aniões superóxido através da NADH oxidase (141). A atividade catalítica da aldose redutase desempenha um papel em várias doenças inflamatórias, como é o caso da asma (145). Um estudo efetuado em 2009 demonstrou que a inibição da aldose redutase impediu a inflamação das vias aéreas em ratos com asma induzida por alérgenos (146). A ativação das células T CD4^+ e CD8^+ levam ao aumento da absorção de **glucose**, regulam positivamente a glicólise e a síntese lipídica, de modo a permitir o seu rápido crescimento e proliferação. Assim, a glucose através da via das pentoses fosfato gera **ribose** e NADPH, e pelo ciclo de Krebs é convertida em citrato para a síntese lipídica. Ocorre ainda a produção de lactato, como sendo um subproduto da glicólise (132).

Os aminoácidos alanina, glicina e treonina encontram-se aumentados nos indivíduos asmáticos comparativamente aos controlos. Como referido anteriormente, a ativação das células T em indivíduos com asma produz elevados níveis de lactato (132). Quando este é produzido, os níveis de **alanina** aumentam como parte da gluconeogénese (30). A envolvimento do metabolismo da glutathione em processos inerentes à asma também já foi referida previamente. A primeira reação que sustenta a biossíntese da glutathione é a formação de uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína, originando γ -glutamilcisteína. Por sua vez esta liga-se à glicina pela ação da glutathione sintetase, gerando assim a glutathione (147). Esta participa em reações que envolvem a síntese de proteínas e ácidos nucleicos e em reações de inativação de radicais livres (148). A glutathione é o principal antioxidante produzido pelas células, sendo o poder antioxidante a sua principal função, protegendo as células de radicais livres através da desativação dos mesmos. Nas células, a glutathione está presente maioritariamente na sua forma reduzida (GSH), pois é a sua forma biologicamente ativa. Devido ao seu papel na proteção contra o stress oxidativo, a disponibilidade desta na sua forma reduzida é um fator chave, no entanto, em condições de stress oxidativo, a GSH converte - se em glutathione oxidada (GSSG) (135). Esta alteração implica uma alteração no balanço *redox*, favorecendo a permanência de ROS. Um desequilíbrio na homeostasia da GSH e no seu estado

redox, contribuem para a progressão de doenças pulmonares, como por exemplo a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema pulmonar, asma e insuficiência respiratória aguda (134). A diminuição nos níveis de GSH implica um aumento na suscetibilidade ao stress oxidativo e pode resultar em danos metabólicos, uma vez que nestas condições, a enzima γ -glutamylcisteína sintetase continua a produzir grandes quantidades de γ -glutamylcisteína, levando a uma acumulação deste dipeptídeo, o qual pode ser convertido em **5-oxoprolina**. Esta vai estar em excesso, sendo posteriormente eliminada pela urina podendo, no entanto, causar acidose metabólica grave (133). A **glicina** é um aminoácido necessário para a formação do grupo heme, da creatina, colagénio e ácidos nucleicos, além de participar na síntese da glutathione, a qual é uma molécula antioxidante com influência na suscetibilidade da asma (57). Um estudo efetuado em ratos, *in vitro*, demonstrou o efeito protetor da glicina nos níveis de glutathione em resposta a estímulos tóxicos (149), surgindo com propriedades imunomoduladoras, reduzindo a produção de superóxido e do fator de necrose tumoral a partir de macrófagos alveolares (150). Por sua vez, a **treonina** é influenciada por alterações no metabolismo da glicina (uma vez que participam em vias metabólicas comuns), e consequentemente pelo balanço *redox* associado à glutathione (46). Observaram-se ainda alterações no metabolismo do ciclo de Krebs. O aumento das concentrações dos metabolitos associados – **ácido aconítico** e **ácido cítrico** - podem sugerir uma maior exigência de energia proveniente da necessidade de um maior esforço na respiração durante exacerbações, sendo provavelmente uma resposta ao stress hipóxico devido à fraca oxigenação (136). De forma análoga, estas variações têm sido igualmente observadas durante o exercício físico, o que sustenta a hipótese de que os níveis elevados destes metabolitos podem ser resultado do metabolismo hipóxico (151).

Com relevância direta no metabolismo lipídico foram identificados o **ácido hexadecanóico** e o **ácido octadecanóico**, com concentrações mais elevadas nos indivíduos asmáticos, os quais podem estar relacionados com a degradação das membranas das vias aéreas, estando envolvidos em processos de peroxidação lipídica (137).

Conclusões

Considerando que estão associadas alterações metabólicas à asma, é espectável que os biofluidos, neste caso concreto a urina, de indivíduos com asma apresentem padrões metabolômicos diferentes de indivíduos considerados saudáveis. Na tentativa de uma melhor compreensão dos mecanismos associados à doença, destacando-se as alterações metabólicas, foi implementada uma metodologia para a análise de quatro famílias químicas em simultâneo, nomeadamente aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares. Testando diferentes condições de sililação

e com recurso ao GC-qMS, foi possível identificar 35 metabolitos pertencentes às famílias alvo (4 aminoácidos, 6 ácidos orgânicos, 2 ácidos gordos e 23 açúcares). Realizou-se ainda a co-injecção de padrões, a qual permitiu a criação de uma base de dados de espectros de massa de compostos sililados e RIs, a qual foi fundamental para a identificação dos metabolitos detetados neste trabalho e será uma ferramenta útil para trabalhos futuros.

Foram determinados o teor de creatinina e o valor de condutividade, de modo a avaliar a sua variabilidade em cada grupo de indivíduos. Observou-se, com significância estatística de 99%, a existência de diferenças entre os grupos objeto de estudo, sendo que, em valores medianos os indivíduos asmáticos apresentaram valor de condutividade (17 ± 4 mS/cm) e creatinina (842 ± 211 µg/mL) superiores comparativamente aos controlos (11 ± 6 mS/cm para condutividade e 612 ± 195 µg/mL para creatinina). Ainda não é clara a relação entre a condutividade e os seus valores mais elevados em indivíduos asmáticos, no entanto sabe-se que a condutividade é influenciada por várias doenças metabólicas, entre as quais surge a doença renal crónica. Já se encontram reportados alguns estudos que avaliam a propensão de desenvolver doença renal crónica por parte de indivíduos asmáticos e obteve-se uma associação positiva. Assim, os elevados valores de condutividade em cerca de 34% dos indivíduos asmáticos em comparação com os indivíduos saudáveis podem advir da existência de algum comprometimento renal.

Uma vez que a condutividade e a creatinina estão reportadas na literatura como sendo parâmetros de normalização da urina, as concentrações dos metabolitos (expressas em equivalentes de padrão interno) foram normalizadas pelos respetivos valores de condutividade e teor de creatinina, com o objetivo de verificar se isso iria ou não incrementar o número de metabolitos estatisticamente diferentes entre os grupos. No entanto, estas abordagens não se revelaram melhores para a distinção entre os grupos. Assim, aos 35 metabolitos detetados, realizou-se uma quantificação com os dados expressos em equivalentes de padrão interno, e as

amostras foram comparadas em termos de concentração dos metabolitos pelos diferentes grupos. Com significância estatística, observaram-se diferenças num conjunto de 19 metabolitos (3 aminoácidos, 6 ácidos orgânicos e 10 açúcares). Na população alvo deste trabalho estava incluído um grupo de indivíduos com asma e alergia, o qual era constituído por 34 mulheres e 22 homens, dos 3 os 79 anos de idade, e em que 59% tomava medicação e 36% tinha co-patologias associadas. Assim, de modo a reduzir a influência de potenciais fatores de confusão, nomeadamente a idade, analisaram-se os dados correspondentes a uma faixa etária dos 10 aos 30 anos, com 19 mulheres e 16 homens, onde 59% tomava medicação e 20% tinha co-patologias. Quando são analisados estes dados, verifica-se que há 28 metabolitos (4 aminoácidos, 6 ácidos orgânicos, 2 ácidos gordos e 16 açúcares) estatisticamente diferentes entre os grupos objeto de estudo, ou seja, obtiveram-se mais 9 metabolitos (L-5-oxoprolina, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, treitol, ribose, frutose, manitol, sorbose e galactose) com diferenças significativas. Assim, a totalidade dos aminoácidos, dos ácidos orgânicos, dos ácidos gordos e 16 dos 23 açúcares identificados, revelaram-se estatisticamente diferentes entre os grupos objeto de estudo.

Da interpretação da relevância biológica dos metabolitos identificados e vias metabólicas associadas foi possível observar a desregulação em vários processos bioquímicos. Apesar da dispersão nos valores dentro de cada grupo, relacionada com o carácter heterógeno da doença e com a existência de vários fenótipos e endótipos dentro da asma, foi possível avaliar informação relevante relativamente ao metabolismo dos aminoácidos, metabolismo lipídico, metabolismo energético e metabolismo dos hidratos de carbono, relacionados com fenómenos de stress oxidativo.

Trabalho Futuro:

No seguimento do trabalho realizado surgiram várias linhas de ação, das quais se enumeram as seguintes:

- Avaliar o perfil metabolómico da urina ao nível de outros compostos com relevância na compreensão da doença, como por exemplo, compostos associados às vias de sinalização purinérgicas;
- Alargar este estudo a uma população maior, permitindo estudar os indivíduos ao longo do tempo. Ter sempre em conta a relação entre os grupos controlo e os grupos objeto de estudo, tentando minimizar as diferenças dos efeitos associados a fatores de confusão, como o género, a idade, a medicação e as co-patologias.

Referências Bibliográficas

- (1) Filho, P. d'AlmeidaTelles. (2008) Asma grave em adultos. *Pulmão RJ* 21, Supl 1:60-72.
- (2) Leung, T. F., Ko, F. W. S., and Wong, G. W. K. (2013) Recent advances in asthma biomarker research. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 7, 297–308.
- (3) National Institutes of Health. (2007) Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. *National Heart, Lung and Blood Institute* 120, 94–138.
- (4) Barnes, P. J., Jonsson, B., and Klim, J. B. (1996) The costs of asthma. *European Respiratory Journal* 9, 636–642.
- (5) Marle, M. E. van den A., Bruil, J., and Detmar, S. B. (2005) Evaluation of cost of disease: Assessing the burden to society of asthma in children in the European Union. *Allergy* 60, 140–149.
- (6) Gibson, G. J., Loddenkemper, R., Sibille, Y., and Lundbäck, B. (2013) The European Lung White Book. Brussels, Belgium.
- (7) Mutius, E. von. (2000) The environmental predictors of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, 9–19.
- (8) Mattarucchi, E., Baraldi, E., and Guillou, C. (2012) Metabolomics applied to urine samples in childhood asthma; differentiation between asthma phenotypes and identification of relevant metabolites. *Biomedical Chromatography* 26, 89–94.
- (9) Gibeon, D., and Chung, K. F. (2012) The investigation of severe asthma to define phenotypes. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 42, 678–92.
- (10) Busse, W. W. (2011) Asthma diagnosis and treatment: filling in the information gaps. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128, 740–50.
- (11) Bel, E. H., Sousa, A., Fleming, L., Bush, A., Chung, K. F., Versnel, J., Wagener, A. H., Wagers, S. S., Sterk, P. J., and Compton, C. H. (2011) Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). *Thorax* 66, 910–917.
- (12) Oliphant, D. R. (2010) About Asthma. Toronto: The Asthma Society of Canada.
- (13) Black, P. H. (2002) Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity* 16, 622–653.
- (14) Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M., and Vignola, A. M. (2000) State of the Art - Asthma From Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161, 1720–1745.
- (15) Amin, K. (2012) The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine* 106, 9–14.
- (16) Todo-bom, A., and Pinto, A. M. (2006) Fisiopatologia da asma grave. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* 4, 43–48.
- (17) Corrêa, M. F. P., Melo, G. O. de, and Costa, S. S. (2008) Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 785–797.
- (18) Barrios, R. J., Kheradmand, F., Batts, L., and Corry, D. B. Asthma Pathology and Pathophysiology. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 130, 447–451.

- (19) Schuh, J. M., Blease, K., Kunkel, S. L., and Hogaboam, C. M. (2003) Chemokines and cytokines : axis and allies in asthma and allergy. *Cytokine & Growth Factor* 14, 503–510.
- (20) Ho, W. E., Xu, Y. J., Xu, F., Cheng, C., Peh, H. Y., Tannenbaum, S. R., Fred Wong, W. S., and Ong, C. N. (2013) Metabolomics reveals altered metabolic pathways in experimental asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 48, 204–211.
- (21) Zhao, Y., Fu, L., Li, R., Wang, L.-N., Yang, Y., Liu, N.-N., Zhang, C.-M., Wang, Y., Liu, P., Tu, B.-B., Zhang, X., and Qiao, J. (2012) Metabolic profiles characterizing different phenotypes of polycystic ovary syndrome: plasma metabolomics analysis. *BMC Medicine* 10, 153.
- (22) Caldeira, M., Barros, A. S., Bilelo, M. J., Parada, A., Câmara, J. S., and Rocha, S. M. (2011) Profiling allergic asthma volatile metabolic patterns using a headspace-solid phase microextraction/gas chromatography based methodology. *Journal of Chromatography A* 1218, 3771–3780.
- (23) MacNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European Journal of Pharmacology* 429, 195–207.
- (24) Kirkham, P., and Rahman, I. (2006) Oxidative stress in asthma and COPD : Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 476–494.
- (25) Dworski, R. (2000) Oxidant stress in asthma. *Thorax* 55, 51–54.
- (26) Kanazawa, H., Kurihara, N., Hirata, K., and Takeda, T. (1991) The Role of Free Radicals Obstruction in Asthmatic in Airway Patients. *Chest* 100, 1319–1322.
- (27) Vachier, I., Damon, M., Doucen, C. le, Paulet, A. C. de, Chanez, P., Michel, F. B., and Godard, P. (1992) Increased Oxygen Species Generation in Blood Monocytes of Asthmatic Patlents. *The American Review of Respiratory Disease* 146, 1161–1166.
- (28) Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal* 5, 9–19.
- (29) Jung, J., Kim, S.-H., Lee, H.-S., Choi, G. S., Jung, Y.-S., Ryu, D. H., Park, H.-S., and Hwang, G.-S. (2013) Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 43, 425–433.
- (30) Saude, E. J., Skappak, C. D., Regush, S., Cook, K., Ben-Zvi, A., Becker, A., Moqbel, R., Sykes, B. D., Rowe, B. H., and Adamko, D. J. (2011) Metabolomic profiling of asthma: diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 757–764.
- (31) Torday, J. S., Torday, D. P., Gutnick, J., Qin, J., and Rehan, V. (2001) Biologic Role of Fetal Lung Fibroblast Triglycerides as Antioxidants. *Pediatric Research* 49, 843–849.
- (32) Mehta, A. K., Singh, B. P., Arora, N., and Gaur, S. N. (2010) Choline attenuates immune inflammation and suppresses oxidative stress in patients with asthma. *Immunobiology* 215, 527–534.
- (33) Pauly, D. F., and Pepine, C. J. (2003) The Role of Carnitine in Myocardial Dysfunction. *American Journal of Kidney Diseases* 41, 35–43.
- (34) Montuschi, P., Corradi, M., Ciabattini, G., Nightingale, J., Kharitonov, S. A., and Barnes, P. J. (1999) Increased 8-Isoprostane, a Marker of Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160, 216–220.

- (35) Fogarty, A., Broadfield, E., Lewis, S., Lawson, N., and Britton, J. (2004) Amino acids and asthma : a case-control study. *European Respiratory Journal* 23, 565–568.
- (36) Ulrey, C. L., Liu, L., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. (2005) The impact of metabolism on DNA methylation. *Human Molecular Genetics* 14, 139–147.
- (37) Wolak, J. E., Jr, C. R. E., and O’Connell, T. M. (2013) Metabolomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from cystic fibrosis patients. *Biomarkers Journal* 14, 55–60.
- (38) Phypers, B., and Pierce, J. T. (2006) Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 6, 128–132.
- (39) Rashid, A. O., Azam, H. M., DeBari, V. A., Blamoun, A. I., Moammar, M. Q., and Khan, M. A. (2008) Non-anion gap acidosis in asthma: Clinical and laboratory features and outcomes for hospitalized patients. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 38, 228–234.
- (40) Meert, K., McCaulley, L., and Sarnaik, A. (2012) Mechanism of lactic acidosis in children with acute severe asthma. *Pediatric Critical Care Medicine* 13, 28–31.
- (41) Wheelock, C. E., Goss, V. M., Balgoma, D., Nicholas, B., Brandsma, J., Skipp, P. J., Snowden, S., D’Amico, A., Horvath, I., Chaiboonchoe, A., Ahmed, H., Ballereau, S., Rossios, C., Chung, K. F., Montuschi, P., Fowler, S. J., Adcock, I. M., Postle, A. D., Dahlén, S.-E., Rowe, A., Sterk, P. J., Auffray, C., and Djukanovic, R. (2013) Application of omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *The European Respiratory Journal* 42, 802–825.
- (42) Adamko, D. J., Sykes, B. D., and Rowe, B. H. (2012) The metabolomics of asthma: novel diagnostic potential. *Chest* 141, 1295–1302.
- (43) Zhang, S., Gowda, G. A. N., Ye, T., and Raftery, D. (2010) Advances in NMR-based biofluid analysis and metabolite profiling. *The Royal Society of Chemistry* 135, 1490–1498.
- (44) Kuban, P., and Foret, F. (2013) Exhaled breath condensate : Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. *Analytica Chimica Acta* 805, 1–18.
- (45) Lara, A., Khatri, S. B., Wang, Z., Comhair, S. A. A., Xu, W., Dweik, R. A., Bodine, M., Levison, B. S., Hammel, J., Bleecker, E., Busse, W., Calhoun, W. J., Castro, M., Chung, K. F., Curran-everett, D., Gaston, B., Israel, E., Jarjour, N., Moore, W., Peters, S. P., Teague, W. G., Wenzel, S., and Hazen, S. L. (2008) Alterations of the Arginine Metabolome in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178, 673–681.
- (46) Fitzpatrick, A. M., Park, Y., Brown, L. A. S., and Jones, D. P. (2014) Children with severe asthma have unique oxidative stress-associated metabolomic profiles. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133, 258–261.
- (47) Ho, W. E., Xu, Y. J., Cheng, C., Peh, H. Y., Tannenbaum, S. R., Wong, W. S. F., and Ong, C. N. (2014) Metabolomics reveals inflammatory-linked pulmonary metabolic alterations in a murine model of house dust mite-induced allergic asthma. *Journal of Proteome Research* 13, 3771–3782.
- (48) Bolte, G., Kompauer, I., Fobker, M., Cullen, P., Keil, U., Mutius, E., and Weiland, S. K. (2006) Fatty acids in serum cholesteryl esters in relation to asthma and lung function in children. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36, 293–302.
- (49) Calabrese, C., Triggiani, M., Marone, G., and Mazzarella, G. (2000) Arachidonic acid

- metabolism in inflammatory cells of patients with bronchial asthma. *Allergy* 55, 27–30.
- (50) Freedman, S. D., Blanco, P. G., Zaman, M. M., Shea, J. C., Ollero, M., Hopper, I. K., Weed, D. a, Gelrud, A., Regan, M. M., Laposata, M., Alvarez, J. G., and O’Sullivan, B. P. (2004) Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *The New England Journal of Medicine* 350, 560–569.
- (51) Saude, E. J., Obiefuna, I. P., Somorjai, R. L., Ajamian, F., Skappak, C., Ahmad, T., Dolenko, B. K., Sykes, B. D., Moqbel, R., and Adamko, D. J. (2009) Metabolomic biomarkers in a model of asthma exacerbation: urine nuclear magnetic resonance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179, 25–34.
- (52) Meurs, H., Maarsingh, H., and Zaagsma, J. (2003) Arginase and asthma: Novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 450–455.
- (53) King, N. E., Rothenberg, M. E., and Zimmermann, N. (2004) Arginine in asthma and lung inflammation. *The Journal of Nutrition* 134, 2830–2836.
- (54) Vercelli, D. (2003) Arginase: Marker, effector, or candidate gene for asthma? *Journal of Clinical Investigation* 111, 1815–1817.
- (55) Zimmermann, N., and Rothenberg, M. E. (2006) The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *European Journal of Pharmacology* 533, 253–262.
- (56) Morris, C. R., Poljakovic, M., Lavrishia, L., Machado, L., Kuypers, F. A., and Morris, S. M. (2004) Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170, 148–153.
- (57) Rahman, I., and MacNee, W. (2000) Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *The European Respiratory Journal* 16, 534–554.
- (58) Shaheen, S. O., Sterne, J. a, Songhurst, C. E., and Burney, P. G. (2000) Frequent paracetamol use and asthma in adults. *Thorax* 55, 266–270.
- (59) Collipp, P. J., Chen, S. Y., Sharma, R. K., Balachandar, V., and Maddaiah, V. T. (1975) Tryptophane metabolism in bronchial asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 35, 153–158.
- (60) Fernández-Peralbo, M. A., and Luque de Castro, M. D. (2012) Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 41, 75–85.
- (61) Shirasu, M., and Touhara, K. (2011) The scent of disease : volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *The Journal of Biochemistry* 150, 257–266.
- (62) Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorndahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., and Wishart, D. S. (2013) The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* 8.
- (63) Loureiro, C. C., Duarte, I. F., Gomes, J., Carrola, J., Barros, A. S., Gil, A. M., Bousquet, J., Bom, A. T., and Rocha, S. M. (2014) Urinary metabolomic changes as a predictive biomarker of asthma exacerbation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133, 261–263.
- (64) Waikar, S. S., Sabbiseti, V. S., and Bonventre, J. V. (2010) Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Official Journal of the International Society of Nephrology* 78, 486–94.

- (65) Esther, C. R., Boysen, G., Olsen, B. M., Collins, L. B., Ghio, A. J., Swenberg, J. W., and Boucher, R. C. (2009) Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 296, 987–993.
- (66) Warrack, B. M., Hnatyshyn, S., Ott, K. H., Reily, M. D., Sanders, M., Zhang, H., and Drexler, D. M. (2009) Normalization strategies for metabonomic analysis of urine samples. *Journal of Chromatography B* 877, 547–552.
- (67) Wagner, B. D., Accurso, F. J., and Laguna, T. A. (2010) The applicability of urinary creatinine as a method of specimen normalization in the cystic fibrosis population. *Journal of Cystic Fibrosis* 9, 212–216.
- (68) González-Domínguez, R., Castilla-Quintero, R., García-Barrera, T., and Gómez-Ariza, J. L. (2014) Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 465, 20–27.
- (69) Boeniger, M. F., Lowry, L. K., and Rosenberg, J. (1993) Interpretation of Urine Results Used To Assess Chemical Exposure With Emphasis on Creatinine Adjustments: a Review. *American Industrial Hygiene Association Journal* 54, 615–627.
- (70) Curtis, G., and Fogel, M. (1970) Creatinine Excretion: Diurnal Variation and Variability of Whole and Part-Day Measures. *Journal of the American Psychosomatic Society* 32, 337–350.
- (71) Bosch, J. P., Saccaggi, A., Lauer, A., Ronco, C., Belledonne, M., and Glabman, S. (1983) Renal functional reserve in humans. Effect of protein intake on glomerular filtration rate. *The American Journal of Medicine* 75, 943–950.
- (72) Wesson, B. L. G., Lauler, D. P., Vries, D., and Wardener, D. (1961) Diurnal cycle of glomerular filtration rate and sodium and chloride excretion during responses to altered salt and water balance in man. *The Journal of Clinical Investigation* 40, 1967–1977.
- (73) Garde, A. H., Hansen, Å. M., Kristiansen, J., and Knudsen, L. E. (2004) Comparison of Uncertainties Related to Standardization of Urine Samples with Volume and Creatinine Concentration. *Annals of Occupational Hygiene* 48, 171–179.
- (74) Barr, D. B., Wilder, L. C., Caudill, S. P., Gonzalez, A. J., Needham, L. L., and Pirkle, J. L. (2005) Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environmental Health Perspectives* 113, 192–200.
- (75) Bode, D., Pagani, E., Cumiskey, W., von Roemeling, R., Hamel, L., and Silver, P. (2000) Comparison of Urinary Desmosine Excretion in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease or Cystic Fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 13, 175–180.
- (76) Downey, D. G., Martin, S. L., Dempster, M., Moore, J. E., Keogan, M. T., Starcher, B., Edgar, J., Bilton, D., and Elborn, J. S. (2007) The relationship of clinical and inflammatory markers to outcome in stable patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 42, 216–220.
- (77) Peng, C. T., Yang, Z. C., and Maltby, D. (1991) Prediction of retention indexes III . Silylated derivatives of polar compounds. *Journal of Chromatography* 586, 113–129.
- (78) H.J. Chaves das Neves, and A.M. Costa Freitas. (1996) Introdução À Cromatografia Gás-Líquido De Alta Resolução (Dias de Sousa, L., Ed.) 1st ed.
- (79) Zhang, Q., Wang, G., Du, Y., Zhu, L., and A, J. (2007) GC/MS analysis of the rat urine for metabonomic research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the*

- (80) Wu, H., Xue, R., Dong, L., Liu, T., Deng, C., Zeng, H., and Shen, X. (2009) Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography / mass spectrometry. *Analytica chimica Acta* 648, 98–104.
- (81) Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K. P., Frase, P. D., and Bramley, P. M. (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC / MS and LC / MS / MS. *Journal of Experimental Botany* 56, 219–243.
- (82) Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., and Oefner, P. J. (2009) Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Journal* 393, 445–452.
- (83) Jorge, T. F., Rodrigues, J. A., Caldana, C., Schmidt, R., van Dongen, J. T., Thomas-Oates, J., and António, C. (2014) Mass Spectrometry-based Plant Metabolomics: Metabolite Responses to Abiotic Stress. *Mass Spectrometry Reviews* 35, 620–649.
- (84) Rashaid, A. H. B., Jackson, G. P., and Harrington, P. de B. (2014) Quantitation of Amino Acids in Human Hair by Trimethylsilyl Derivatization Gas Chromatography / Mass Spectrometry. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* 1.
- (85) Drodz, J. (1975) Chemical derivatization in gas chromatography. *Journal of Chromatography* 113, 303–356.
- (86) Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., and Oefner, P. J. (2008) Automated GC – MS analysis of free amino acids in biological fluids. *Journal of Chromatography B* 870, 222–232.
- (87) Zaideh, B. I., Saad, N. M. R., Lewis, B. A., and Brenna, J. T. (2001) Reduction of Nonpolar Amino Acids to Amino Alcohols To Enhance Volatility for High-Precision Isotopic Analysis. *Analytical Chemistry* 73, 799–802.
- (88) Molnár-Perl, I., and Katona, Z. F. (2000) GC-MS of amino acids as their trimethylsilyl/t-butyltrimethylsilyl Derivatives: In model solutions III. *Chromatographia* 51, 228–236.
- (89) Villas-bôas, S. G., Smart, K. F., Sivakumaran, S., and Lane, G. A. (2011) Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites Journal* 1, 3–20.
- (90) Kouremenos, K. A., Harynuk, J. J., Winniford, W. L., Morrison, P. D., and Marriott, P. J. (2010) One-pot microwave derivatization of target compounds relevant to metabolomics with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878, 1761–1770.
- (91) Namera, A., Yashiki, M., Nishida, M., and Kojima, T. (2002) Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 776, 49–55.
- (92) Chen, T., Xie, G., Wang, X., Fan, J., Qiu, Y., Zheng, X., Qi, X., Cao, Y., Su, M., Wang, X., Xu, L. X., Yen, Y., Liu, P., and Jia, W. (2011) Serum and Urine Metabolite Profiling Reveals Potential Biomarkers of Human Hepatocellular Carcinoma. *Molecular & Cellular Proteomics* 10.
- (93) Kvitvang, H. F. N., Andreassen, T., Adam, T., Villas-b, S. G., and Bruheim, P. (2011) Highly Sensitive GC/MS/MS Method for Quantitation of Amino and Nonamino Organic Acids. *Analytical Chemistry* 83, 2705–2711.
- (94) Villas-Bôas, S. G., Noel, S., Lane, G. A., Attwood, G., and Cookson, A. (2006) Extracellular metabolomics: A metabolic footprinting approach to assess fiber degradation

- in complex media. *Analytical Biochemistry* 349, 297–305.
- (95) Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., and Nielsen, J. (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews* 24, 613–646.
- (96) Gullberg, J., Jonsson, P., Nordström, A., Sjöström, M., and Moritz, T. (2004) Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 331, 283–295.
- (97) Wu, H., Liu, T., Ma, C., Xue, R., Deng, C., Zeng, H., and Shen, X. (2011) GC / MS-based metabolomic approach to validate the role of urinary sarcosine and target biomarkers for human prostate cancer by microwave-assisted derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 635–646.
- (98) Abbiss, H., Rawlinson, C., Maker, G. L., and Trengove, R. (2015) Assessment of automated trimethylsilyl derivatization protocols for GC – MS-based untargeted metabolomic analysis of urine. *Metabolomics* 11, 1908–1921.
- (99) Pasikanti, K. K., Ho, P. C., and Chan, E. C. Y. (2008) Gas chromatography / mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of Chromatography B* 871, 202–211.
- (100) Initiative for Asthma, G. (2015) Global Strategy For Asthma Management And Prevention 1–87.
- (101) Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., and Beasley, R. (2004) The global burden of asthma : executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* 59, 469–478.
- (102) Sa-sousa, A., Morais-almeida, M., Azevedo, L. F., Carvalho, R., Jacinto, T., and Todobom, A. (2012) Prevalence of asthma in Portugal - The Portuguese National Asthma Survey. *Clinical and Translational Allergy* 2, 2–15.
- (103) Dool, H. van Den, and Kratz, P. D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* 11, 463–471.
- (104) Butts, W. C. (1972) Two-Column Gas Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Biochemically Significant Compounds. *Analytical Biochemistry* 46, 187–199.
- (105) Kempa, S., Hummel, J., Schwemmer, T., Pietzke, M., Strehmel, N., Wienkoop, S., Kopka, J., and Weckwerth, W. (2009) An automated GCxGC-TOF-MS protocol for batch-wise extraction and alignment of mass isotopomer matrixes from differential ¹³C-labelling experiments : a case study for photoautotrophic-mixotrophic grown *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Journal of Basic Microbiology* 49, 82–91.
- (106) Lefevre, M. F., Verhaeghe, B. J., Declerck, D. H., Bocxlaer, J. F. Van, Leenheer, A. P. De, and Sagher, R. M. (1989) Metabolic Profiling of Urinary Organic Acids by Single and Multicolumn Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 27, 23–29.
- (107) Petersson, G., and Chemistry, E. (1977) Retention Data in GLC Analysis ; Carbohydrate-Related Hydroxy Carboxylic and Dicarboxylic Acids as Trimethylsilyl Derivatives. *Journal of Chromatographic Science* 15, 245–255.
- (108) Hoffmann, G., Aramakl, S., Bium-hoffmann, E., Nyhan, W. L., and Sweetman, L. (1989) Quantitative Analysis for Organic Acids in Biological Samples : Batch Isolation Followed by Gas. *Clinical Chemistry* 35, 587–595.

- (109) D.J.Harvey. (1989) Identification of Long-chain Fatty Acids and Alcohols from Human Cerumen by the Use of Picolinyl and Nicotinate Esters. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry* 18, 719–723.
- (110) Yang, Z. C., and Cashman, J. R. (1992) Structure-retention index relationships for derivatized monosaccharides on non-polar gas chromatography columns. *Journal of Chromatography A* 596, 79–84.
- (111) Binder, R. G., and Haddon, W. F. (1984) Analysis of O-methylinositols raphy-mass spectrometry. *Carbohydrate Research* 129, 21–32.
- (112) Barbara d'Acampora Zellner, Carlo Bicchi, Paola Dugo, Patrizia Rubiolo Mondello, G. D. and L. (2008) Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 297–314.
- (113) Orata, F. (2012) Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* 83–156.
- (114) Medeiros, P. M., and Simoneit, B. R. T. (2007) Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1141, 271–278.
- (115) Zhao, C.-X., Liang, Y.-Z., Fang, H.-Z., and Li, X.-N. (2005) Temperature-programmed retention indices for gas chromatography–mass spectroscopy analysis of plant essential oils. *Journal of Chromatography A* 1096, 76–85.
- (116) Zellner, A. B., Bicchi, C., Dugo, P., Rubiolo, P., Dugo, G., and Mondello, L. (2008) Linear retention indices in gas chromatographic analysis. *Flavour and Fragrance Journal* 23, 297–314.
- (117) Bergstrom, K., and Gurtler, J. (1971) Trimethylsilylation of Amino Acids. *Acta Chemica Scandinavica* 25, 175–188.
- (118) Rontani, J. F., and Aubert, C. (2004) Trimethylsilyl transfer during electron ionization mass spectral fragmentation of some hydroxycarboxylic and dicarboxylic acid trimethylsilyl derivatives and the effect of chain length. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 1889–1895.
- (119) Tabb, D. L., Vega-Montoto, L., Rudnick, P. A., Variyath, A. M., Ham, A.-J. L., Bunk, D. M., Kilpatrick, L. E., Billheimer, D. D., Blackman, R. K., Cardasis, H. L., Carr, S. A., Clauser, K. R., Jaffe, J. D., Kowalski, K. A., Neubert, T. A., Regnier, F. E., Schilling, B., Tegeler, T. J., Wang, M., Wang, P., Whiteaker, J. R., Zimmerman, L. J., Fisher, S. J., Gibson, B. W., Kinsinger, C. R., Mesri, M., Rodriguez, H., Stein, S. E., Tempst, P., Paulovich, A. G., Liebler, D. C., and Spiegelman, C. (2010) Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 9, 761–776.
- (120) Marickar, Y. M. F. (2010) Electrical conductivity and total dissolved solids in urine. *Urological Research* 38, 233–235.
- (121) Liu, D., Zhen, X., Liang, Y., Jing, X., Zhang, T., Zhang, G., and Liu, Z. (2013) Persistent asthma increases the risk of chronic kidney disease : a retrospective cohort study of 2354 patients with asthma. *Chinese Medical Journal* 126, 4093–4099.
- (122) Rincon, M., and Irvin, C. G. (2012) Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International Journal of Biological Sciences* 8, 1281–1290.
- (123) Shlipak, M. G., Fried, L. F., Crump, C., Bleyer, A. J., Manolio, T. A., Tracy, R. P.,

- Furberg, C. D., and Psaty, B. M. (2003) Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 107, 87–92.
- (124) Sukkar, M. B., Hughes, J. M., Armour, C. L., and Johnson, P. R. A. (2001) Tumour necrosis factor- α potentiates contraction of human bronchus in vitro. *Respirology* 6, 199–203.
- (125) Negri, A. L. (2004) Prevention of progressive fibrosis in chronic renal diseases: Antifibrotic agents. *Journal of Nephrology* 17, 496–503.
- (126) Vilaysane, A., Chun, J., Seamone, M. E., Wang, W., Chin, R., Hirota, S., Li, Y., Clark, S. A., Tschopp, J., Trpkov, K., Hemmelgarn, B. R., Beck, P. L., and Muruve, D. A. (2010) The NLRP3 Inflammasome Promotes Renal Inflammation and Contributes to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* 21, 1732–1744.
- (127) Huang, H.-L., Ho, S.-Y., Li, C.-H., Chu, F.-Y., Ciou, L.-P., Lee, H.-C., Chen, W.-L., and Tzeng, N.-S. (2014) Bronchial asthma is associated with increased risk of chronic kidney disease. *BMC pulmonary medicine* 14, 80.
- (128) Triantafilou, K., Kar, S., Kuppeveld, F. J. M. Van, and Triantafilou, M. (2013) Rhinovirus-Induced Calcium Flux Triggers NLRP3 and NLRC5 Activation in Bronchial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49, 923–934.
- (129) Dolinay, T., Kim, Y. S., Howrylak, J., Hunninghake, G. M., An, C. H., Fredenburgh, L., Massaro, A. F., Rogers, A., Gazourian, L., Nakahira, K., Haspel, J. A., Landazury, R., Eppanapally, S., Christie, J. D., Meyer, N. J., Ware, L. B., Christiani, D. C., Ryter, S. W., Baron, R. M., and Choi, A. M. K. (2012) Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185, 1225–1234.
- (130) Kaspar, H., Dettmer, K., Chan, Q., Daniels, S., Nimkar, S., Daviglus, M. L., Stamler, J., Elliott, P., and Oefner, P. J. (2009) Urinary amino acid analysis: A comparison of iTRAQ-LC-MS/MS, GC-MS, and amino acid analyzer. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877, 1838–1846.
- (131) Finkel, T. (2015) The metabolic regulation of aging. *Nature Medicine* 21, 1416–1423.
- (132) Gerriets, V. A., and Rathmell, J. C. (2012) Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends in Immunology* 33, 168–172.
- (133) Forman, H. J., Zhang, H., and Rinna, A. (2009) Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 1–12.
- (134) Rahman, I. (2005) Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutation Research* 579, 58–80.
- (135) Perricone, C., De Carolis, C., and Perricone, R. (2009) Glutathione: A key player in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 8, 697–701.
- (136) Chang, C., Guo, Z., He, B., and Yao, W. (2015) Metabolic alterations in the sera of Chinese patients with mild persistent asthma: a GC-MS-based metabolomics analysis. *Acta Pharmacologica Sinica* 36, 1356–1366.
- (137) Kelly, R. S., Dahlin, A., McGeachie, M. J., Qiu, W., Sordillo, J., Wan, E. S., Wu, A. C., and Lasky-Su, J. (2016) Asthma metabolomics and the potential for integrative omics in research and the clinic. *Chest* 151, 262–277.
- (138) Fahrman, J., Grapov, D., Yang, J., Hammock, B., Fiehn, O., Bell, G. I., and Hara, M. (2015) Systemic alterations in the metabolome of diabetic NOD mice delineate increased oxidative stress accompanied by reduced inflammation and hypertriglyceremia. *American*

Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism 308, 978–989.

- (139) Kelly, F. J., Mudway, I., Blomberg, A., and Frew, A. (1999) Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *The Lancet* 354, 482–484.
- (140) Jacob, R. a, and Sotoudeh, G. (2002) Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care* 5, 66–74.
- (141) Tang, W. H., Martin, K. A., and Hwa, J. (2012) Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Frontiers in Pharmacology* 3, 1–8.
- (142) Xu, X. L., Xie, Q. M., Shen, Y. H., Jiang, J. J., Chen, Y. Y., Yao, H. Y., and Zhou, J. Y. (2008) Mannose prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Inflammation Research* 57, 104–110.
- (143) Bowler, R. P. (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of Asthma. *Endocrine Reviews* 25, 612–628.
- (144) Hackett, N. R., Heguy, A., Harvey, B. G., O'Connor, T. P., Luettich, K., Flieder, D. B., Kaplan, R., and Crystal, R. G. (2003) Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29, 331–343.
- (145) Ramana, K. V., and Srivastava, S. K. (2010) Aldose reductase: A novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42, 17–20.
- (146) Yadav, U. C. S., Ramana, K. V., Aguilera-Aguirre, L., Boldogh, I., Boulares, H. A., and Srivastava, S. K. (2009) Inhibition of aldose reductase prevents experimental allergic airway inflammation in mice. *PLoS ONE* 4, 6535–6548.
- (147) Anderson, M. E. (1998) Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 111, 1–14.
- (148) Townsend, D. M., Tew, K. D., and Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57, 145–155.
- (149) Deters, M., Siegers, C. P., and Strubelt, O. (1998) Influence of glycine on the damage induced in isolated perfused rat liver by five hepatotoxic agents. *Toxicology* 128, 63–72.
- (150) Wheeler, M. D., and Thurman, R. G. (1999) Production of superoxide and TNF-alpha from alveolar macrophages is blunted by glycine. *The American Journal of Physiology* 277, 952–959.
- (151) Pechlivanis, A., Kostidis, S., Saraslanidis, P., Petridou, A., Tsalis, G., Mougios, V., Gika, H. G., Mikros, E., and Theodoridis, G. A. (2010) 1H NMR-based metabonomic investigation of the effect of two different exercise sessions on the metabolic fingerprint of human urine. *Journal of Proteome Research* 9, 6405–6416.

Anexo I

Espectros de massa dos padrões sililados

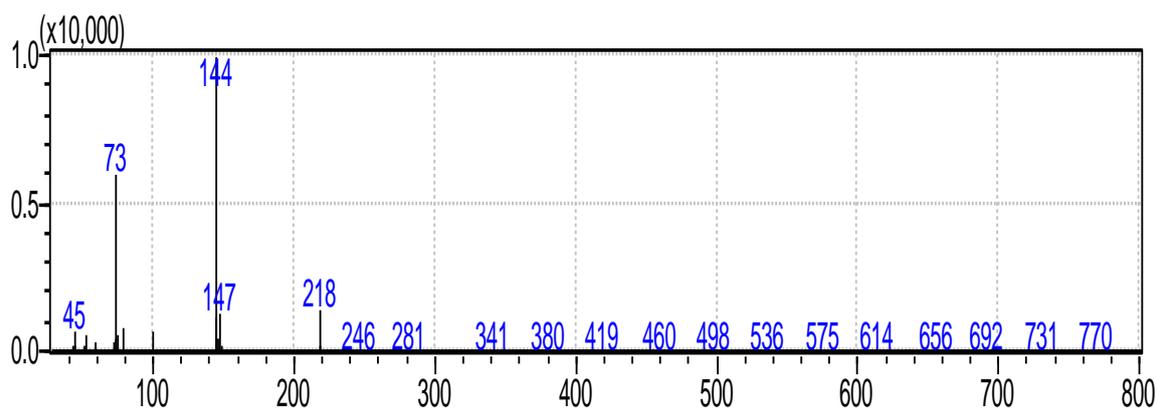
De seguida são apresentados os espectros de massa dos padrões sililados, organizados por família química:

- a) aminoácidos.
- b) ácidos orgânicos.
- c) ácidos gordos.
- d) açúcares.

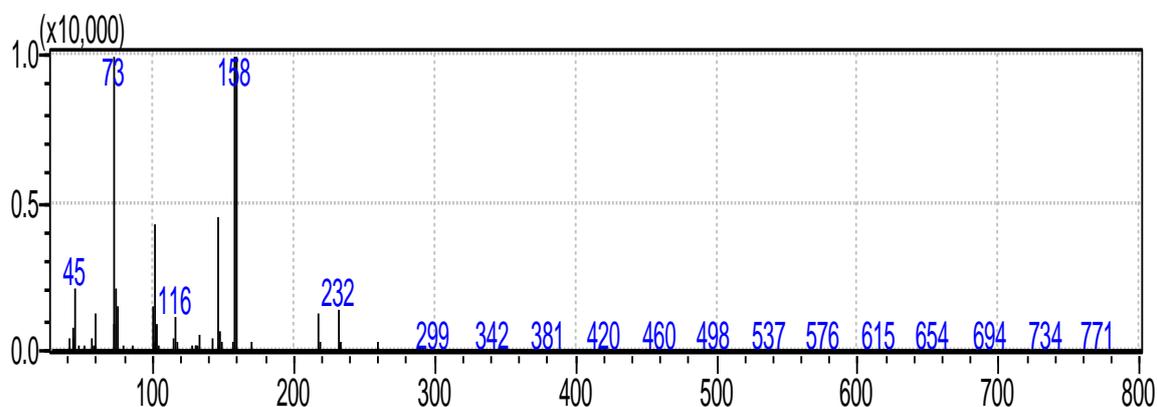
Para cada composto é apresentado o espectro de massa, adquirido numa gama de 30-800 m/z e o índice de retenção (RI), obtido na coluna DB-1 30 m \times 0,25 μ m).

a) Aminoácidos

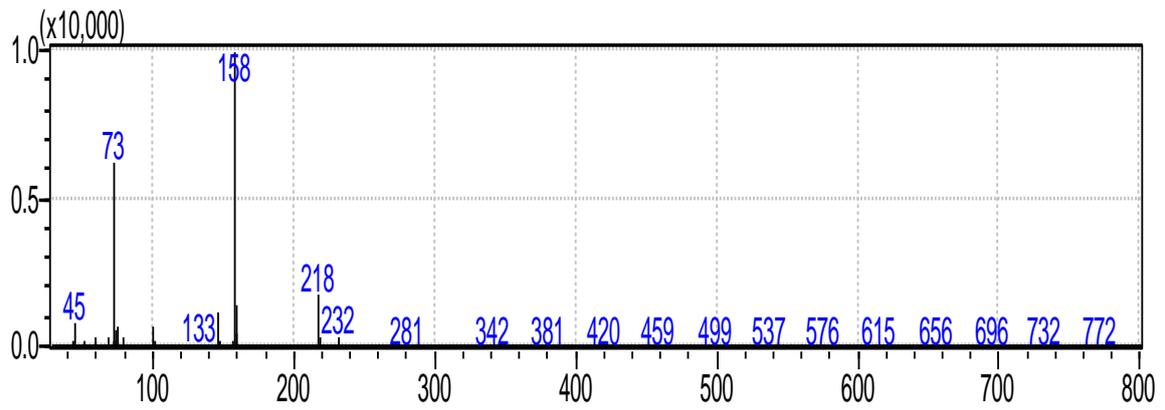
L-Valina, RI = 1240



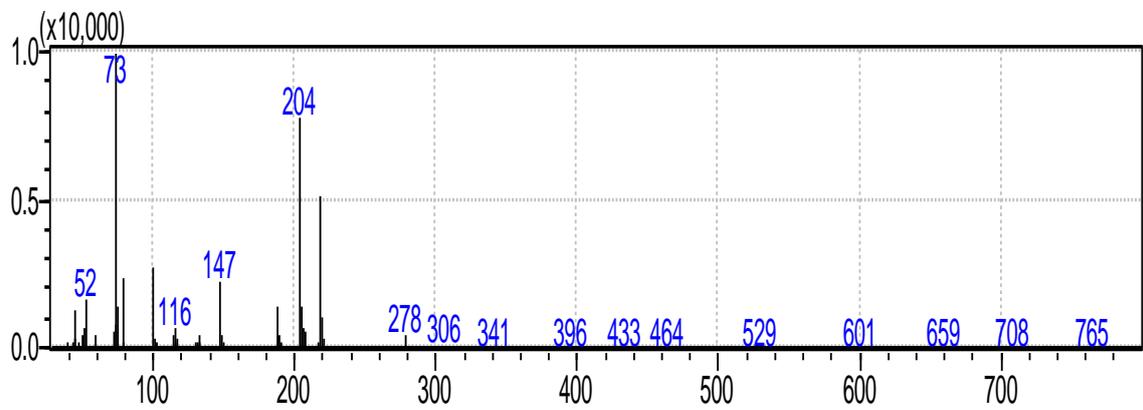
L-Leucina, RI = 1297



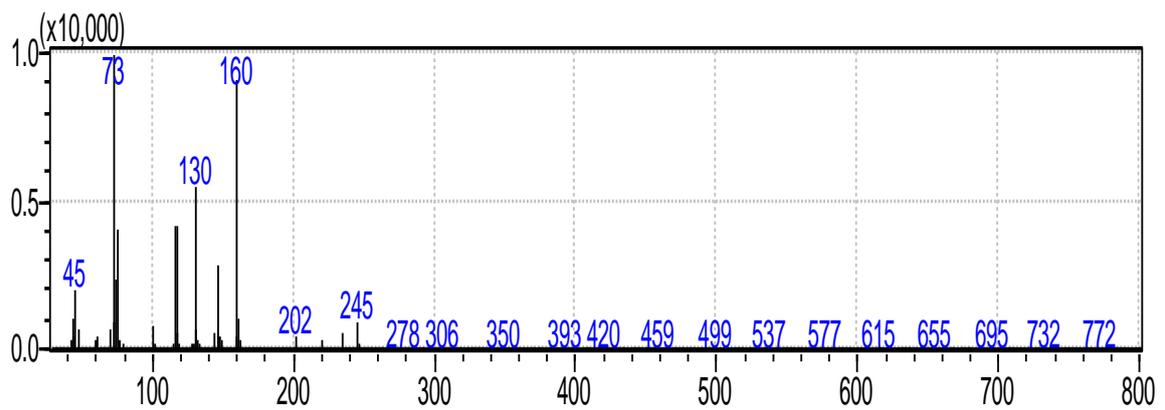
L-Isoleucina, RI = 1314



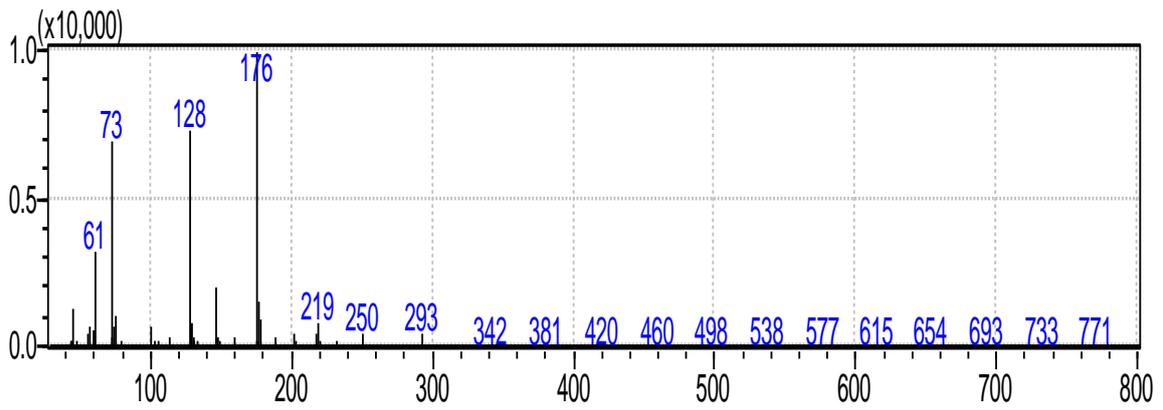
L-Serina, RI = 1384



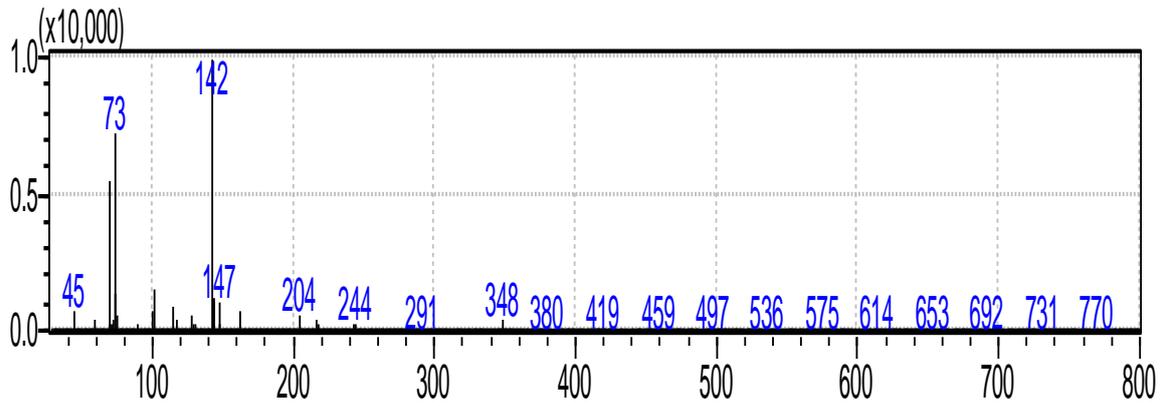
L-Ácido Aspártico, RI = 1424



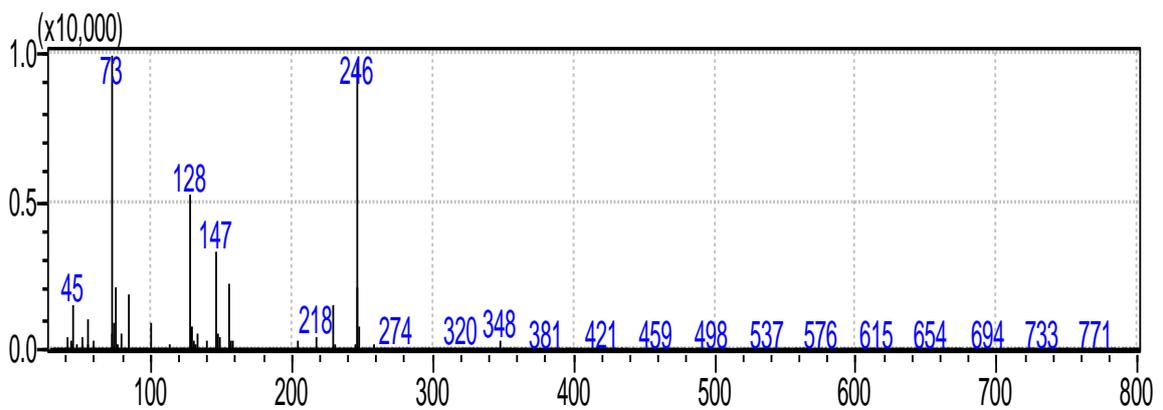
L-Metionina, RI = 1518



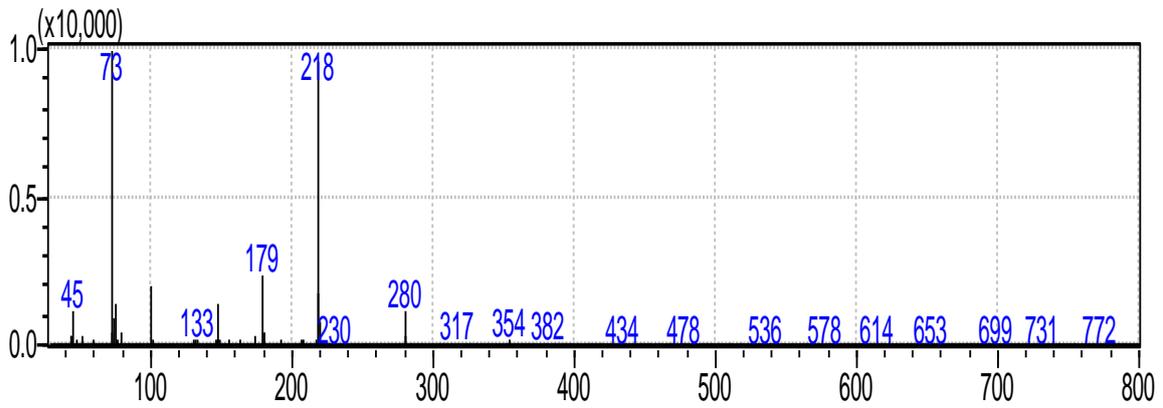
L-Arginina, RI = 1635



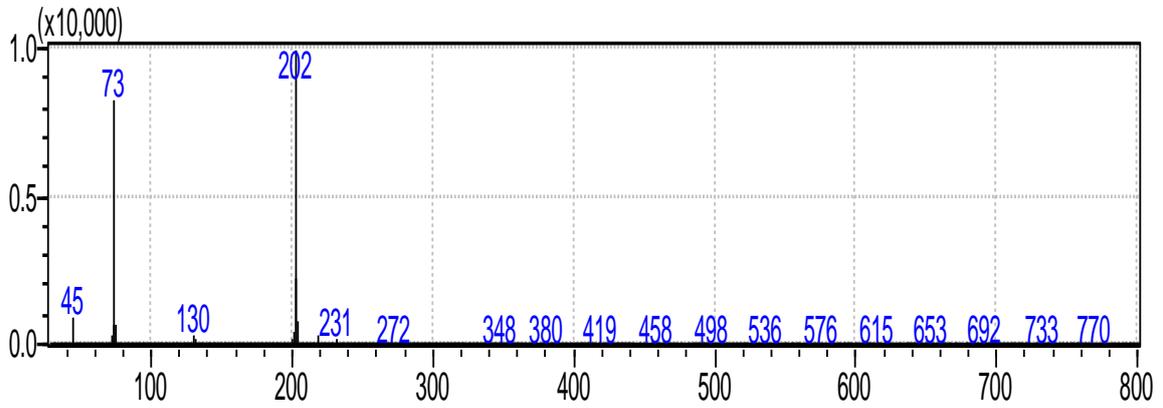
L-Ácido Glutâmico, RI = 1635



DL-Tirosina, RI = 1944

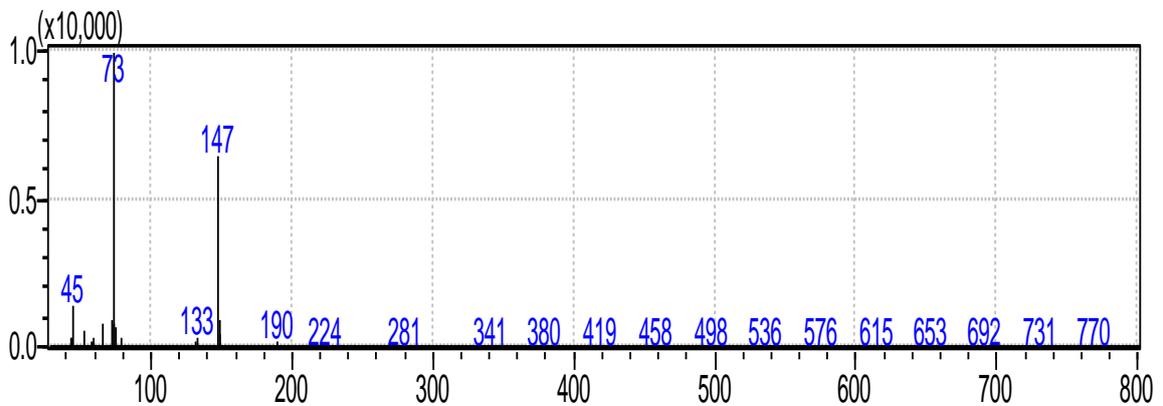


Triptofano, RI = 2139

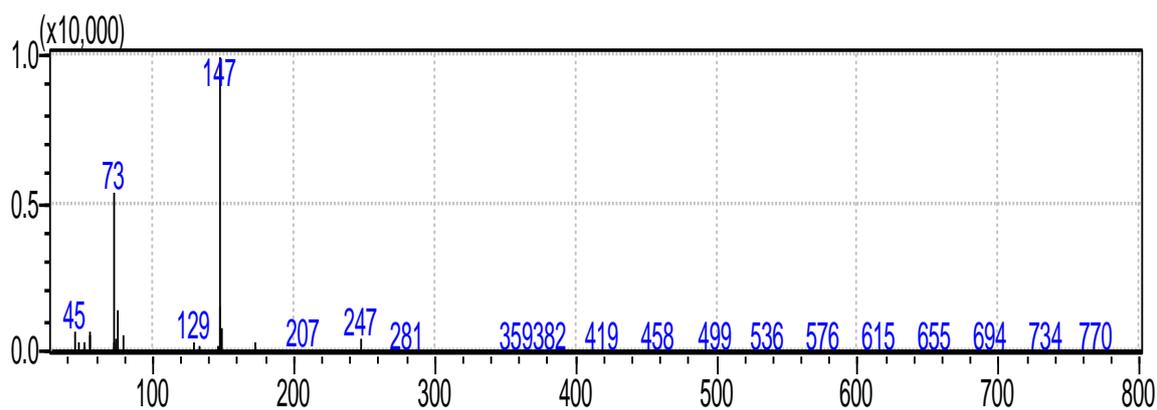


b) Ácido Orgânicos

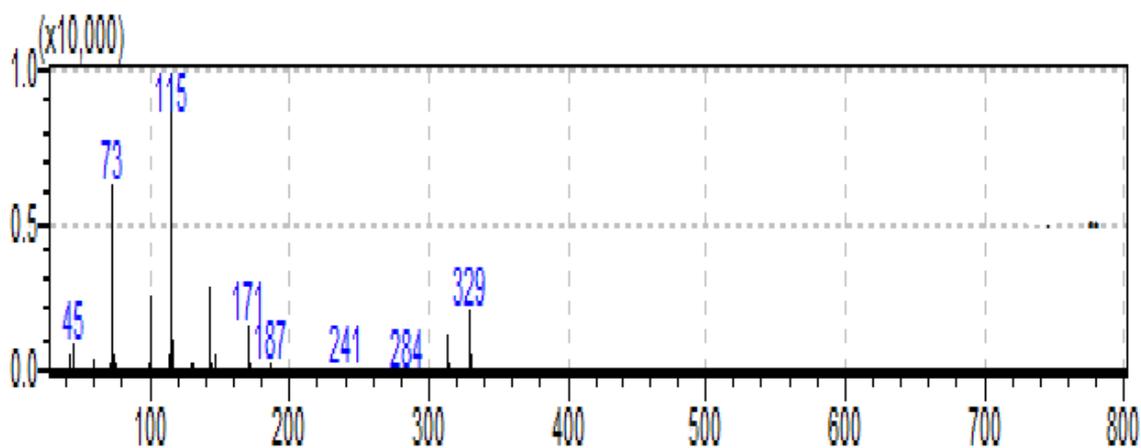
Ácido Oxálico, RI = 1165



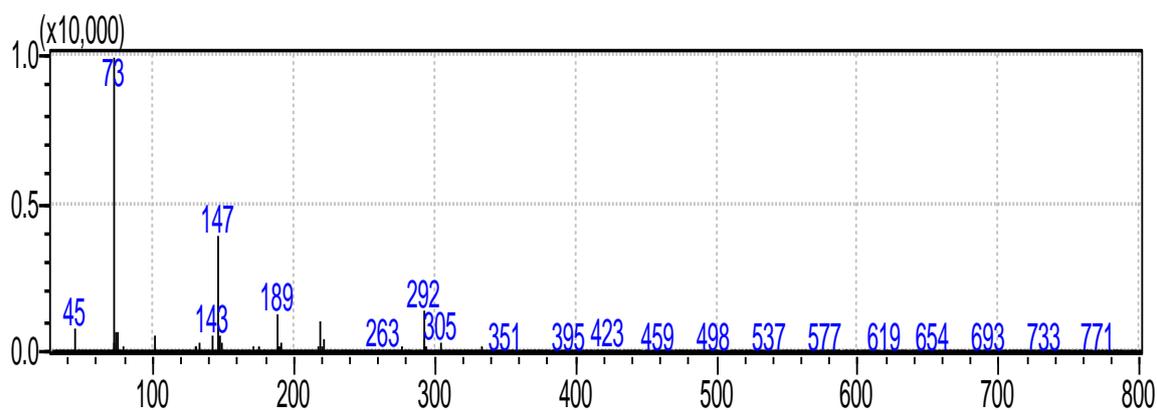
Ácido Butanedióico, RI = 1317



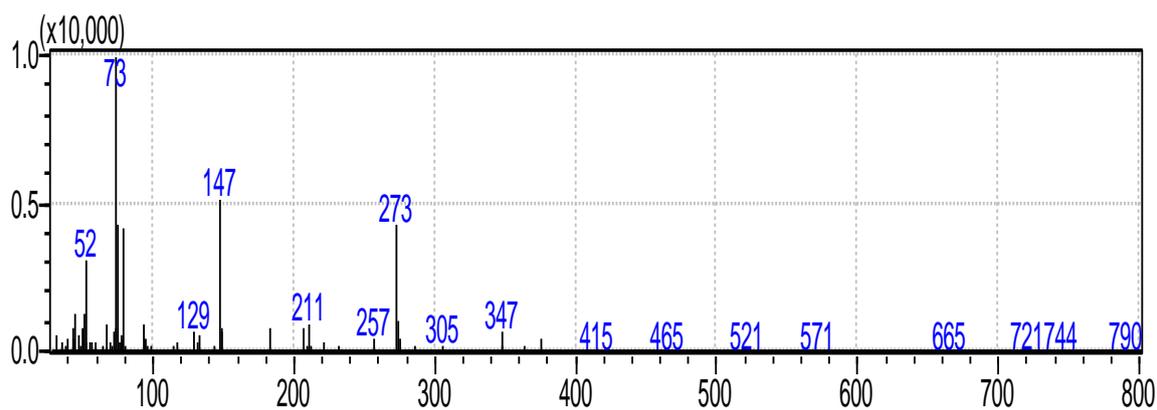
Creatinina, RI = 1429



Ácido 2,3-dihidroxiбутanedióico, RI = 1670

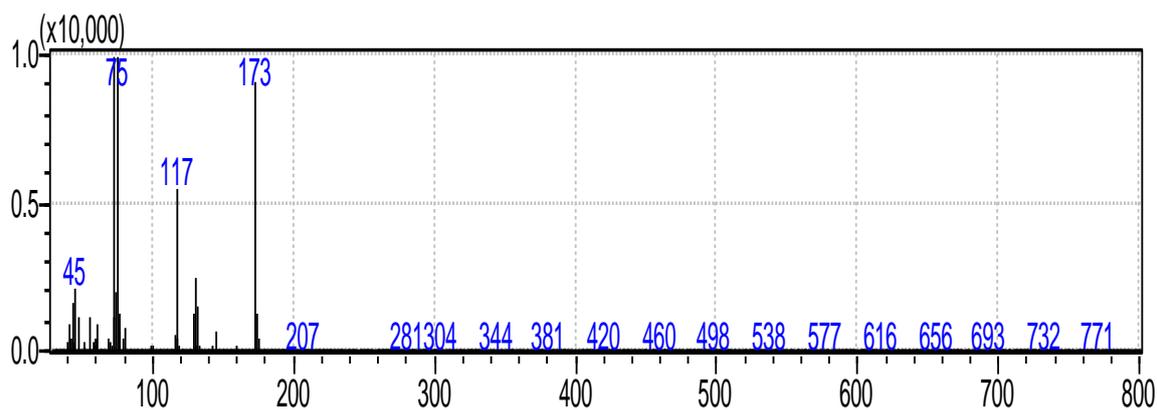


Ácido Cítrico, RI = 1845

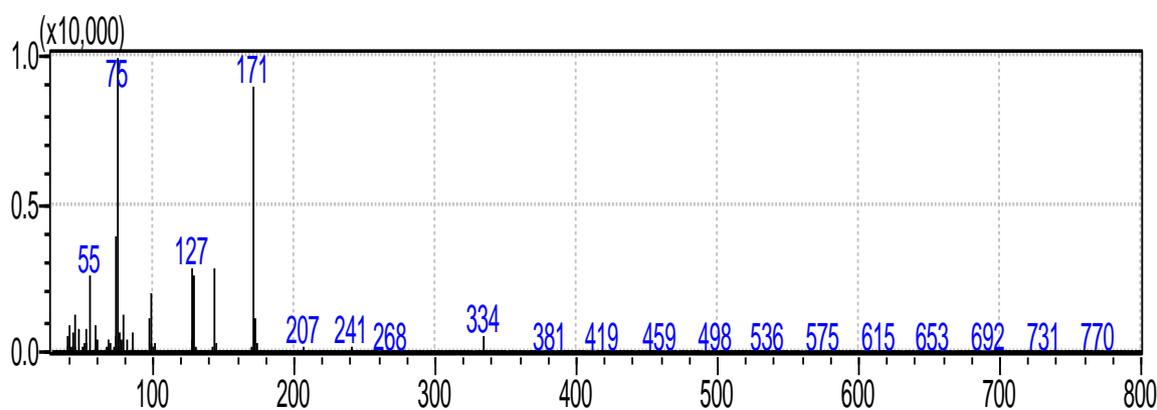


c) Ácidos Gordos

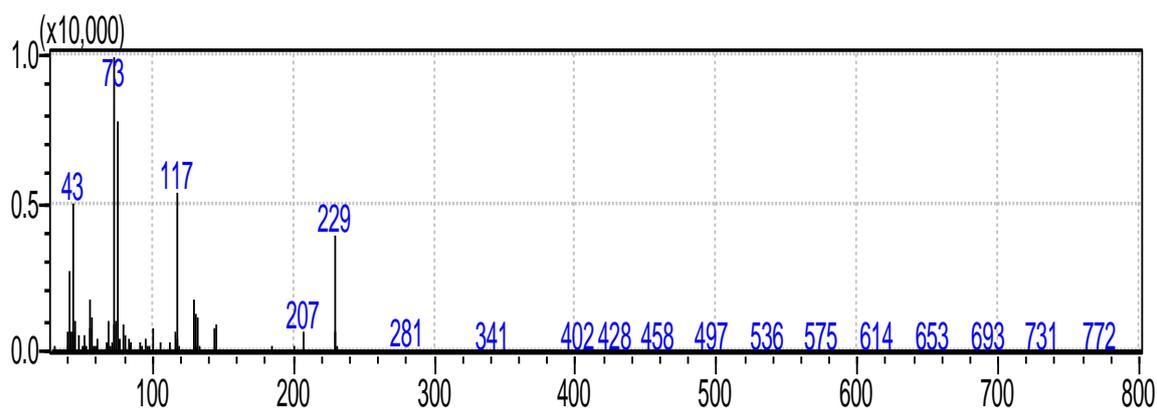
Ácido Hexanóico, RI = 1105



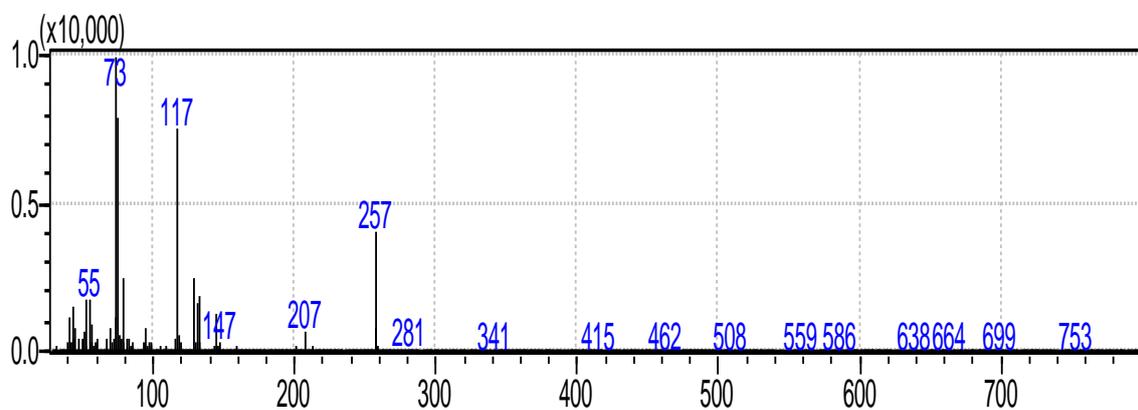
Ácido trans-2-hexanóico, RI = 1138



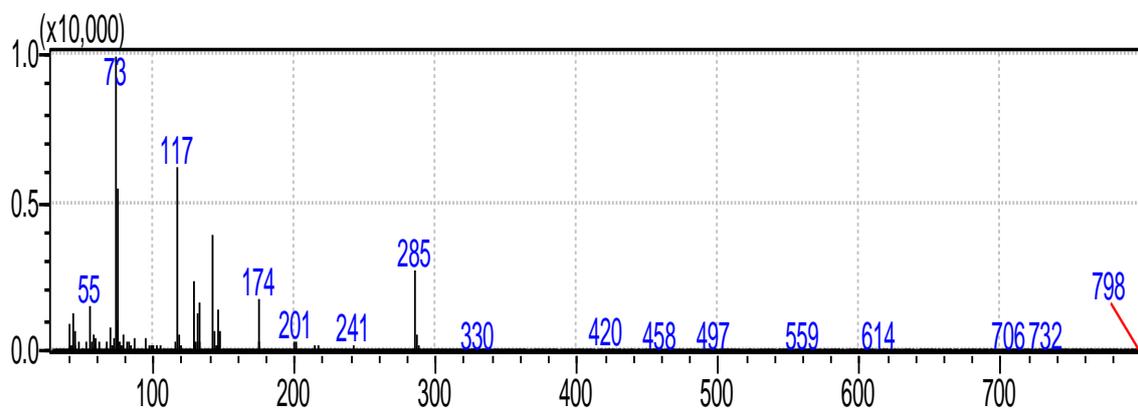
Ácido Decanoico, RI = 1457



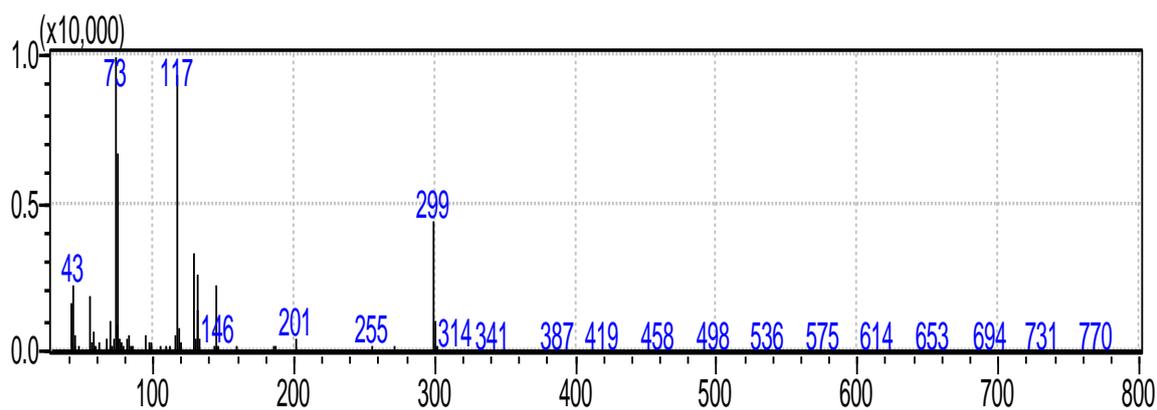
Ácido Láurico, RI = 1651



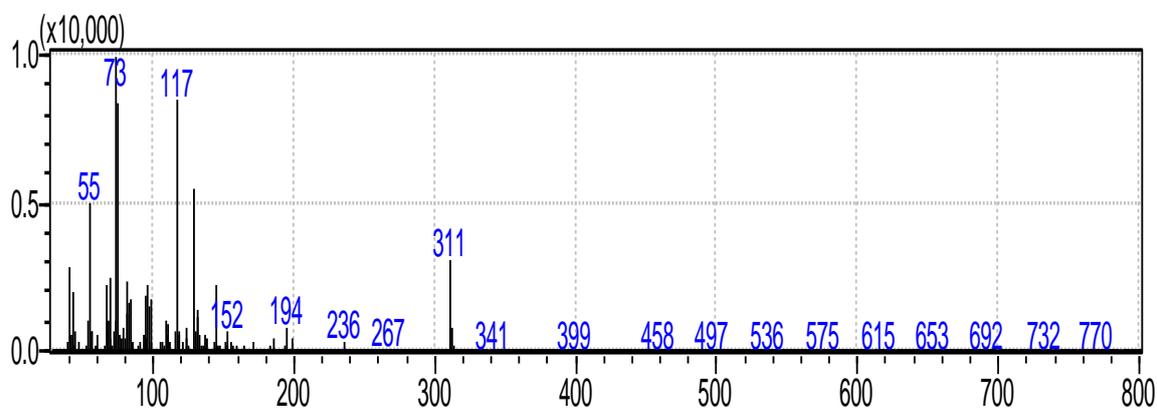
Ácido Mirístico, RI = 1844



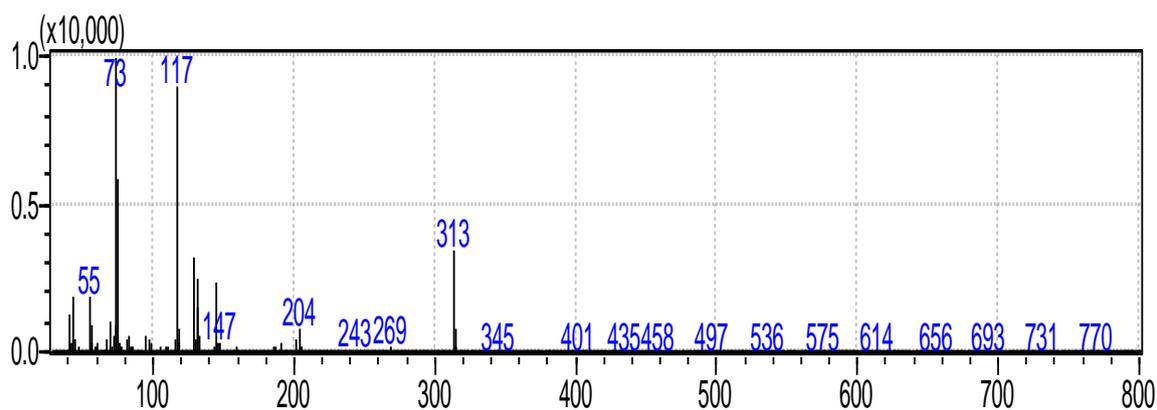
Ácido Pentadecanoico, RI = 1947



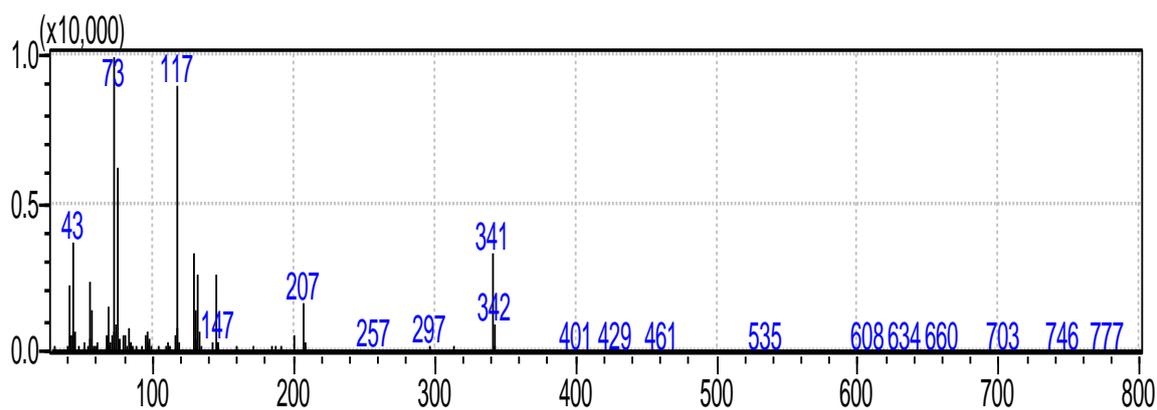
Ácido Palmitoleico, RI = 2014



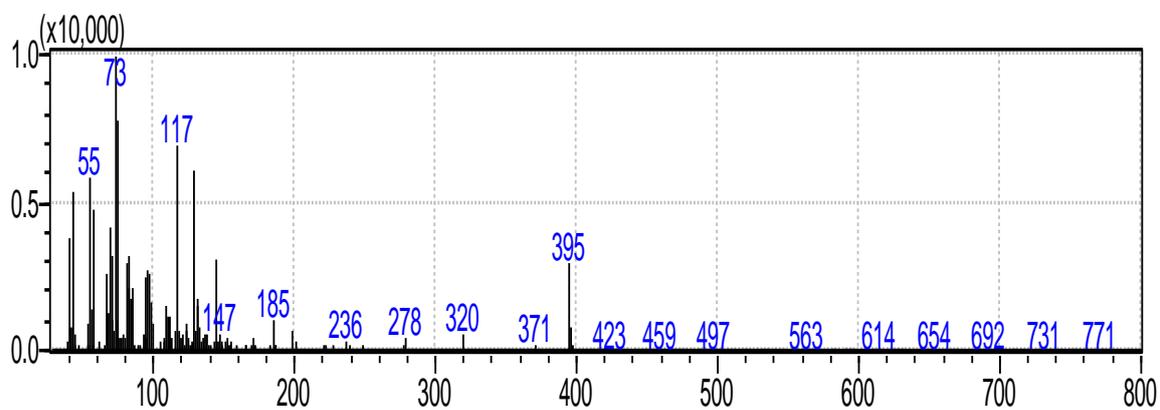
Ácido Palmítico, RI = 2034



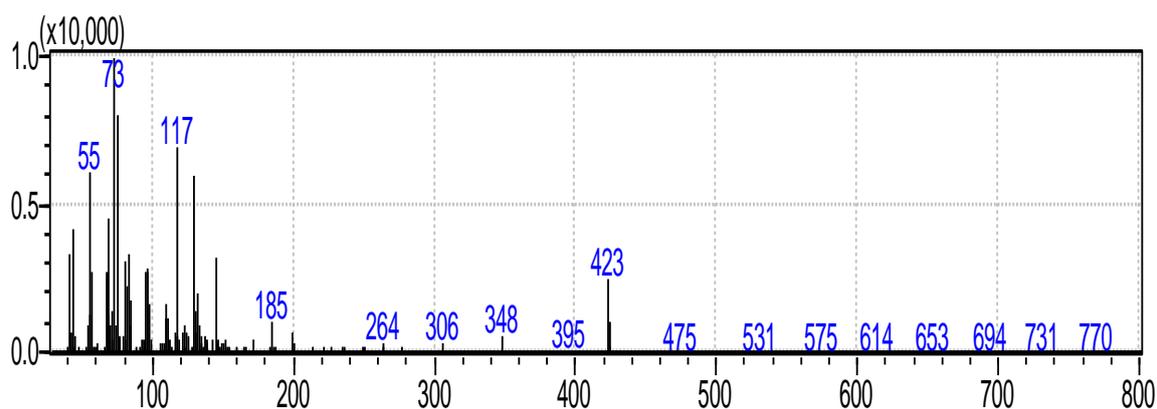
Ácido Esteárico, RI = 2201



Ácido Erúxico, RI = 2491

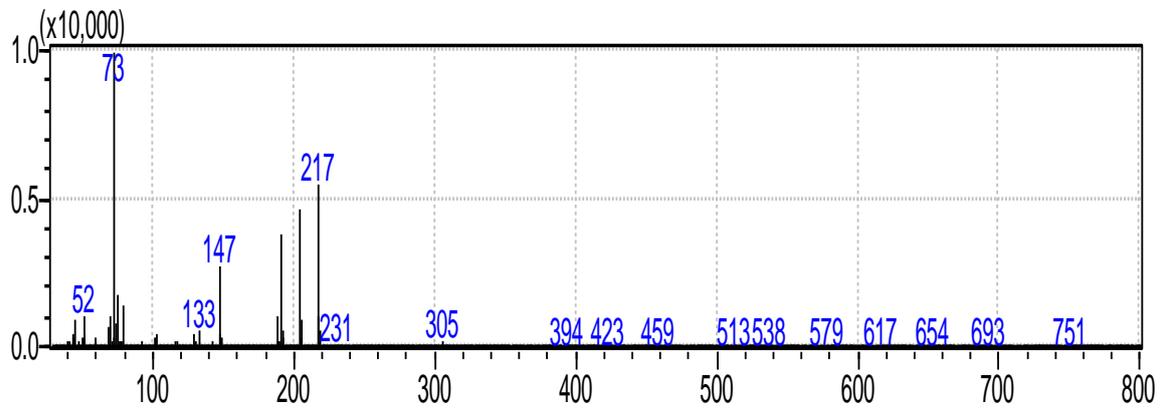


Ácido Nervónico, RI = 2637

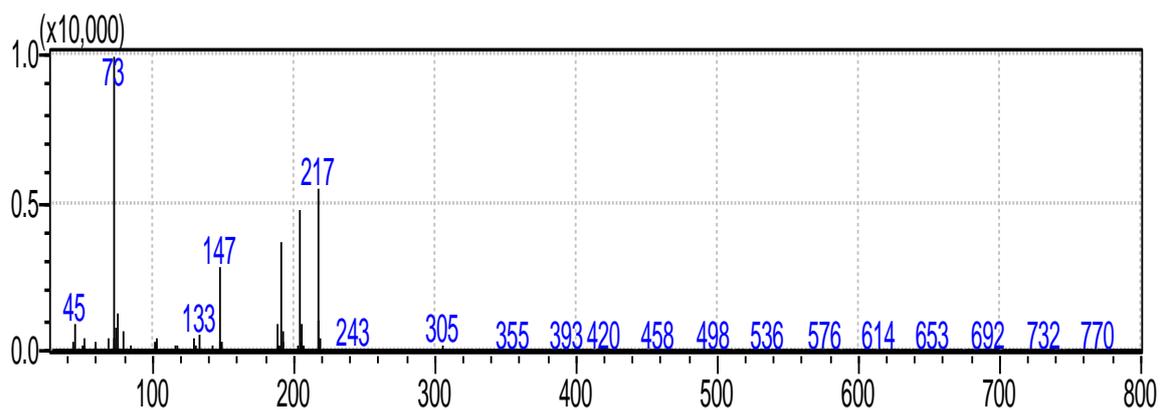


d) Açuceres

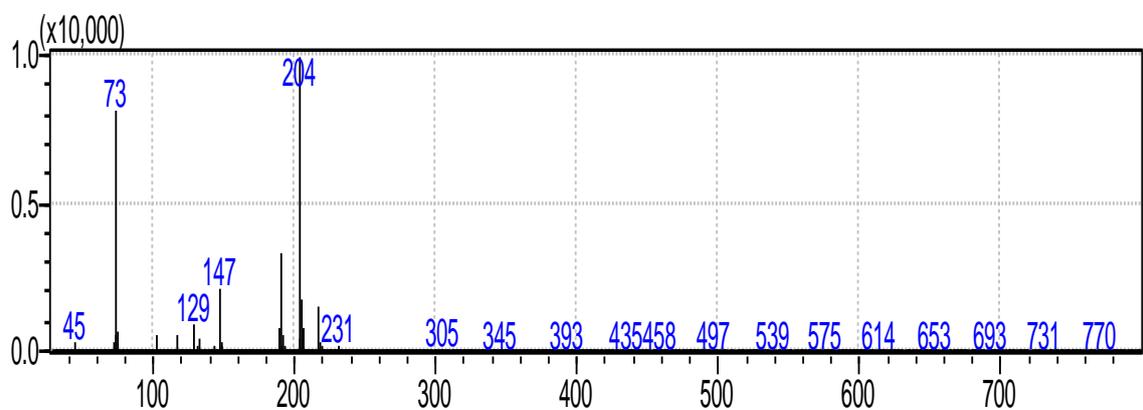
Arabinose, RI = 1657



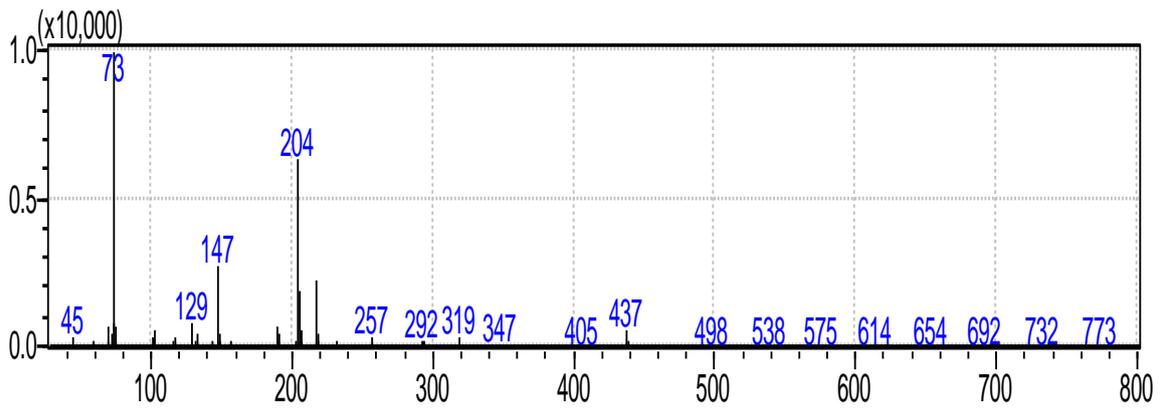
D-Ribose, RI = 1691



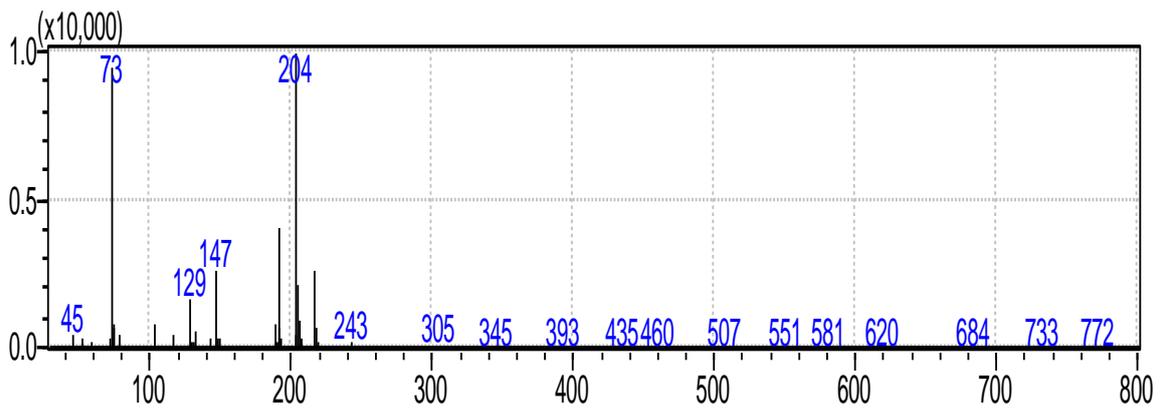
Manose, RI = 1859



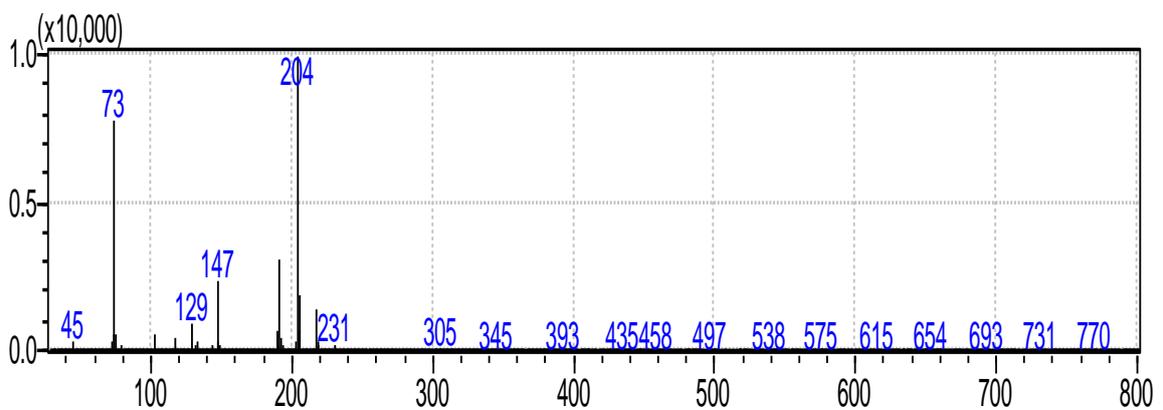
D-Fructose, RI = 1869



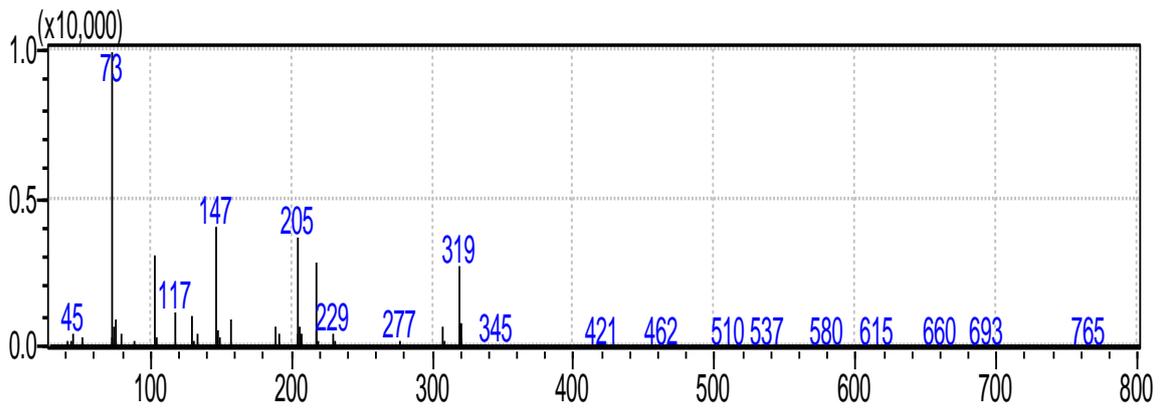
Galactose, RI = 1910



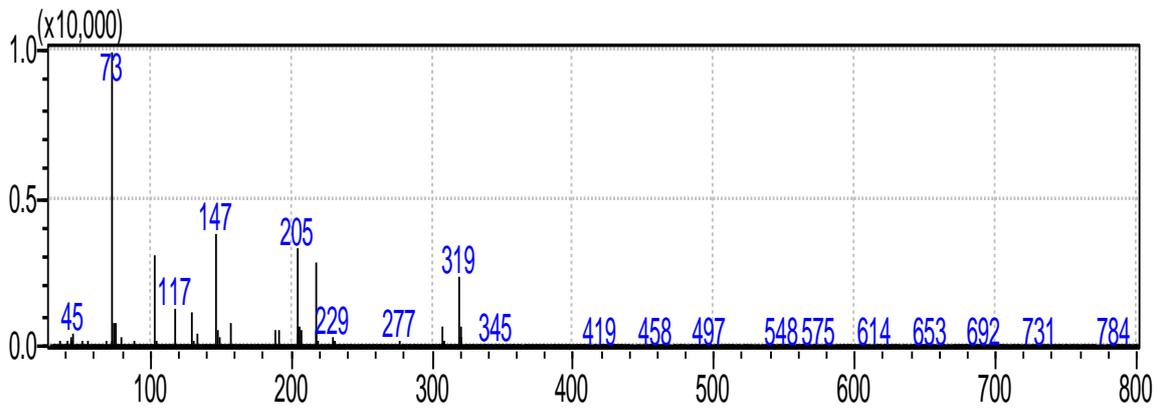
Glucose, RI = 1938



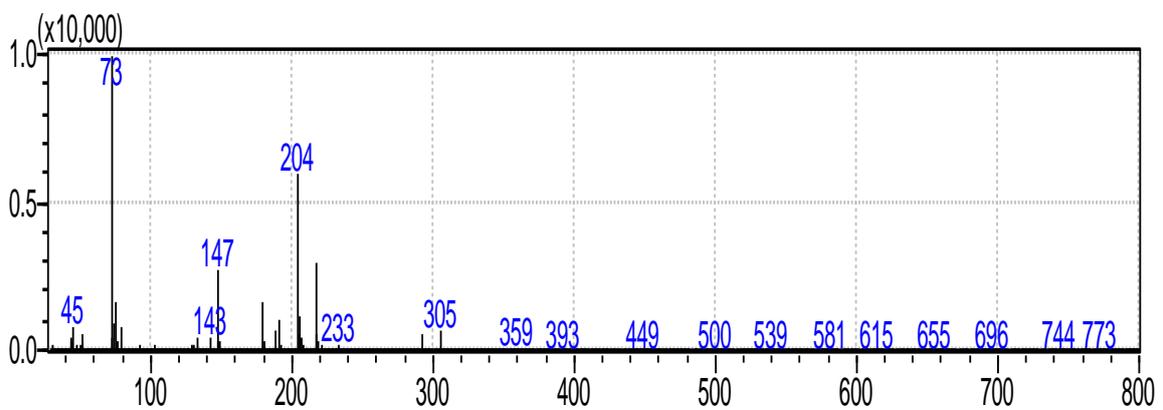
D-Manitol, RI = 2000



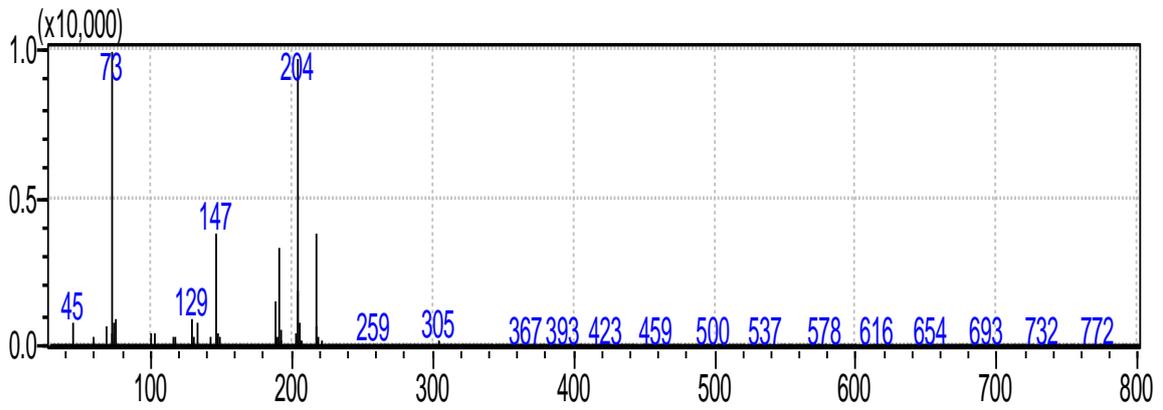
D-Sorbitol, RI = 2002



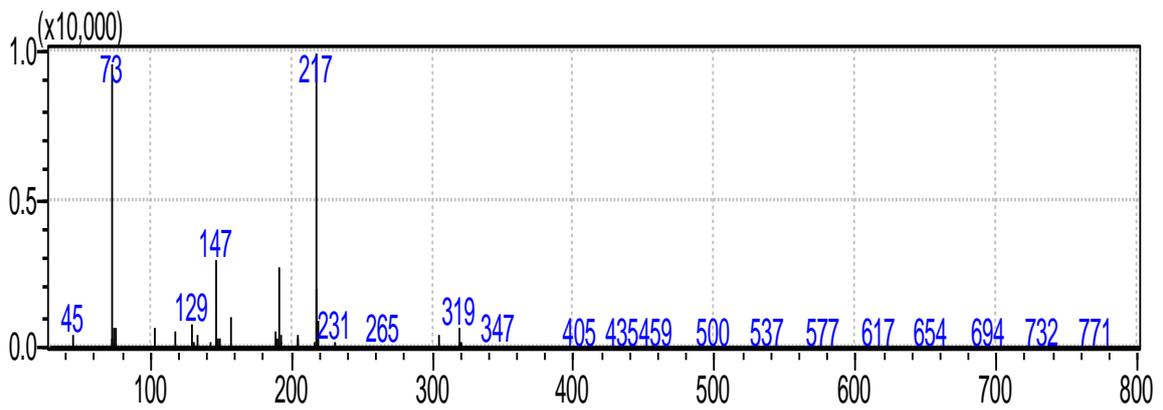
Ácido galacturónico, RI = 2004



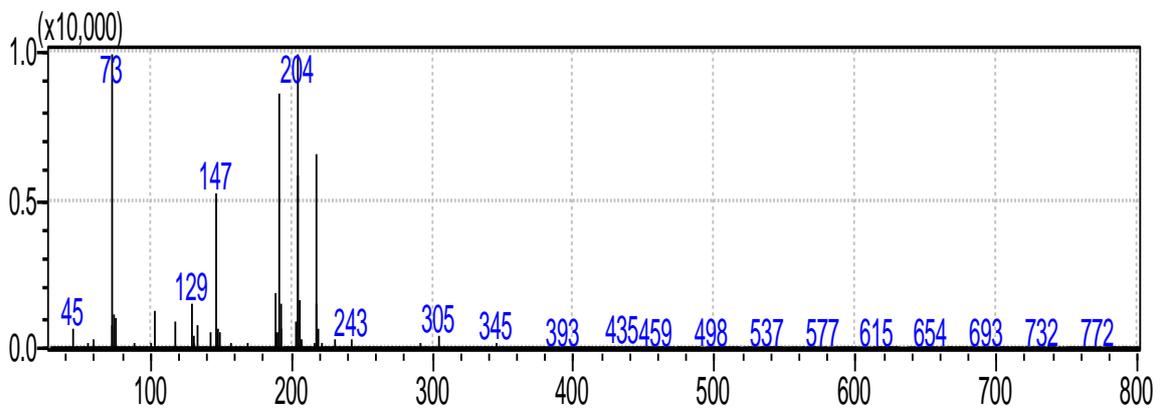
D-Xilose, RI = 2039



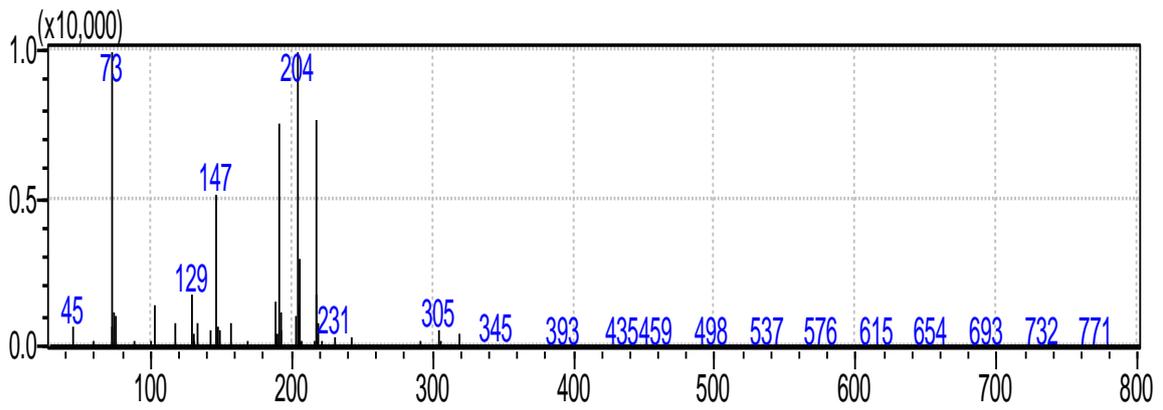
D-Altrose, RI = 2148



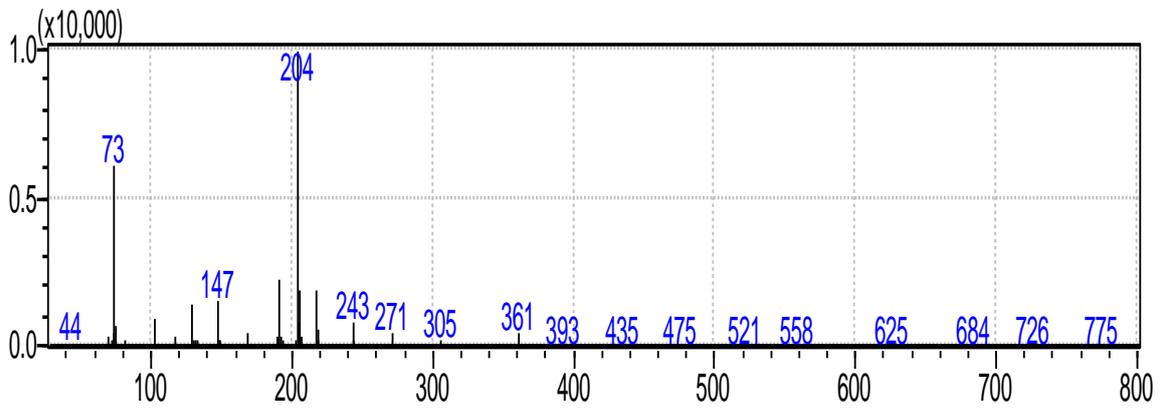
D-Alose, RI = 2185



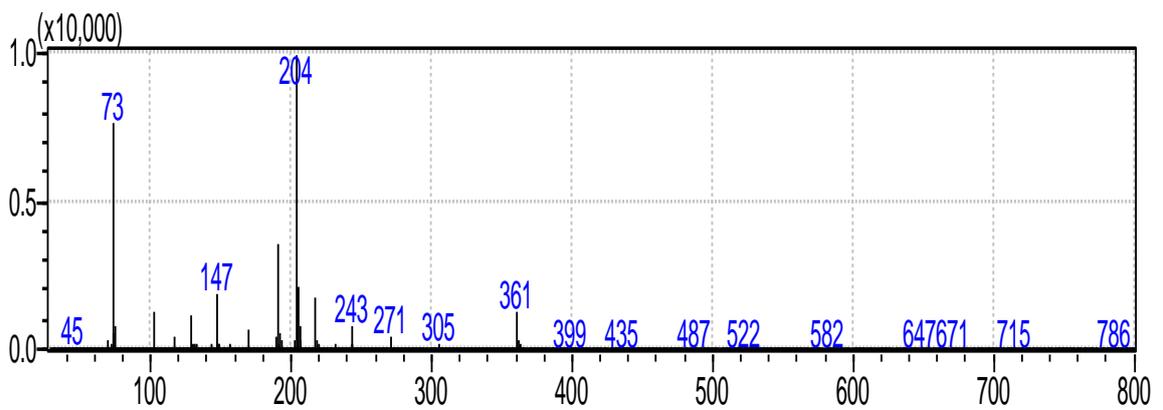
D-Talose, RI = 2194



Lactose, RI = 2559



Maltose, RI = 2619

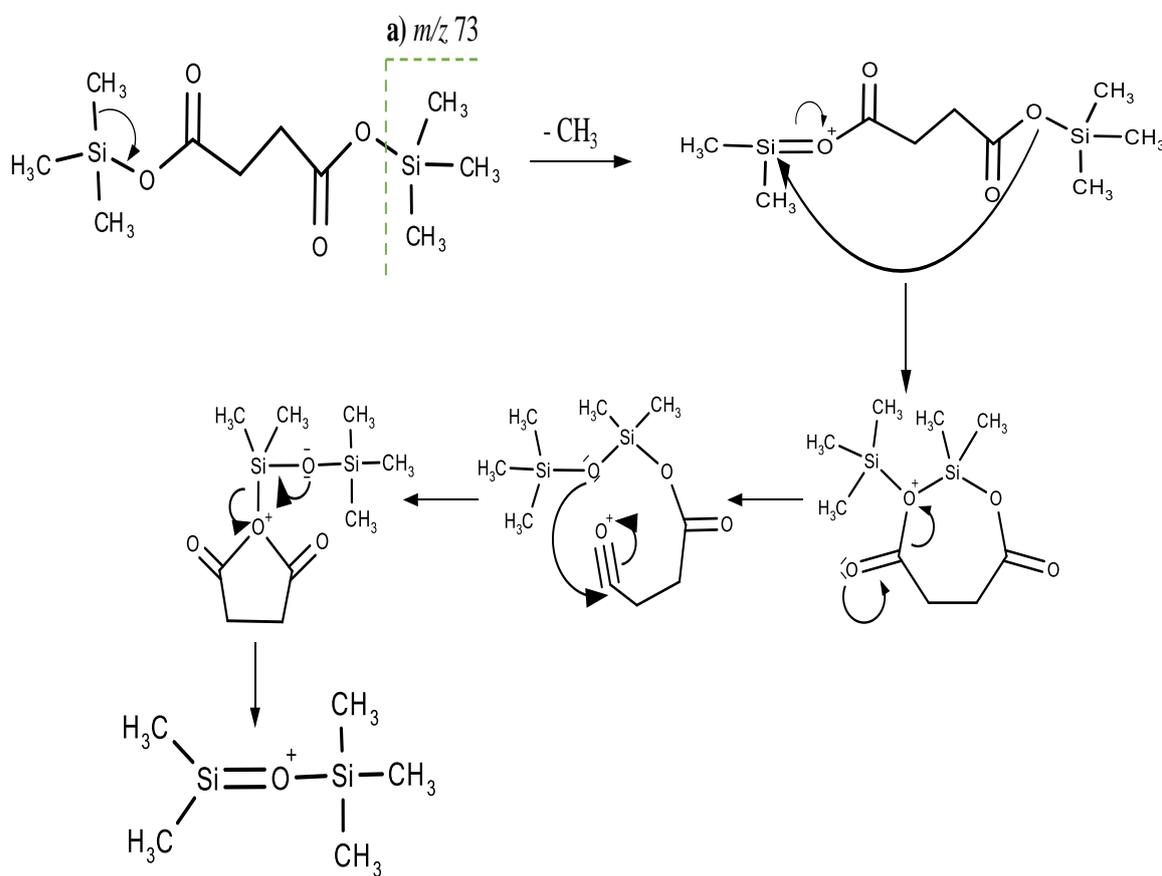


Anexo II

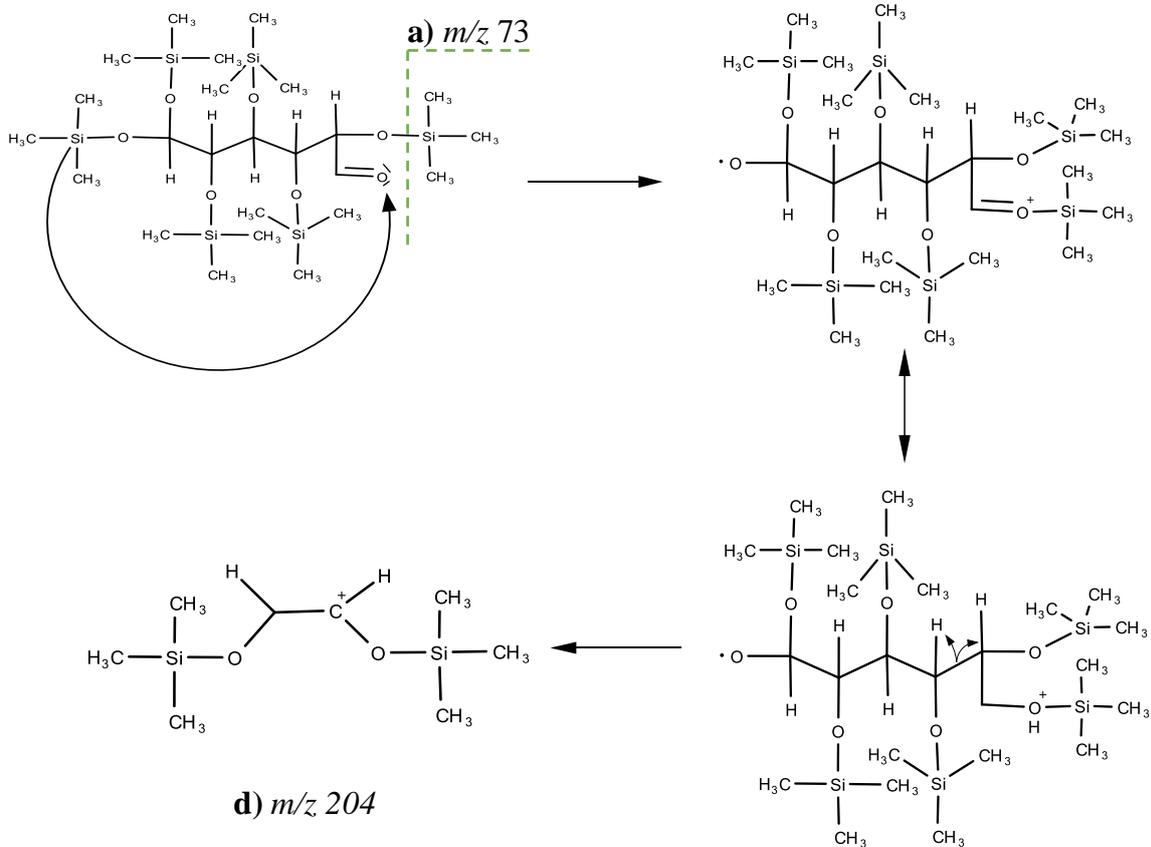
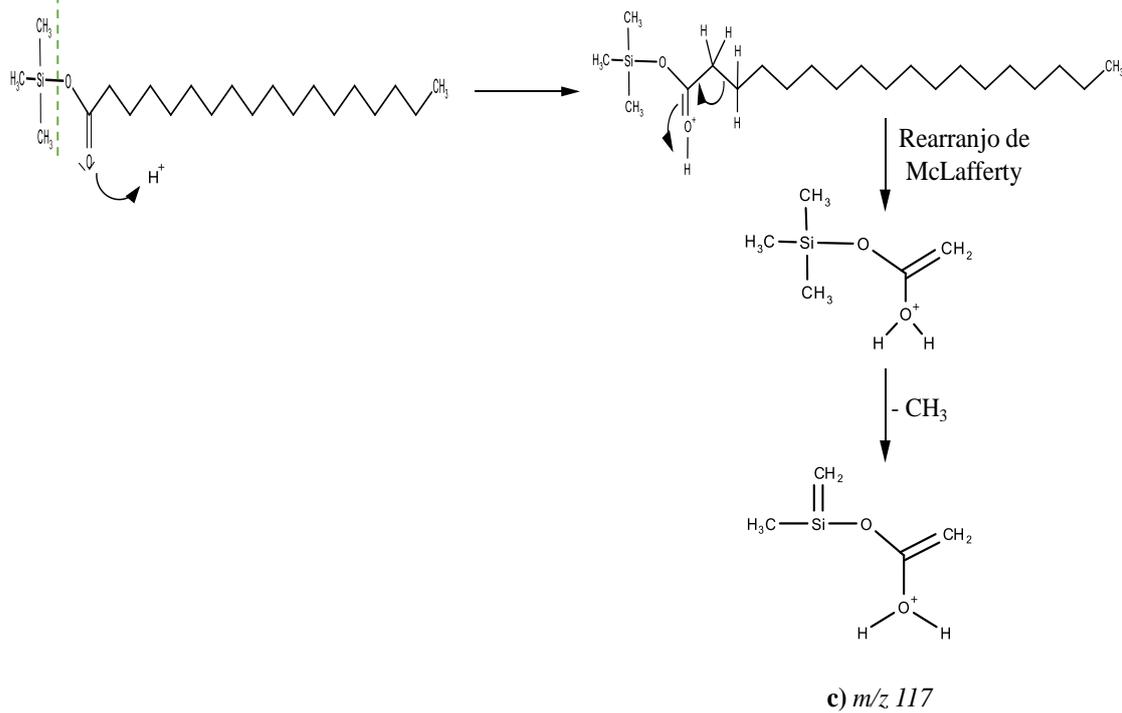
Mecanismos envolvidos no processo de fragmentação característico das diferentes famílias químicas

De seguida são apresentados os mecanismos envolvidos na formação dos iões representados na **Figura 9**, sendo eles:

- a) m/z 73
- b) m/z 147
- c) m/z 117
- d) m/z 204



a) m/z 73



Anexo III

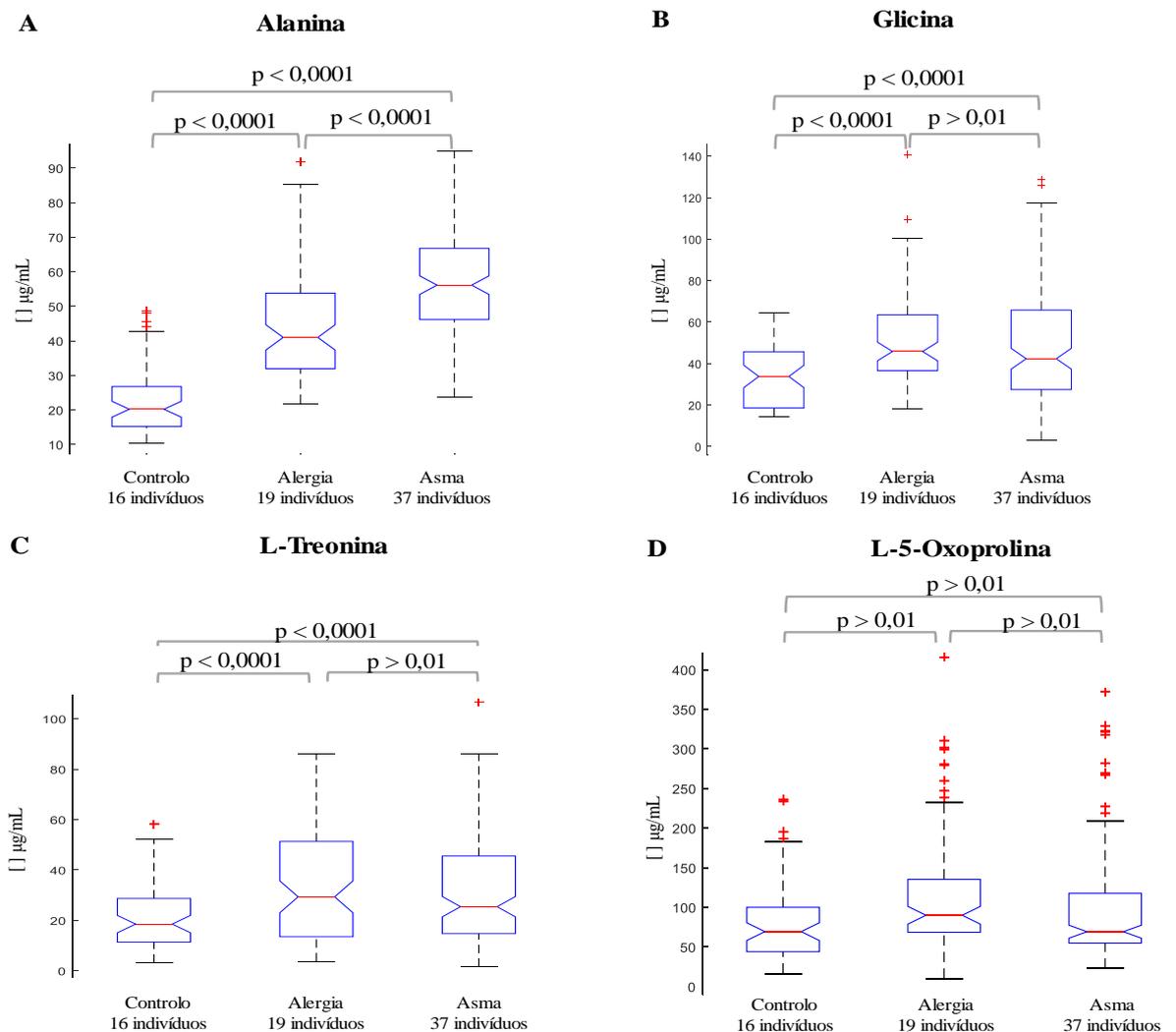
Dispersão dos resultados obtidos e significância estatística da diferença nas concentrações dos metabolitos identificados

De seguida são apresentadas as *boxplots* referentes à dispersão dos resultados obtidos e à significância estatística da diferença das concentrações dos metabolitos identificados, agrupando os indivíduos em três grupos distintos (controlo, asma, alergia).

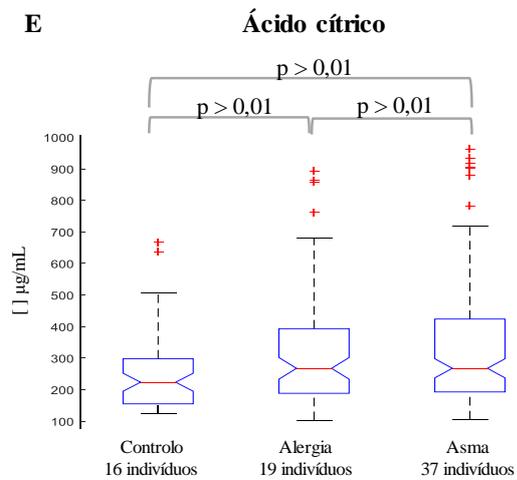
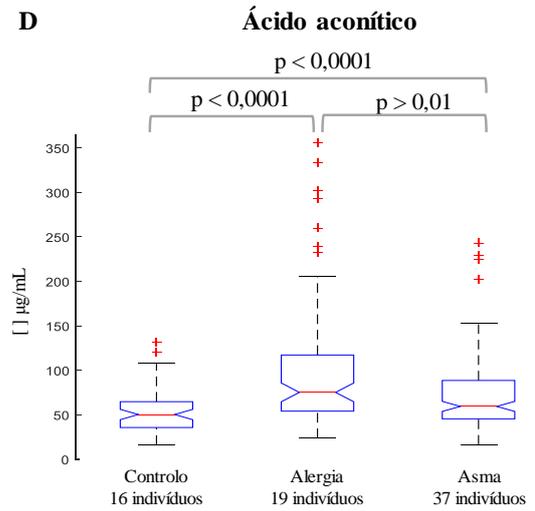
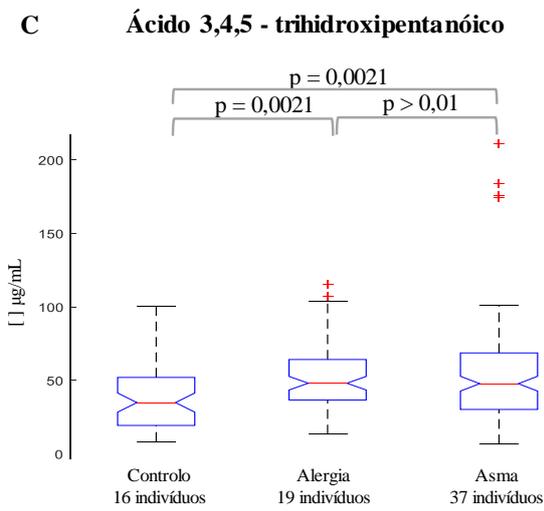
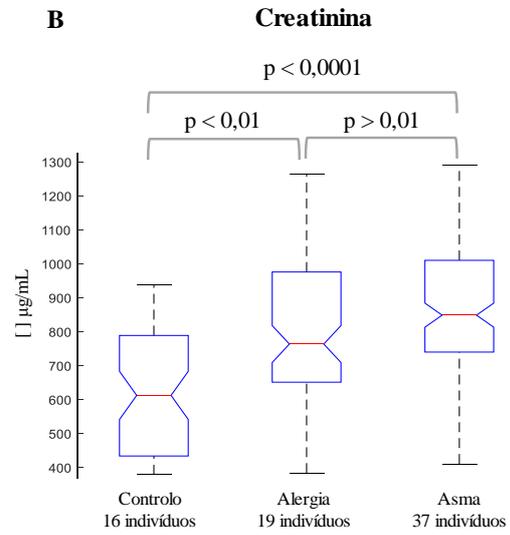
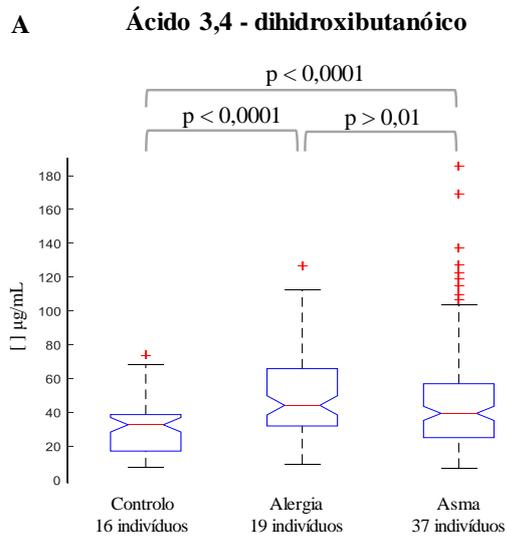
As *boxplots* estão organizadas por família química:

- a) aminoácidos.
- b) ácidos orgânicos.
- c) ácidos gordos.
- d) açúcares.

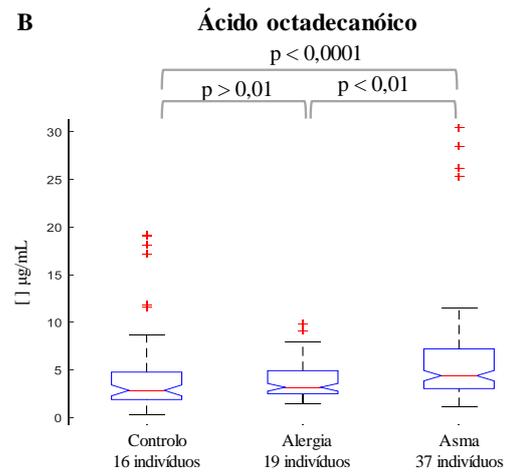
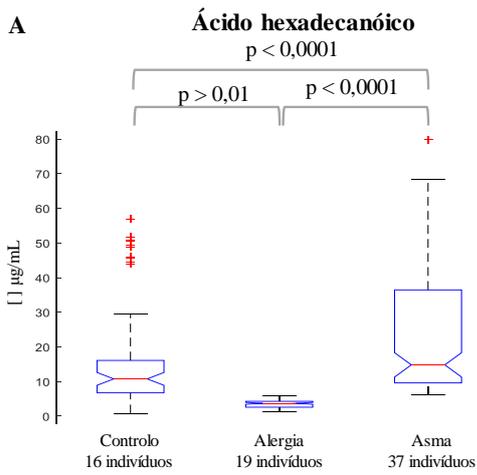
a) Aminoácidos



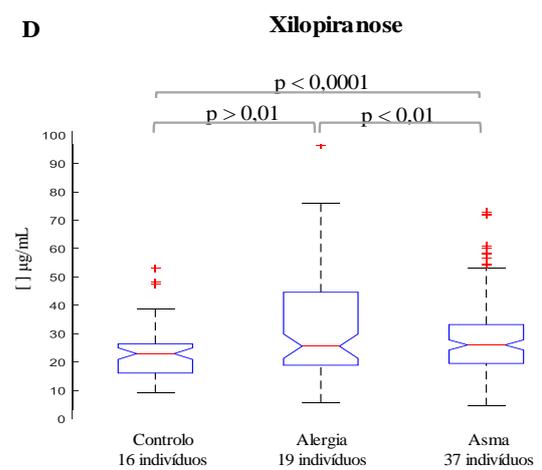
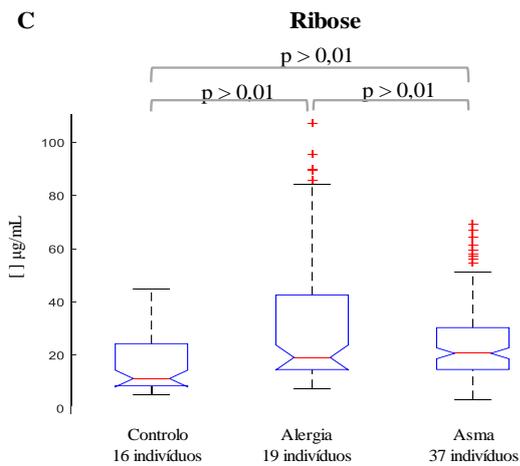
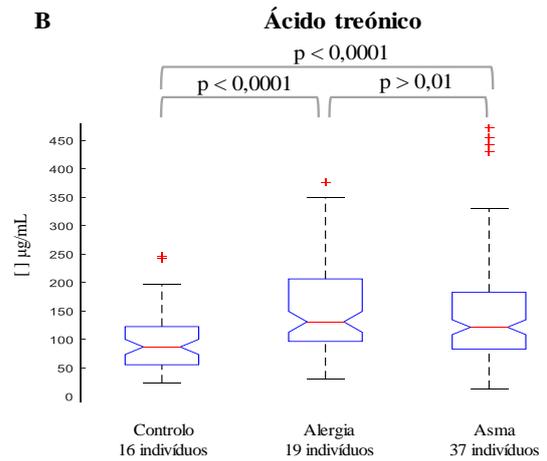
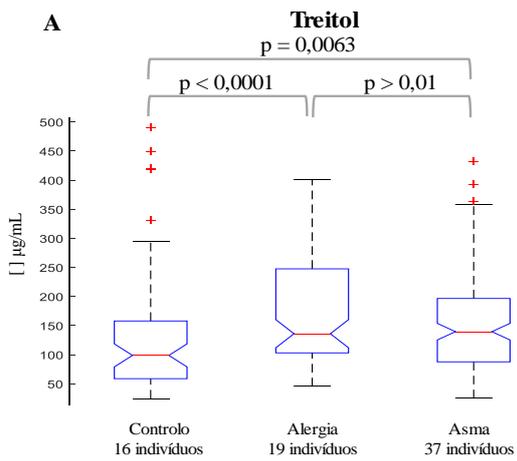
b) Ácidos orgânicos

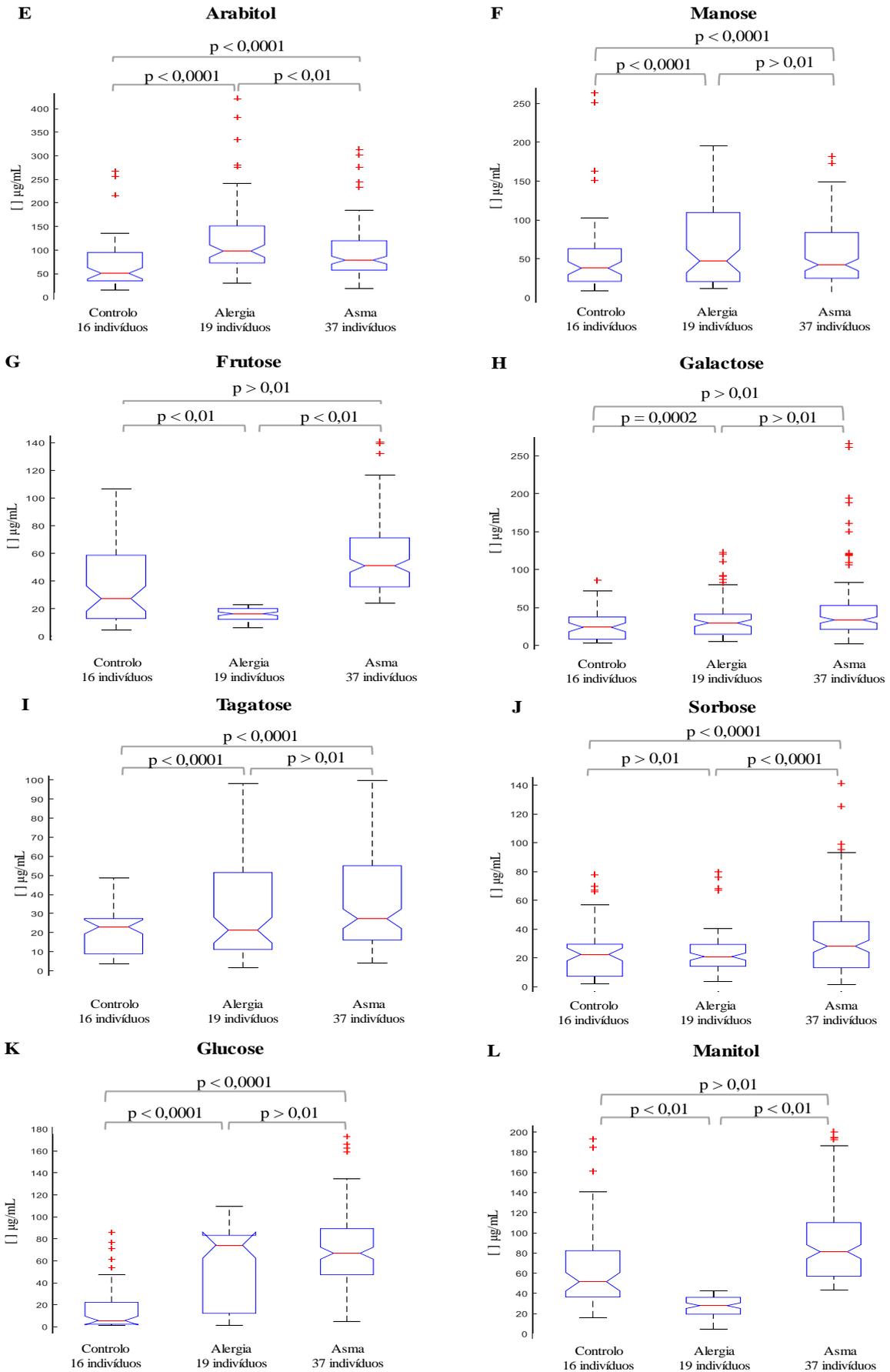


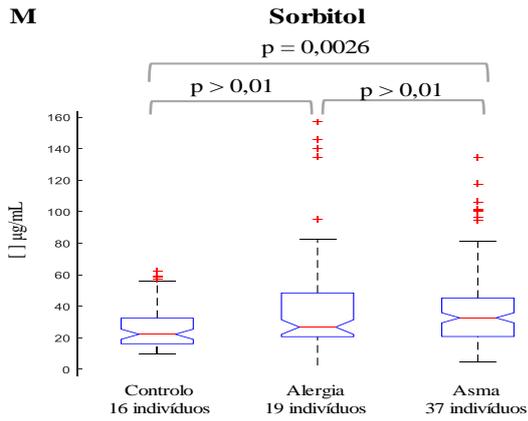
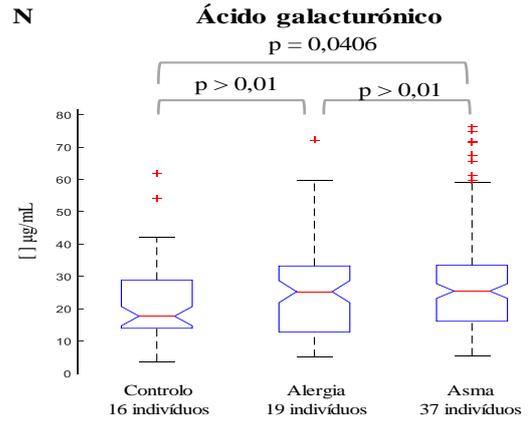
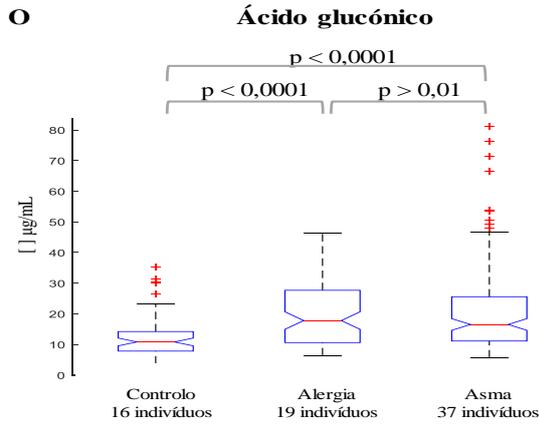
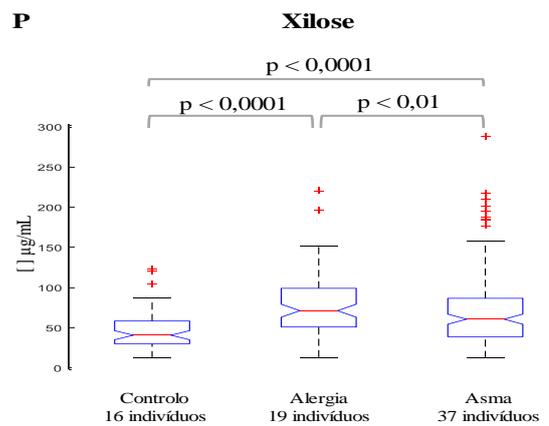
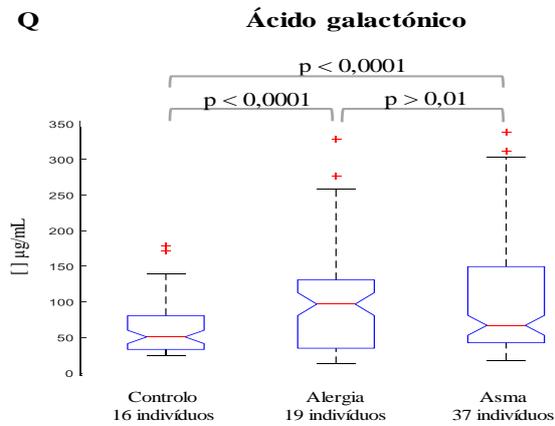
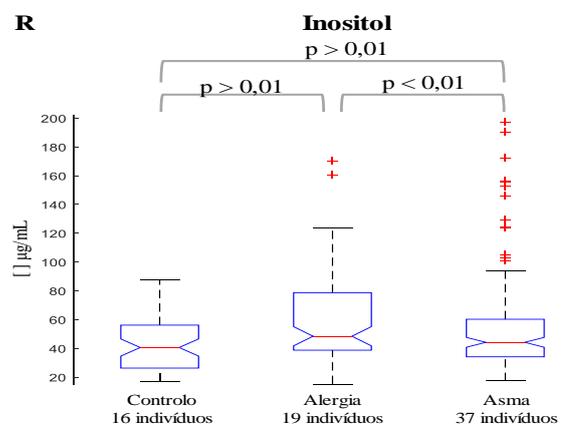
c) Ácidos gordos



d) Açúcares





M**N****O****P****Q****R****S**