



# Periostina como um importante biomarcador do fenótipo inflamatório T2 em pacientes brasileiros com asma

Danielle Cristiane Baldo<sup>1,2</sup>, José Gustavo Romaldini<sup>1</sup>,  
Marcia Margaret Menezes Pizzichini<sup>3</sup>, José Eduardo D. Cançado<sup>1</sup>,  
Alessandra Dellavance<sup>2</sup>, Roberto Stirbulov<sup>1</sup>

1. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.
2. Grupo Fleury, Pesquisa e Desenvolvimento, São Paulo (SP), Brasil.
3. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), Brasil.

Recebido: 9 setembro 2022.

Aprovado: 27 setembro 2022.

Estudo realizado nas instituições Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Grupo Fleury, São Paulo (SP), Brasil.

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi de avaliar o desempenho laboratorial da periostina associada a um painel de biomarcadores para identificar o fenótipo inflamatório de pacientes brasileiros com asma. **Métodos:** Foram avaliados 103 indivíduos brasileiros, incluindo 37 asmáticos e 66 controles não asmáticos. Ambos os grupos foram submetidos a análises de periostina sérica, níveis de eosinófilos no sangue periférico, a fração exalada de óxido nítrico (FeNO), IgE sérica total, leucotrieno E<sub>4</sub> urinário e citocinas séricas. **Resultados:** Maiores níveis de periostina ( $p = 0,005$ ), eosinófilos periféricos ( $p = 0,012$ ), FeNO ( $p = 0,001$ ), IgE total ( $p < 0,001$ ) e IL-6 ( $p \leq 0,001$ ) foram encontrados nos pacientes asmáticos do que nos controles. As análises de biomarcadores pela curva ROC mostraram uma AUC superior a 65%. A periostina (OR: 12.550; IC 95%: 2.498–63.063) e a IL-6 (OR: 7.249; IC 95%: 1.737–30.262) se mostraram biomarcadores adequados da inflamação da asma. Eosinófilos periféricos, FeNO, IgE total, IL-6, TNF e IFN- $\gamma$  apresentaram correlação com características clínicas de gravidade em pacientes asmáticos. A periostina teve valores mais elevados na asma T2 ( $p = 0,006$ ) e o TNF na asma não T2 ( $p = 0,029$ ). **Conclusão:** O painel de biomarcadores proposto para a identificação do fenótipo inflamatório de pacientes asmáticos demonstrou bom desempenho. A periostina provou ser um importante biomarcador para a identificação da asma T2.

**Palavras-chave:** Asma; Biomarcadores; Eosinofilia; Fenótipo.

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e limitações variáveis de fluxo aéreo que são reversíveis espontaneamente ou com tratamento. Considerada uma das doenças crônicas mais prevalentes no mundo, a asma é responsável direta e indiretamente por diversas perdas médicas e produtivas,<sup>(1,2)</sup> sendo o Brasil um dos países com maior prevalência.<sup>(3,4)</sup>

O diagnóstico da asma baseia-se clinicamente na presença de sintomas compatíveis associados a limitações variáveis de fluxo aéreo e manifestações de hiperresponsividade das vias aéreas.<sup>(5,6)</sup> Entre os pacientes asmáticos, existe um subgrupo de indivíduos com asma de difícil tratamento. Embora esses pacientes façam uso de altas doses de medicamentos para controlar seus sintomas, eles apresentam atributos que dificultam o controle, como fatores comportamentais, baixa adesão, técnicas inalatórias incorretas, exposição ambiental ou ocupacional e a presença de comorbidades.<sup>(7)</sup> Um subgrupo menor desses pacientes tem asma grave. Esses indivíduos carecem de controle adequado dos sintomas, mesmo quando diagnósticos alternativos são excluídos, comorbidades são tratadas, gatilhos são removidos e a adesão ao tratamento é satisfatória; eles representam cerca de 1 a 4% da população geral de asmáticos.<sup>(8,9)</sup>

Várias opções de agentes imunobiológicos estão atualmente disponíveis para o tratamento da asma grave. Para uma abordagem alvo-específica dentre as opções existentes, a identificação do fenótipo inflamatório é fundamental.<sup>(10)</sup> Dentre os fenótipos inflamatórios, o mais frequente é a inflamação do tipo 2 (T2), que se caracteriza pela presença de células T auxiliares do tipo 2 (Th2) ou células imunes inatas do tipo 2 (ILC-2), e se manifesta como eosinofilia das vias aéreas e/ou sistêmica.<sup>(11)</sup>

Todos os imunobiológicos aprovados para uso são direcionados ao tratamento da asma T2, que pode ser identificada por meio de biomarcadores disponíveis, como eosinófilos no sangue periférico (eosinófilos periféricos) e imunoglobulina E sérica total (IgE total), eosinófilos no escarro induzido (eosinófilos no escarro) e a fração exalada de óxido nítrico (FeNO).<sup>(12)</sup> Novos biomarcadores para a diferenciação da asma T2 têm sido propostos, como a periostina sérica e o leucotrieno E<sub>4</sub> urinário (LTE<sub>4</sub>).<sup>(13,14)</sup> Há também estudos investigando o uso de citocinas envolvidas nas vias inflamatórias das células Th1 e Th17, como IL-6, TNF e IFN- $\gamma$ , como biomarcadores para asma não T2.<sup>(15-17)</sup>

As diretrizes da Iniciativa Global pela Asma (GINA) de 2021 recomendam a identificação de pelo menos um dos seguintes achados para o estabelecimento da asma T2: (1) eosinófilos periféricos  $\geq 150$  células/

### Correspondência para:

Danielle Cristiane Baldo. Av. Santo Amaro, 4584 - Brooklin, CEP 04702-000, São Paulo, SP, Brasil.

Tel.: 55 (11) 98553-1348. E-mail: danielle.baldo@grupofleury.com.br.

Apoio financeiro: Grupo Fleury financiou o presente estudo sob Protocolo NP-229.

$\mu\text{L}$  e/ou (2)  $\text{FeNO} \geq 20$  ppb e/ou (3) eosinófilos no escarro  $\geq 2\%$  e/ou (4) asma induzida por alergia e/ou (5) a necessidade de terapia de manutenção com corticosteroides orais (CO). Se necessário, os valores de eosinófilos periféricos e  $\text{FeNO}$  devem ser medidos ao menos 3 vezes sob administração da menor dose possível de corticosteroides orais.<sup>(5)</sup>

Atualmente, os serviços de rotina dos laboratórios clínicos estão amplamente disponíveis para a quantificação de IgE sérica total e eosinófilos periféricos, mas carecem de validação metodologicamente direcionada no contexto clínico da asma. Também não há um serviço que forneça quantificações de  $\text{FeNO}$ , periostina e  $\text{LTE}_4$  para uso na prática clínica. A quantificação de eosinófilos no escarro é um teste ideal para a fenotipagem da asma; entretanto, é uma técnica complexa e de difícil aplicação na rotina clínica.<sup>(18)</sup> A disponibilidade e acessibilidade de outros biomarcadores são essenciais, não apenas visando a substituição de biomarcadores menos úteis, mas também para a complementação de informações sobre o fenótipo inflamatório dos pacientes. Nesse sentido, um painel mais completo de biomarcadores pode ser útil.<sup>(12,19,20)</sup> Para isso, é fundamental que os laboratórios clínicos validem esses ensaios no contexto clínico da asma para determinar o desempenho analítico dos testes para esse fim.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi de avaliar o desempenho analítico de um painel de biomarcadores para identificação do fenótipo inflamatório em um grupo de pacientes asmáticos no Brasil.

## MÉTODOS

O presente estudo transversal, observacional e analítico foi devidamente registrado na Plataforma Brasil sob CAAE nº 73640917.8.0000.5479 e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e do Grupo Fleury. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Este estudo incluiu indivíduos brasileiros maiores de 18 anos de dois centros diferentes: pacientes diagnosticados com asma grave de acordo com os critérios internacionais descritos nas diretrizes da ATS/ERS,<sup>(21)</sup> acompanhados no ambulatório de asma grave da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e pacientes com asma não grave e indivíduos controles, colaboradores da empresa Grupo Fleury, que se voluntariaram a participar por meio de comunicação interna do projeto de pesquisa. O tamanho amostral foi estimado seguindo a diretriz CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) EP09-A3, que determina um requisito mínimo de 40 amostras para verificação conduzida pelo usuário.

Pacientes e controles foram recrutados de fevereiro de 2019 a maio de 2021. Os pacientes foram instruídos a não interromper o tratamento em andamento, pois a avaliação não era intervencionista e não abordava um tratamento específico. Para inclusão no grupo de asma não grave, foram aceitos pacientes previamente

diagnosticados por um especialista, que tiveram crises de asma na vida adulta e que não preenchiam os critérios para asma grave pela história clínica e pelas medicações utilizadas para controle dos sintomas. O grupo de controle foi determinado por pareamento de sexo com o grupo de asma.

Todos os participantes do estudo (pacientes e controles) foram avaliados quanto à obesidade (cálculo do IMC), alergia a antígenos inalantes (detecção de IgE específica contra poeira doméstica, ácaros, pólen de gramíneas, epitélio e proteínas animais e/ou fungos) e se tinham qualquer uma das seguintes comorbidades: apneia do sono, bronquiectasia, dermatite atópica, urticária crônica, polipose nasal, rinossinusite crônica, disfunção das cordas vocais ou doenças autoimunes.

Os pacientes asmáticos foram avaliados quanto à história da doença (asma de início tardio foi definida como o início dos sintomas na idade adulta), os medicamentos em uso para categorização da etapa de tratamento de acordo com a GINA, o controle da asma por meio do Teste de Controle da Asma (TCA) e a função pulmonar pela análise dos valores da capacidade vital forçada (CVF) e do volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $\text{VEF}_{1s}$ ) da espirometria (Koko® PFT Spirometer, nSpire Health Inc, Longmont, CO, EUA) prevista (antes do uso do broncodilatador), realizados de acordo com os critérios de qualidade e reprodutibilidade da ATS/ERS.<sup>(22)</sup> Asma T2 foi definida quando os pacientes apresentavam ambos os biomarcadores: valores de eosinófilos periféricos  $\geq 150$  células/ $\mu\text{L}$  e  $\text{FeNO} \geq 20$  ppb.

As quantificações de IgE total e específica foram realizadas por imunofluorimetria automatizada e plataformas de eletroquimioluminescência, sendo os resultados expressos em kilo unidades por litro (kU/L). Os níveis sanguíneos de eosinófilos, expressos em células por microlitro (células/ $\mu\text{L}$ ), foram determinados por citometria de fluxo fluorescente e impedância, com confirmação das contagens e análise morfológica por microscopia quando aplicável.

A quantificação da periostina sérica foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit Human Periostin/OSF-2 (R&D Systems Inc, Minneapolis, MI, EUA), e os resultados foram expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL). Os testes de quantificação de  $\text{FeNO}$  foram realizados de acordo com as recomendações da ATS/ERS<sup>(23)</sup> usando um dispositivo NIOX-MINO® (Circassia AB, Uppsala, Suécia) e expressos em partes por bilhão (ppb). A quantificação de  $\text{LTE}_4$  foi realizada por ELISA competitivo com o kit Leukotriene E4 ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os resultados de  $\text{LTE}_4$  foram normalizados pela concentração de creatinina sérica na amostra e expressos em picogramas por miligrama de creatinina (pg/mg Cr). Já as citocinas inflamatórias IL-6, TNF e IFN- $\gamma$  foram quantificadas pela metodologia BD™ Cytometric Array Human (CBA) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e expressos em picogramas por mililitro (pg/mL). A IL-6 foi avaliada nos pacientes asmáticos e controles, enquanto TNF e IFN- $\gamma$  foram analisados apenas nos pacientes asmáticos.

As distribuições das variáveis numéricas foram avaliadas por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Nos casos de distribuição não paramétrica de dados, o teste de Mann-Whitney foi usado para comparações entre dois grupos, e o teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparações entre três grupos. Para variáveis categóricas, as interações de frequência foram analisadas pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher. A curva ROC foi utilizada para medir o desempenho dos testes como discriminador de asmáticos e controles. A inferência das variáveis preditoras do fenótipo inflamatório foi realizada por regressão logística bivariada pelo método de regressão linear.

As análises foram realizadas com o software IBM SPSS Statistics (versão 20.0) e os gráficos foram gerados com o software GraphPad PRISM (versão 5.01).

Não foi possível quantificar todas as variáveis para todas as amostras devido a limitações de volume ou indisponibilidade; no entanto, essa perda não impactou significativamente nenhuma variável. A amostragem final em cada análise está detalhada nas Tabelas e Figuras abaixo.

## RESULTADOS

A coleta de dados foi realizada em 103 indivíduos, 37 (36%) dos quais eram pacientes asmáticos e 66 (64%), controles não asmáticos. Dentre os 37 asmáticos, 15 (40,5%) eram asmáticos graves acompanhados no Ambulatório de Asma Grave da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, enquanto 22 (59,5%) eram asmáticos não graves, colaboradores do Grupo Fleury. Os dados demográficos dos pacientes estão apresentados na Tabela 1.

### *Análise comparativa dos biomarcadores nos pacientes com asma e nos controles*

Para avaliar os métodos analíticos utilizados para a quantificação dos biomarcadores, os valores obtidos dos pacientes asmáticos foram comparados aos dos controles. A Figura 1 ilustra os resultados obtidos nesta análise, bem como a significância estatística encontrada

em cada comparação. Valores mais elevados de eosinófilos periféricos ( $p = 0,012$ ), FeNO ( $p \leq 0,001$ ), IgE ( $p \leq 0,001$ ), periostina ( $p = 0,005$ ) e IL-6 ( $p \leq 0,001$ ) foram observados nos pacientes asmáticos em comparação com os controles; no entanto, não houve diferença nos valores de LTE<sub>4</sub> ( $p = 0,353$ ).

### *Verificação do desempenho analítico dos biomarcadores*

Para estabelecer os pontos de corte de desempenho analítico ótimo em relação aos métodos avaliados no contexto da asma, os biomarcadores que apresentaram níveis significativamente mais elevados em pacientes asmáticos foram avaliados pela análise da curva ROC para determinar a sensibilidade e especificidade. Amostras com dados faltantes foram excluídas das análises. Os resultados mostraram uma curva estatisticamente significativa para todos os biomarcadores analisados, com área sob a curva (AUC) superior a 65%. As curvas obtidas estão representadas na Figura 2.

A Tabela 2 descreve os resultados da curva ROC, bem como os pontos de corte de melhor desempenho analítico para cada biomarcador, incluindo a sensibilidade quando a especificidade foi superior a 90%.

A análise de regressão logística binária foi realizada para determinar se a associação de biomarcadores contribuiria para uma melhor sensibilidade no contexto clínico da asma. Para tanto, os biomarcadores foram categorizados de acordo com os pontos de corte estabelecidos em positivos (acima do ponto de corte) e negativos (abaixo do ponto de corte). A periostina (OR: 12.550; IC 95%: 2.498-63.063) e a IL-6 (OR: 7.249; IC 95%: 1.737-30.262) foram preditores significantes de asma, enquanto os outros biomarcadores não foram.

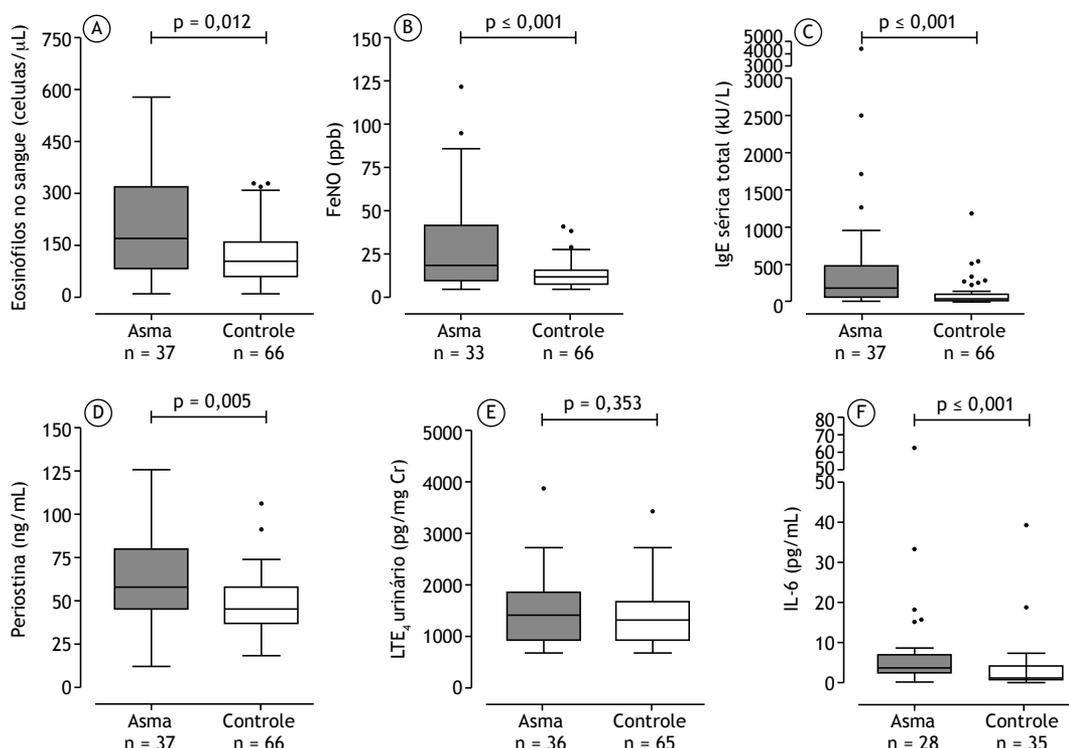
### *Análise da interferência de comorbidades nos valores dos biomarcadores*

Para analisar a interferência das comorbidades nos valores dos biomarcadores, o grupo controle foi estratificado quanto à presença de alergias, obesidade e presença de uma ou mais comorbidades associadas a piores prognósticos na asma (apneia

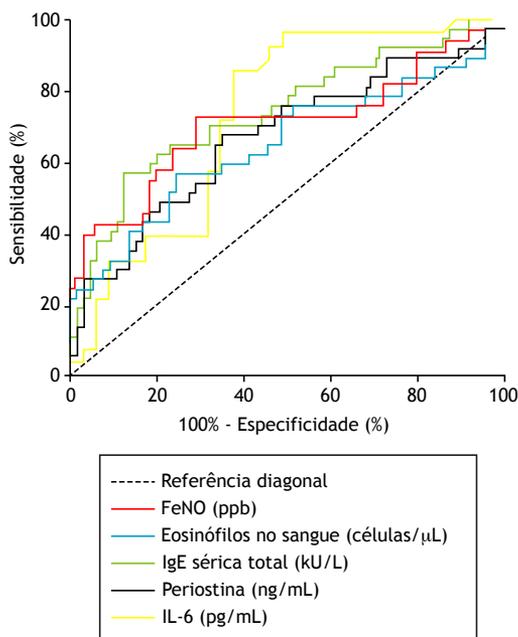
**Tabela 1.** Dados demográficos estratificados por grupo.

Variáveis	Asmáticos (n = 37)	Controles (n = 66)
Sexo (% mulheres) <sup>a</sup>	27 (73%)	49 (74%)
Idade (anos) <sup>b</sup>	39 (33,5 - 54,0)	33 (27,8 - 38,3)
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	28 (23 - 33)	25 (23 - 29)
Alergia (IgE específica) <sup>a</sup>	30 (81%)	26 (39%)
Outras comorbidades <sup>a</sup>	19 (51%)	23 (35%)
Início tardio (asma na idade adulta) <sup>a</sup>	15 (41%)	-
TCA <sup>b</sup>	20 (16 - 23)	-
Exacerbações (ano anterior) <sup>a</sup>	9 (24%)	-
CVF (% predita) <sup>b</sup>	90 (73 - 100)	-
VEF <sub>1</sub> (% predita) <sup>b</sup>	80 (55 - 92)	-
Etapas 4 e 5 do tratamento GINA <sup>a</sup>	17 (46%)	-
Uso de CO <sup>a</sup>	5 (14%)	-

IMC: Índice de massa corporal (quilogramas por metro quadrado); IgE: Imunoglobulina E; TCA: Teste de controle da asma; CVF: Capacidade vital forçada; VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; GINA: Iniciativa Global pela Asma; CO: Corticosteroides orais. <sup>a</sup> Número de casos (%); <sup>b</sup> Mediana (Intervalo interquartil 25 - 75).



**Figura 1.** Biomarcadores nos pacientes asmáticos e controles. Caixas verticais representam os intervalos interquartis 25 - 75. As linhas centrais representam as medianas e as hastes indicam os limites inferior e superior. Os pontos representam outliers. FeNO: Fração exalada de óxido nítrico; LTE<sub>4</sub>: Leucotrieno E<sub>4</sub> urinário; IL: Interleucina; IgE: Imunoglobulina E.



**Figura 2.** Curva característica de operação do receptor (ROC) com base nos valores dos biomarcadores no contexto clínico da asma. Cada biomarcador tem sua própria curva estimada.

do sono, bronquiectasia, dermatite atópica, urticária crônica, polipose nasal, rinossinusite crônica, rinite alérgica ou disfunção das cordas vocais). Nenhuma

das comorbidades foi associada a valores elevados de biomarcadores (Tabela S1).

### Análise comparativa dos biomarcadores em pacientes asmáticos de acordo com as características clínicas e fenótipos

Para avaliar a associação entre os valores dos biomarcadores e os dados clínicos dos pacientes, o grupo asmático foi analisado separadamente quanto às variáveis clínicas estudadas.

Os pacientes com asma mais grave (em níveis mais elevados de tratamento de acordo com a GINA) apresentaram valores mais elevados de IL-6 ( $p \leq 0,001$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p = 0,007$ ) e níveis mais baixos de eosinófilos periféricos ( $p = 0,030$ ) do que pacientes com asma não grave. Na avaliação categórica quanto ao controle da asma, não foram encontradas diferenças nos níveis de biomarcadores em asma não controlada (TCA < 20) e controlada (TCA  $\geq 20$ ) ou em asmáticos em uso de corticosteroides orais. Já com relação às variáveis relativas a limitações de fluxo aéreo, menores percentuais ( $\leq 80\%$ ) de CVF foram associados a maiores valores de IL-6 ( $p = 0,002$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, percentuais menores ( $\leq 80\%$ ) de VEF<sub>1</sub> também foram correlacionados com maiores valores de IFN- $\gamma$  ( $p = 0,045$ ).

A asma alérgica, definida como a presença de IgE específica, apresentou valores significativamente maiores de FeNO ( $p = 0,008$ ) e menores de IFN- $\gamma$  ( $p = 0,044$ ). Quanto à asma tardia, foram encontrados valores

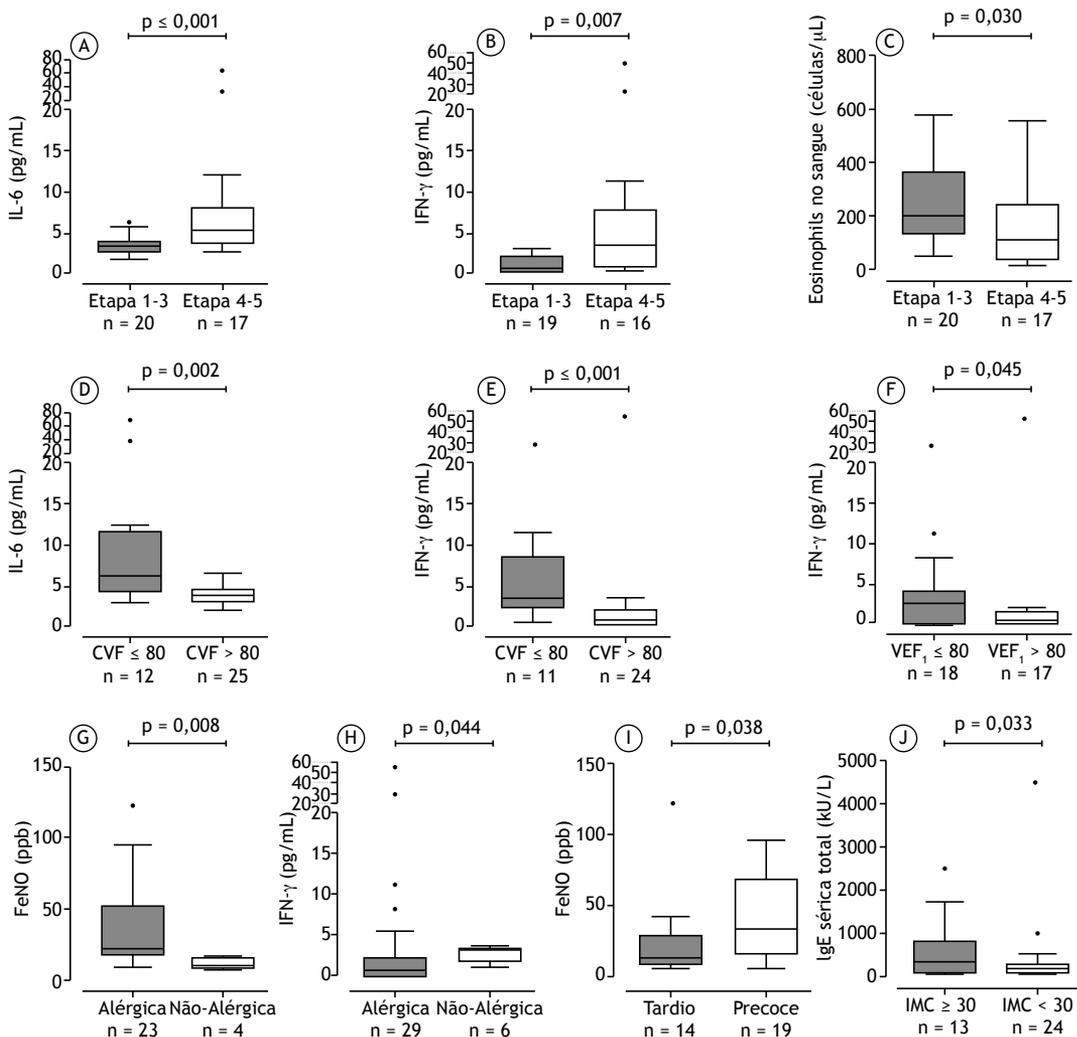
significativamente menores de FeNO ( $p = 0,038$ ). A estratificação dos pacientes de acordo com o fenótipo da obesidade ( $IMC \geq 30$ ) evidenciou valores de IgE total significativamente maiores nos pacientes obesos ( $p = 0,033$ ) (Figura 3).

Na classificação dos pacientes asmáticos pelos parâmetros  $FeNO \geq 20$  ppb e eosinófilos periféricos  $\geq 150$  células/ $\mu L$  para o estabelecimento da asma T2,<sup>(5)</sup> a periostina apresentou níveis significativamente mais elevados na asma T2 ( $p = 0,006$ ), mas não  $LTE_4$  ( $p =$

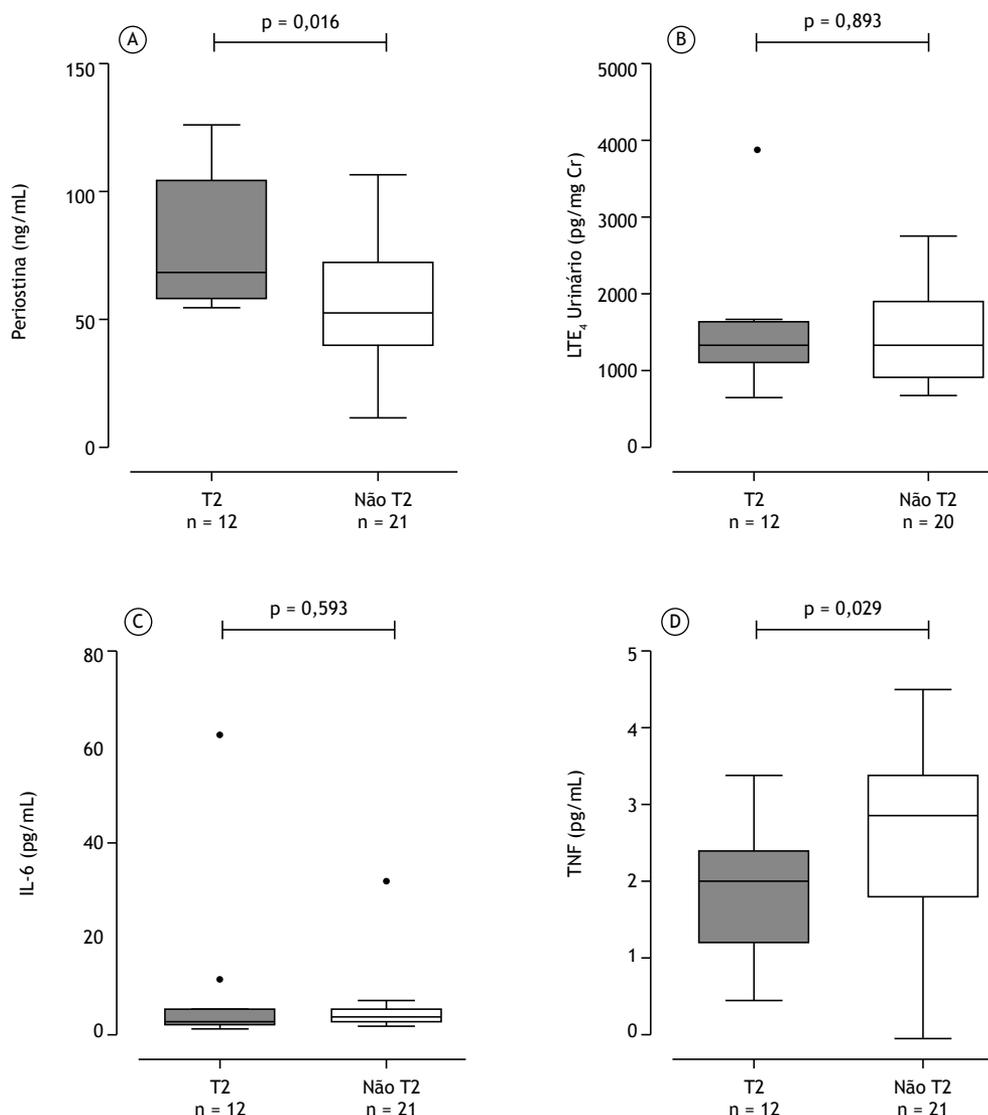
**Tabela 2.** Resultados da análise da curva ROC e do desempenho analítico dos biomarcadores considerando pontos de corte com especificidade acima de 90%.

Variáveis	AUC	Erro Padrão	Valor-p	Intervalo de confiança 95%		Ponto de corte	Desempenho analítico	
				Limite inferior	Limite superior		Sensibilidade	Especificidade
FeNO (ppb)	0,707	0,062	$\leq 0,001$	0,586	0,828	$>27$	42,4%	93,9%
Eosinófilos periféricos (células/ $\mu L$ )	0,649	0,061	0,012	0,530	0,769	$>275$	29,7%	92,4%
IgE total (kU/L)	0,741	0,053	$\leq 0,001$	0,637	0,845	$>265$	40,5%	90,9%
Periostina (ng/mL)	0,669	0,058	0,005	0,555	0,782	$>75$	27,0%	97,0%
IL-6 (ng/mL)	0,731	0,064	0,001	0,605	0,857	$>6$	32,1%	91,4%

FeNO: Fração exalada de óxido nítrico; IgE: Imunoglobulina E; IL: Interleucina.



**Figura 3.** Biomarcadores nos pacientes asmáticos de acordo com suas características clínicas. Caixas verticais representam os intervalos interquartis 25 - 75. As linhas centrais representam as medianas e as hastes indicam os limites inferior e superior. Os pontos representam outliers. FeNO: Fração exalada de óxido nítrico; IL: Interleucina; IFN- $\gamma$ : Interferon gama; CVF: Capacidade vital forçada; VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado em 1 segundo; IMC: Índice de massa corporal. (a - c) Etapas de tratamento de acordo com a GINA.



**Figura 4.** Biomarcadores em pacientes asmáticos de acordo com o fenótipo inflamatório T2. Caixas verticais representam os intervalos interquartis 25 - 75. As linhas centrais representam as medianas e as hastas indicam os limites inferior e superior. Os pontos representam outliers. LTE<sub>4</sub>: Leucotrieno E<sub>4</sub> urinário; IL: Interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral.

0,893) ou IL-6 (p = 0,593). O TNF apresentou valores menores na asma T2 (p = 0,029) (Figura 4).

## DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente estudo foi de validar o uso de um painel de biomarcadores na prática clínica e determinar o desempenho analítico de testes já utilizados e novos para identificar o fenótipo inflamatório da asma. Isso é de suma importância para médicos e pacientes, principalmente no contexto da asma grave, em que a identificação do fenótipo inflamatório é fundamental para a implementação de terapia alvo-específica.<sup>(6)</sup> Diante desse objetivo, verificou-se o desempenho analítico (sensibilidade e especificidade) dos ensaios isolados, bem como os benefícios de oferecer um painel de testes com mais informações sobre as características fisiopatológicas dos pacientes.

Corroborando com alguns estudos na literatura,<sup>(19,24)</sup> os valores de eosinófilos periféricos e IgE total foram maiores em pacientes asmáticos do que nos controles. Esses biomarcadores são amplamente utilizados atualmente na prática clínica e auxiliam na identificação de fenótipos inflamatórios eosinofílicos e alérgicos. No entanto, a validação analítica direcionada não é realizada no contexto clínico da asma por laboratórios. Níveis mais baixos de eosinófilos no sangue foram encontrados em pacientes asmáticos realizando as etapas 4 e 5 do tratamento GINA, um possível efeito de altas doses de corticosteróides inalatórios e do uso de corticosteróides sistêmicos por esses pacientes, resultando em supressão eosinofílica.<sup>(25)</sup> Um achado previamente descrito, embora pouco estudado, foram níveis mais elevados de IgE total em pacientes obesos.<sup>(26)</sup>

A FeNO também é um biomarcador importante não apenas para identificar o fenótipo inflamatório, mas

também como preditor da resposta ao tratamento com anti-IL-4/IL-13.<sup>(27)</sup> Uma das formas de determinar a FeNO é por meio de um dispositivo portátil de fácil manuseio<sup>(28)</sup> na prática clínica. Com a aprovação deste método pela ANVISA, tornou-se possível a utilização desse biomarcador durante o manejo de pacientes asmáticos no Brasil. Este estudo corroborou achados da literatura referentes aos valores aumentados desse biomarcador no contexto clínico da asma e esclareceu suas características analíticas para validação nacional. A correlação entre FeNO e asma alérgica e de início precoce também já foi descrita anteriormente na literatura,<sup>(5,29)</sup> reforçando a relação entre FeNO e asma T2.

Dois biomarcadores que atualmente não são utilizados rotineiramente na prática clínica também foram avaliados: periostina sérica e LTE<sub>4</sub> urinário; ambos são relacionados à asma T2,<sup>(14,30)</sup> embora o LTE<sub>4</sub> urinário frequentemente apresente resultados controversos na literatura.<sup>(31)</sup> A periostina é uma proteína matricelular envolvida em diferentes funções biológicas<sup>(32)</sup> que foi identificada na asma no processo de remodelação dos tecidos das vias aéreas.<sup>(33)</sup> Sua expressão é induzida por IL-13, uma citocina que desempenha um papel fundamental na resposta à asma T2 e que está envolvida na hiperresponsividade das vias aéreas.<sup>(13)</sup> A periostina é usada como um biomarcador da asma T2 e seu papel na identificação de bons respondedores a corticosteroides<sup>(34)</sup> e anti-IL-13<sup>(35)</sup> já foi descrita. Este estudo não apenas corroborou o aumento dos valores da periostina no contexto clínico da asma, mas também reforçou seu papel complementar no valor preditivo da doença quando comparado aos controles e seus níveis elevados em pacientes com eosinófilos periféricos e FeNO elevados (asma T2). Em relação ao LTE<sub>4</sub> urinário, não foram observadas diferenças entre os valores obtidos nos controles ou quanto às características clínicas.

Outro biomarcador investigado, a IL-6, apresentou valores maiores em pacientes asmáticos do que nos controles e valores ainda mais altos em pacientes com asma não T2. Semelhante aos outros biomarcadores, a IL-6 pode estar elevada em diferentes condições clínicas, como a COVID-19,<sup>(36)</sup> por sua conhecida participação em processos inflamatórios crônicos.<sup>(37)</sup> No presente estudo, valores mais altos de IL-6 também foram preditores de asma e relacionados às etapas 4 e 5 do tratamento GINA e menores percentuais de CVF, refletindo diretamente uma possível relação com a gravidade da doença. Valores mais elevados de IFN- $\gamma$  também foram observados em pacientes em estágios mais elevados de tratamento, com menor CVF e VEF<sub>1</sub>, e na asma não alérgica, mostrando possível ativação imunológica mediada por células Th1.<sup>(16)</sup> A citocina TNF também apresentou valores mais elevados em asmáticos não T2, fato que reforça a identificação de outras vias fisiopatológicas nesses pacientes.

Os dados obtidos com as curvas ROC evidenciaram pontos de corte com melhor equilíbrio entre especificidade e sensibilidade na asma. Esses pontos são superiores aos indicados pela GINA,<sup>(5)</sup> porém mais próximos do ponto de corte, com aplicações clínicas sólidas, como FeNO  $\geq$  25 ppb para indicação de tratamento com anti-IL-4/IL-13<sup>(27)</sup> e eosinófilos periféricos  $\geq$  300 células/ $\mu$ L com anti-IL-5/receptor anti-IL-5.<sup>(38,39)</sup> A sensibilidade modesta encontrada era esperada, uma vez que todos os biomarcadores avaliados, com exceção da IL-6, estão aumentados na asma eosinofílica, que representa a maioria, mas não todos os casos da doença.<sup>(40)</sup> Em relação à especificidade, esta coorte mostrou que a presença de comorbidades associadas à dificuldade de controle da asma não afetou significativamente os níveis dos biomarcadores. No entanto, o número de pacientes analisados foi uma limitação; mais estudos são necessários para sustentar este achado.

Por fim, uma limitação importante do presente estudo foi a ausência da coleta de escarro induzido, um dos testes mais importantes para a identificação do fenótipo inflamatório. Com a pandemia da COVID-19, procedimentos capazes de liberar aerossóis de material respiratório, como nebulização durante a coleta de escarro induzido, foram proibidos fora de contextos de emergência. Portanto, estudos futuros com a adição de testes de escarro induzido podem fortalecer nossos achados. Além disso, o acesso a uma amostra maior de asmáticos graves e pacientes de outros centros no Brasil é fundamental para melhor avaliar a aplicabilidade clínica desse painel, bem como os desfechos relacionados à resposta ao tratamento. É possível que a falta de diferenças referente aos níveis de biomarcadores e pacientes asmáticos não controlados se deva ao pequeno número de pacientes graves.

A utilização de um painel de biomarcadores como teste único, com informação técnico-laboratorial relativa à validação de cada exame no contexto clínico da asma, é uma abordagem fundamental para auxiliar os clínicos e doentes no tratamento individualizado e efetivo. Os biomarcadores já consolidados na prática clínica, juntamente com os novos, oferecidos em conjunto, poderiam fornecer informações confiáveis e precisas para a determinação do fenótipo inflamatório da asma, permitindo assim intervenções direcionadas que poderiam prever sintomas graves e complicações relacionadas à doença.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Concepção e desenho do estudo: DCB e RS; coleta de dados: DCB e JGR; análise e interpretação dos dados: DCB e RS; redação do manuscrito: DCB; revisão crítica do manuscrito: DCB, JGR, MMMP, JEDC, AD e RS; aprovação final do manuscrito: RS.

## REFERÊNCIAS

1. Peters SP, Ferguson G, Deniz Y, Reisner C. Uncontrolled asthma: a review of the prevalence, disease burden and options for treatment.

Respir Med. 2006;100(7):1139-51. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.03.031>.

2. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12:204. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-204>.
3. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007;62(9):758-66. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.070169>.
4. Menezes AM, Wehrmeister FC, Horta B, Szwarcwald CL, Vieira ML, Malta DC. Prevalence of asthma medical diagnosis among Brazilian adults: National Health Survey, 2013. *Rev Bras Epidemiol*. 2015;18 Suppl 2:204-13. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201500060018>.
5. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. 2021.
6. Pizzichini MMM, Carvalho-Pinto RM, Cançado JED, Rubin AS, Cerci Neto A, Cardoso AP, et al. 2020 Brazilian Thoracic Association recommendations for the management of asthma. *J Bras Pneumol*. 2020;46(1):e20190307. <https://doi.org/10.1590/1806-3713/e20190307>.
7. Carvalho-Pinto RM, Cançado JED, Pizzichini MMM, Fiterman J, Rubin AS, Cerci Neto A, et al. 2021 Brazilian Thoracic Association recommendations for the management of severe asthma. *J Bras Pneumol*. 2021;47(6):e20210273. <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20210273>.
8. Hekking PW, Wener RR, Amelink M, Zwinderman AH, Bouvy ML, Bel EH. The prevalence of severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):896-902. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.042>.
9. Kerkhof M, Tran TN, Soriano JB, Golam S, Gibson D, Hillyer EV, et al. Healthcare resource use and costs of severe, uncontrolled eosinophilic asthma in the UK general population. *Thorax*. 2018;73(2):116-24. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210531>.
10. Campo P, Rodríguez F, Sánchez-García S, Barranco P, Quirce S, Pérez-Francés C, et al. Phenotypes and endotypes of uncontrolled severe asthma: new treatments. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(2):76-88. PMID: 23654073.
11. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012;18(5):716-25. <https://doi.org/10.1038/nm.2678>.
12. Wagener AH, de Nijs SB, Lutter R, Sousa AR, Weersink EJ, Bel EH, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*. 2015;70(2):115-20. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205634>.
13. Izuahara K, Ohta S, Ono J. Using Periostin as a Biomarker in the Treatment of Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8(6):491-8. <https://doi.org/10.4168/aaair.2016.8.6.491>.
14. Kolmert J, Gómez C, Balgoma D, Sjödin M, Bood J, Konradsen JR, et al. Urinary Leukotriene E<sub>4</sub> and Prostaglandin D<sub>2</sub> Metabolites Increase in Adult and Childhood Severe Asthma Characterized by Type 2 Inflammation. A Clinical Observational Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;203(1):37-53. <https://doi.org/10.1164/rccm.201909-1869OC>.
15. Liang Z, Liu L, Zhao H, Xia Y, Zhang W, Ye Y, et al. A Systemic Inflammatory Endotype of Asthma With More Severe Disease Identified by Unbiased Clustering of the Serum Cytokine Profile. *Medicine*. 2016;95(25):e3774. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003774>.
16. Zhu M, Liang Z, Wang T, Chen R, Wang G, Ji Y. Th1/Th2/Th17 cells imbalance in patients with asthma with and without psychological symptoms. *Allergy Asthma Proc*. 2016;37(2):148-56. <https://doi.org/10.2500/aap.2016.37.3928>.
17. Israel E, Reddel HK. Severe and Difficult-to-Treat Asthma in Adults. *N Engl J Med*. 2017;377(10):965-76. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1608969>.
18. Vijverberg SJ, Hilvering B, Raaijmakers JA, Lammers JW, Maitland-van der Zee AH, Koenderman L. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. *Biologics*. 2013;7:199-210. <https://doi.org/10.2147/BTT.S29976>.
19. Buhl R, Korn S, Menzies-Gow A, Aubier M, Chapman KR, Canonica GW, et al. Prospective, Single-Arm, Longitudinal Study of Biomarkers in Real-World Patients with Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(8):2630-9.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.03.038>.
20. Holguin F, Cardet JC, Chung KF, Diver S, Ferreira DS, Fitzpatrick A, et al. Management of severe asthma: a European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline. *Eur Respir J*. 2020;55(1):1900588. <https://doi.org/10.1183/13993003.00588-2019>.
21. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43(2):343-73. <https://doi.org/10.1183/09031936.00202013>.
22. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(3):1107-36. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.3.7663792>.
23. American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):912-30. <https://doi.org/10.1164/rccm.200406-710ST>.
24. Pavlidis S, Takahashi K, Ng Kee Kwong F, Xie J, Hoda U, Sun K, et al. "T2-high" in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. *Eur Respir J*. 2019;53(1):1800938. <https://doi.org/10.1183/13993003.00938-2018>.
25. Lommatzsch M, Klein M, Stoll P, Virchow JC. Impact of an increase in the inhaled corticosteroid dose on blood eosinophils in asthma. *Thorax*. 2019;74(4):417-8. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212233>.
26. Carballo I, Alonso-Sampedro M, Gonzalez-Conde E, Sanchez-Castro J, Vidal C, Gude F, et al. Factors Influencing Total Serum IgE in Adults: The Role of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;182(3):220-8. <https://doi.org/10.1159/000510789>.
27. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, et al. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med*. 2018;378(26):2486-96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804092>.
28. Hemmingsson T, Linnarsson D, Gamber R. Novel hand-held device for exhaled nitric oxide-analysis in research and clinical applications. *J Clin Monit Comput*. 2004;18(5-6):379-87. <https://doi.org/10.1007/s10877-005-1158-z>.
29. Akar-Ghibril N, Casale T, Custovic A, Phipatanakul W. Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(2):429-40. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.008>.
30. Johansson MW, Evans MD, Crisafi GM, Holweg CTJ, Matthews JG, Jarjour NN. Serum periostin is associated with type 2 immunity in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(6):1904-7.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1346>.
31. Lueke AJ, Meeusen JW, Donato LJ, Gray AV, Butterfield JH, Saenger AK. Analytical and clinical validation of an LC-MS/MS method for urine leukotriene E<sub>4</sub>: A marker of systemic mastocytosis. *Clin Biochem*. 2016;49(13-14):979-82. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.02.007>.
32. Izuahara K, Nunomura S, Nanri Y, Ogawa M, Ono J, Mitamura Y, et al. Periostin in inflammation and allergy. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(23):4293-303. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2648-0>.
33. Conway SJ, Izuahara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(7):1279-88. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1494-y>.
34. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15858-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707413104>.
35. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1088-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106469>.
36. Coomes EA, Haghbayan H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2020;30(6):1-9. <https://doi.org/10.1002/rmv.2141>.
37. López-Mejías R, González-Gay MA. IL-6: linking chronic inflammation and vascular calcification. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(8):457-9. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0259-x>.
38. Bleeker ER, Wechsler ME, FitzGerald JM, Menzies-Gow A, Wu Y, Hirsch I, et al. Baseline patient factors impact on the clinical efficacy of benralizumab for severe asthma. *Eur Respir J*. 2018;52(4):1800936. <https://doi.org/10.1183/13993003.00936-2018>.
39. Harrison T, Canonica GW, Chupp G, Lee J, Schleif F, Welte T, et al. Real-world mepolizumab in the prospective severe asthma REALITI-A study: initial analysis. *Eur Respir J*. 2020;56(4):2000151. <https://doi.org/10.1183/13993003.00151-2020>.
40. Hudey SN, Ledford DK, Cardet JC. Mechanisms of non-type 2 asthma. *Curr Opin Immunol*. 2020;66:123-8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.10.002>.