



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

Camila Akemi Sakaguchi

**Efeitos de diferentes intensidades de um treinamento muscular
inspiratório em ciclistas recreacionais: uma abordagem
metabolômica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aparecida Maria Catai

**SÃO CARLOS
2020**

Camila Akemi Sakaguchi

**Efeitos de diferentes intensidades de um treinamento muscular
inspiratório em ciclistas recreacionais: uma abordagem
metabolômica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisioterapia. Área de concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Maria Catai

Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos

Supervisor do Estágio no Exterior: Prof. Dr. David Christopher Nieman

**Departamento de Ciências do Exercício da Appalachian State University-
Carolina do Norte-EUA**

SÃO CARLOS

2020

Investigação conduzida no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular (LFCV) – Núcleo de Pesquisas em Exercício Físico (NUPEF) do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em colaboração com o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar e o *Human Performance Laboratory* da Appalachian State University- Carolina do Norte-EUA.

Projeto desenvolvido com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo 001, Bolsa demanda Social (Processo nº 88887.336068/2019-00) e Bolsa Doutorado Sanduíche no exterior (Processo: nº 88881.189063/2018-01) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo – FAPESP – Processo nº 2016/222157.

DIREITO DE REPRODUÇÃO

Autorizamos a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte. Após um (1) ano da data da defesa pública desta tese.

São Carlos, 13 de março de 2020.

Profa. Dra. Aparecida Maria Catai
(Orientadora)

Ma. Camila Akemi Sakaguchi
(Candidata ao título de Doutora)

FICHA CATALOGRÁFICA

Este item será anexado após a defesa pública de doutorado.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Camila Akemi Sakaguchi, realizada em 14/02/2020:

Profa. Dra. Aparecida Maria Catai
UFSCar

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Simone Dal Corso
UNINOVE

Prof. Dr. Rodrigo Polaquini Simões
UFSCar

Profa. Dra. Patricia Chakur Brum
USP

Dedico este trabalho à minha mãe Solange e meus irmãos Tatiana e Eduardo. Vocês são meu porto seguro.

“Era como um novo mundo aberto para mim, o mundo da ciência, que finalmente me foi permitido conhecer em toda a liberdade.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, meu pai querido, pela sua imensa generosidade e amor incondicional. Obrigada por cuidar de mim e me guiar com tanto carinho nessa caminhada, me dando forças, paciência, sabedoria, e me permitindo cada vez mais crescer na fé.

À mulher a quem tenho admiração e respeito infinitos, e que é dona do abraço e colo mais reconfortante do mundo, a Solange, minha mãe. Por nunca medir esforços para que eu realizasse meus sonhos e por sempre estar ao meu lado, me incentivando, aconselhando e acreditando em mim, minha mãe e melhor amiga. Te amo muito Mamis!

Aos meus irmãos queridos, Tatiana e Eduardo; por fazerem parte do que me completa e me equilibra. Tati, com seu jeitinho meigo e carinhoso, obrigada pelos abraços, pelos beijos, pela paciência, e pela alegria de ser tia da Sarah, minha Zezinha. Edu, com seu jeito prático e brincalhão, obrigada pelos conselhos, risadas, músicas e filmes. Obrigada aos dois pelos relatórios sobre o estado de braveza mãe! Amo vocês!

À minha tia e madrinha Marina, que sempre cuidou de nós com muito amor e me permitiu chegar até aqui, pois sempre acreditou no poder e no valor de investir na nossa educação. Te amo tia.

Ao meu primo e padrinho Erico, que me ajudou desde as viagens para prestar vestibular até minha mudança para São Carlos, obrigada pelo carinho e pela força.

Ao meu companheiro Nate, pela paciência, amor e carinho. Sempre procurando me fazer sorrir, me lembrando do que é mais importante, e que devo confiar em Deus acima de tudo. Seu apoio nessa etapa final foi essencial, sem o seu carinhoso “hang in there” tudo teria sido mais difícil. Mal posso esperar por essa nossa espera acabar!

À minha amada família recheada de tios e primos, e à minha ba Fumika. Obrigada por todo carinho!

Aos meus amigos desde o tempo de colégio, Luma, Thiago, Murilo, Henrique, Paulinha e Victor (tio Chico), pela amizade verdadeira e duradoura. Obrigada pelos

encontros em Marília, pelos conselhos, risadas e pelo carinho. Ter amigos que envelhecem com você, não tem preço! Amo vocês!

Aos meus amigos da academia Top Fitness, Thassi e Fábio, pelos treinos e por toda a força durante esses anos nos momentos em que eu estava sem bolsa de estudos, sempre me ajudaram muito. Faltam palavras para agradecer a generosidade e carinho que vocês tiveram comigo. Vocês são super especiais.

Aos amigos de São Carlos, Julio, Paula, Alair e Vicente, por toda a ajuda desde o meu mestrado. Agradeço o carinho, apoio, compreensão e amizade. Vocês moram no meu coração.

Aos amigos da igreja Vineyard Sanca, por me acolherem como família, pelos ensinamentos, conselhos, e por estarem ao meu lado nessa busca constante por mais de Deus e da verdade.

Meu agradecimento especial e com muito carinho à minha orientadora, e mãe científica, Catai. Obrigada pela valiosa oportunidade, por acreditar e confiar em mim e no meu potencial, por se orgulhar pelas minhas conquistas, se alegrar com minhas alegrias, chorar minhas tristezas ao meu lado e por lutar comigo (e por mim!) para que eu chegasse até aqui. Esses quatro anos de doutorado foram sem dúvida divisores de águas na minha vida e sou eternamente grata a você. Obrigada pelo carinho, pelos puxões de orelha, pelos conselhos, palavras de positividade e estímulo científico. Seu amor pelos seus alunos, pela ciência e pela profissão me inspira!

Ao Prof. Dr. Maurício Jamami. Obrigada por ter aberto as portas para mim no mestrado, por sempre ser paciente comigo, por me apoiar nas minhas decisões e por ter contribuído muito para o meu amadurecimento profissional.

Ao meu querido coorientador do exterior e amigo, Dr. Nieman, por ter sido tão receptivo comigo no *Human Performance Laboratory*, pelas oportunidades, conversas agradáveis, ensinamentos científicos e de vida. Um agradecimento especial pela sua visita com tanto carinho ao Brasil. Sua paixão pela ciência é contagiante e sua humildade e benevolência, admiráveis! Muito obrigada!

Aos meus companheiros de coleta, não tenho palavras para agradecer por tudo que fizemos juntos. Os dias de coleta e treinamento não foram fáceis. Fomos um time

maravilhoso. Patrícia, obrigada pela sua alegria durante as coletas, paciência, persistência e ajudas nas madrugadas escrevendo projetos e artigos. Etere, pelas palavras de conforto, ajuda nos artigos, prestatividade, ensinamentos e paciência. Ao Raphael, meu irmão descoberto no doutorado, pela parceria, carinho, risadas, e pela sua amizade verdadeira e sincera. Ao Cláudio, que sempre cuidou de mim e do Rapha como filhos, obrigada pela sua alegria, positividade, carinho, paciência, atenção e conselhos. Vocês são demais!

Aos meus queridos amigos e colegas que fiz nesses anos de jornada no laboratório, tenho um carinho muito especial por cada um de vocês. Stephanie, Maria Cecília, Mariana, Silvia, Thomas, Ariane, Gabriela, Torrinha, Giovana, Carol e Jean, obrigada por tornarem meus dias mais leves! Foi muito bom estar com vocês. Não posso deixar de agradecer de forma especial a Ste, sempre muito doce e delicada, pela generosidade quando me acolheu em sua casa antes de eu sair para o sanduíche e pelo carinho comigo. Ciça (parceira "fit"), Mari e Sil, pela amizade dentro e fora do laboratório, parceria, carinho e preocupação. Ju, pelos conselhos, dicas de compras, risadas e pela sua ajuda nessa etapa final. Obrigada meninas!

Aos responsáveis pelo laboratório Unilab de São Carlos, onde foram realizados os exames bioquímicos dos participantes de nossa pesquisa.

À Dra. Isabela A. Verzola Aniceto, cardiologista da Unidade Saúde Escola/UFSCar, por auxiliar nas avaliações clínicas de nossos voluntários.

À nutricionista Carla C. Dato, pelas avaliações, orientações e controle nutricional de nossos voluntários.

Aos colaboradores do Departamento de Química da UFSCar, Prof. Dr. Antônio G. Ferreira, Prof. Dr. Thiago Venâncio, Dr^a. Maria G. A. Carosio, Dr^a Roberta M. Maria, pelos ensinamentos e análises de RMN. E a Profa. Dra. Heloisa do Departamento de Fisiologia e Bioquímica da UFSCar.

Aos Profs. Dr. Fernando Fabrizzi e Dr. Rodrigo P. Simões por participarem da minha qualificação de doutorado e por suas valiosas considerações que enriqueceram o desenvolvimento deste estudo.

A minha banca de defesa de doutorado: Prof^a. Dr^a. Fernanda de Freitas Anibal, Prof^a. Dr^a. Simone Dal Corso, Prof^a. Dr^a. Patricia Chakur Brum, Prof. Dr. Rodrigo Polaquini Simões, por terem aceitado participar deste momento tão especial para mim e por suas valiosas considerações e correções que certamente enriquecerão este estudo

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos. Em especial ao Emerson, por sua eficiência e prestatividade; e à Iolanda, sempre cheia de luz, bondade, carisma e alegria; pelo seu café feito com muito carinho e sua presença, essenciais na nossa rotina no departamento.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro que viabilizou a realização desta pesquisa. À CAPES pela Bolsa de Doutorado Demanda Social e pelo Programa de Doutorado Sanduíche do Exterior (PDSE), que permitiu o meu período de aprendizado no Centro de Pesquisas da Carolina do Norte, no *Human Performance Laboratory* da Appalachian State University.

Aos voluntários dessa pesquisa, os meus mais sinceros agradecimentos, vocês disponibilizaram seu precioso tempo em prol da pesquisa científica. Obrigada!!!

E, por fim, a todos aqueles que por um lapso não mencionei, mas que colaboraram para esta pesquisa: Muito obrigada!!!

RESUMO

O treinamento muscular inspiratório (TMI) é um potencial método complementar à treinamentos esportivos proposto para melhora do desempenho esportivo. No entanto, os mecanismos envolvidos com adaptações metabólicas decorrentes de sua aplicação e a melhor intensidade de treino a ser utilizada permanecem incertos. Uma análise do perfil dos estudos investigando os efeitos do exercício físico no metaboloma humano e seus achados mais relevantes, contribuiria para uma síntese dos principais metabólitos alterados com o exercício físico e suas modalidades, fornecendo importantes informações para a interpretação e resultados na investigação dos efeitos metabólicos do TMI em diferentes intensidades utilizando uma abordagem metabolômica. Portanto, esta tese é composta de 2 estudos: **Estudo 1: Objetivo:** Realizar uma avaliação qualitativa de estudos metabolômicos de alta qualidade publicados na última década explorando alterações induzidas pelo exercício no metaboloma humano. **Métodos:** O estudo seguiu as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). As buscas foram realizadas nas bases de dados eletrônicas: PubMed, *Science Direct*, SCOPUS e *Web of Science*. A qualidade dos estudos foi avaliada utilizando um sistema de pontuação criado especificamente para estudos metabolômicos. Os critérios para a inclusão dos artigos foram: a utilização da metabolômica para medir as alterações nos metabólitos induzidas pelo exercício físico, indivíduos saudáveis, utilização das matrizes: soro, plasma, urina ou saliva. Revisões, relatos de casos, diretrizes, teses e dissertações, resumos de conferências e estudos utilizando modelos animais ou *in vitro* não foram incluídos. **Resultados:** Um total de 1355 estudos identificados e 24 foram incluídos. Dos estudos incluídos, 63% focaram em alterações metabólicas agudas após exercícios intensos e prolongados. Os melhores estudos utilizaram plataformas analíticas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) com grandes bibliotecas de padrões químicos e forte suporte de bioinformática avançada. Esses estudos reportaram grandes alterações em diversos metabólitos lipídicos e seus relacionados. As mudanças na concentração dos metabólitos, mesmo após exercícios extenuantes, geralmente retornam aos níveis próximos ao pré-exercício após um dia de recuperação. **Conclusão:** Poucos estudos investigaram alterações metabólicas após exercícios agudos de duração mais curta (<60 min) e

menores volumes de trabalho. As mudanças nas concentrações metabólicas nesses tipos de estudos são pequenas comparadas aos estudos com exercícios de alta intensidade e de longa duração. Mais estudos são necessários para melhorar a compreensão das respostas dos sistemas humanos à variadas cargas de trabalho e efeitos crônicos. Os resultados derivados desta revisão fornecem direções para futuras investigações focadas nas respostas do metaboloma humano ao exercício físico. **Estudo 2: Objetivo:** Investigar os efeitos crônicos de diferentes intensidades do treinamento muscular inspiratório (TMI) no metaboloma sérico humano em ciclistas recreacionais saudáveis do sexo masculino. **Métodos:** Utilizando um desenho de grupos paralelos, 28 participantes foram randomizados em três grupos de TMI: baixa intensidade (BI, n = 7); intensidade moderada (IM, n = 10) e alta intensidade (AI, N = 11). O TMI foi realizado por 11 semanas. Um grupo de participantes nas mesmas condições, que não realizaram o TMI, mas participaram de todos os procedimentos, foi incluído como controle (GC, N = 6). As amostras de sangue foram analisadas quanto a alterações metabólicas usando RMN ¹H. A análise estatística incluiu uma ANOVA de medidas repetidas 4 (grupo) x 2 (tempo) usando o modelo linear geral (GLM) e análise multivariada de componentes principais (PCA). **Resultados:** A análise metabolômica de abordagem *untargeted* das amostras de soro identificou 22 metabólitos, incluindo aminoácidos, lipídios e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. As alterações nos metabólitos não diferiram significativamente entre os grupos, indicando que o TMI em três diferentes níveis de intensidade não alterou o metaboloma sérico em relação ao grupo controle. **Conclusão:** Esses resultados revelam novas informações sobre os efeitos metabólicos do TMI no metabolismo humano, e são consistentes com os resultados de estudos com treinamento físico envolvendo outros grupamentos musculares e que mostram pequenas e limitadas alterações crônicas no metaboloma sérico em resposta ao treinamento físico. Estudos utilizando plataformas analíticas mais sensíveis ou análises estatísticas supervisionadas, grandes grupos de sujeitos e diferentes populações podem continuar a contribuir com a investigação dos efeitos metabólicos relacionados ao TMI.

Palavras-chave: metabolômica, metabolismo, exercícios respiratórios, força muscular, resistência muscular, músculo inspiratório.

ABSTRACT

The inspiratory muscle training is a potential complementary method to sports training aiming to improve sports performance, but the metabolic mechanisms related to this technique and the best training intensity remains unknown. The analysis of the studies investigating the exercise-induced effects on human metabolome and its most relevant findings would contribute to a synthesis of the main metabolites changed by physical exercise and exercise modalities, supporting the interpretation and results in the investigation of effects to the IMT at different intensities using a metabolomics approach. Therefore, this thesis comprises 2 studies: **Study 1: Aim:** To provide a qualitative appraisal of metabolomics-based studies published over the past decade exploring exercise-induced alterations of the human metabolome. **Methods:** This review was performed according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. The search was performed in the following electronic databases: PubMed, Science Direct, SCOPUS and Web of Science. The quality of the studies was assessed using a scoring system created specifically for metabolomics studies. Eligibility criteria for inclusion comprised: the use of metabolomics to measure exercise-induced changes in metabolites, healthy participants, the use of serum, plasma, urine or saliva samples. Reviews, case reports, guidelines, theses and dissertations, conference abstracts, and studies using animal or *in vitro* models were not included. **Results:** from a total of 1355 studies identified, 24 were included. Of these papers, 63% focused on acute metabolite changes following intense and prolonged exercise. The best studies utilized liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) analytical platforms with large chemical standard libraries and strong, multivariate bioinformatics support. These studies reported large-fold changes in diverse lipid-related metabolites. Metabolite shifts, even after strenuous exercise, typically return to near pre-exercise levels after one day of recovery. **Conclusion:** Only few studies investigated metabolite changes following acute exercise bouts of shorter durations (< 60 min) and workload volumes. Plasma metabolite shifts in these types of studies are modest comparing to high intensity and long duration exercise studies. More studies are needed to improve scientific understanding of the human system's response to varying, chronic exercise workloads. The findings derived from this review provide direction for future investigations focused on the body's metabolome response to exercise. **Study 2: Aim:**

To investigate the chronic effects of different intensities of an inspiratory muscle training (IMT) on the human serum metabolome in healthy male recreational cyclists.

Methods: Using a randomized, parallel group design, twenty-eight participants were randomized to three IMT groups: low intensity (LI, n=7); moderate intensity (MI, n=10) and high intensity (HI, N =11). The IMT was performed for 11 weeks. Another group of participants under the same conditions, who did not perform the IMT but participated in all procedures, was included as controls (CG, N=6). Blood samples were analyzed for metabolite shifts using ¹H NMR. Statistical analysis included a 4 (group) x 2 (time) repeated measures ANOVA using the general linear model (GLM), and multivariate Principal Component Analysis (PCA). **Results:** Untargeted metabolomics analysis of serum samples identified 22 metabolites, including amino acids, lipids, and tricarboxylic acid cycle intermediates. Metabolites shifts did not differ between groups indicating that IMT at three intensity levels did not alter the serum metabolome relative to the control group. **Conclusion:** These results reveal novel insights to the metabolic effects of the IMT in human metabolomic and are consistent with the results from other studies showing negligible chronic alterations in the serum metabolome in response to physical training. Studies using more sensitive metabolomics platforms or supervised multivariate statistical analysis, large groups, and different population may continue contribute to the investigation of the IMT metabolic effects.

Keywords: Metabolomics, Metabolism, Breathing Exercises, Muscle Strength, Muscle Endurance, Inspiratory Muscle.

LISTA DE FIGURAS

ESTUDO 1

Figura 1. Classificação dos estudos considerando a pontuação total.	40
Figura 2. Resultados do diagrama de fluxo de revisão.....	41

ESTUDO 2

Figura 1. Desenho do protocolo do estudo.....	63
Figura 2. Diagrama de fluxo dos participantes.	64
Figura 3. Ilustração do protocolo do teste de resistência muscular respiratória.	67
Figura 4. Ilustração do protocolo de uma sessão de treinamento muscular inspiratório.	68
Figura 5. Voluntário durante uma sessão de treinamento muscular inspiratório.	69
Figura 6. Tubo de RMN 1H e espectrômetro de ressonância magnética nuclear.] ...	70
Figura 7. Ilustração dos deltas (pós-pré TMI) dos valores de VO ₂ e PIMÁX dos grupos GC, BI, MI, AI.	73
Figura 8. Gráficos de scores da PCA de todas as amostras de soro pré- e pós- protocolo.....	75

LISTA DE TABELAS

ESTUDO 1

Tabela 1. Critérios de pontuação para avaliação da qualidade dos estudos metabólicos.	39
Tabela 2. Classificação dos estudos de acordo com o sistema de pontuação.	42
Tabela 3. Estudos com alta intensidade e longa duração.	465
Tabela 4. Resumos das características e principais achados de nove estudos utilizando outros desenhos e tipos de exercício.	50

ESTUDO 2

Tabela 1. Características dos participantes do estudo (média \pm DP).	72
Tabela 2. Metabólitos séricos humanos identificados pela espectroscopia de RMN de ^1H e deslocamentos químicos nos grupos Controle, Baixa Intensidade, Intensidade Moderada e Alta Intensidade, pré- e pós-treinamento muscular inspiratório.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	alta intensidade
BI	baixa intensidade
Bpm	batimento por minuto
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
DFISIO	Departamento de Fisioterapia
DXA	<i>dual-energy x-ray absorptiometry</i> / Absorciometria por raios-X com dupla energia
FC	frequência cardíaca
FR	frequência respiratória
GC	grupo controle
GC-MS	<i>gas chromatography–mass spectrometry</i> / cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i> / Banco de dados de metaboloma humano
IM	intensidade moderada
IMC	índice de massa corporal
IMC	índice de massa corpórea
IMT	<i>inspiratory muscle training</i>
kg/m ²	quilogramas por metro quadrado
L/min	litros por minuto
LC-MS	<i>liquid chromatography – mass spectrometry</i> / cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LFCV	Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular
mg/dL	miligramas por decilitro

mg/L	miligramas por litro
min	minutos
mL	mililitros
mL/kg/min	mililitros por quilograma por minutos
mmHg	milímetros de mercúrio
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NUPEF	Núcleo de Pesquisas em Exercício Físico
PA	pressão arterial
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCRu	proteína C reativa ultrasensível
PI _{MÁX}	pressão inspiratória máxima
PThC	pressão inspiratória crítica
PTh _{MÁX}	pressão inspiratória mantida por pelo menos 1 minuto
RER	taxa de troca respiratória
RMI	resistência muscular inspiratória
RMIi	resistência muscular inspiratória incremental
RMN	ressonância magnética nuclear
rpm	rotações por minuto
TECP	teste de exercício cardiopulmonar
TMI	treinamento muscular inspiratório
UFSCar	Universidade Federal De São Carlos
USE	Unidade Saúde Escola
VO ₂	consumo de oxigênio
VO ₂ pico	consumo de oxigênio no pico do exercício
W	<i>watts</i>

SUMÁRIO

CONTEXTUALIZAÇÃO	24
REFERÊNCIAS.....	30
<i>Parte I - ESTUDO 1 (versão em português com detalhes e inclusão de ilustrações).....</i>	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 OBJETIVO	37
3 MÉTODOS	37
3.1. Estratégia de Busca	37
3.2. Critérios de Elegibilidade para Inclusão	38
3.3. Extração dos Dados e Inclusão dos Estudos	38
3.4. Avaliação da Qualidade dos Estudos.....	38
4 RESULTADOS.....	40
4.1. Estudos utilizando Alta Intensidade e Longa Duração	44
4.2. Estudos utilizando Alta Intensidade e Curta Duração, Moderada Intensidade e Curta / Longa duração, Desenhos Transversais e Treinamentos	50
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES E DIREÇÕES FUTURAS	58
<i>Parte II - ESTUDO 2 (versão em português com detalhes e inclusão de ilustrações).....</i>	60
1 INTRODUÇÃO	61
2 OBJETIVO	61
3 MÉTODOS	62
3.1 Participantes	62
3.2 Desenho do Estudo.....	62
3.3 Sessão Experimental	64

3.3.1 Avaliações clínicas, nutricionais e caracterização da amostra	64
3.3.2 Treinamento Muscular Inspiratório (TMI)	67
3.4 Coleta, armazenamento e preparo de amostras para análise de RMN.....	69
3.5 Aquisição de dados por RMN e identificação de metabólitos.....	70
3.6 Análise Estatística	71
4 RESULTADOS.....	71
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	75
<i>Parte III - CONSIDERAÇÕES FINAIS E DESDOBRAMENTOS FUTUROS.....</i>	85
<i>Parte IV - ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO (2016/2020)....</i>	87
<i>APÊNDICE 1 – Resumo do manuscrito a ser submetido.....</i>	91
<i>ANEXO A - COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO – ESTUDO 1</i>	93
<i>ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO – ESTUDO 2</i>	94
<i>ANEXO C - COMITÊ DE ÉTICA.....</i>	95

CONTEXTUALIZAÇÃO

O estudo do funcionamento dos sistemas biológicos humano de maneira holística tem sido cada vez mais valorizado, e com o avanço da tecnologia, é possível que ele seja feito por meio de uma descrição qualitativa e quantitativa dos componentes atuantes nas complexas interações presentes no metabolismo (DUNN et al., 2011; HOFFMAN, 2017).

A metabolômica, considerada como o nível final das tecnologias “ômicas” que compreendem: genômica, proteômica e transcriptômica (DUNN et al., 2011; PSYCHOGIOS et al., 2011; RYAN; ROBARDS, 2006), é denominada a ciência que estuda o “metaboloma”, termo utilizado para descrever um conjunto completo de moléculas de baixo peso molecular presentes nos sistemas biológicos, os metabólitos (DUNN et al., 2011; NICHOLSON; WILSON, 2003; NIEMAN et al., 2014a). Os metabólitos estão presentes nos tecidos, biofluidos (ex: plasma, soro, urina, saliva) e/ou volatilizados nos gases respiratórios (HEANEY; DEIGHTON; SUZUKI, 2017), e atuam no metabolismo como substratos, reagentes, sinalizadores, intermediários e produtos de processos mediados por enzimas (SAKAGUCHI et al., 2019).

Utilizando de plataformas analíticas sofisticadas; como a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e a Espectrometria de Massas (MS); controles de qualidade rígidos e protocolos bioquímicos de identificação, os estudos metabolômicos buscam o entendimento das complexas interações do metabolismo humano e do comportamento dos metabólitos diante de diversos fatores de perturbação, como o exercício físico, dieta, doenças, drogas e meio-ambiente (NIEMAN; MITMESSER, 2017).

As estratégias utilizadas para investigação metabolômica podem ser divididas de duas formas: *targeted* ou *untargeted*. Na primeira, a análise é direcionada para a identificação de metabólitos já conhecidos, relacionados à processos ou vias metabólicas específicas que modulam a função biológica de interesse (ABDELNUR, 2011; HEANEY; DEIGHTON; SUZUKI, 2017). Já na estratégia *untargeted*, também conhecida como global, é realizado um “perfil” do total dos metabólitos presentes na amostra, e todos os metabólitos identificados são semi-quantificados para a posterior investigação da relação destes metabólitos com a condição predefinida de interesse (ex: marcadores relacionados à doenças cardiovasculares) (ABDELNUR, 2011; DUFT et al., 2017; HEANEY; DEIGHTON; SUZUKI, 2017).

Apesar de o metabolismo ser um dos assuntos mais antigos estudados na bioquímica (DUNN et al., 2011), este campo ainda é considerado como emergente no meio científico voltado ao exercício físico, e seu avanço foi significativo nos últimos 10 anos, quando os primeiros estudos com atletas humanos utilizando as plataformas analíticas de tecnologia avançada foram publicados (NIEMAN; MITMESSER, 2017; SAKAGUCHI et al., 2019). O aumento do número de estudos se deve à maior disponibilidade das plataformas de espectrometria de massas, bem como a expansão dos bancos de dados de metabólitos *online* como o *Human Metabolome Database* (HMDB), e bibliotecas de padrões químicos, além do avanço da bioinformática para análise dos imensos bancos de dados (CANUTO et al., 2018; SAKAGUCHI et al., 2019).

Sabe-se que o exercício físico é um dos principais moduladores do metabolismo (LE MOYEC et al., 2012), e seus efeitos envolvem a depleção de nutrientes e energia, aumento do metabolismo gerando mais produtos metabólicos, e consequentemente fazendo com que o nível de metabólitos endógenos se altere proporcionalmente ao nível de estresse gerado (YAN et al., 2009).

Em 2014, o termo “*Sportomics*” foi introduzido por Bassini e Cameron, definido como: o estudo das alterações metabólicas em atletas durante competições e treinamentos esportivos”. O estudo metabolômico das respostas às diferentes modalidades e intensidades de exercício físico envolve a medida de uma seleção de metabólitos, proteínas e fatores de transcrição. Essas medidas têm como objetivo o entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações fenotípicas resultantes dos diferentes fatores ligados ao exercício, permitindo o aprimoramento e a personalização das intervenções, como por exemplo em estratégias nutricionais ou ajustes de protocolos de treinamento, maximizando as adaptações para saúde e desempenho físico (HEANEY; DEIGHTON; SUZUKI, 2017).

Os estudos presentes na literatura utilizando metabolômica para investigar os efeitos do exercício físico envolvem uma vasta variedade de desenhos, protocolos de exercício, bem como o uso de diferentes matrizes biológicas e plataformas analíticas (DUFT et al., 2017). O uso relativamente recente da técnica neste campo, e o seu potencial para gerar resultados relevantes relacionados às adaptações metabólicas do exercício físico nos conduziu ao primeiro estudo desta tese intitulado “*Estudos*

metabolômicos analisando alterações induzidas pelo exercício no metaboloma humano: uma revisão sistemática”, com o objetivo de estabelecer um panorama qualitativo dos estudos publicados nos últimos 10 anos, bem como sintetizar os principais achados destes estudos. Para isso, realizamos uma revisão sistemática nas principais bases de dados eletrônicas: *PubMed* (via *National Library of Medicine*), *Science Direct*, SCOPUS (Elsevier) and *Web of Science*, e atribuímos uma pontuação baseada em critérios importantes para estudos metabolômicos com exercício físico, relacionados ao desenho do estudo (número de sujeitos e características do estudo), aos métodos utilizados (plataforma analítica – métodos de análise e suporte estatístico) e o caráter inovador.

Diante do amplo espectro de possibilidades de emprego da metabolômica, e do seu potencial para revelar os mecanismos metabólicos de acordo com o estímulo aplicado, surgiu o interesse em utilizar desta ferramenta para elucidar os mecanismos metabólicos responsáveis pelos efeitos de uma técnica que vem sendo estudada no meio esportivo: o treinamento muscular inspiratório (TMI) (CAHALIN; ARENA, 2015; HAJGHANBARI et al., 2013; KARSTEN et al., 2018; SALES et al., 2016).

A prática esportiva em evidência na atualidade tanto por profissionais quanto amadores tem se tornado cada vez mais competitiva (STELZER et al., 2015), e a prescrição de treino individualizada têm sido valorizada, levando em conta a condição física do praticante e o nível de fadiga alcançado, contribuindo progressivamente para as respostas ao treinamento (CAPOSTAGNO; LAMBERT; LAMBERTS, 2016). Na busca por ultrapassar o efeito platô de treinos específicos cardiovasculares ou da musculatura periférica, o TMI tem sido cada vez mais procurado por atletas e treinadores de diferentes modalidades como um método complementar para se atingir um melhor desempenho no desporto (HAJGHANBARI et al., 2013; ILLI et al., 2012; VERGES et al., 2007).

Os efeitos do TMI estão relacionados aos fatores que influenciam a fadiga muscular periférica e dispneia, fatores responsáveis pela interrupção do exercício físico (DEMPSEY et al., 2008; JANSSENS et al., 2013; SHEEL, 2002). Acredita-se que o TMI atue na atenuação do metaborreflexo muscular inspiratório, fenômeno em que a fadiga da musculatura respiratória, levando ao acúmulo de íons H⁺ e metabólitos (ex. lactato, amônia), provoca uma hiperativação simpática vasoconstrictora na

musculatura periférica a fim de redirecionar o fluxo sanguíneo para a musculatura respiratória ativa. Como resultado, ocorre a redução da perfusão de oxigênio no músculo locomotor, limitando sua habilidade de realizar trabalho (HAJGHANBARI et al., 2013; ROMER; POLKEY, 2008; SHEEL, 2002).

Do ponto de vista metabólico, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pelos efeitos do TMI. Uma das observações relacionadas ao efeito adaptativo desse treinamento refere-se à redução da concentração do lactato sanguíneo durante a realização de atividade física (BROWN; SHARPE; JOHNSON, 2008; GRIFFITHS; MCCONNELL, 2007; ROMER; MCCONNELL; JONES, 2002), alteração que pode refletir favoravelmente às mudanças no equilíbrio ácido básico e/ou no atraso de acúmulo de metabólitos, embasando o efeito citado anteriormente e explicando de maneira parcial o aumento da capacidade aeróbia encontrada com a aplicação do método, portanto, muito ainda há a ser estudado.

Além disso, apesar da crescente aplicação do TMI e seus benefícios relatados na literatura (ENRIGHT et al., 2006; ENRIGHT; UNNITHAN, 2011; HAJGHANBARI et al., 2013; ILLI et al., 2012), ainda não está estabelecido um consenso em relação ao melhor protocolo a ser utilizado para cada população e objetivo de treinamento. A principal divergência relaciona-se a intensidade utilizada para prescrição do treino. A maior parte dos estudos utiliza porcentagens entre 50 a 80% da pressão inspiratória máxima ($PI_{MÁX}$), e os melhores resultados relacionados à fatores ligados ao desempenho físico parecem ser obtidos utilizando a intensidade de 60% da $PI_{MÁX}$ (intensidade moderada). Acreditamos que a comparação dos efeitos metabólicos crônicos gerados pelo TMI em diferentes intensidades poderia preencher essa lacuna e contribuir para estabelecer a melhor carga de treinamento (ENRIGHT et al., 2006; ENRIGHT; UNNITHAN, 2011; HAJGHANBARI et al., 2013; KARSTEN et al., 2018).

A partir destes questionamentos, foi elaborado o segundo estudo desta tese, intitulado: *“Influência crônica do treinamento muscular inspiratório de diferentes intensidades no metaboloma sérico humano”*. Neste estudo, tivemos como objetivo realizar o mapeamento metabólico de ciclistas recreacionais após 11 semanas de TMI em diferentes intensidades (alta, moderada, leve) e identificar os principais compostos modificados e possíveis vias metabólicas relacionadas aos efeitos do TMI, além de discriminar as particularidades pertencentes à cada intensidade.

A presente tese é composta de 2 estudos: o *estudo 1*: “Estudos metabolômicos analisando alterações induzidas pelo exercício no metaboloma humano : uma revisão sistemática”, encontra-se publicado no periódico *Metabolites*, e o *estudo 2*: “Influência crônica do treinamento muscular inspiratório de diferentes intensidades no metaboloma sérico humano”, submetido ao mesmo periódico e encontra-se sob revisão (*Anexo B*). Estes estudos estão apresentados nas próximas sessões desta tese no formato de manuscrito, escritos na língua portuguesa e com inclusão de ilustrações.

REFERÊNCIAS

ABDELNUR, P. V. Metabolômica e espectrometria de massas. **Embrapa Agroenergia - Circular Técnica**, v. 1, p. 4, 2011.

AL-KHELIFI, F. et al. A pilot study comparing the metabolic profiles of elite-level athletes from different sporting disciplines. **Sports Medicine - Open**, v. 4, n. 1, p. 2, 5 jan. 2018.

BROWN, P. I.; SHARPE, G. R.; JOHNSON, M. A. Inspiratory muscle training reduces blood lactate concentration during volitional hyperpnoea. **European Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 1, p. 111–117, set. 2008.

CAHALIN, L. P.; ARENA, R. A. Breathing exercises and inspiratory muscle training in heart failure. **Heart Failure Clinics**, v. 11, n. 1, p. 149–172, jan. 2015.

CANUTO, G. A. B. et al. METABOLOMICS: DEFINITIONS, STATE-OF-THE-ART AND REPRESENTATIVE APPLICATIONS. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, jan. 2018.

CAPOSTAGNO, B.; LAMBERT, M. I.; LAMBERTS, R. P. A Systematic Review of Submaximal Cycle Tests to Predict, Monitor, and Optimize Cycling Performance. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 11, n. 6, p. 707–714, set. 2016.

DANAHER, J. et al. The use of metabolomics to monitor simultaneous changes in metabolic variables following supramaximal low volume high intensity exercise. **Metabolomics**, v. 12, n. 1, p. 7, 11 nov. 2015.

DAVISON, G. et al. Metabolomic response to acute hypoxic exercise and recovery in adult males. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1682, 2018.

DEMPSEY, J. A. et al. Respiratory system determinants of peripheral fatigue and endurance performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 3, p. 457–461, mar. 2008.

DUFT, R. G. et al. Metabolomics and Exercise: possibilities and perspectives. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, n. 2, 2017.

DUNN, W. B. et al. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387–426, jan. 2011.

ENRIGHT, S. J. et al. Effect of high-intensity inspiratory muscle training on lung volumes, diaphragm thickness, and exercise capacity in subjects who are healthy. **Physical Therapy**, v. 86, n. 3, p. 345–354, mar. 2006.

ENRIGHT, S. J.; UNNITHAN, V. B. Effect of inspiratory muscle training intensities on pulmonary function and work capacity in people who are healthy: a randomized controlled trial. **Physical Therapy**, v. 91, n. 6, p. 894–905, jun. 2011.

FABBRI, S. et al. **Improvements in the StArt tool to better support the systematic review process**. Proceedings of the 20th International Conference on Evaluation and Assessment in Software Engineering. **Anais...: EASE '16**. New York, NY, USA: ACM, 2016. Disponível em: <<http://doi.acm.org/10.1145/2915970.2916013>>. Acesso em: 17 dez. 2018

GRIFFITHS, L. A.; MCCONNELL, A. K. The influence of inspiratory and expiratory muscle training upon rowing performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 5, p. 457–466, mar. 2007.

HAJGHANBARI, B. et al. Effects of respiratory muscle training on performance in athletes: a systematic review with meta-analyses. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 27, n. 6, p. 1643–1663, jun. 2013.

HEANEY, L. M.; DEIGHTON, K.; SUZUKI, T. Non-targeted metabolomics in sport and exercise science. **Journal of Sports Sciences**, v. 37, n. 9, p. 959–967, mar. 2017.

HODGSON, A. B. et al. Metabolic response to green tea extract during rest and moderate-intensity exercise. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 1, p. 325–334, jan. 2013.

HOFFMAN, N. J. Omics and Exercise: Global Approaches for Mapping Exercise Biological Networks. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 10, out. 2017.

HOWE, C. C. F. et al. Untargeted metabolomics profiling of an 80.5 km simulated treadmill ultramarathon. **Metabolites**, v. 8, n. 1, 13 fev. 2018.

ILLI, S. K. et al. Effect of respiratory muscle training on exercise performance in healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 42, n. 8, p. 707–724, 1 ago. 2012.

JACOBS, D. M. et al. Metabolic response to decaffeinated green tea extract during rest and moderate-intensity exercise. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9936–9943, 8 out. 2014.

JANSSENS, L. et al. The assessment of inspiratory muscle fatigue in healthy individuals: a systematic review. **Respiratory Medicine**, v. 107, n. 3, p. 331–346, mar. 2013.

KARL, J. P. et al. Military training elicits marked increases in plasma metabolomic signatures of energy metabolism, lipolysis, fatty acid oxidation, and ketogenesis. **Physiological Reports**, v. 5, n. 17, set. 2017.

KARSTEN, M. et al. The effects of inspiratory muscle training with linear workload devices on the sports performance and cardiopulmonary function of athletes: A systematic review and meta-analysis. **Physical Therapy in Sport: Official Journal of the Association of Chartered Physiotherapists in Sports Medicine**, v. 34, p. 92–104, nov. 2018.

KNAB, A. M. et al. Effects of a flavonoid-rich juice on inflammation, oxidative stress, and immunity in elite swimmers: a metabolomics-based approach. **International**

Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, v. 23, n. 2, p. 150–160, abr. 2013.

LE MOYEC, L. et al. NMR metabolomics for assessment of exercise effects with mouse biofluids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 2, p. 593–602, ago. 2012.

LEHMANN, R. et al. Medium chain acylcarnitines dominate the metabolite pattern in humans under moderate intensity exercise and support lipid oxidation. **PloS One**, v. 5, n. 7, p. e11519, 12 jul. 2010.

LEWIS, G. D. et al. Metabolic signatures of exercise in human plasma. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 33, p. 33ra37, 26 maio 2010.

LIBERATI, A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **PLoS medicine**, v. 6, n. 7, 21 jul. 2009.

MANAF, F. A. et al. Characterizing the plasma metabolome during and following a maximal exercise cycling test. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, 2 ago. 2018.

MESSIER, F. M. et al. The impact of moderate altitude on exercise metabolism in recreational sportsmen: a nuclear magnetic resonance metabolomic approach. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 42, n. 11, p. 1135–1141, nov. 2017.

NEAL, C. M. et al. Six weeks of a polarized training-intensity distribution leads to greater physiological and performance adaptations than a threshold model in trained cyclists. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 114, n. 4, p. 461–471, 15 fev. 2013.

NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Opinion: understanding “global” systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 8, p. 668–676, 2003.

NIEMAN, D. C. et al. Influence of a polyphenol-enriched protein powder on exercise-induced inflammation and oxidative stress in athletes: a randomized trial using a metabolomics approach. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e72215, 2013a.

NIEMAN, D. C. et al. Serum metabolic signatures induced by a three-day intensified exercise period persist after 14 h of recovery in runners. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 10, p. 4577–4584, 4 out. 2013b.

NIEMAN, D. C. et al. Influence of pistachios on performance and exercise-induced inflammation, oxidative stress, immune dysfunction, and metabolite shifts in cyclists: a randomized, crossover trial. **PloS One**, v. 9, n. 11, p. e113725, 2014a.

NIEMAN, D. C. et al. Metabolomics approach to assessing plasma 13- and 9-hydroxy-octadecadienoic acid and linoleic acid metabolite responses to 75-km cycling. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 1, p. R68-74, 1 jul. 2014b.

NIEMAN, D. C. et al. Metabolomics-based analysis of banana and pear ingestion on exercise performance and recovery. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 12, p. 5367–5377, 4 dez. 2015.

NIEMAN, D. C.; MITMESSER, S. H. Potential impact of nutrition on immune system recovery from heavy exertion: a metabolomics perspective. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 18 maio 2017.

NIEMAN, D. C.; SHA, W.; PAPPAN, K. L. IL-6 linkage to exercise-induced shifts in lipid-related metabolites: a metabolomics-based analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 2, p. 970–977, 03 2017.

NIEMAN, D. C.; WENTZ, L. M. The compelling link between physical activity and the body's defense system. **Journal of Sport and Health Science**, v. 8, n. 3, p. 201–217, 1 maio 2019.

PEAKE, J. M. et al. Metabolic and hormonal responses to isoenergetic high-intensity interval exercise and continuous moderate-intensity exercise. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 7, p. E539-552, 1 out. 2014.

PECHLIVANIS, A. et al. ¹H NMR study on the short- and long-term impact of two training programs of sprint running on the metabolic fingerprint of human serum. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 1, p. 470–480, 4 jan. 2013.

PSYCHOGIOS, N. et al. The human serum metabolome. **PloS One**, v. 6, n. 2, p. e16957, 16 fev. 2011.

RA, S.-G. et al. Metabolomics of salivary fatigue markers in soccer players after consecutive games. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 39, n. 10, p. 1120–1126, out. 2014.

ROMER, L. M.; MCCONNELL, A. K.; JONES, D. A. Effects of inspiratory muscle training on time-trial performance in trained cyclists. **Journal of Sports Sciences**, v. 20, n. 7, p. 547–562, jul. 2002.

ROMER, L. M.; POLKEY, M. I. Exercise-induced respiratory muscle fatigue: implications for performance. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 104, n. 3, p. 879–888, mar. 2008.

RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 23, p. 7954–7958, 1 dez. 2006.

SAKAGUCHI, C. A. et al. Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, 9 ago. 2019.

SALES, A. T. DO N. et al. Respiratory muscle endurance after training in athletes and non-athletes: A systematic review and meta-analysis. **Physical Therapy in Sport: Official Journal of the Association of Chartered Physiotherapists in Sports Medicine**, v. 17, p. 76–86, jan. 2016.

SHEEL, A. W. Respiratory muscle training in healthy individuals: physiological rationale and implications for exercise performance. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 32, n. 9, p. 567–581, 2002.

STANDER, Z. et al. The altered human serum metabolome induced by a marathon. **Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society**, v. 14, n. 11, p. 150, 3 nov. 2018.

STELZER, I. et al. Ultra-endurance exercise induces stress and inflammation and affects circulating hematopoietic progenitor cell function. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 25, n. 5, p. e442-450, out. 2015.

VERGES, S. et al. Expiratory muscle fatigue impairs exercise performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 2, p. 225–232, set. 2007.

YAN, B. et al. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 106, n. 2, p. 531–538, fev. 2009.

ZAFEIRIDIS, A. et al. Global metabolic stress of isoeffort continuous and high intensity interval aerobic exercise: a comparative ¹H NMR metabonomic study. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 12, p. 4452–4463, 02 2016.

**Parte I - ESTUDO 1 (versão em português com
detalhamentos e inclusão de ilustrações)**

“Estudos Metabolômicos Analisando Alterações Induzidas pelo Exercício no Metaboloma Humano : Uma Revisão Sistemática”¹

“Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review”

Camila A. Sakaguchi, David C. Nieman, Ettore F. Signini, Raphael M. Abreu, Aparecida M. Catai

¹ Artigo publicado na revista *Metabolites* (ISSN: 2218-1989) doi:10.3390/metabo9080164

Recebido: 10 de julho de 2019; Aceito: 31 de julho de 2019; Publicado: 9 de agosto de 2019.
Current Impact Factor: 3.303
JCR category rank: 126/298 (Q2) in 'Biochemistry & Molecular Biology'

1 INTRODUÇÃO

A atividade física aguda e crônica resulta em amplas adaptações em órgãos e sistemas, levando a benefícios à saúde (GRAZIOLI et al., 2017). As melhorias na tecnologia têm permitido aos pesquisadores quantificar essas adaptações usando uma abordagem de biologia de sistemas, sobrepondo informações de genes utilizando a transcriptômica, proteômica e metabolômica (DAVISON et al., 2018; DUNN et al., 2011; GRAZIOLI et al., 2017; HODGSON et al., 2013; JACOBS et al., 2014; NIEMAN et al., 2014, 2015; NIEMAN; MITMESSER, 2017; NIEMAN; SHA; PAPPAN, 2017; WACKERHAGE; SMITH; WISNIEWSKI, 2014). Dados combinados de abordagens multiômicas irão melhorar a compreensão científica a respeito do complexo efeito modulador que a atividade física tem sobre o fenótipo à nível individual e nos mecanismos moleculares relacionados.

Metabolômica é definida como a identificação e quantificação simultânea de numerosos metabólitos de baixo peso molecular que participam como substratos, reagentes, agentes de sinalização, intermediários e produtos de reações mediadas por enzimas (DUNN et al., 2011; NIEMAN; MITMESSER, 2017). Os metabólitos são os produtos de longos processos bioquímicos e refletem de maneira próxima o fenótipo expresso. Com o apoio de plataformas analíticas avançadas e bioinformática, os dados metabolômicos podem fornecer informações valiosas sobre o impacto biológico da atividade física, tratamento farmacológico, intervenções nutricionais e outras exposições (NIEMAN; MITMESSER, 2017).

Procedimentos de metabolômica global foram realizados pela primeira vez nas décadas de 1960 e 1970, quando a espectrometria de massas por cromatografia gasosa (GC-MS) foi usada para medir metabólitos humanos em amostras de sangue e urina (DUNN et al., 2011). No entanto, a metabolômica tem sido considerada como um campo emergente no meio científico desde meados 2010, ano em que foram publicados os primeiros estudos que investigaram os efeitos do exercício físico em humanos atletas (NIEMAN; MITMESSER, 2017). Desde então, um número crescente de grupos de pesquisa tem usado a metabolômica em estudos com exercício físico. Isso se deve, em grande parte, à ampla disponibilidade de plataformas de espectrometria de massas, bancos de dados de metabólitos on-line acessíveis gratuitamente como o *Human Metabolome Database* (HMDB), a expansão de acervos

de substâncias químicas de referência, e o suporte de bioinformática avançada para analisar e compreender os grandes volumes de dados. Resultante disso, tem sido observada uma capacidade aprimorada de detectar com precisão um maior número de metabólitos e, em seguida, interpretar o efeito geral no metaboloma humano em uma ampla variedade de matrizes.

2 OBJETIVO

Esta revisão sistemática tem como objetivo realizar uma avaliação qualitativa de estudos metabolômicos publicados durante a década passada, explorando alterações induzidas pelo exercício físico (agudo e crônico) no metaboloma humano. As conclusões provenientes desta revisão fornecerão uma estrutura baseada em evidências para investigações futuras.

3 MÉTODOS

Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (LIBERATI et al., 2009) e foi pré-registrada no *International Prospective Register of Systematic Review* (PROSPERO). Para sistematizar a busca e a extração de dados, foi utilizada uma ferramenta eletrônica padronizada gratuita chamada *State of the Art by Systematic Review* (StArt) (FABBRI et al., 2016). O software StArt identificou os estudos duplicados durante a extração, processo que foi confirmado manualmente por dois revisores principais. Os estudos foram selecionados, extraídos e incluídos de forma independente por dois pesquisadores (CAS e EFS), e um terceiro pesquisador independente (RMA) verificou o processo de inclusão para solucionar qualquer desacordo entre os dois pesquisadores principais.

3.1. Estratégia de Busca

A pesquisa eletrônica foi realizada no dia 26 de novembro de 2018, e atualizada em 10 de abril de 2019. As buscas foram realizadas nos seguintes bancos de dados eletrônicos: *PubMed* (via Biblioteca Nacional de Medicina), *Science Direct*, *SCOPUS* (Elsevier) e *Web of Science*. Os termos MeSH foram selecionados e combinados de

acordo com o método de análise (*metabolomics*) e atividade obrigatória (*sports OR exercise*). Além disso, a estratégia de busca foi limitada à estudos com humanos (população de interesse), idioma inglês e tipo de estudo (ensaios clínicos).

3.2. Critérios de Elegibilidade para Inclusão

Os resumos dos estudos foram primeiramente examinados e avaliados pelos critérios listados. Os estudos foram selecionados se a metabolômica fosse utilizada para medir as alterações nos metabólitos induzidas pelo exercício físico em participantes saudáveis usando amostras de soro, plasma, saliva ou urina. Estudos baseados em exercícios com intervenções nutricionais foram incluídos, mas para esta revisão foram considerados e extraídos apenas os dados coletados nos grupos controle. Revisões, relatos de casos, diretrizes, teses e dissertações, resumos de conferências e estudos utilizando modelos animais ou *in vitro* não foram incluídos.

3.3. Extração dos Dados e Inclusão dos Estudos

Os seguintes dados dos estudos selecionados foram extraídos: nome do primeiro autor, ano de publicação, características dos participantes e grupos (população, tamanho da amostra, grupos, sexo, idade, nível de atividade física), elementos do desenho do estudo (tipo de estudo, tipo de exercício, duração e intensidade de exercício), procedimentos metabolômicos (plataforma analítica, dados relacionados aos metabólitos) e comentários resumidos.

3.4. Avaliação da Qualidade dos Estudos

A qualidade dos estudos foi avaliada por dois pesquisadores (CAS e EFS) utilizando um sistema de pontuação, criado durante o desenvolvimento deste estudo, especificamente para avaliar estudos metabolômicos (Tabela 1 e Figura 1). O sistema foi elaborado pelo Professor Doutor David Christopher Nieman, especialista em exercício físico e estudos com abordagem metabolômica, diretor do Laboratório *Human Performance* da universidade *Appalachian State* (Carolina do Norte, EUA), que considerou, de acordo com sua *expertise*, critérios importantes que caracterizam estudos metabolômicos de alta qualidade.

Tabela 1. Critérios de pontuação para avaliação da qualidade dos estudos metabolômicos.

Critérios de Pontuação			
Seção	Pontuação Máxima	Aspectos	Atribuição de Pontos
	2	Número de Participantes	Estudo Paralelo 0 – N < 20 2 – N > 20
			Estudo Cross-over 0 – N < 13 2 – N > 13
Desenho do Estudo	2	Características do Estudo	Presença de grupo randomizado controlado Matriz apropriada > 2 momentos de coleta de amostra Duração ≥ 3 semanas (somente para estudos crônicos) 0 - Nenhum dos itens anteriores 1 – Pelo menos 2 dos 3 primeiros critérios listados 3 - Todos os 3 dos 3 critérios listados
	3	Método de Análise	3 - LC-MS/MS com padrões extensos 1 - ¹ H NMR, padrões limitados 1 - GC-MS, padrões limitados
Metodologia	2	Recursos Estatísticos	0 – Estatística univariada simples 1 - Estatística univariada + análises adicionais para separação e agrupamento dos dados, e para controle de fatores de confusão 2 - Estatística univariada + PCA, OPLS-DA, PLS-DA, ou procedimentos semelhantes utilizando bioinformática avançada.
Novidade	2		Novas informações para literatura.

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; H NMR: espectroscopia por ressonância magnética nuclear; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; PCA: análise de componentes principais; PLS-DA análise discriminatória por mínimos quadrados parciais; OPLS-DA: análise discriminatória por mínimos quadrados parciais ortogonais.

Pontuação Total	Classificação
9 – 11	Excelente
6 – 8	Bom
4 – 5	Regular
< 4	Ruim

Figura 1. Classificação dos estudos considerando a pontuação total.

4 RESULTADOS

Um total de 1355 artigos foram identificados para esta análise. Após a revisão dos resumos, 1314 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão. Dos 41 estudos selecionados para a leitura de textos na íntegra, seis foram excluídos por não atenderem aos critérios da análise. Dos 35 estudos incluídos para pontuação, 24 atingiram uma pontuação mínima de 6 e foram incluídos na análise final (Figura 2 e Tabela 2).

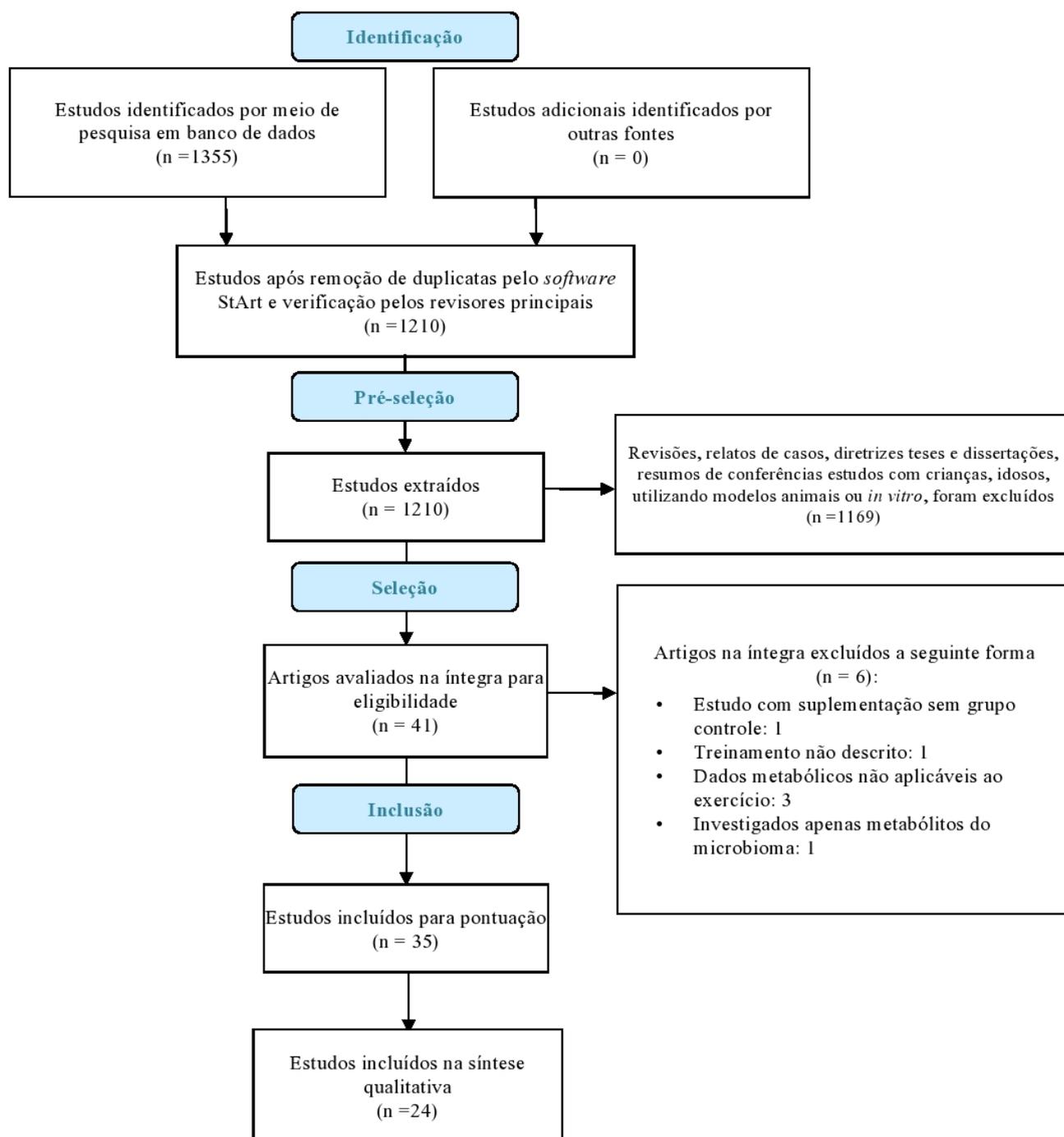


Figura 2. Resultados do diagrama de fluxo de revisão.

Tabela 2. Classificação dos estudos de acordo com o sistema de pontuação.

Autores, Ano de publicação	Desenho do estudo			Métodos		Inovação	Pontuação final	Classificação
	Número de Sujeitos	Características do Estudos	Métodos de Análise	Suporte Estatístico				
Nieman et al., 2015	2	2	3	2	2	2	11	Excelente
Jacobs et al., 2014	2	2	3	2	2	2	11	Excelente
Nieman et al., 2014	2	2	3	1	1	2	10	Excelente
Nieman et al., 2017	2	1	3	2	2	2	10	Excelente
Davison et al., 2018	2	2	3	1	1	1	9	Excelente
Hodgson et al., 2012	0	2	3	2	2	2	9	Excelente
Karl et al., 2017	0	1	3	2	2	2	8	Bom
Lehman et al., 2010	0	1	3	2	2	2	8	Bom
Lewis et al., 2010	2	1	3	0	0	2	8	Bom
Nieman et al., 2013	0	2	3	1	1	2	8	Bom
Al-Khelaifi et al., 2018	2	0	3	2	2	1	8	Bom
Knab at al., 2013	0	2	1	2	2	2	7	Bom
Manaf et al., 2018	0	1	3	2	2	1	7	Bom
Messier et al., 2017	2	1	1	2	2	1	7	Bom
Nieman et al., 2013	0	1	3	1	1	2	7	Bom
Nieman et al., 2014	0	1	3	1	1	2	7	Bom
Ra et al., 2014	2	1	1	2	2	1	7	Bom

Continuação Tabela 2.

Autores, Ano de publicação	Desenho do estudo			Métodos		Inovação	Pontuação final	Classificação
	Número de Sujeitos	Características do Estudos	Métodos de Análise	Suporte Estatístico				
Stander et al., 2018	2	1	1	2	1	1	7	Bom
Danaher et al., 2015	0	1	1	2	1	2	6	Bom
Howe et al., 2018	0	0	3	2	1	1	6	Bom
Neal et al., 2013	0	1	1	2	2	2	6	Bom
Peake et al., 2014	0	2	1	1	2	2	6	Bom
Pechlivanis et al., 2013	0	1	1	2	2	2	6	Bom
Zafeiridis et al., 2016	0	1	1	2	2	2	6	Bom
Muhsen Ali et al., 2016	0	0	3	2	0	0	5	Regular
Castro et al., 2019	2	1	1	1	0	0	5	Regular
Enea et al., 2010	0	1	1	2	1	1	5	Regular
Andersson Hall et al., 2015	0	1	1	2	1	1	5	Regular
Pechlivanis et al., 2010	0	1	1	2	1	1	5	Regular
Wang et al., 2015	0	1	1	2	1	1	5	Regular
Yan et al., 2009	0	1	1	2	1	1	5	Regular
Prado et al., 2017	2	0	2	0	0	0	4	Regular
Sun et al., 2017	0	0	1	2	1	1	4	Regular
Berton et al., 2017	0	1	1	0	1	1	3	Fraco
Valério et al., 2018	0	1	1	0	1	1	3	Fraco

Efeitos da intensidade e duração do exercício físico no metabolismo

As respostas metabólicas ao exercício dependem da intensidade e duração do esforço. Para os objetivos desta revisão, alta e moderada intensidades foram diferenciadas usando o limiar de intensidade de 60% da captação de oxigênio e frequência cardíaca de reserva, e de longa e curta duração usando um limiar de duração de 60 min (NIEMAN; WENTZ, 2019)

4.1. Estudos utilizando Alta Intensidade e Longa Duração

Mais da metade dos estudos incluídos nesta análise (62,5%; n = 15) investigou as respostas dos metabólitos à exercícios de alta intensidade e longa duração, incluindo corrida (n = 8) (DAVISON et al., 2018; HOWE et al., 2018; LEHMANN et al., 2010; LEWIS et al., 2010; NIEMAN et al., 2013a, 2013b; NIEMAN; SHA; PAPPAN, 2017; STANDER et al., 2018), ciclismo (n = 5) (MANAF et al., 2018; MESSIER et al., 2017; NIEMAN et al., 2014a, 2014b, 2015), futebol (n = 1) e natação (n = 1) (KNAB et al., 2013) (Tabela 3). A espectrometria de massas por cromatografia líquida (LC-MS) com ou sem GC-MS foi usada para identificação dos metabólitos em 11 desses estudos (DAVISON et al., 2018; HOWE et al., 2018; LEHMANN et al., 2010; LEWIS et al., 2010; MANAF et al., 2018; NIEMAN et al., 2013a, 2013b, 2014a, 2014b, 2015; NIEMAN; SHA; PAPPAN, 2017), GC-MS foi utilizada como o método primário em dois estudos (KNAB et al., 2013; STANDER et al., 2018), espectrometria de massas por tempo-de-vôo com eletroforese capilar (CE-TOFMS) em um estudo (RA et al., 2014), e ressonância magnética nuclear (RMN) em um estudo (MESSIER et al., 2017). Alterações em grande quantidade nos metabólitos da via lipídica foram relatadas pela maioria dos pesquisadores, incluindo aumentos nos ácidos graxos plasmáticos de cadeia média e longa, produtos de oxidação dos ácidos graxos (dicarboxilato e ácidos graxos mono-hidroxi, acilcarnitinas) e corpos cetônicos, com reduções correspondentes nos triacilgliceróis (Tabela 3). Outras alterações nos metabólitos incluíram variações na concentração de aminoácidos e aumentos nos componentes do metabolismo energético do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

Tabela 3. Estudos com alta intensidade e longa duração.

Autores, Ano de Publicação	População do Estudo	Plataforma Analítica / Matriz	Desenho do Estudo	Principais Achados do Efeito do Exercício Separado de Outras Intervenções	Intensidade
Nieman et al., 2015	20 ciclistas do sexo masculino (39,2 ± 1,9 anos)	UPLC-MS/MS; Plasma	Estudo randomizado, crossover (três braços); protocolo de ciclismo de 75 Km, ingestão de: somente água, banana e água, peras e água (washout de duas semanas); coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (0-h, 1,5-h, 21-h)	509 metabólitos foram quimicamente identificados; ↑ ratio > 2-fold: 107 metabólitos aumentados no teste no grupo ingerindo somente água (efeitos do exercício); ↑ ratio > 5-fold: 35 metabólitos aumentados, todos da via lipídica, todos significativamente elevados 1,5-h pós-exercício, apenas 8 permaneceram após 21-h pós-exercício.	Alta intensidade, longa duração
Nieman et al., 2014*	19 ciclistas do sexo masculino (38,06 ± 1,6 anos)	GC-MS e UHPLC-MS/MS; Plasma	Estudo randomizado, crossover (dois braços); protocolo de ciclismo de 75 Km, com suplementação de pistache ou sem pistache (washout de 2 semanas); coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (0-h, 1,5-h, 21-h)	423 metabólitos foram quimicamente identificados; 167 metabólitos foram aumentados pelo exercício; todos, exceto 26 desses metabólitos, estavam relacionados ao metabolismo lipídico e da carnitina, com as maiores alterações observadas nas cetonas, ácidos graxos dicarboxilatos e nos ácidos graxos de cadeia longa.	Alta intensidade, longa duração
Nieman et al., 2017	24 corredores do sexo masculino (36,5 ± 1,8 anos)	GC-MS e UHPLC-MS/MS; Plasma	Análise ANOVA de medidas repetidas, somente um grupo; coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (0-h), uma sessão até a exaustão a 70% do VO ₂ máx	209 metabólitos quimicamente identificados foram alterados com o exercício, especialmente ↑ ácidos graxos de cadeia longa e média, produtos da oxidação de ácidos graxos (ácidos graxos dicarboxilatos e mono-hidroxi, e acilcarnitinas) e ↑ corpos	Alta intensidade, longa duração

Continuação Tabela 3.

cetônicos. Relação secundária com ↑ IL-6.

Davison et al., 2018	24 homens saudáveis (28 ± 5 anos)	LC-MS; Soro	Estudo duplo-cego, randomizado, crossover (dois braços); 60 min de corrida a 75% do $\dot{V}O_2$ máx em hipóxia ($FiO_2 = 0,16\%$) (câmara de hipóxia) e normoxia ($FiO_2 = 0,21\%$) (washout de 1 semana); coletas sanguíneas: pré- (após 30 minutos de descanso em hipóxia, normoxia), pós-exercício (0-h, 3-h)	27 metabólitos alterados com o exercício, identificados usando bancos de dados da Internet; maioria relacionados com o metabolismo lipídico (várias moléculas de acilcarnitinas) e ao metabolismo da purina (↑ adenina, ↑ adenosina e ↓ hipoxantina (3 h após a recuperação)); ↑ de 4,3-fold em 18 acilcarnitinas pós-exercício, aumento mantido acima do valor basal mesmo após 3-h de recuperação.	Alta intensidade, longa duração
Lehman et al., 2010	Sujeitos do sexo masculino, saudáveis; 1º estudo: n = 13 (32,6 ± 6,1 anos) 2º estudo: n = 8 (30,9 ± 5,8 anos)	UPLC-qTOF-MS; Plasma	Estudo paralelo; 1º estudo: corrida em esteira 60min a 75% $\dot{V}O_2$, pontos no tempo das amostras de sangue: pré- e pós-exercício (0-h, 3-h, 24-h); 2º estudo: corrida em esteira >120 min a 70% do \dot{V}_{IAT} , coletas sanguíneas: pré- (1-h 45-min após o café da manhã) e pós-exercício (0-h, 3-h, 24-h)	10 metabólitos, quimicamente identificados, caracterizaram a separação entre os momentos de coleta sanguínea; A maioria ácidos graxos livres não esterificados; ↑ de 9-fold das acilcarnitinas.	Alta intensidade, longa duração
Lewis et al., 2010	25 corredores do sexo masculino, amadores (42 ± 9 anos)	LC-MS; Plasma	Medidas repetidas, somente um grupo; Maratona de Boston; coletas sanguíneas: pré- e pós-maratona	Metabólitos quimicamente identificados; ↑ em glicólise, lipólise, catabolismo da adenina e catabolismo de aminoácidos; ↑ indicadores de glicogenólise (glicose-6-fosfato e 3-fosfoglicerato) e pequenas moléculas que refletem o estresse oxidativo (alantoina) e que modulam a sensibilidade à insulina (niacinamida)	Alta intensidade, longa duração

Continuação Tabela 3.

<p>Nieman et al., 2013</p>	<p>35 corredores de longa distância, do sexo masculino (grupo suplementado: 33,7 ± 6,8 anos; placebo: 35,2 ± 8,7 anos)</p>	<p>GC-MS and UHPLC-MS/MS; Soro</p>	<p>Estudo paralelo, duplo-cego; Suplementação de 2 semanas (proteína enriquecida com polifenóis) seguida de 3 dias de exercício de alta intensidade (2,5h a 70% do VO_{2max}); coletas sanguíneas: pré e pós-14 dias de suplementação, e 0-h e 14-h após o terceiro dia de corrida</p>	<p>324 metabólitos quimicamente identificados se alteraram com o período de 3 dias de exercício; ↑ metabólitos relacionados à oxidação de ácidos graxos e cetogênese, incluindo ácidos graxos livres, acilcarnitinas, ácidos graxos 3-hidroxi e ácidos dicarboxílicos, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, produção de energia, nucleotídeos, cofatores e vitaminas.</p>	<p>Alta intensidade, longa duração</p>
<p>Knab et al., 2013</p>	<p>9 atletas de elite de sprint de média distância de natação, sexo masculino; 7 indivíduos controle (saúdáveis e com menos de 150 min / semana de exercícios) (24,6 ± 0,7 anos)</p>	<p>GC-MS; Soro</p>	<p>Estudo randomizado, crossover, suplementação de 10 dias com suco rico em flavonóides (~ 240 mL pré- e pós-treino) ou sem suco. Prática de 2h de natação por 10 dias, aproximadamente 5500m de treinamento intervalado de natação (washout de 3 semanas). Coletas sanguíneas: pré- e pós-cada período de suplementação de 10 dias e pós-exercício (0-h)</p>	<p>325 metabólitos foram identificados quimicamente; nenhum efeito do suco nas alterações induzidas pelo exercício; ↑ Estresse oxidativo e ↓ efeito antioxidante no grupo de nadadores em comparação ao grupo controle não-atlético; Metabólitos que diferiram estão principalmente relacionados à utilização de substratos e suplementos utilizados pelos nadadores. Mudança pequena, porém, significativa no pré- e pós-exercício nos metabólitos relacionados à utilização de substratos: ácido pirúvico, ácido propanóico, d-frutose, manose, n-acetilglutamina, norleucina, aloisoleucina e ácido d-glicurônico.</p>	<p>Alta intensidade, longa duração</p>
<p>Manaf et al., 2018</p>	<p>18 homens saudáveis e ativos recreacionais (24,7 ± 4,8 anos)</p>	<p>LC-MS; Plasma</p>	<p>Análise ANOVA de medidas repetidas, somente um grupo; teste em ciclo ergômetro até a exaustão (81 min) com carga de trabalho de 3 mMI (W_{3mMI}) de lactato; coletas sanguíneas: pré-exercício, durante o</p>	<p>80 metabólitos identificados usando bancos de dados da Internet; 68 metabólitos alterados durante o exercício; ↑ Ácidos graxos livres e ↓ triptofano contribuíram para diferenças</p>	<p>Alta intensidade, longa duração</p>

Continuação Tabela 3.

			exercício (10 minutos, antes da fadiga), ponto de exaustão (imediatamente após a fadiga), pós-exercício (20 minutos após a fadiga)	no metaboloma plasmático no momento de fadiga.	
Messier et al., 2017	20 homens saudáveis (39 ± 4,3 anos)	¹ H NMR; Plasma	Estudo crossover; exercício em ciclo ergômetro durante 60 min no limiar ventilatório 1 a 70 rpm, ao nível do mar e acima de 2150 m do nível do mar (2 semanas de washout); coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (0-h)	18 metabólitos identificados usando bancos de dados da Internet; ↓ níveis glicose e aminoácidos livres; Não houve diferença no metabolismo lipídico entre altitudes; houve mudança de substrato energético da oxidação lipídica para a oxidação de carboidratos a 2150m acima do nível do mar.	Alta intensidade, longa duração
Nieman et al., 2013	15 corredores (7 homens, 8 mulheres) (35,2 ± 8,7 anos)	GC-MS e UHPLC-MS/MS; Soro	Estudo transversal, protocolo de 3 dias de exercício (2,5 h por dia em séries à ≈ 70% do VO ₂ máx); coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (0-h, 14-h)	Metabólitos quimicamente identificados; ↑ ≥ 2- fold em 75 metabólitos imediatamente após o período de 3 dias de exercício, 22 metabólitos relacionados ao metabolismo lipídico/carnitina, 13 relacionados ao metabolismo de aminoácidos/peptídeos, 4 ao metabolismo da hemoglobina / porfirina e 3 intermediários do ciclo de Krebs. Após 14 h de recuperação: 50 dos 75 metabólitos ainda permaneceram elevados. ↓ 22 metabólitos pós-exercício relacionados ao metabolismo de lisolipídios e do ácido biliar.	Alta intensidade, longa duração
Nieman et al., 2014*	19 ciclistas do sexo masculino (38,06 ± 1,6 anos)	GC-MS e UHPLC-MS/MS; Plasma	Análise ANOVA de medidas repetidas, somente um grupo; coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (0-h, 1,5-h, 21-	221 metabólitos quimicamente identificados alterados pelo exercício; todos, exceto 26, relacionados ao metabolismo lipídico e da carnitina;	Alta intensidade, longa duração

Continuação Tabela 3.

Ra et al., 2014	37 jogadores de futebol do sexo masculino (20,6 ± 0,04 anos)	CE-TOFMS; Saliva	Análise ANOVA de medidas repetidas, somente um grupo; 3 dias de jogos (90 min por dia); amostras de saliva coletadas: pré-exercício (1 mês antes) e pós-exercício (24 horas após)	maiores alterações observadas para ↑ cetonas, ácidos graxos dicarboxilatos e ácidos graxos de cadeia longa.	Alta intensidade, longa duração
Stander et al., 2018	31 corredores recreacionais de maratona (19 homens e 12 mulheres) (41 ± 12 anos)	GC-TOFMS; Soro	Análise ANOVA de medidas repetidas, somente um grupo; Maratona de 42 Km; coletas sanguíneas: pré- e pós- maratona (0-h)	144 metabólitos quimicamente identificados; ↑ 12 metabólitos (ex: 3- metil-histidina, glicose 1- e 6-fosfato, taurina, aminoácidos) relacionados ao catabolismo muscular, metabolismo da glicose, metabolismo lipídico, metabolismo de aminoácidos e metabolismo energético.	Alta intensidade, longa duração
Howe et al., 2018	9 corredores de ultramaratona do sexo masculino (34 ± 7 anos)	HILIC-MS; Plasma	Análise ANOVA de medidas repetidas, somente um grupo; Simulação de ultramaratona (80,5 Km) em esteira ergométrica; coletas sanguíneas: pré- e pós- exercício (0-h)	70 metabólitos identificados quimicamente; ↑ carboidratos, ácidos graxos, intermediários do ciclo de Krebs, cetonas e ↓ aminoácidos; ↑ ácidos graxos de cadeia ímpar e α- hidroxiácidos.	Alta intensidade, longa duração
Howe et al., 2018	9 corredores de ultramaratona do sexo masculino (34 ± 7 anos)	HILIC-MS; Plasma	Análise ANOVA de medidas repetidas, somente um grupo; Simulação de ultramaratona (80,5 Km) em esteira ergométrica; coletas sanguíneas: pré- e pós- exercício (0-h)	446 metabólitos quimicamente identificados; ↓ metabolismo de aminoácidos após 80,5 km; ↑ na formação de ácidos graxos insaturados e parcialmente oxidados de cadeia média e conjugados de ácidos graxos com carnitinas.	Alta intensidade, longa duração

UHPLC-MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas; UHPLC-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; UHPLC / Q-TOF MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas com analisador de tempo de voo; ¹H NMR: espectroscopia por ressonância magnética nuclear; CE-TOFMS: eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas com analisador de tempo de voo; HILIC-MS: cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas; 0-h: imediatamente após; VO₂máx = captação máxima de oxigênio; FiO₂ = fração do oxigênio inspirado; V_{IAT} = velocidade no limiar anaeróbio individual. * As referências (NIEMAN et al., 2014a, 2014b) foram do mesmo estudo, mas os conjuntos de dados forneceram informações adicionais.

4.2. Estudos utilizando Alta Intensidade e Curta Duração, Moderada Intensidade e Curta / Longa duração, Desenhos Transversais e Treinamentos

Tabela 4. Resumos das características e principais achados de nove estudos utilizando outros desenhos e tipos de exercício.

Autores, Ano de Publicação	População do Estudo	Plataforma Analítica / Matriz	Desenho do Estudo	Principais Achados do Efeito do Exercício Separado de Outras Intervenções	Intensidade
Danaher et al., 2015	7 homens ativos (22,9 ± 5,0 anos)	GC-MS; Plasma	Estudo crossover, randomizado; dois protocolos de exercício supra máximo de baixo volume e alta intensidade (washout de 1 semana); (1) HIE150%: 30 x 20 s pedalando a 150% do VO ₂ pico, 40 s de descanso (348 ± 27W) e (2) HIE300%: 30 x 10s pedalando a 300% VO ₂ pico, descanso de 50 s (697 ± 54 W); coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (0-h, 1-h)	55 metabólitos quimicamente identificados detectados; HIE300% produziu maiores perturbações metabólicas em comparado com HIE150%; Alterações mais evidentes durante a recuperação do que o exercício, com ↑ via glicolítica e ácidos graxos e metabolismo lipídico.	Alta intensidade, curta duração
Zafeiridis et al., 2016	9 homens jovens saudáveis (20,5 ± 0,7 anos). Treino de futebol 4-5 vezes por semana.	¹ H NMR; Plasma	Estudo crossover, randomizado; três protocolos de corrida (washout de 2 semanas): intenso contínuo (18 minutos, 80% da velocidade aeróbica máxima (MAV)), intervalo longo (29 minutos, 3 minutos a 95% do MAV, recuperação de 3 minutos a 35% do MAV) e intervalo curto	17 metabólitos identificados usando bancos de dados da Internet; Nenhuma diferença detectável nos metabólitos; ↑ metabolismo de carboidratos / lipídios e ativação do ciclo de Krebs nos três protocolos.	Alta intensidade, curta duração

Continuação Tabela 4.

			(18 min, 30 s a 110% do MAV, recuperação de 30 s a 50% do MAV); coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (5 min).			
Jacobs et al., 2014	19 homens saudáveis e fisicamente ativos (21 ± 2 anos)	GC-MS e LC-MS/MS; Plasma	Estudo crossover, duplo-cego, randomizado; Suplementação de 6 dias de chá verde descafeinado ou ingestão de placebo (washout de 28 dias) 2 h antes de 30 min de pedalada a 55% do VO ₂ máx.	152 metabólitos quimicamente identificados mudaram com o exercício; ↑ metabólitos relacionados ao metabolismo adrenérgico e energético (por exemplo, lactato, piruvato, malato, succinato, glicerol, cortisol); ↓ 2-hidroxobutirato.	Moderada intensidade, curta duração	
Hodgson et al., 2012	27 homens saudáveis e fisicamente ativos (22 ± 5 anos)	GC-MS e LC-MS/MS; Plasma	Estudo paralelo, duplo-cego, randomizado. Suplementação de 7 dias de chá verde com cafeína ou ingestão de placebo 2 horas antes de 60 minutos de pedalada a 50% do VO ₂ máx.	238 metabólitos quimicamente detectados mudaram com o exercício; ↑ razão > 2: lactato, piruvato, succinato, noradrenalina e glicerol; ↓ 2-hidroxobutirato, trans-4-hidroxi-prolina, manose, certos triacilglicerídeos (TAGs) e nicotinamida.	Moderada intensidade, curta duração	
Karl et al., 2017	25 homens soldados altamente treinados (19,0 ± 1,0 anos)	UPLC-MS/MS; Plasma	Estudo paralelo, duplo-cego, randomizado; Marcha de cross-country esqui de 51 dias e 51 km carregando carga de 45 kg; coletas sanguíneas: pré- e pós-exercício (finalizadores iniciais: 8 a 10 h ou finalizadores tardios: 2 a 3 h).	478 metabólitos quimicamente identificados alteraram pré- e pós-exercício. ↑ 88% dos ácidos graxos livres; ↑ 91% das acilamitinas; ↓ 88% dos mono- e diacilgliceróis detectados nas vias do metabolismo lipídico; Menor ↑ de 75% dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico; ↑ 50% dos	Moderada intensidade, longa duração	

Continuação Tabela 4.

		aminoácidos de cadeia ramificada.	
Peake et al., 2014	10 homens ciclistas e triatletas (33,2 ± 6,7 anos)	GC-MS; Plasma	Alta e moderada intensidade, longa duração
<p>49 metabólitos quimicamente identificados; 29 mudaram com o exercício (11 mudaram com HIIT e MOD; 13 mudaram apenas com HIIT; 5 mudaram apenas com MOD); ↑ na oxidação de carboidratos e ↓ na oxidação de gordura no exercício HIIT comparado ao MOD; Glicose e lactato mais altos em 0-h no HIIT em comparação ao MOD.</p>			
Metabólitos quimicamente identificados;			
Al-Khelaifi et al., 2018	191 atletas de elite (171 homens, 20 mulheres)	UPLC-MS/MS; Soro	Atletas de elite, modelo transversal
<p>↑ Estresse oxidativo comum a esportes de alta potência e alta resistência; ↑ esteróides e vias de poliamina mais proeminentes em modalidades de resistência; ↑ esteróis, purinas contendo adenina e metabólitos energéticos mais evidentes em modalidades de potência.</p>			
Neal et al., 2013	12 homens ciclistas (36 ± 6 anos)	¹ H NMR; Urina	Treinamento, baixa, moderada e alta intensidade
<p>Método usado para identificar metabólitos não relacionados; metabólitos identificados como ↓ ácido hipúrico, ↑</p>			

<p>de baixa intensidade, 0% de intensidade moderada, 20% de alta intensidade) e uma intensidade de treinamento limiar (57% de baixa intensidade, 43% de intensidade moderada, 0% de alta intensidade) (washout de 4 semanas); coletas de urina: antes e depois de cada período de treinamento.</p>	<p>creatinina, ↑ dimetilamina, ↑ 3-metilxantina, ↓ hipoxantina.</p>
<p>14 homens jovens, saudáveis, moderadamente treinados (21 ± 2 anos)</p> <p>Pechlivanis et al., 2013</p>	<p>18 metabólitos quimicamente identificados mudaram após o período de treinamento; separação após treinamento principalmente devido a ↓ lactato, ↓ piruvato, ↑ metilguanidina, ↑ citrato, ↑ glicose, ↑ valina, ↑ taurina, ↑ N-óxido de trimetilamina, ↑ compostos contendo colina, ↑ histidinas, ↑ acetoacetato / acetona, ↓ glicoproteínas acetilas e ↓ lipídios; nenhuma diferença significativa entre os intervalos de treinamento.</p> <p>Treinamento, alta intensidade</p>

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; UPLC-MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas; ¹H NMR: espectroscopia por ressonância magnética nuclear; HIE: exercício de alta intensidade; HIE150%: exercício de alta intensidade a 150% do pico do VO₂; HIE300%: exercício de alta intensidade a 300% do pico do VO₂; W : Watts; MAV: velocidade aeróbia máxima; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico; HIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; MOD = exercício contínuo de intensidade moderada.

A) Alta Intensidade, Curta Duração

Dois estudos mediram as respostas dos metabólitos ao exercício de alta intensidade e curta duração (18 a 30 min) em homens ativos recreacionais e atletas de futebol (DANAHER et al., 2015; ZAFEIRIDIS et al., 2016) (Tabela 4). Os dados de metabólito desses estudos foram derivados de plataformas analíticas GC-MS e RMN. Foram relatadas pequenas alterações pós-exercício para os metabólitos relacionados ao ciclo de Krebs e às vias bioenergéticas relacionadas.

B) Intensidade moderada, curta duração

Um estudo relatou respostas metabólicas após ciclismo de intensidade moderada e curta duração (30 min) (JACOBS et al., 2014) (Tabela 4). Os metabólitos foram identificados usando as plataformas analíticas GC-MS e LC-MS/MS. Pequenas alterações pós-exercício foram relatadas nos metabólitos ligados ao metabolismo energético (lipólise, glicólise, intermediários do ciclo de Krebs e catecolaminas).

C) Intensidade moderada, longa duração

Dois estudos investigaram as respostas dos metabólitos ao ciclismo de intensidade moderada e longa duração e ao *cross-country* esqui (HODGSON et al., 2013; KARL et al., 2017) (Tabela 4). Alterações pequenas a moderadas foram relatadas na condição pós-exercício para metabólitos relacionados às vias glicolíticas e lipídicas, incluindo ácidos graxos livres, aminoácidos de cadeia ramificada, acilcarnitinas, mono- e diacilgliceróis e intermediários do ciclo de Krebs.

D) Intensidade alta e moderada, longa duração

Um estudo comparou as respostas metabólicas do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) e 60 min de ciclismo de intensidade moderada (MOD) usando GC-MS (PEAKE et al., 2014) (Tabela 4). Alterações pequenas a moderadas foram relatadas para metabólitos relacionados ao metabolismo energético e às vias glicolíticas e lipídicas. O HIIT comparado ao MOD induziu níveis mais altos pós-exercício de metabólitos relacionados à via glicolítica e níveis mais baixos de metabólitos relacionados aos lipídios.

E) Estudo transversal com atletas de elite

Um estudo comparou os níveis plasmáticos de metabólitos em atletas de esportes de resistência alta (n = 121) e moderada (n = 70) (AL-KHELAIIFI et al., 2018) (Tabela 4). O estudo metabolômico foi realizado utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS / MS). A análise transversal mostrou algumas diferenças entre os grupos, incluindo níveis mais altos de metabólitos relacionados ao estresse oxidativo, metabolismo de ácidos graxos, biossíntese de esteróides e metabolismo energético em atletas de alta potência e alta resistência. Os níveis plasmáticos de metabólitos relacionados às vias de esteróides e vias de poliaminas foram mais proeminentes em atletas de modalidades de alta resistência; e esteróis, purinas (mais relacionadas à adenina) e metabólitos energéticos, mais evidentes em atletas de modalidades alta potência muscular.

F) Treinamento crônico de baixa, moderada e alta intensidade

Um estudo comparou os efeitos crônicos do treinamento de ciclismo em diferentes intensidades (NEAL et al., 2013) (Tabela 4). Os metabólitos plasmáticos foram medidos com RMN, e apenas pequenas diferenças nos grupos foram relatadas em alguns metabólitos selecionados (ácido hipúrico, hipoxantina, creatinina, dimetilamina, 3-metilxantina).

G) Treinamento Crônico de Alta Intensidade

Um estudo investigou os efeitos crônicos, de um treinamento de corrida de alta intensidade e curta duração nos níveis de metabólitos plasmáticos usando a RMN (PECHLIVANIS et al., 2013) (Tabela 4). Foram relatadas pequenas alterações nos metabólitos selecionados, incluindo lactato, piruvato, intermediários do ciclo de Krebs e fosfolipídios.

5 DISCUSSÃO

Os avanços na espectrometria de massa desde 2010 levaram a um número crescente de estudos baseados em metabolômica direcionados às respostas metabólicas agudas e crônicas após diferentes intensidades de exercícios. Esta revisão sistemática de 24 artigos de alta qualidade publicados nos últimos dez anos revelou que o foco principal (63% dos estudos) tem sido as perturbações agudas dos metabólitos após exercícios aeróbicos de alta intensidade e longa duração.

Pouca informação está disponível na literatura sobre as alterações metabólicas associadas a sessões agudas de exercício com intensidades mais baixas ou em relação aos efeitos à longo prazo de protocolos de treinamento. Os estudos com maior qualidade utilizaram plataformas analíticas LC-MS / MS com grandes bibliotecas de padrões químicos para identificar e detectar mudanças induzidas por exercícios em centenas de metabólitos. O considerável suporte da bioinformática avançada tem contribuído para melhora de modelagens preditivas e descritivas, seleção discriminativa de variáveis e a compreensão geral da resposta do metaboloma do corpo ao exercício.

Esta revisão sistemática indica que uma série de exercícios prolongados e de alta intensidade causam grandes alterações em numerosos e diversos metabólitos relacionados aos lipídios (DAVISON et al., 2018; HOWE et al., 2018; LEHMANN et al., 2010; MANAF et al., 2018; NIEMAN et al., 2013a, 2013b, 2014a, 2014b, 2015; NIEMAN; SHA; PAPPAN, 2017; RA et al., 2014; STANDER et al., 2018). Em um estudo com atletas humanos se exercitando intensamente por mais de duas horas, foram observados aumentos significativos em pelo menos 300 metabólitos identificados pelas plataformas analíticas de LC-MS / MS, com mais de 100 deles aumentando duas vezes ou mais (HOWE et al., 2018; NIEMAN et al., 2013a, 2014a, 2014b, 2015). Essa resposta inclui aumentos pós-exercício nos ácidos graxos plasmáticos de cadeia média e longa, corpos cetônicos, produtos de oxidação de ácidos graxos e ácidos biliares sulfatados. Ao mesmo tempo, diminuições relacionadas ocorrem em ésteres de triacilglicerol plasmático, ácidos biliares primários e secundários e fosfolipídios menores, como lisofosfatidilcolinas e lisofosfatidiletanolaminas (LEHMANN et al., 2010; NIEMAN et al., 2013b, 2014b; NIEMAN; GILLITT; SHA, 2018). A metabolômica com abordagem *untarget* revelou aumentos pós-exercício tanto em ácidos graxos comuns (por exemplo, oleato / vacinado, palmitato, linoleato, estearato, palmitoleato, miristato), como em ácidos graxos atípicos (adrenato, docosapentaenoato, dihomolinolenato, dihomolinoleato, docosadienoato e eicosenoeno). Os compostos representantes da oxidação de ácidos graxos incluem: acilcarnitinas, 3-hidroxiacetato (BHBA) e dicarboxilato e ácidos graxos mono-hidroxi. Outras mudanças importantes foram medidas em relação a concentrações plasmáticas de metabólitos relacionados ao triptofano e à aminoácidos, e componentes do ciclo energético do ácido tricarbóxico (TCA), incluindo malato, aconitato, citrato, fumarato, succinato e alfa-cetoglutarato

(KNAB et al., 2013; LEWIS et al., 2010; MANAF et al., 2018; MESSIER et al., 2017; NIEMAN et al., 2013b; NIEMAN; GILLITT; SHA, 2018; STANDER et al., 2018).

A maioria das alterações nos metabólitos plasmáticos após exercícios intensos e prolongados atingem seu ponto mais baixo em poucas horas. As alterações plasmáticas de muitos desses metabólitos ainda são aparentes, mas em níveis consideravelmente menores, após um dia de recuperação (LEHMANN et al., 2010; NIEMAN et al., 2013b, 2014a, 2014b, 2015; RA et al., 2014). A grande e variada resposta dos metabólitos à alta intensidade de exercício são correspondentes ao estresse fisiológico e às reservas diminuídas de glicogênio que ocorrem no participante (HOWE et al., 2018; LEHMANN et al., 2010; NIEMAN; GILLITT; SHA, 2018; RA et al., 2014).

Um número crescente de estudos vem utilizando a metabolômica para medir a influência de várias intervenções nutricionais nas perturbações metabólicas durante a recuperação após exercícios de alta intensidade e longa duração (KNAB et al., 2013; NIEMAN et al., 2013a, 2014a, 2015, 2018; NIEMAN; GILLITT; SHA, 2018). A metabolômica pode ser considerada como método ideal para medir o impacto de intervenções nutricionais durante o exercício agudo, pois permite medir e identificar simultaneamente as mudanças em centenas de metabólitos de diversas vias. Dados de estudos recentes indicam que carboidratos de bebidas açucaradas e frutas, como bananas, e flavonóides de fontes de alimentos e bebidas, como mirtilos e chá verde, têm um grande efeito na resposta do metaboloma humano ao exercício de alta intensidade (KNAB et al., 2013; NIEMAN et al., 2012, 2013a, 2015, 2018; NIEMAN; MITMESSER, 2017).

Relativamente poucos estudos têm investigado as alterações metabólicas induzidas pelo exercício agudo com durações menores (<60 min) e volumes de exercício mais baixos (DANAHER et al., 2015; PEAKE et al., 2014). Metade desses estudos realizou metabolômica usando plataformas analíticas GC-MS ou RMN, limitando o número de metabólitos identificados e a utilidade desses dados. Como esperado, as mudanças pós-exercício à nível de metabólitos plasmáticos são reduzidas em comparação à alta intensidade e volume de exercício, devido a uma moderada demanda das vias subjacentes de carboidratos e substratos lipídicos.

Mais estudos transversais são necessários para comparar os níveis de metabólitos do plasma e da urina entre indivíduos sedentários e fisicamente ativos e

atletas de diferentes esportes. Esses estudos podem fornecer informações importantes para futuros ensaios clínicos randomizados utilizando protocolos de treinamento. Um estudo utilizando um desenho transversal mostrou algumas diferenças de metabólitos entre grupos atléticos de potência e resistência (AL-KHELAIIFI et al., 2018). No entanto, os atletas não foram testados ao mesmo tempo ou em estados de repouso semelhantes, dificultando dessa forma a retirada de conclusões definitivas.

Poucos estudos randomizados utilizando protocolos de treinamento físico foram realizados para investigar as potenciais adaptações no metaboloma humano (NEAL et al., 2013; PECHLIVANIS et al., 2013). Esses dois estudos empregaram diferentes protocolos de treinamento e desenhos de estudos, e realizaram metabolômica usando a RMN, limitando a utilidade desses dados. Futuros estudos randomizados de treinamento físico com base em metabolômica, especialmente quando combinados com resultados genômicos e proteômicos, melhorarão a compreensão científica da resposta do sistema humano à diferentes intensidades e volumes de exercício (SPARKS, 2017).

6 CONCLUSÕES E DIREÇÕES FUTURAS

A primeira década de estudos com exercícios utilizando a metabolômica, especialmente aqueles que utilizam plataformas analíticas sensíveis como a LC-MS/MS, com grandes bibliotecas de padrões químicos e suporte rigoroso de bioinformática, forneceu informações importantes sobre a biologia de sistemas relacionadas aos mecanismos bioquímicos envolvidos nos efeitos induzidos pelo exercício no metabolismo (HEANEY; DEIGHTON; SUZUKI, 2017; LEWIS et al., 2010). Essa área de conhecimento científico ainda está emergindo e ainda há muito a ser descoberto, especialmente nas áreas envolvendo respostas agudas e crônicas ao exercício físico utilizando intensidades moderadas. A sensibilidade das plataformas analíticas continuará a melhorar, expandindo o número de metabólitos de baixo peso molecular que podem ser detectados. Essas melhorias na tecnologia, combinadas com controle de qualidade aprimorado, suporte da bioinformática, expansão de padrões bioquímicos e ênfase em estudos com grandes grupos de ambos os sexos, melhorarão a identificação e quantificação de metabólitos atualmente conhecidos e desconhecidos em uma variedade de matrizes humanas. É necessário dar mais ênfase à influência da redução do nível de atividade física e da inatividade física nas alterações dos

metabólitos. Essas melhorias nos desenhos e nas metodologias dos estudos ampliarão nossa compreensão a respeito da influência do exercício agudo e crônico no metaboloma humano. Um número crescente de estudos, incluindo o projeto dos Institutos Nacionais de Saúde, 'Molecular Transducers of Physical Activity in Humans', combinarão metabolômica com genética, epigenética, lipidômica e proteômica para examinar todos os aspectos das respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares a intervenções de treinamento utilizando tanto exercícios aeróbicos como também resistidos (SPARKS, 2017).

Agradecimentos

O estudo teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, número: 2016/222157), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, auxílio: 001, Bolsa Doutorado Sanduíche no exterior (Processo: nº 88881.189063/2018-01 e bolsa demanda social (Processo nº 88887.336068/2019-00)). Os órgãos de financiamento não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Parte II - ESTUDO 2 (versão em português com detalhamentos e inclusão de ilustrações)

“Influência crônica do treinamento muscular inspiratório de diferentes intensidades no metaboloma sérico humano”¹

Camila A. Sakaguchi¹, David C. Nieman², Eto F. Signini¹, Raphael M. de Abreu¹, Claudio D. Silva¹, Patrícia Rehdher-Santos¹, Maria G. A. Carosio³, Roberta M. Maria³, Carla C. Dato⁴, Heloisa S. S. de Araújo⁵, Tiago Venâncio³, Antônio G. Ferreira³, Aparecida M. Catai¹

¹Artigo publicado na revista Metabolites (ISSN: 2218-1989) doi:10.3390/metabo10020078

Recebido: 10 de janeiro de 2020; Aceito: 6 de fevereiro de 2020; Publicado: 21 de fevereiro de 2020.

Current Impact Factor: 3.303

JCR category rank: 126/298 (Q2) in 'Biochemistry & Molecular Biology'

1 INTRODUÇÃO

Durante a última década, estudos metabolômicos forneceram novas concepções a respeito da influência do exercício nas respostas e adaptações metabólicas, fisiológicas e relacionadas à saúde (NIEMAN; WENTZ, 2019; SAKAGUCHI et al., 2019). A metabolômica é potencialmente uma ferramenta importante para monitorar atletas durante diferentes fases do treinamento físico (SAN-MILLÁN, 2019). Uma recente revisão sistemática mostrou que a maioria dos estudos utilizando a metabolômica têm se concentrado nas respostas metabólicas agudas ao exercício intenso e prolongado, e que mais informações sobre os efeitos crônicos do treinamento físico são necessárias (SAKAGUCHI et al., 2019).

O treinamento muscular inspiratório (TMI) é um potencial método complementar para melhorar o desempenho esportivo (HAJGHANBARI et al., 2013; ILLI et al., 2012; SHEEL, 2002). Nesse método, uma carga adicional é aplicada ao diafragma e aos músculos inspiratórios acessórios com o objetivo de aumentar a força e a resistência dessa musculatura (CAVALCANTE SILVA; HALL; MAIOR, 2019). Evidências apontam que o TMI possui importante papel na atenuação do metaborreflexo (SHEEL, 2002), no qual o acúmulo de lactato e outros metabólitos nos músculos respiratórios (SPENGLER et al., 1999) desencadeia uma resposta simpática, causando vasoconstrição nos membros em atividade, e conseqüentemente, a interrupção precoce do exercício (GEARY et al., 2019; ILLI et al., 2012; MARTINS DE ABREU et al., 2019). Desse modo, o TMI atenuaria a sensação de dispnéia, o acúmulo de lactato e a fadiga periférica, conseqüentemente melhorando o desempenho do exercício (CAVALCANTE SILVA; HALL; MAIOR, 2019; HAJGHANBARI et al., 2013; ILLI et al., 2012).

Os benefícios fisiológicos do IMT no desempenho esportivo têm sido descritos em diversos estudos (ARCHIZA et al., 2018; CAVALCANTE SILVA; HALL; MAIOR, 2019; HAJGHANBARI et al., 2013; ILLI et al., 2012), porém, os mecanismos metabólicos responsáveis pelas modificações decorrentes desta modalidade de treino permanecem incertos.

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do TMI realizado em três intensidades (baixa, moderada e alta) no metaboloma sérico de ciclistas recreacionais saudáveis do sexo masculino. A metabolômica de abordagem *untarget* foi realizada

usando espectroscopia de RMN de ^1H associada à bioinformática avançada. Nossa hipótese foi que 11 semanas de TMI em intensidades moderadas e altas resultariam em alterações crônicas nos metabólitos séricos, que contribuiriam para o entendimento científico sobre mecanismos metabólicos atuantes do método.

3 MÉTODOS

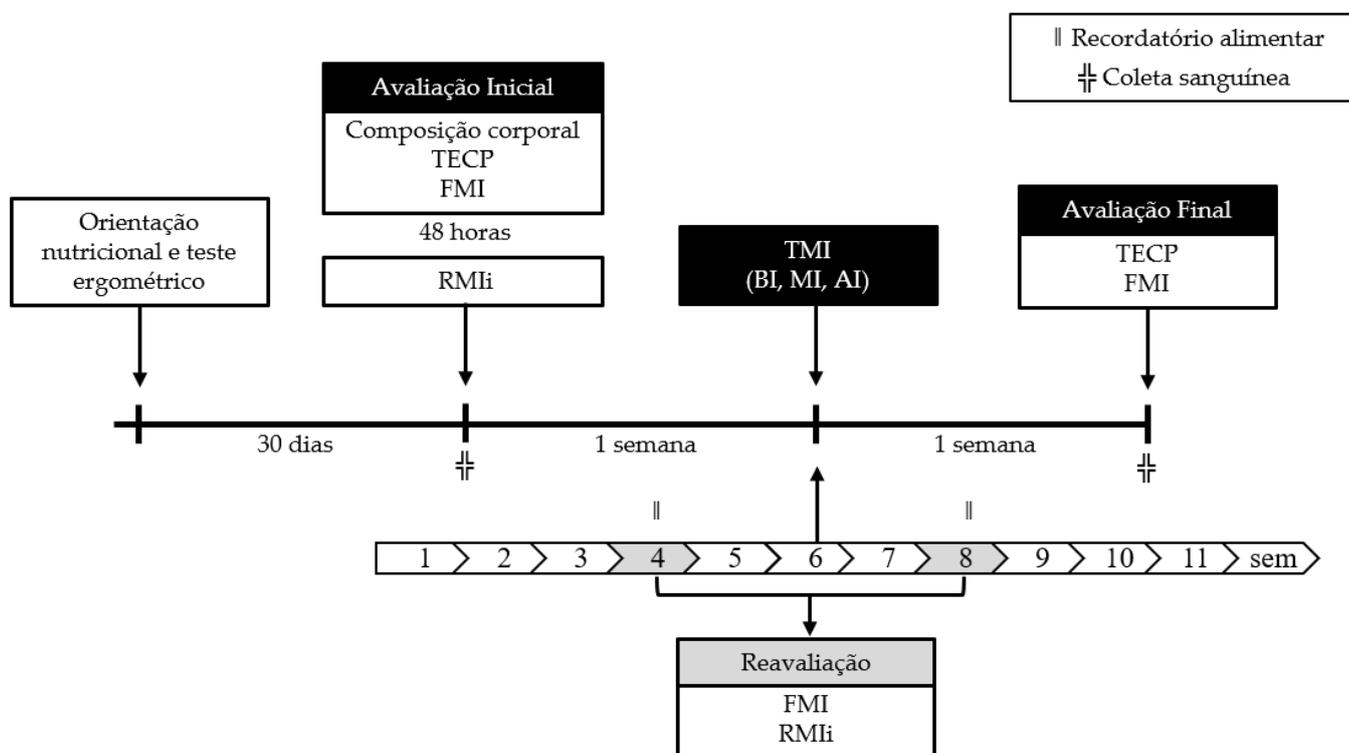
3.1 Participantes

Os participantes foram recrutados por meio de divulgação na UFSCar, mídia local, redes sociais e grupos de ciclismo da cidade de São Carlos e região. Os participantes incluíram 34 ciclistas recreacionais aparentemente saudáveis do sexo masculino. Os critérios de inclusão compreenderam: homens de 20 a 40 anos, não fumantes, índice de massa corporal (IMC) menor que 30 Kg/m², regularmente envolvidos no treinamento de ciclismo (qualquer modalidade, porém com prática mínima de 150 minutos semanais por pelo menos 6 meses ininterruptos de prática previamente ao protocolo experimental). Os participantes assinaram voluntariamente o termo de consentimento livre e esclarecido, e todos os procedimentos do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) sob o parecer de nº 2.303.309, e registrados no ClinicalTrials.gov (protocolo número NCT02984189).

3.2 Desenho do Estudo

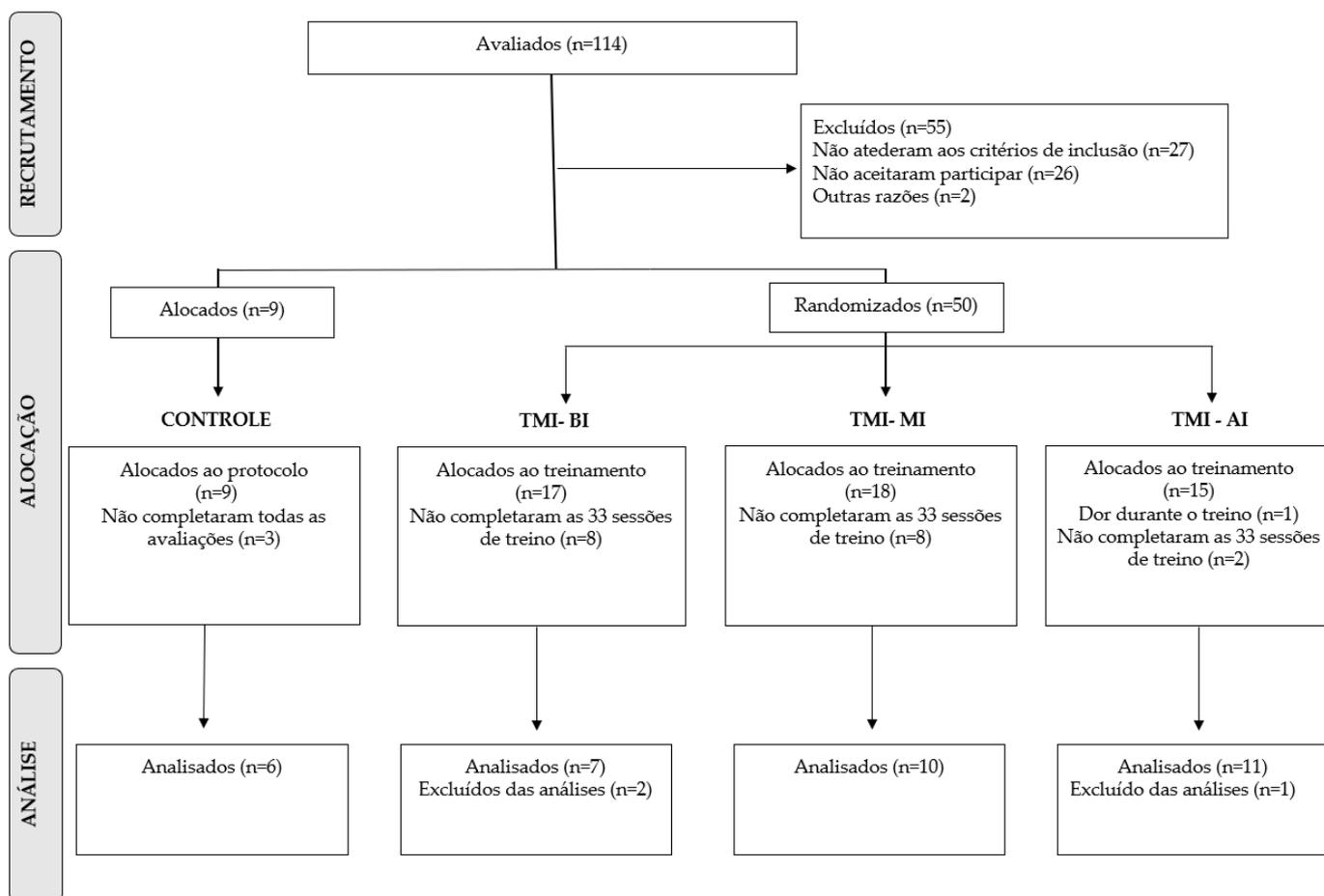
Estudo randomizado, paralelo, longitudinal. O desenho metodológico seguiu as orientações do *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) (SCHULZ et al., 2011). A descrição completa do protocolo foi relatada anteriormente (REHDER-SANTOS et al., 2019) e é apresentada graficamente na Figura 1. Os participantes do TMI foram alocados aleatoriamente de forma estratificada (KERNAN, 1999), em três grupos: grupo de baixa intensidade ou *sham* (BI, n = 7), moderada intensidade (MI, n = 10) e alta intensidade (AI, n = 11), considerando-se pareamento da classificação funcional aeróbia e faixa etária (subdividida em décadas – 20 a 30 e 31 a 40 anos), e para a alocação dos participantes foram utilizados envelopes pardos. O grupo de BI realizou o TMI com resistência de 6 cmH₂O, o grupo de IM foi treinado com uma

intensidade representando 60% da pressão inspiratória máxima ($PI_{M\acute{A}X}$) e o de AI realizou com uma intensidade representando $\approx 85-90\%$ da $PI_{M\acute{A}X}$ (REHDER-SANTOS et al., 2019). Um grupo de participantes que atenderam à todos os critérios de inclusão, mas que não realizou o TMI, foi submetido à todas as avaliações e acompanhamento, e foi incluído como controle (GC, N = 6). Conforme resumido na Figura 2, os dados que foram analisados pertenceram aos sujeitos (N = 34) que completaram todos os aspectos do estudo. A avaliação da capacidade funcional e força muscular inspiratória, bem como a coleta das amostras de sangue foram realizadas ao início e final do protocolo experimental, na 1ª e na 13ª semana.



TECP, teste de exercício cardiopulmonar; FMI, teste de força muscular inspiratória; RMIi, teste de resistência muscular inspiratória incremental; TMI, treinamento muscular inspiratório; BI, baixa intensidade; MI, moderada intensidade; AI, alta intensidade.

Figura 1. Desenho do protocolo do estudo. Após um mês pós-orientações da dieta nutricional, os participantes foram submetidos a 13 semanas de protocolo. Os grupos de treinamento realizaram o treinamento muscular inspiratório por 11 semanas. O grupo controle participou de todas as avaliações e procedimentos, incluindo os testes de reavaliação e os registros alimentares.



TMI- BI, treinamento muscular inspiratório com baixa intensidade; TMI - MI, treinamento muscular inspiratório com intensidade moderada; TMI - AI, treinamento muscular inspiratório com alta intensidade.

Figura 2. Diagrama de fluxo dos participantes.

3.3 Seção Experimental

Todos os procedimentos dos testes experimentais e TMI foram realizados no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular - Núcleo de Pesquisas em Exercício Físico (NUPEF) do Departamento de Fisioterapia (DFisio) da Universidade Federal de São Carlos. As avaliações clínicas e ergometria foram realizadas na área de Fisioterapia em Cardiologia da Unidade Saúde Escola (USE-UFSCar). O processamento e a análise de dados metabólicos foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.3.1 Avaliações clínicas, nutricionais e caracterização da amostra

Orientações nutricionais

Um mês antes das avaliações iniciais os participantes receberam uma lista de alimentos individualizada com orientações alimentares fornecidas por uma nutricionista, e o plano alimentar foi seguido pelos participantes para minimizar os possíveis efeitos da variação da ingestão de alimentos no metaboloma.

Composição corporal

A avaliação da composição corporal para caracterização dos participantes foi realizada por meio da absorciometria por dupla emissão de raios X [Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA)] (Discovery DXA System, Hologic, USA), e foi verificada a quantidade e distribuição normal de massa óssea, massa gordurosa, gordura visceral e massa muscular

Teste de exercício cardiopulmonar (TECP)

A capacidade aeróbia funcional dos participantes [consumo de oxigênio pico (VO_2 PICO)] (BALADY et al., 2010) foi avaliada por meio do TECP utilizando o carro metabólico ULTIMA MedGraphics (St. Paul, Minnesota, EUA). O teste foi realizado em um cicloergômetro de frenagem eletromagnética por meio de um protocolo incremental do tipo rampa (CORIVAL V3, Lode BV, Holanda). O protocolo consistiu em: repouso de 1 minuto; seguido de aquecimento com carga livre durante 3 min; incremento de carga por minuto, segundo potência determinada para cada participante (entre 25 a 45 W/min); recuperação ativa de 6 minutos após a interrupção do incremento; e recuperação passiva de 1 minuto. A potência foi calculada de acordo com os valores estabelecidos pela fórmula descrita por Wasserman et al. (2012) e adaptada por um avaliador experiente de acordo com o condicionamento físico de cada participante.

Os participantes foram orientados a manter a cadência de 60 - 80 rotações por minuto (rpm) durante o protocolo, e o teste teve duração entre 8 e 12 min (WASSERMAN et al., 2011). Os critérios para interrupção do teste estão descritos por Balady et al. (2010). O maior valor do VO_2 obtido nos últimos 30 segundos do TECP foi considerado o VO_2 pico (BALADY et al., 2010). A classificação funcional aeróbia foi realizada segundo as diretrizes da American Heart Association (AHA) (1972).

Teste de força muscular inspiratória

A força muscular inspiratória (FMI) foi medida durante manobras de esforço inspiratório máximo, com o participante em repouso, na posição sentada, utilizando um

manovacuômetro digital (MVD-300, 179 Globalmed, Porto Alegre, Brasil), e um clipe nasal, de acordo com a Diretriz Brasileira para mensuração das pressões respiratórias estáticas máximas (SOUZA, 2002). Essa medida foi efetuada sempre pelo mesmo avaliador.

A $PI_{MÁX}$ foi determinada durante o esforço inspiratório máximo, a partir do volume residual. Estas manobras foram realizadas contra um tubo com extremidade distal ocluída e foi utilizada uma peça bucal com orifício de 2 mm (SOUZA, 2002). Os valores das pressões respiratórias máximas foram aqueles observados no primeiro segundo após o pico de pressão. Foram realizadas no mínimo 3 manobras, com intervalo de 30s entre cada manobra (ROMER; MCCONNELL, 2004), sendo considerados os maiores valores reprodutíveis (diferença <10%) encontrados em pelo menos três manobras. Os valores de normalidade foram baseados na equação de regressão proposta por Neder et al. (2003) para a população brasileira. Para cada parâmetro, o limite inferior da normalidade foi obtido subtraindo-se do valor previsto pela equação o produto (1,645 x erro padrão da estimativa). Foi considerada fraqueza muscular respiratória, valores de pressões estáticas <60% do predito (HAUTMANN et al., 2000; MILLER, 2005).

Teste de resistência muscular inspiratória incremental

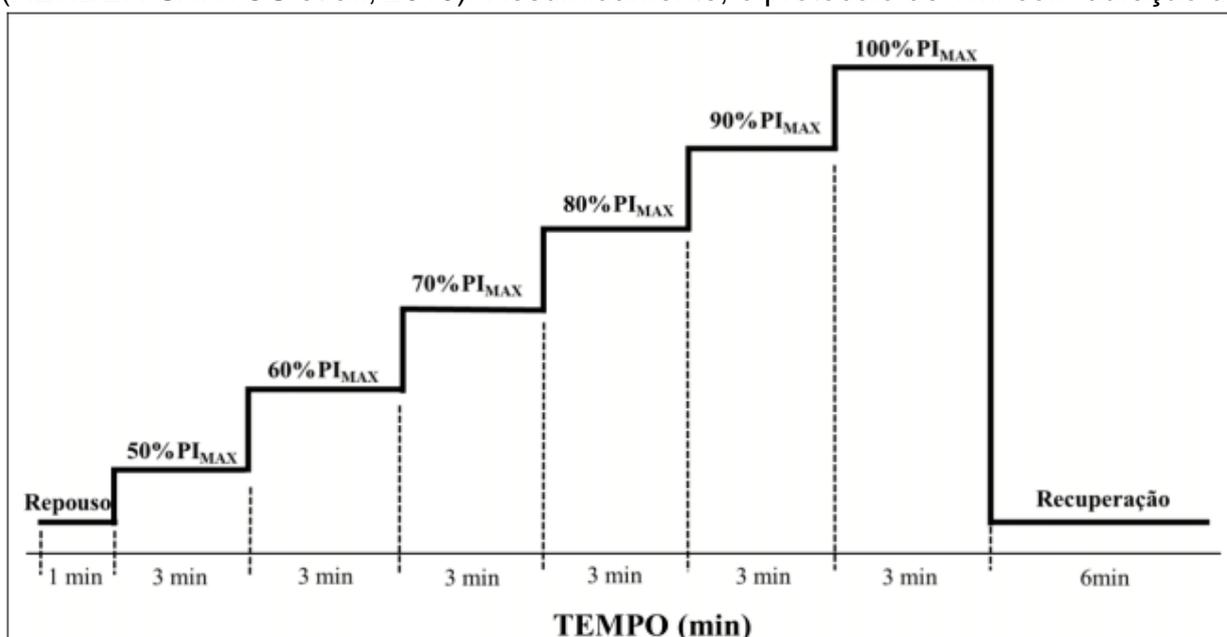
O teste de resistência muscular inspiratória foi realizado utilizando um resistor inspiratório linear (PowerBreathe, Ironman K5, HaB Ltd, Reino Unido), e um protocolo incremental com cargas de 50 a 100% da $PI_{MÁX}$, sendo acrescentados 10% da $PI_{MÁX}$ a cada 3 min (Figura 3). As respirações foram controladas por comando verbal, sempre pelo mesmo avaliador, e a frequência respiratória (FR) mantida em 12 incursões respiratórias por minuto. O teste podia progredir somente até atingir 100% da $PI_{MÁX}$. Neste caso, se o participante fosse capaz de gerar um fluxo de ar suficiente para disparar o equipamento mais de uma vez nesta intensidade, a medida da $PI_{MÁX}$ era refeita, e o teste de RMI repetido após 15 minutos. Os critérios de interrupção foram: incapacidade de disparar a carga nas primeiras 3 tentativas, incapacidade de manter a FR em 12 respirações/minuto por pelo menos 1 minuto, esforço respiratório excessivo referido pelo participante ($BORG/CR10 \geq 7$) (BORG, 1982) e solicitação de interrupção pelo participante. A maior porcentagem da $PI_{MÁX}$ que o participante foi capaz manter por pelo menos 1 minuto ($PTh_{MÁX}$) foi considerada como a carga de resistência muscular

inspiratória (DALL'AGO et al., 2006; NEVES et al., 2014, 2012). O valor encontrado (P_{ThMAX}) foi utilizado para a determinação da carga de treinamento do grupo AI, bem como o seu reajuste ao longo as semanas de treinamento. A descrição completa do protocolo de determinação das cargas e ajuste encontra-se no estudo de Rehder-Santos et al (2019).

Figura 3. Ilustração do protocolo do teste de resistência muscular respiratória.

3.3.2 Treinamento Muscular Inspiratório (TMI)

Mais detalhes do protocolo de treinamento foram publicados anteriormente (REHDER-SANTOS et al., 2019). Resumidamente, o protocolo de TMI com duração de



11 semanas consistiu em três sessões presenciais de 1 hora por semana, organizadas da seguinte forma: 5 minutos de aquecimento usando 50% da carga de treinamento e, em seguida, 3 séries de 15 minutos cada, intervalo de 1 minuto entre as séries (Figura 4). O TMI foi realizado utilizando um resistor inspiratório linear (PowerBreathe, Ironman K5, HaB Ltd, Reino Unido) (Figura 5). Exceto para o grupo BI, as cargas foram ajustadas de acordo com os testes de reavaliação após 4 e 8 semanas de treinamento.

Os registros alimentares de 3 dias foram analisados pela nutricionista por meio de um programa computadorizado de avaliação dietética de consumo calórico e macronutrientes (revolução Avanutri®; Avanutri Equipamentos de Avaliação Ltda., Três

Rios, RJ - Brasil). A variação no balanço de macronutrientes foi limitada a 10% entre os registros.

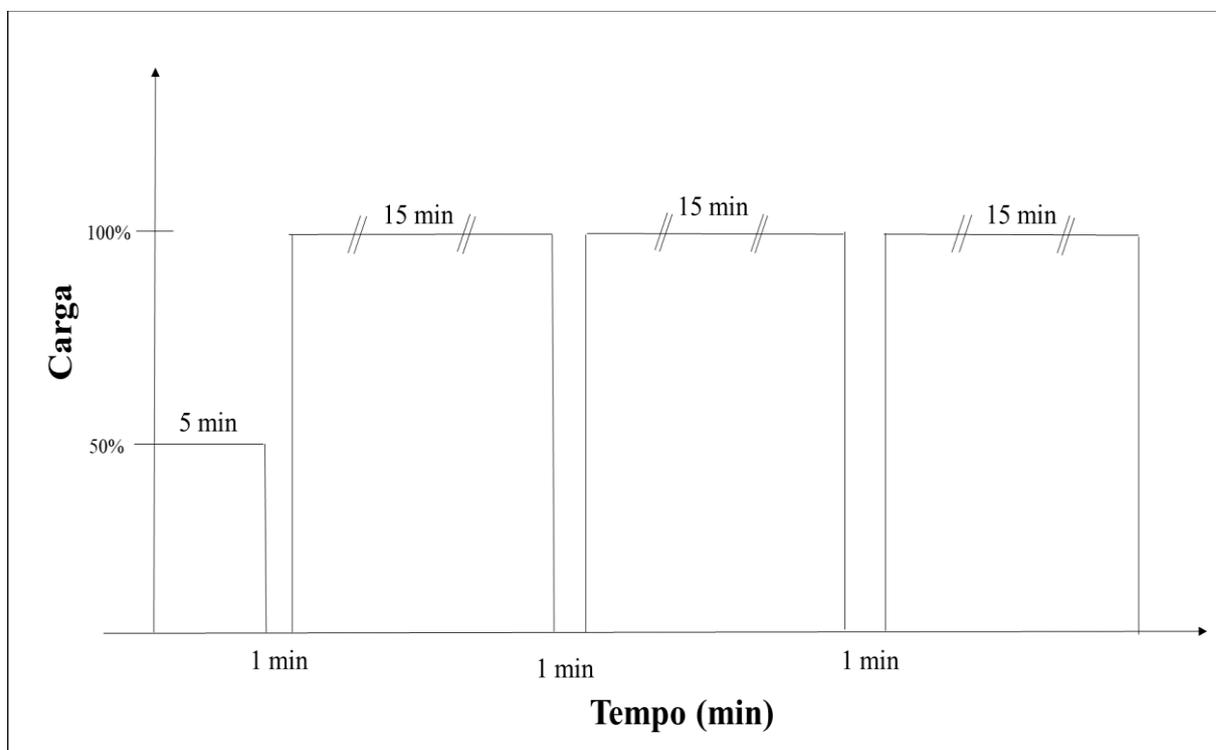


Figura 4. Ilustração do protocolo de uma sessão de treinamento muscular inspiratório.

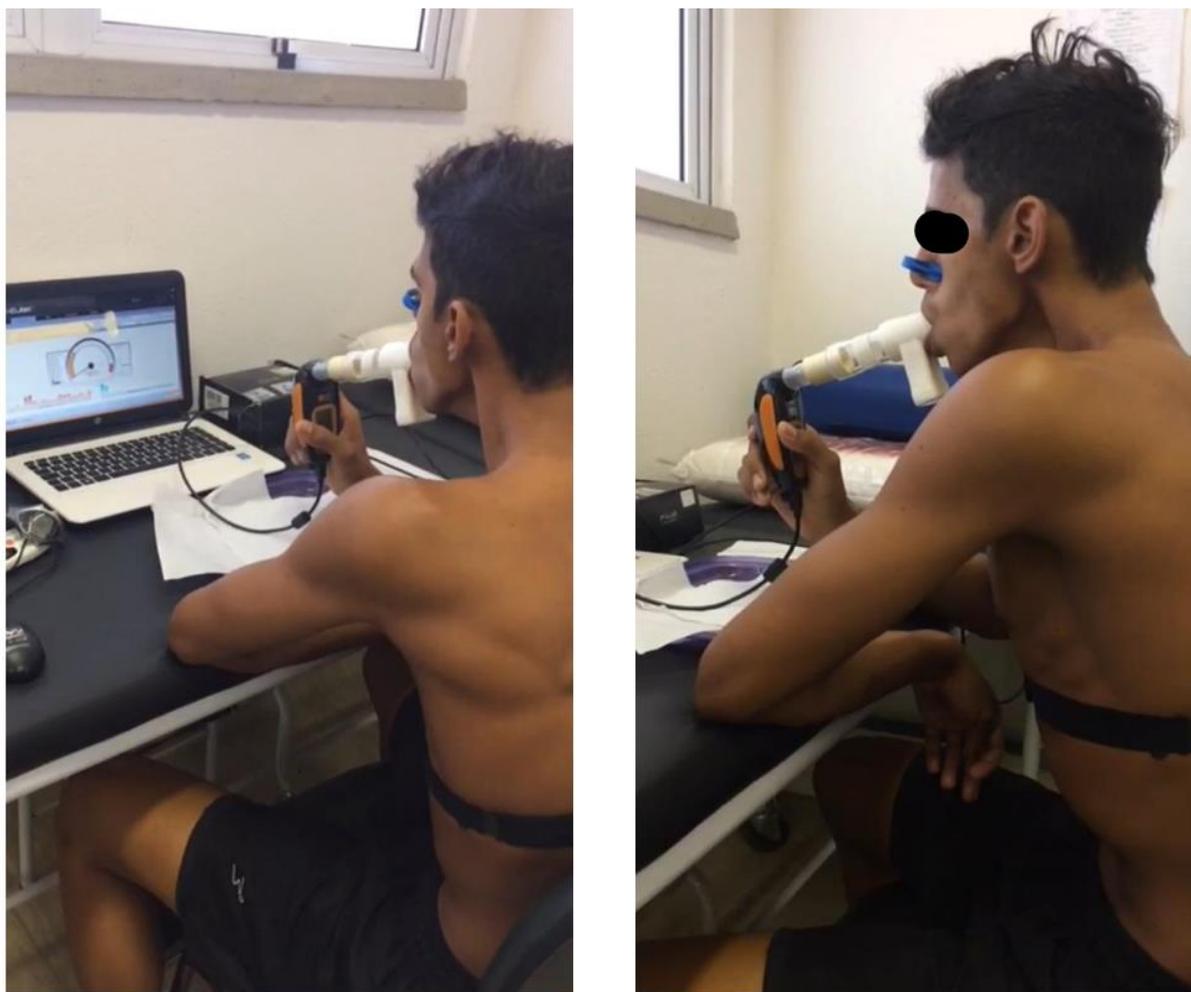


Figura 5. Voluntário durante uma sessão de treinamento muscular inspiratório.

3.4 Coleta, armazenamento e preparo de amostras para análise de RMN

Os participantes compareceram em jejum de até 12h ao UNILAB (Laboratório de Análises Clínicas da UNIMED de São Carlos) e as amostras de sangue foram coletadas por venopunção da veia antecubital com os indivíduos na posição sentada. As amostras entregues aos pesquisadores em tubos (S-Monovette 4.9 ml Sarstedt - Germany), foram centrifugadas à 3000 rpm, durante 10 minutos, e o soro foi extraído e fracionado em *ependorfs*. Os *ependorfs* foram armazenados em *ultrafreezer* à -80°C para minimizar a degradação dos componentes da amostra (LEWIS et al., 2010) até a posterior análise pela RMN ^1H .

As amostras foram descongeladas imediatamente antes da análise por meio da ^1H RMN e as proteínas foram precipitadas com 600 μL de composto de referência interno para RMN, TMSP-d₄, a 0,002% (m / v) em metanol-d₄, homogeneizadas e

centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de RMN de 5 mm e inseridos no espectrômetro de RMN (Figura 5).

3.5 Aquisição de dados por RMN e identificação de metabólitos

Os procedimentos metabolômicos foram realizados de acordo com protocolos previamente publicados (BECKONERT et al., 2007). Cada espectro foi adquirido usando um espectrômetro Bruker Avance III 600 MHz (Bruker Biospin, Alemanha) (operado a 600,08 MHz por ^1H) (Figura 6) equipado com uma sonda criogênica de 5 mm e operado a uma temperatura de 23 °C. Os espectros foram faseados manualmente e corrigidos na linha de base usando o software Bruker Topspin 3.5 (Bruker Biospin, Alemanha).



Figura 6. Tubo de RMN ^1H e espectrômetro de ressonância magnética nuclear.

As medições unidimensionais (1D) de ^1H RMN foram realizadas usando a sequência de pulso noesypr1d (padrão Bruker), com pré-supressão do sinal da água. Foram realizadas 64 varreduras (ns) em pontos de dados de 128 k em uma largura espectral de 15,0182 ppm, usando um atraso de relaxamento de 1s, um tempo de aquisição de 7,27 s. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional

(RMN 2D) foi realizada e incluiu espectroscopia de correlação (COZY) e espectroscopia de correlação quântica única heteronuclear (HSQC) para confirmar a atribuição de picos e a identificação de metabólitos. Depois que todos os espectros foram adquiridos, o ajuste de fase, a correção da linha de base, a remoção do sinal da água (4,6-5,1 ppm), a calibração espectral e a quantificação foram conduzidos seguindo os parâmetros para criação de perfil, conforme definido no software Chenomx NMR Suite 8.31 (Chenomx Inc., Edmonton, Canadá). Os metabólitos foram identificados usando o banco de dados da Internet (*Human Metabolome Database*) e também o software Chenomx NMR Suite, e os resultados foram comparados com outras publicações (NEAL et al., 2013; PECHLIVANIS et al., 2013).

3.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm DP. Os dados da avaliação inicial de caracterização dos participantes, registro alimentar e deltas (pós-pré TMI) dos valores de VO_2 e $PI_{MÁX}$, foram comparados entre os grupos (GC, BI, MI, AI) usando a ANOVA *one-way* e teste de Tukey. A significância estatística foi aceita quando $p \leq 0,05$. Os dados de metabolômica foram analisados usando o modelo linear geral (GLM) e ANOVA de medidas repetidas de 4 (grupo) x 2 (tempo) (IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 24.0, IBM Corp, Armonk, NY, EUA). Os dados espectrais foram analisados por estatística multivariada usando o software Amix® v 3.9.14 (Bruker BioSpin, Alemanha). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada usando dados pré e pós-TMI para todos os quatro grupos (Controle, BI, MI, AI). A análise por componentes principais (PCA) considerou 179 espectros de RMN, 88 variáveis *buckets* e 4 componentes principais. A variância total explicada foi de 54,70% para PC1vsPC2 e 95% de nível de confiança. O escalonamento de linhas na matriz foi relacionado à intensidade total e as colunas para a unidade de variância.

4 RESULTADOS

Foram incluídos na análise 34 ciclistas recreacionais aparentemente saudáveis (idades de 20 a 40 anos) que aderiram com sucesso a todos os aspectos do desenho do estudo. As características dos participantes ao início do estudo estão resumidas na Tabela 1. Os participantes não apresentaram diferença significativa em idade, estatura,

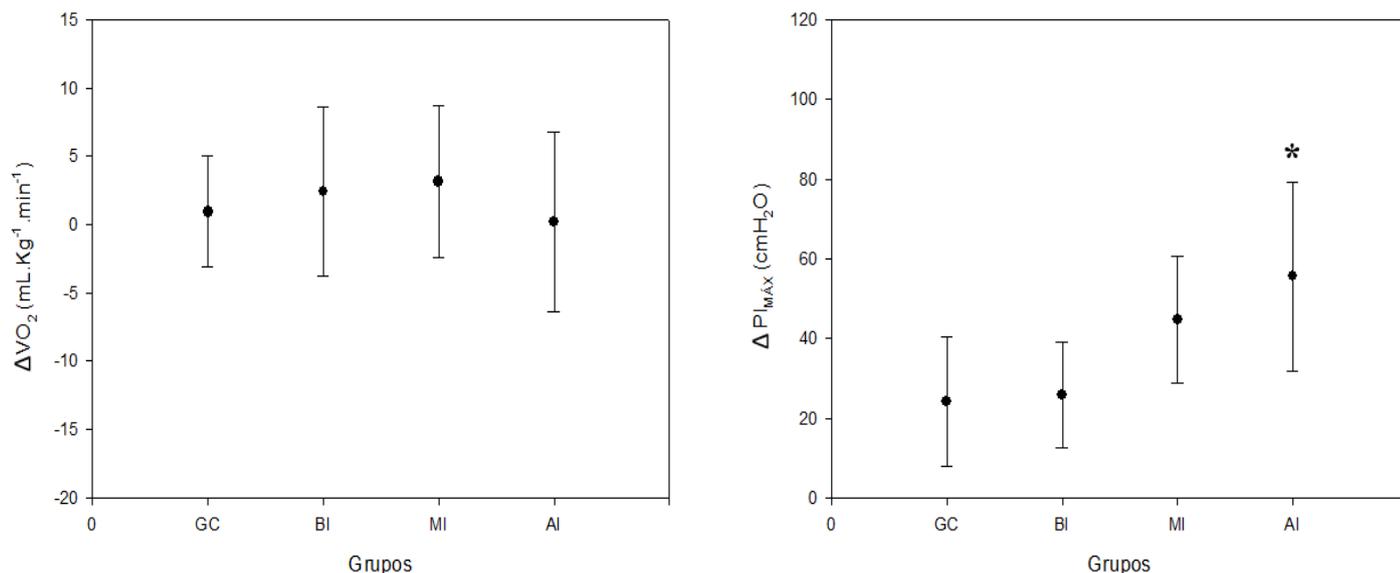
massa corporal, IMC, percentual de gordura corporal, percentual de massa magra corporal, força muscular inspiratória e VO_2 pico. Os registros alimentares não revelaram diferença ao longo do tempo na ingestão calórica, de macronutrientes e micronutrientes durante o estudo.

Tabela 1. Características dos participantes do estudo (média \pm DP).

Variável	GC (N = 6)	BI (N = 7)	MI (N = 10)	AI (N = 11)	valor de p
Idade (anos)	30.8 \pm 5.6	29.6 \pm 4.9	31.9 \pm 7.1	30.3 \pm 7.2	0.896
Estatura (m)	1.74 \pm 0.12	1.79 \pm 0.03	1.75 \pm 0.05	1.77 \pm 0.06	0.580
Massa corporal (kg)	75.9 \pm 18.0	75.9 \pm 12.4	73.8 \pm 8.2	78.5 \pm 10.2	0.838
IMC (kg/m ²)	24.9 \pm 4.3	23.8 \pm 4.4	23.9 \pm 1.9	25.1 \pm 3.4	0.804
Gordura corporal (%)	22.0 \pm 3.27	21.6 \pm 6.31	21.1 \pm 3.4	22.1 \pm 4.72	0.958
Massa magra corporal (%)	75.1 \pm 3.52	74.9 \pm 5.79	75.8 \pm 3.25	74.8 \pm 4.27	0.946
VO_2 pico (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	52.6 \pm 15.2	40.9 \pm 8.77	48.9 \pm 9.60	48.8 \pm 12.7	0.321
PI _{máx} (cmH ₂ O)	151 \pm 11.4	150 \pm 10.4	159 \pm 24.8	145 \pm 13.7	0.303
%predicted	116 \pm 10	114 \pm 6	123 \pm 20	111 \pm 13	0.480

BI, baixa intensidade; MI, moderada intensidade; AI, alta intensidade; IMC, índice de massa corporal; VO_2 pico, consumo de oxigênio no momento pico; PI_{máx}, pressão inspiratória máxima.

O VO_2 pico aumentou de maneira semelhante entre os grupos de TMI (BI, MI, AI) e controle, após 11 semanas de treinamento, e o delta (pós-pré treinamento) não apresentou diferença entre os grupos (2,43 \pm 6,19; 3,18 \pm 5,54; 0,19 \pm 6,56 mL.min⁻¹.kg⁻¹) (p = 0,520), ou em relação ao controle (0,950 \pm 4.06, p=0,665). O TMI melhorou o valor delta da força muscular inspiratória (PI_{máx}) (pós-pré treinamento) nos grupos BI, MI e AI (25,9 \pm 13,3; 44,7 \pm 16,0; 55,6 \pm 23,8 cmH₂O), e no grupo controle (24.2 \pm 16.2), mas com diferença significativa no grupo AI quando comparado ao de BI (p = 0,012), e AI quando comparado ao GC (p=0,009) (Figura 7).



GC: grupo controle; BI, baixa intensidade; MI, moderada intensidade; AI, alta intensidade; IMC, índice de massa corporal; VO₂ pico, consumo de oxigênio no momento pico; PImáx, pressão inspiratória máxima.

Figura 7. Ilustração dos deltas (pós-pré TMI) dos valores de VO₂ e PIMÁX dos grupos GC, BI, MI, AI.

Um total de 22 metabólitos (aminoácidos, ácidos graxos, intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) foram identificados com a espectroscopia de RMN de ¹H (consulte a Tabela 2 para deslocamentos químicos). A ANOVA de medidas repetidas indicou que não houve efeitos significativos de interação grupo x tempo em nenhum dos 22 metabólitos (Tabela 2). Esses achados foram confirmados pela PCA. Os resultados estatísticos multivariados estão representados na Figura 8. Nenhum modelo válido foi encontrado, indicando que não há separação significativa nas alterações gerais dos metabólitos entre os quatro grupos do estudo (GC, BI, MI, AI) utilizando este método de análise.

Tabela 2. Metabólitos séricos humanos identificados pela espectroscopia de RMN de ^1H e deslocamentos químicos nos grupos Controle, Baixa Intensidade, Intensidade Moderada e Alta Intensidade, pré- e pós-treinamento muscular inspiratório.

Metabólitos	Deslocamento químico (ppm)	Controle		Baixa Intensidade		Moderada Intensidade		Alta Intensidade		Valor de p: interação
		Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino	
Leucina	0.9	402 ± 41.8	425 ± 80.8	405 ± 52.1	400 ± 48.8	444 ± 73.0	388 ± 47.8	414 ± 46.1	428 ± 70.7	0.142
(CH ₂) _n AG	1.26	1536 ± 180	1621 ± 316	1549 ± 192	1545 ± 195	1743 ± 290	1522 ± 202	1613 ± 168	1682 ± 296	0.144
Lactato	1.33	572 ± 104	598 ± 99.8	631 ± 110	642 ± 115	617 ± 120	574 ± 110	595 ± 111	595 ± 115	0.817
Alanina	1.47	47.4 ± 9.40	48.4 ± 4.88	53.8 ± 4.52	48.2 ± 16.7	48.0 ± 9.86	50.4 ± 10.05	52.1 ± 12.2	54.4 ± 10.7	0.540
CH ₂ =CH ₂ -CO lipídios	1.6	251 ± 31.0	262 ± 46.8	249 ± 29.2	244 ± 34.5	267 ± 45.0	235 ± 31.5	254 ± 25.1	263 ± 41.7	0.216
Acetato	1.9	3.40 ± 1.09	4.44 ± 1.59	3.14 ± 1.04	3.08 ± 0.98	3.50 ± 1.20	3.13 ± 0.72	3.46 ± 1.66	2.79 ± 1.27	0.118
Acetona	2.2	8.97 ± 3.40	9.80 ± 2.97	9.14 ± 4.71	7.51 ± 1.81	28.1 ± 55.5	17.3 ± 31.5	16.6 ± 15.2	8.73 ± 5.07	0.924
Creatina	3.02	1.92 ± 0.90	1.97 ± 0.61	1.99 ± 0.69	1.91 ± 0.83	2.02 ± 0.50	2.18 ± 1.24	2.12 ± 0.89	2.68 ± 1.11	0.516
Creatinina	3.05	7.58 ± 2.06	7.27 ± 1.12	9.45 ± 1.93	8.05 ± 2.47	8.17 ± 1.31	7.76 ± 1.60	7.97 ± 0.99	8.22 ± 1.56	0.404
Arginina	3.19	64.4 ± 7.53	72.5 ± 11.8	66.4 ± 13.1	61.5 ± 11.6	64.6 ± 11.8	63.5 ± 14.5	68.0 ± 12.8	71.7 ± 13.3	0.264
Betaína	3.25	119 ± 20.8	137 ± 18.8	122 ± 24.3	120 ± 16.7	134 ± 23.3	121 ± 16.2	128 ± 22.9	129 ± 33.8	0.137
Glicina	3.7	63.2 ± 6.82	71.0 ± 11.7	67.8 ± 10.8	64.4 ± 11.8	64.7 ± 10.3	64.4 ± 13.6	68.4 ± 10.1	70.1 ± 12.0	0.378
Prolina	4.2	50.3 ± 8.10	54.5 ± 10.1	51.2 ± 5.79	51.0 ± 5.53	55.3 ± 9.81	51.1 ± 6.56	52.8 ± 5.96	55.2 ± 11.0	0.342
Glicose	4.5	82.5 ± 11.8	95.7 ± 16.4	88.3 ± 16.0	83.9 ± 15.8	83.7 ± 13.4	83.2 ± 17.8	91.0 ± 13.7	91.8 ± 16.0	0.270
Glicose	5.2	62.0 ± 8.02	70.1 ± 11.4	67.2 ± 10.6	63.7 ± 12.5	64.1 ± 10.3	63.6 ± 13.1	68.1 ± 10.2	70.0 ± 11.9	0.352
AG =CH	5.3	342 ± 36.3	366 ± 74.0	349 ± 52.6	346 ± 49.1	387 ± 63.9	349 ± 49.5	369 ± 36.5	377 ± 66.4	0.315
Uréia	5.7	141 ± 31.1	162 ± 50.6	152 ± 34.4	136 ± 45.1	143 ± 40.4	126 ± 19.8	154 ± 36.7	145 ± 53.0	0.375
Tirosina	6.8	4.46 ± 0.84	4.85 ± 0.62	4.67 ± 0.58	4.23 ± 1.09	4.46 ± 0.80	4.41 ± 0.88	4.56 ± 0.69	4.89 ± 0.95	0.417
Metil histidina	7.0	2.42 ± 0.25	2.54 ± 0.39	2.60 ± 0.22	2.02 ± 0.95	2.52 ± 0.35	2.43 ± 0.40	2.54 ± 0.36	2.51 ± 0.35	0.155
Fenilalanina	7.4	2.09 ± 0.38	2.32 ± 0.24	2.24 ± 0.24	2.01 ± 0.62	2.21 ± 0.35	2.11 ± 0.35	2.06 ± 0.31	2.24 ± 0.36	0.105
Histidina	7.7	2.55 ± 0.19	2.73 ± 0.42	2.77 ± 0.20	2.18 ± 1.06	2.70 ± 0.39	2.63 ± 0.44	2.72 ± 0.39	2.69 ± 0.34	0.156
Triptofano	7.72	2.10 ± 0.47	2.41 ± 0.28	2.37 ± 0.25	2.13 ± 0.50	2.13 ± 0.35	2.16 ± 0.31	2.13 ± 0.35	2.34 ± 0.34	0.056
Formato	8.5	0.31 ± 0.07	0.30 ± 0.04	0.27 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.06	0.30 ± 0.08	0.30 ± 0.07	0.26 ± 0.06	0.512

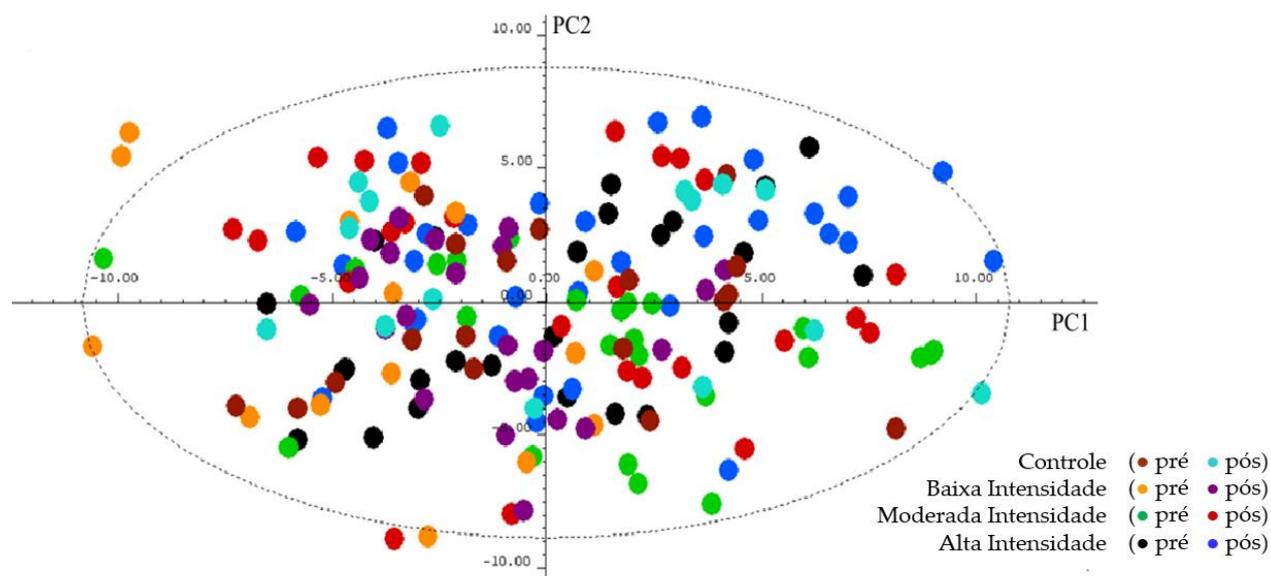


Figura 8. Gráficos de scores da PCA de todas as amostras de soro pré- e pós-protocolo. Cada cor representa um grupo e uma condição de treinamento diferente (descritos na legenda). Não é possível observar separação distinta entre os grupos de treinamento pré- e pós-protocolo.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este estudo paralelo, randomizado, de 11 semanas de treinamento investigou os efeitos do TMI em três intensidades diferentes no metaboloma sérico humano. A metabolômica *untarget* com RMN ^1H identificou 22 metabólitos, incluindo aminoácidos, lipídios e intermediários do CAT. Contrário à nossa hipótese, o TMI em intensidades moderadas e altas não alterou as concentrações de metabólitos plasmáticos em relação ao grupo controle. Esse achado foi confirmado pelo uso de procedimentos de bioinformática, incluindo a PCA (Figura 8), na qual não foi estabelecido um modelo válido que separasse os grupos nas condições pré e pós o período de treinamento de 11 semanas.

A magnitude das mudanças nos metabólitos plasmáticos está diretamente relacionada à intensidade e duração do exercício (GRAPOV et al., 2019; NEAL et al., 2013; SIOPI; MOUGIOS, 2018). Em revisão sistemática avaliando estudos com

exercícios agudos, prolongados e de alta intensidade foram observadas grandes alterações, induzidas pelo exercício, em um grande número de metabólitos incluindo lipídios, aminoácidos e componentes do ciclo CAT (SAKAGUCHI et al., 2019).

Poucos estudos investigaram os efeitos crônicos induzidos pelo treinamento físico no metaboloma (CASTRO et al., 2019; NEAL et al., 2013; PECHLIVANIS et al., 2013). Esses estudos incluíram protocolos de ciclismo e corrida de intensidade moderada e/ou alta, e as mudanças nos metabólitos foram limitadas e de baixa magnitude. Dessa forma, as alterações induzidas pelo treinamento físico nos metabólitos plasmáticos não são consensuais, mas foram relatadas como incluindo redução de ácido hipúrico, hipoxantina, piruvato, lactato, e aumento de creatinina, dimetilamina, 3-metilxantina, , intermediários do CAT e fosfolipídios (SAKAGUCHI et al., 2019).

No presente estudo, o TMI com duração de 11 semanas resultou em melhoras da força muscular inspiratória com respostas significativas principalmente do treinamento de alta intensidade comparativamente ao grupo de baixa intensidade e controle. No entanto, essa mudança não refletiu em alterações expressivas nos metabólitos plasmáticos, sendo esse último achado consistente com os poucos estudos que investigaram os efeitos crônicos de treinamentos físicos disponíveis na literatura. Este estudo concentrou-se em um número limitado de metabólitos das vias bioenergéticas (aminoácidos, lipídios, intermediários do CAT) (MOGHETTI et al., 2016). Estudos abrangentes de metabolômica usando LC-MS/MS talvez sejam necessários para melhor definir as possíveis alterações crônicas nos metabólitos relacionados a uma variedade de modalidades de treinamento físico, incluindo o TMI. É possível que TMI melhore o desempenho do exercício por intermédio de alterações nos metabólitos ligados ao metaborreflexo (HAJGHANBARI et al., 2013; ILLI et al., 2012; KARSTEN et al., 2018). E, esse efeito talvez possa ser capturado por meio de uma plataforma de análise metabolômica mais sensível do que a utilizada nesta investigação. Este estudo ainda possui como limitação o baixo número de participantes, em parte devido ao desafio quanto as exigências de tempo para o cumprimento do protocolo de treinamento (BRENNAN et al., 2018). Adicionalmente, o grupo controle não foi randomicamente selecionado, porém, os participantes deste grupo foram incluídos considerando o pareamento da idade e capacidade funcional dos participantes dos grupos treinados.

Na literatura e prática clínica, o TMI é frequentemente empregado na reabilitação de indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica, pós-infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca (DE ABREU et al., 2017; DELLWEG et al., 2017; GOSSELINK et al., 2011; HOSSEIN POUR et al., 2019; MORENO et al., 2017; NEVES et al., 2012). Nesses grupos, reporta-se que a aplicação do método está relacionada com o aumento da força muscular inspiratória, da capacidade ao exercício, da função cardíaca e autonômica e da qualidade de vida (WANG; YEH, 2019). Também em estudo com pacientes em hemodiálise foi observada melhora na função de biomarcadores inflamatórios, como a redução do fator de necrose tumoral (sTNFR2) e aumento de adiponectinas após 8 semanas de TMI (FIGUEIREDO et al., 2018). Face a essas considerações, é possível supor que estudos metabolômicos com TMI em populações doentes, devido à uma provável maior magnitude de resposta ao treinamento, possam mostrar alterações metabólicas relacionadas ao processo da doença e as melhorias na força muscular inspiratória e na capacidade ao exercício.

Em conclusão, os dados deste estudo utilizando a metabolômica indicaram que o TMI, em três níveis de intensidade, na população de ciclistas recreacionais, não alterou o metaboloma sérico em relação ao grupo controle. Esses resultados são consistentes com outros estudos de treinamentos físicos que mostram pequenas alterações no metaboloma sérico em comparação com as grandes perturbações, mas transitórias, relacionadas ao exercício prolongado e de alta intensidade. Nossas descobertas fornecem informações importantes para o planejamento de estudos futuros utilizando a metabolômica que pretendam investigar os efeitos crônicos de treinamentos físicos. Ainda, pesquisas adicionais são necessárias para elucidar as adaptações metabólicas induzidas por diferentes intensidades de TMI.

Agradecimentos

O estudo teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, número: 2016/222157), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, auxílio: 001; Bolsa CAPES Demanda Social (Processo nº 88887.336068/2019-00)). Os órgãos de financiamento não tiveram nenhum papel no

desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS ABDELNUR, P. V. Metabolômica e espectrometria de massas. **Embrapa Agroenergia - Circular Técnica**, v. 1, p. 4, 2011.

AL-KHELIFI, F. et al. A pilot study comparing the metabolic profiles of elite-level athletes from different sporting disciplines. **Sports Medicine - Open**, v. 4, n. 1, p. 2, 2018.

BALADY, G. J. et al. Clinician's Guide to cardiopulmonary exercise testing in adults: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 191–225, 2010.

BROWN, P. I.; SHARPE, G. R.; JOHNSON, M. A. Inspiratory muscle training reduces blood lactate concentration during volitional hyperpnoea. **European Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 1, p. 111–117, 2008.

CAHALIN, L. P.; ARENA, R. A. Breathing exercises and inspiratory muscle training in heart failure. **Heart Failure Clinics**, v. 11, n. 1, p. 149–172, 2015.

CANUTO, G. A. B. et al. METABOLOMICS: DEFINITIONS, STATE-OF-THE-ART AND REPRESENTATIVE APPLICATIONS. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CAPOSTAGNO, B.; LAMBERT, M. I.; LAMBERTS, R. P. A Systematic Review of Submaximal Cycle Tests to Predict, Monitor, and Optimize Cycling Performance. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 11, n. 6, p. 707–714, 2016.

DALL'AGO, P. et al. Inspiratory muscle training in patients with heart failure and inspiratory muscle weakness: a randomized trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 4, p. 757–763, 2006.

DANAHER, J. et al. The use of metabolomics to monitor simultaneous changes in metabolic variables following supramaximal low volume high intensity exercise. **Metabolomics**, v. 12, n. 1, p. 7, 2015.

DAVISON, G. et al. Metabolomic response to acute hypoxic exercise and recovery in adult males. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1682, 2018.

DEMPSEY, J. A. et al. Respiratory system determinants of peripheral fatigue and endurance performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 3, p. 457–461, 2008.

DUFT, R. G. et al. Metabolomics and Exercise: possibilities and perspectives. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, n. 2, 2017.

DUNN, W. B. et al. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387–426, 2011.

ENRIGHT, S. J. et al. Effect of high-intensity inspiratory muscle training on lung volumes, diaphragm thickness, and exercise capacity in subjects who are healthy. **Physical Therapy**, v. 86, n. 3, p. 345–354, 2006.

ENRIGHT, S. J.; UNNITHAN, V. B. Effect of inspiratory muscle training intensities on pulmonary function and work capacity in people who are healthy: a randomized controlled trial. **Physical Therapy**, v. 91, n. 6, p. 894–905, 2011.

FABBRI, S. et al. **Improvements in the StArt tool to better support the systematic review process**. Proceedings of the 20th International Conference on Evaluation and Assessment in Software Engineering. **Anais.EASE '16**. New York, NY, USA: ACM, 2016.

GRIFFITHS, L. A.; MCCONNELL, A. K. The influence of inspiratory and expiratory muscle training upon rowing performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 5, p. 457–466, 2007.

HAJGHANBARI, B. et al. Effects of respiratory muscle training on performance in athletes: a systematic review with meta-analyses. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 27, n. 6, p. 1643–1663, 2013.

HAUTMANN, H. et al. Maximal inspiratory mouth pressures (PIMAX) in healthy subjects--what is the lower limit of normal? **Respiratory Medicine**, v. 94, n. 7, p. 689–693, 2000.

HEANEY, L. M.; DEIGHTON, K.; SUZUKI, T. Non-targeted metabolomics in sport and exercise science. **Journal of Sports Sciences**, v. 37, n. 9, p. 959–967, 2017.

HODGSON, A. B. et al. Metabolic response to green tea extract during rest and moderate-intensity exercise. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 1, p. 325–334, 2013.

HOFFMAN, N. J. Omics and Exercise: Global Approaches for Mapping Exercise Biological Networks. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 10, 2017.

HOWE, C. C. F. et al. Untargeted metabolomics profiling of an 80.5 km simulated treadmill ultramarathon. **Metabolites**, v. 8, n. 1, 2018.

ILLI, S. K. et al. Effect of respiratory muscle training on exercise performance in healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 42, n. 8, p. 707–724, 2012.

JACOBS, D. M. et al. Metabolic response to decaffeinated green tea extract during rest and moderate-intensity exercise. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9936–9943, 2014.

JANSSENS, L. et al. The assessment of inspiratory muscle fatigue in healthy individuals: a systematic review. **Respiratory Medicine**, v. 107, n. 3, p. 331–346, 2013.

KARL, J. P. et al. Military training elicits marked increases in plasma metabolomic signatures of energy metabolism, lipolysis, fatty acid oxidation, and ketogenesis. **Physiological Reports**, v. 5, n. 17, 2017.

KARSTEN, M. et al. The effects of inspiratory muscle training with linear workload devices on the sports performance and cardiopulmonary function of athletes: A systematic review and meta-analysis. **Physical Therapy in Sport: Official Journal of the Association of Chartered Physiotherapists in Sports Medicine**, v. 34, p. 92–104, 2018.

KNAB, A. M. et al. Effects of a flavonoid-rich juice on inflammation, oxidative stress, and immunity in elite swimmers: a metabolomics-based approach. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 150–160, 2013.

LE MOYEC, L. et al. NMR metabolomics for assessment of exercise effects with mouse biofluids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 2, p. 593–602, 2012.

LEHMANN, R. et al. Medium chain acylcarnitines dominate the metabolite pattern in humans under moderate intensity exercise and support lipid oxidation. **PloS One**, v. 5, n. 7, p. e11519, 2010.

LEWIS, G. D. et al. Metabolic signatures of exercise in human plasma. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 33, p. 33ra37, 2010.

LIBERATI, A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **PLoS medicine**, v. 6, n. 7, 21, 2009.

MANAF, F. A. et al. Characterizing the plasma metabolome during and following a maximal exercise cycling test. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, 2, 2018.

MESSIER, F. M. et al. The impact of moderate altitude on exercise metabolism in recreational sportsmen: a nuclear magnetic resonance metabolomic approach. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 42, n. 11, p. 1135–1141, 2017.

MILLER, M. R. et al. Standardisation of spirometry. **The European Respiratory Journal**, v. 26, n. 2, p. 319–338, 2005.

NEAL, C. M. et al. Six weeks of a polarized training-intensity distribution leads to greater physiological and performance adaptations than a threshold model in trained cyclists. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 114, n. 4, p. 461–471, 2013.

NEDER, J. A. et al. Reference values for lung function tests. II. Maximal respiratory pressures and voluntary ventilation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 32, n. 6, p. 719–727, 1999.

NEVES, L. F. et al. Expiratory and expiratory plus inspiratory muscle training improves respiratory muscle strength in subjects with COPD: systematic review. **Respiratory Care**, v. 59, n. 9, p. 1381–1388, 2014.

NEVES, L. M. T. et al. Relationship between inspiratory muscle capacity and peak exercise tolerance in patients post-myocardial infarction. **Heart & Lung: The Journal of Critical Care**, v. 41, n. 2, p. 137–145, 2012.

NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Opinion: understanding “global” systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 8, p. 668–676, 2003.

NIEMAN, D. C. et al. Influence of a polyphenol-enriched protein powder on exercise-induced inflammation and oxidative stress in athletes: a randomized trial using a metabolomics approach. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e72215, 2013a.

NIEMAN, D. C. et al. Serum metabolic signatures induced by a three-day intensified exercise period persist after 14 h of recovery in runners. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 10, p. 4577–4584, 2013b.

NIEMAN, D. C. et al. Influence of pistachios on performance and exercise-induced inflammation, oxidative stress, immune dysfunction, and metabolite shifts in cyclists: a randomized, crossover trial. **PloS One**, v. 9, n. 11, p. e113725, 2014a.

NIEMAN, D. C. et al. Metabolomics approach to assessing plasma 13- and 9-hydroxy-octadecadienoic acid and linoleic acid metabolite responses to 75-km cycling. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 1, p. R68-74, 2014b.

NIEMAN, D. C. et al. Metabolomics-based analysis of banana and pear ingestion on exercise performance and recovery. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 12, p. 5367–5377, 2015.

NIEMAN, D. C.; MITMESSER, S. H. Potential impact of nutrition on immune system recovery from heavy exertion: a metabolomics perspective. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 2017.

NIEMAN, D. C.; SHA, W.; PAPPAN, K. L. IL-6 linkage to exercise-induced shifts in lipid-related metabolites: a metabolomics-based analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 2, p. 970–977, 2017.

NIEMAN, D. C.; WENTZ, L. M. The compelling link between physical activity and the body’s defense system. **Journal of Sport and Health Science**, v. 8, n. 3, p. 201–217, 2019.

PEAKE, J. M. et al. Metabolic and hormonal responses to isoenergetic high-intensity interval exercise and continuous moderate-intensity exercise. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 7, p. E539-552, 2014.

PECHLIVANIS, A. et al. 1H NMR study on the short- and long-term impact of two training programs of sprint running on the metabolic fingerprint of human serum. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 1, p. 470–480, 2013.

PSYCHOGIOS, N. et al. The human serum metabolome. **PloS One**, v. 6, n. 2, p. e16957, 2011.

RA, S.-G. et al. Metabolomics of salivary fatigue markers in soccer players after consecutive games. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 39, n. 10, p. 1120–1126, 2014.

REHDER-SANTOS, P. et al. Critical inspiratory pressure - a new methodology for evaluating and training the inspiratory musculature for recreational cyclists: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 20, n. 1, p. 258, 2019.

ROMER, L. M.; MCCONNELL, A. K. Inter-test reliability for non-invasive measures of respiratory muscle function in healthy humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 2–3, p. 167–176, 2004.

ROMER, L. M.; MCCONNELL, A. K.; JONES, D. A. Effects of inspiratory muscle training on time-trial performance in trained cyclists. **Journal of Sports Sciences**, v. 20, n. 7, p. 547–562, 2002.

ROMER, L. M.; POLKEY, M. I. Exercise-induced respiratory muscle fatigue: implications for performance. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 104, n. 3, p. 879–888, 2008.

RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 23, p. 7954–7958, 2006.

SAKAGUCHI, C. A. et al. Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, 2019.

SALES, A. T. DO N. et al. Respiratory muscle endurance after training in athletes and non-athletes: A systematic review and meta-analysis. **Physical Therapy in Sport: Official Journal of the Association of Chartered Physiotherapists in Sports Medicine**, v. 17, p. 76–86, 2016.

SHEEL, A. W. Respiratory muscle training in healthy individuals: physiological rationale and implications for exercise performance. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 32, n. 9, p. 567–581, 2002.

SOUZA, R. Pressões respiratórias estáticas máximas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28, p. 155–164, 2002.

STANDER, Z. et al. The altered human serum metabolome induced by a marathon. **Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society**, v. 14, n. 11, p. 150, 2018.

STELZER, I. et al. Ultra-endurance exercise induces stress and inflammation and affects circulating hematopoietic progenitor cell function. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 25, n. 5, p. e442-450, 2015.

VERGES, S. et al. Expiratory muscle fatigue impairs exercise performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 2, p. 225–232, 2007.

WASSERMAN, K. W. M. et al. **Principles of Exercise Testing and Interpretation: Including Pathophysiology and Clinical Applications**. Fifth edition ed. Philadelphia: LWW, 2011.

YAN, B. et al. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 106, n. 2, p. 531–538, 2009.

ZAFEIRIDIS, A. et al. Global metabolic stress of isoeffort continuous and high intensity interval aerobic exercise: a comparative ¹H NMR metabonomic study. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 12, p. 4452–4463, 2016.

Parte III - CONSIDERAÇÕES FINAIS E DESDOBRAMENTOS FUTUROS

Os resultados obtidos no *estudo 1* desta tese, intitulado “Estudos metabolômicos analisando alterações no metaboloma humano induzidas pelo exercício: Uma Revisão Sistemática”, nos permitiram concluir que a metabolômica é uma área emergente no meio científico, e a evolução das técnicas de análise e o suporte da bioinformática avançada tem permitido a identificação e quantificação de números cada vez maiores de metabólitos.

A grande maioria dos estudos de alta qualidade que utilizaram a metabolômica para verificar os efeitos do exercício físico no metabolismo foram publicados na última década, e investigaram os efeitos agudos do exercício de alta intensidade e longa duração com ou sem intervenção nutricional. O alto estímulo quando associado a técnicas avançadas, principalmente a LC-MS/MS, e a vasta biblioteca de padrões químicos, foi capaz de revelar grandes alterações principalmente em mediadores lipídicos, aminoácidos e componentes do ciclo do ácido tricarboxílico; e a rápida regulação do metabolismo faz com que as alterações retornem aos valores próximos do basal dentro de poucas horas. Apesar disso, os desvios na concentração de alguns metabólitos mais tardios podem ser observados ainda no dia seguinte de recuperação.

A metabolômica, como ciência emergente, possui alto potencial para contribuir com diversos campos a serem explorados, como diferentes matrizes, condições físicas, patologias e populações. São necessários mais estudos com o objetivo de investigar as adaptações metabólicas crônicas de protocolos de treinamento, e os efeitos de intensidades variadas no metaboloma humano.

Em relação aos resultados do *estudo 2*, intitulado: “Influência crônica do treinamento muscular inspiratório em diferentes intensidades no metaboloma sérico humano”, três diferentes intensidades de um protocolo de TMI na população de ciclistas recreacionais não foram capazes de gerar alterações metabólicas crônicas detectadas por meio da RMN ¹H utilizando tanto o modelo linear geral (GLM), quanto a análise por PCA. Estes resultados são valiosos para o planejamento de estudos futuros utilizando a metabolômica para verificar as adaptações metabólicas geradas pelo TMI. Estudos com um maior número de participantes, o uso de uma técnica mais sensível como a LC-MS/MS, associada à grandes acervos de padrões químicos e

análises estatísticas robustas possivelmente contribuirão com a elucidação dos efeitos do TMI e das diferentes intensidades, ou até mesmo a descoberta de novos biomarcadores relacionados com a aplicação do [treino—treinamento muscular](#) inspiratório e responsáveis pela melhora do desempenho físico no esporte. Além disso, o estudo metabolômico com análise do efeito do TMI em populações com doenças poderá trazer contribuições adicionais acerca das alterações em biomarcadores relacionados à patologia, e aos benefícios do TMI [relacionados implicados](#) na modulação desses biomarcadores, como resultado da melhora de força, capacidade funcional e qualidade de vida.

Como desdobramentos futuros, serão realizados tratamentos quimiométricos mais robustos, como o método supervisionado PLS-DA buscando obter um modelo que permita a separação entre as classes. As amostras restantes ainda serão analisadas utilizando a técnica de LC-MS, explorando os efeitos do TMI por meio de uma plataforma analítica mais sensível.

Parte IV - ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO (2016/2020)

Artigos completos publicados em periódicos

1. Martins de Abreu, R.; Porta, A.; Rehder-Santos, P.; Cairo, B.; Donisete da Silva, C.; De Favari Signini, É.; **Sakaguchi, C.A.**; Catai, A.M. Effects of inspiratory muscle-training intensity on cardiovascular control in amateur cyclists. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2019;317(6): R891–R902. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00167.2019>
2. Nieman, D.C.; Simonson, A.; **Sakaguchi, C.A.**; Sha, W.; Blevins, T.; Hatta Baugh, J.; Kuhlmeier, M. Acute Ingestion of a Mixed Flavonoid and Caffeine Supplement Increases Energy Expenditure and Fat Oxidation in Adult Women: A Randomized, Crossover Clinical Trial. *Nutrients.* 2019;11(11):2665. <https://doi.org/10.3390/nu11112665>
3. **Sakaguchi, C.A.**; Nieman, D.C.; Signini, E.F.; Abreu, R.M.; Catai, A.M. Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review. *Metabolites.* 2019 Aug 9;9(8):164. <https://doi.org/10.3390/metabo9080164>
4. Nieman, D.C.; Valacchi, G.; Wentz, L.M.; Ferrara, F.; Pecorelli, A.; Woodby, B.; **Sakaguchi, C.A.**; Simonson, A. Mixed Flavonoid Supplementation Attenuates Postexercise Plasma Levels of 4-Hydroxynonanal and Protein Carbonyls in Endurance Athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2019;1–8. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2019-0171>
5. Nieman, D.C.; Gillitt, N.D.; Chen, G.Y.; Zhang, Q.; **Sakaguchi, C.A.**; Stephan, E.H. Carbohydrate intake attenuates post-exercise plasma levels of cytochrome P450-generated oxylipins. *PLoS One.* 2019 Mar 18;14(3):e0213676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213676>
6. Nieman, D.C.; Kay, C.D.; Rathore, A.S.; Grace, M.H.; Strauch, R.C.; Stephan, E.H.; **Sakaguchi, C.A.**; Lila, M.A. Increased Plasma Levels of Gut-Derived Phenolics Linked to Walking and Running Following Two Weeks of Flavonoid Supplementation. *Nutrients.* 2018 Nov 9;10(11):1718. <https://doi.org/10.3390/nu10111718>

Resumos publicados em anais de congressos

1. SIGNINI, ETORE F.; REHDER-SANTOS, PATRICIA; ABREU, R. M.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D.; DATO, C. C.; CATAI, A. M. Contribuição dos sistemas envolvidos na captação, transporte e consumo de oxigênio na manutenção do trabalho respiratório durante um teste de resistência muscular respiratória incremental. In: 40º Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2019, São Paulo. Suplemento da revista SOCESP, 2019. v. 29. p. 279-279.
2. SILVA, C. D; SANTOS, P. R.; ABREU, R. M.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SIGNINI, E. F.; DATO, C. C.; CATAI, A. M. . Respostas da frequência cardíaca à diferentes intensidades de treinamento muscular inspiratório em ciclistas recreacionais: Estudo clínico e randomizado. In: XXXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2018, São Paulo. In: XXXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2018, São Paulo. Suplemento da revista SOCESP, 2018, 2018. v. 28. p. 323-323.
3. SIGNINI, ETORE F.; SANTOS, P. R.; ABREU, R. M.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D.; DATO, C. C. ; CATAI, A. M. . Relação entre as variáveis cardiovasculares, ventilatórias e metabólicas, com o trabalho mecânico inspiratório externo durante um teste de resistência muscular respiratória incremental. In: XXXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2018, São Paulo. Suplemento da revista SOCESP, 2018. v. 28. p. 279-279.
4. ABREU, R. M.; REHDER-SANTOS, PATRICIA; SIGNINI, E. F.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D.; CATAI, A. M. . Efeitos do treinamento muscular inspiratório sobre o controle autonômico cardíaco de ciclistas recreacionais. In: XXXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2018, São Paulo. Suplemento da revista SOCESP, 2018. v. 28. p. 318-318.
5. REHDER-SANTOS, PATRICIA; ABREU, RAPHAEL M.; SIGNINI, E. F.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D.; DATO, C. C. ; CATAI, A. M. . A intensidade de treinamento muscular inspiratório interfere na melhora do desempenho físico de ciclistas recreacionais? estudo randomizado e controlado. In: XIX Simpósio internacional de fisioterapia cardiorrespiratória e fisioterapia em

- terapia intensiva, 2018, Manaus. XIX Simpósio internacional de fisioterapia cardiopulmonar e fisioterapia em terapia intensiva, 2018. v. 9. p. 208-209.
6. SIGNINI, E. F.; REHDER-SANTOS, P.; ABREU, R. M.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D.; DATO, C. C. ; CATAI, A. M. . Contribuição dos sistemas cardiovascular, respiratório e metabólico para a manutenção do trabalho mecânico inspiratório externo durante um teste de resistência muscular respiratória incremental. In: XIX Simpósio internacional de fisioterapia cardiopulmonar e fisioterapia em terapia intensiva, 2018, Manaus. XIX Simpósio internacional de fisioterapia cardiopulmonar e fisioterapia em terapia intensiva, 2018. v. 9. p. 149-149.
 7. ABREU, RAPHAEEL M.; REHDER-SANTOS, P.; SIGNINI, E. F.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D.; DATO, C. C. ; CATAI, A. M. . Effects of inspiratory muscle training on cardiac autonomic control. In: European Respiratory Society Congress. In: European Respiratory Society Congress, 2018, Paris. European Respiratory Journal, 2018. v. 52. p. PA1450.
 8. BUTO, M. S. S.; **SAKAGUCHI, CAMILA A.**; FARCHE, A. C. S.; VASSIMON-BARROSO, V.; FIOGBE, E.; CARNAVALE, B. F. ; ROSSI, P. G. ; TAKAHASHI, A. C. M. . Repercussões cardíacas à manobra postural ativa de idosos pré-frágeis. In: I Congresso Paulista de Ciência e Tecnologia Aplicadas à Gerontologia, 2018, São Carlos. I Congresso Paulista de Ciência e Tecnologia Aplicadas à Gerontologia, 2018. p. 91-91.
 9. MARCONDES, A. C. A.; SANTOS, P. R.; SIGNINI, E. F.; ABREU, R. M.; **SAKAGUCHI, C.A.** ; SILVA, C. D. ; DATO, C. C. ; CATAI, A. M. . IDENTIFICAÇÃO DO PONTO DE APARECIMENTO METABÓRREFLEXO NOS TESTES CARDIOPULMONAR E DE RESISTÊNCIA MUSCULAR RESPIRATÓRIA INCREMENTAL. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica (CIC) e IX Congresso de Iniciação ao Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CIDTI) da UFSCar - 2017, 2017, São Carlos, 2017.
 10. SIGNINI, E. F.; SANTOS, P. R.; ABREU, R. M.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D. ; DATO, C. C. ; ANICETO, I. A. V. ; CATAI, A. M. . ESTUDO DAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS E METABÓLICAS DURANTE O TESTE DE RESISTÊNCIA INSPIRATÓRIA EM JOVENS SAUDÁVEIS. In: XXIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSCAR, 2017, SÃO

CARLOS. ANAIS DO XXIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSCAR. X: X, 2017. v. XX. p. XX-XX.

12. CANDIDO, J. A.; SANTOS, P. R.; ABREU, R. M.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SILVA, C. D. ; SIGNINI, E. F. ; CATAI, A. M. . ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE VARIÁVEIS CARDIOVASCULARES À MANOBRA DE PRESSÃO INSPIRATÓRIA MÁXIMA? In: XXIV Congresso de Iniciação Científica (CIC) e IX Congresso de Iniciação ao Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CIDTI) da UFSCar - 2017, 2017, São Carlos. ANAIS DO XXIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSCAR, 2017. v. X.
13. LOZANO, R. L.; DATO, C. C; SILVA, C. D.; **SAKAGUCHI, C.A.**; SANTOS, P. R.; SIGNINI, E. F.; ABREU, R. M.; MARRARA, K. T. ; CATAI, A. M. . ESTUDO DA RESPOSTA AGUDA DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DURANTE UMA SESSÃO DE TREINAMENTO MUSCULAR INSPIRATÓRIO EM CICLISTAS RECREACIONAIS. In: 19º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2017, São Carlos. 19º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - ANAIS DOS EVENTOS DO UNICEP - 2017, 2017. v. XX. p. 102-102.

Outras produções no período (manuscrito a ser submetido)

SAKAGUCHI, C. A.; JAMAMI, M.; MINATEL, V.; REHDER-SANTOS, P.; DUCATTI, R.; RIBEIRO, B. A.; SILVA, E.; CATAI, A. M. Respiratory muscle endurance test using a high load: correlations with a cardiopulmonary exercise testing.

Colaboração em projeto de pesquisa

Marcele Stephanie de Souza Buto – doutorado PPG-Ft (2018)

Título do projeto: Repercussões cardiovasculares de um treinamento multicomponente em idosos pré-frágeis.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Anielle Cristhine de Medeiros Takahashi.

Co orientadora: Prof^a. Dr^a Aparecida Maria Catai.

APÊNDICE 1 – Resumo do manuscrito a ser submetido

Teste de resistência muscular respiratória com alta intensidade: correlações com o teste de esforço cardiopulmonar

Sakaguchi, C.A.; Jamami, M.; Minatel, V.; Rehder-Santos, P.; Ducatti, R.; Ribeiro, B.A.; Silva, E.; Catai, A.M.

Objetivos: Caracterizar as respostas de um protocolo de teste de resistência da musculatura inspiratória (RMI) de carga constante utilizando a pressão inspiratória crítica (PThC), uma intensidade que representa a relação entre força e tempo sustentado; e correlacionar as respostas do teste de exercício cardiopulmonar (TECP). **Métodos:** Estudo observacional, transversal. Neste estudo, 79 participantes fisicamente ativos dos sexo masculino (39.0 ± 12.0 anos) realizaram o teste de RMI com carga constante utilizando a PThC (RMI-PThC) e o TECP. Os dados metabólicos e ventilatórios foram coletados durante ambos os testes, e os pontos registrados no TECP representaram: o limiar anaeróbio ventilatório (LAv); ponto de compensação respiratória (PCR); pico de consumo de oxigênio (VO_{2PICO}) e $80\% VO_{2PICO}$. As correlações foram realizadas utilizando os testes de correlação de Pearson ou Spearman, de acordo com a distribuição da amostra e de suas variâncias, e os coeficientes de correlação (r) estatisticamente significativos se $p < 0,05$. **Resultados:** Houve diferença significativa entre todos os momentos do TECP, exceto entre $80\%VO_{2PICO}$ e o PCR. Foram encontradas correlações positivas entre o teste de RMI-PThC e o TECP para as variáveis VO_2 , estimativa do equivalente metabólico (MET) e carga. No momento do LAv: $r=0.443$, $p<0.001$ para VO_2 ; $r=0.365$, $p<0.001$ para MET; $r=0.343$, $p=0.002$ para carga; no momento de $80\%VO_{2PICO}$: $r=0.407$, $p<0.001$ para VO_2 ; $r=0.325$, $p=0.003$ para MET; $r=0.408$, $p<0.001$ para carga; no momento do PCR $r=0.443$, $p<0.001$ para VO_2 ; $r=0.365$, $p<0.001$ para MET; $r=0.443$, $p<0.001$ para carga; e no momento do VO_{2PICO} : $r=0.407$, $p<0.001$ para VO_2 ; $r=0.371$, $p<0.001$; para MET; $r=0.408$ e $p<0.001$ para carga.

Conclusão: As respostas metabólicas do teste de RMI de carga constante utilizando a PThC foram positivamente correlacionadas com as respostas geradas em diferentes momentos do TECP, mais evidentemente nos momentos de VO_{2PICO} e $80\%VO_{2PICO}$. A PThC representa o limiar entre o exercício intenso e severo, e o

esforço gerado com a sua utilização está relacionado às demandas de um exercício global, e a sua utilização no meio clínico é potencialmente uma ferramenta para avaliação da capacidade funcional.

Palavras-chave:

exercício respiratório; teste de exercício cardiopulmonar; testes de função respiratória; músculos respiratórios, mecanismos respiratórios.

ANEXO A - COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO – ESTUDO 1



Review

Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review

Camila A. Sakaguchi ^{1,*} , David C. Nieman ² , Ettore F. Signini ¹, Raphael M. Abreu ¹ and Aparecida M. Catai ¹

¹ Physical Therapy Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

² North Carolina Research Campus, Appalachian State University, Kannapolis, NC 28081, USA

* Correspondence: sakaguchicamila@estudante.ufscar.br; Tel.: +55-16-3351-8705

Received: 10 July 2019; Accepted: 31 July 2019; Published: 9 August 2019



Abstract: This systematic review provides a qualitative appraisal of 24 high-quality metabolomics-based studies published over the past decade exploring exercise-induced alterations of the human metabolome. Of these papers, 63% focused on acute metabolite changes following intense and prolonged exercise. The best studies utilized liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) analytical platforms with large chemical standard libraries and strong, multivariate bioinformatics support. These studies reported large-fold changes in diverse lipid-related metabolites, with more than 100 increasing two-fold or greater within a few hours post-exercise. Metabolite shifts, even after strenuous exercise, typically return to near pre-exercise levels after one day of recovery. Few studies investigated metabolite changes following acute exercise bouts of shorter durations (< 60 min) and workload volumes. Plasma metabolite shifts in these types of studies are modest in comparison. More cross-sectional and exercise training studies are needed to improve scientific understanding of the human system's response to varying, chronic exercise workloads. The findings derived from this review provide direction for future investigations focused on the body's metabolome response to exercise.

Keywords: exercise; sports; metabolomics; metabolism

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO – ESTUDO 2



camilasakaguchi90 . <camilasakaguchi790@gmail.com>

[Metabolites] Manuscript ID: metabolites-705044 - Submission Received

1 mensagem

Editorial Office <metabolites@mdpi.com>

10 de janeiro de 2020 18:25

Responder a: metabolites@mdpi.com

Para: Camila Akemi Sakaguchi <camilasakaguchi790@gmail.com>

Cc: Camila Akemi Sakaguchi <sakaguchicamila@estudante.ufscar.br>, David Christopher Nieman <niemandc@appstate.edu>, Ettore De Favari Signini <etore8@gmail.com>, Raphael Martins de Abreu <raphaelmartins.abreu@gmail.com>, Claudio Donisete Silva <claudio_acrobatica@hotmail.com>, Patricia Rehder-Santos <rehderpaty@hotmail.com>, Maria Gabriela Aparecida Carosio <gabi_carosio@hotmail.com>, Roberta Manzano Maria <robmmaria@gmail.com>, Carla Cristina Dato <carla.dato@yahoo.com.br>, Heloisa Sobreiro Selistre Araújo <hsaraujo@ufscar.br>, Thiago Venâncio <t_venancio@yahoo.com>, Antônio Gilberto Ferreira <giba_04@yahoo.com.br>, Aparecida Maria Catai <mcatai@ufscar.br>

Dear Ms. Sakaguchi,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Metabolites

Manuscript ID: metabolites-705044

Type of manuscript: Article

Title: Chronic influence of inspiratory muscle training at different intensities on the serum metabolome

Authors: Camila Akemi Sakaguchi, David Christopher Nieman, Ettore De Favari Signini, Raphael Martins de Abreu, Claudio Donisete Silva, Patricia Rehder-Santos, Maria Gabriela Aparecida Carosio, Roberta Manzano Maria, Carla Cristina Dato, Heloisa Sobreiro Selistre Araújo, Thiago Venâncio, Antônio Gilberto Ferreira, Aparecida Maria Catai *

Received: 10 January 2020

E-mails: sakaguchicamila@estudante.ufscar.br, niemandc@appstate.edu, etore8@gmail.com, raphaelmartins.abreu@gmail.com, claudio_acrobatica@hotmail.com, rehderpaty@hotmail.com, gabi_carosio@hotmail.com, robmmaria@gmail.com, carla.dato@yahoo.com.br, hsaraujo@ufscar.br, t_venancio@yahoo.com, giba_04@yahoo.com.br, mcatai@ufscar.br

Exercise Metabonomics

https://www.mdpi.com/journal/metabolites/special_issues/exercise_metabonomics

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/dd8cf059b437c3db40ef35377f897a52

The following points were confirmed during submission:

1. Metabolites is an open access journal with publishing fees of 1600 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/metabolites/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <https://www.mdpi.com/about/ioap>. If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the Metabolites editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission. (Please refer to the Rights & Permissions website: <https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Metabolites editorial office at metabolites@mdpi.com

Kind regards,

Metabolites Editorial Office
St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland
E-Mail: metabolites@mdpi.com
Tel. +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18

*** This is an automatically generated email ***

ANEXO C - COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MAPEAMENTO METABÓLICO APÓS DIFERENTES INTENSIDADES DE TREINAMENTO DA MUSCULATURA INSPIRATÓRIA EM CICLISTAS RECREACIONAIS: ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO

Pesquisador: Aparecida Maria Catai

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71741417.0.0000.5504

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.303.309

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo com desenho experimental a ser realizado no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular da UFSCar. 40 indivíduos do sexo masculino, idade entre 20 e 40 anos, praticantes de ciclismo, serão aleatorizados em Grupo Controle (GC, n=10), Grupo Sham (GS, n=10), Grupo PThC (GPThC, n=10) e Grupo 60% da PIMÁX (G60, n=10), levando-se em conta a idade e a capacidade funcional aeróbia. O TMI terá a duração de 11 semanas. Todos os indivíduos receberão orientação nutricional, sendo realizada padronização alimentar seguida por um mês antes do início dos treinos. A cada 3 semanas responderão à um recordatório nutricional (R24h) para controle do padrão do consumo alimentar. No início e final do protocolo experimental, serão coletadas amostras de sangue que serão centrifugadas para retirada do plasma e armazenadas a -80C. Posteriormente, após o descongelamento e tratamento das amostras, o metaboloma será gerado por meio do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker, Fallanden, Switzerland), e utilizando a análise quimiométrica, será realizada a identificação/quantificação de metabólitos de interesse.

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo Primário será Avaliar os efeitos de 11 semanas de TMI de diferentes intensidades nas respostas metabólicas de ciclistas recreacionais, via estudo metabólico por RMN de 1H

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 2.303.309

(fingerprint). E o objetivos secundários são Caracterizar as respostas metabólicas basais, a partir do estudo metabolômico por RMN de 1H (fingerprint); Comparar os comportamentos dos espectros encontrados nos três grupos de treinamento; Observar metabólitos específicos ou classes de metabólitos que sofreram alterações em suas concentrações decorrentes do treinamento e a diferença entre elas nos grupos estudados; Identificar os principais compostos e/ou classes de compostos responsáveis por alterações utilizando RMN 1D e 2D, antes e após 11 semanas de TMI em ciclistas recreacionais; Comparar as respostas encontradas no metaboloma após TMI associado ao ciclismo, frente às características do metaboloma da prática isolada do esporte.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador responsável descreve como riscos que "Os participantes durante a participação do projeto poderão apresentar sintomas como falta de ar, cansaço e fadiga muscular periférica, porém nestes casos as avaliações serão interrompidas até que o participante se recupere. Além disso, todos os locais onde o projeto será realizado estão equipados com equipamentos para primeiros socorros e disponibilizarão de equipe de profissionais especializados e treinados para auxiliar em casos de intercorrências." Como Benefícios "Os participantes realizarão avaliações que o colocarão a par do seu condicionamento cardiorrespiratório e poderão auxiliá-los na melhora de seu condicionamento físico. Além disso, os mesmos realizarão avaliações de composição corporal, exame de sangue, testes de força e resistência muscular respiratória, teste ergométrico clínico, teste cardiopulmonar e acompanhamento nutricional de forma gratuita, e receberão ao final da pesquisa, todos os resultados destas avaliações, além de orientações para a melhora da sua prática esportiva e para manutenção de bons hábitos de vida, prevenindo assim possíveis doenças."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa com relevância científica e social. No cronograma apresentado descreve estudo piloto em 01/11/2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto datada e assinada adequadamente. Foi anexado adequadamente o Termo de Ciência da médica Cardiologista responsável pelos testes ergométricos que serão realizados na USE. O TCLE foi apresentado pelo pesquisador responsável de acordo com a Resolução 466/2012 em vigência.

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 2.303.309

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto adequado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos recomenda que os pesquisadores responsáveis consultem as normas do CEP e a resolução nº 466 de 2012, disponíveis na página da Plataforma Brasil em caso de dúvidas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_952911.pdf	31/08/2017 15:12:06		Aceito
Outros	Termo_de_ciencia_Isabela_TE.pdf	31/08/2017 11:29:26	Camila Akemi Sakaguchi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_CEP2_Camila_2017.pdf	07/08/2017 14:36:51	Camila Akemi Sakaguchi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_TMI_METAB_2017_CEP2.pdf	07/08/2017 11:49:17	Camila Akemi Sakaguchi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_CEP.pdf	04/08/2017 17:27:44	Aparecida Maria Catai	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 28 de Setembro de 2017

**Assinado por:
Priscilla Hortense
(Coordenador)**

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br

Review

Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review

Camila A. Sakaguchi ^{1,*} , David C. Nieman ² , Ettore F. Signini ¹, Raphael M. Abreu ¹ and Aparecida M. Catai ¹

¹ Physical Therapy Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

² North Carolina Research Campus, Appalachian State University, Kannapolis, NC 28081, USA

* Correspondence: sakaguchicamila@estudante.ufscar.br; Tel.: +55-16-3351-8705

Received: 10 July 2019; Accepted: 31 July 2019; Published: 9 August 2019



Abstract: This systematic review provides a qualitative appraisal of 24 high-quality metabolomics-based studies published over the past decade exploring exercise-induced alterations of the human metabolome. Of these papers, 63% focused on acute metabolite changes following intense and prolonged exercise. The best studies utilized liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) analytical platforms with large chemical standard libraries and strong, multivariate bioinformatics support. These studies reported large-fold changes in diverse lipid-related metabolites, with more than 100 increasing two-fold or greater within a few hours post-exercise. Metabolite shifts, even after strenuous exercise, typically return to near pre-exercise levels after one day of recovery. Few studies investigated metabolite changes following acute exercise bouts of shorter durations (< 60 min) and workload volumes. Plasma metabolite shifts in these types of studies are modest in comparison. More cross-sectional and exercise training studies are needed to improve scientific understanding of the human system's response to varying, chronic exercise workloads. The findings derived from this review provide direction for future investigations focused on the body's metabolome response to exercise.

Keywords: exercise; sports; metabolomics; metabolism

Article

Chronic Influence of Inspiratory Muscle Training at Different Intensities on the Serum Metabolome

Camila A. Sakaguchi¹, David C. Nieman² , Ettore F. Signini¹, Raphael M. de Abreu¹, Claudio D. Silva¹, Patrícia Rehder-Santos¹ , Maria G. A. Carosio³, Roberta M. Maria³, Carla C. Dato⁴, Heloisa S. S. de Araújo⁵, Tiago Venâncio³, Antônio G. Ferreira³  and Aparecida M. Catai^{1,*}

- ¹ Physical Therapy Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil; sakaguchicamila@estudante.ufscar.br (C.A.S.); etore8@gmail.com (E.F.S.); raphaelmartins.abreu@gmail.com (R.M.d.A.); claudio_acrobatica@hotmail.com (C.D.S.); rehderpaty@hotmail.com (P.R.-S.)
 - ² North Carolina Research Campus, Appalachian State University, Kannapolis, NC 28081, USA; niemandc@appstate.edu
 - ³ Chemistry Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil; gabi_carosio@hotmail.com (M.G.A.C.); robmmaria@gmail.com (R.M.M.); t_venancio@yahoo.com (T.V.); giba_04@yahoo.com.br (A.G.F.)
 - ⁴ Nutrition course, Central Paulista University Center, São Carlos, SP 13563-470, Brazil; carladatonutricionista@gmail.com
 - ⁵ Physiological Sciences Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil; hsaraujo@ufscar.br
- * Correspondence: mcatai@ufscar.br; Tel.: +55-16-3351-8705

Received: 10 January 2020; Accepted: 6 February 2020; Published: 21 February 2020



Abstract: This study investigated the chronic effect of inspiratory muscle training (IMT) on the human serum metabolome in healthy male recreational cyclists. Using a randomized, parallel group design, twenty-eight participants were randomized to three IMT groups: low intensity (LI, $n = 7$); moderate intensity (MI, $n = 10$); and high intensity (HI, $n = 11$). The IMT was performed for 11 weeks. Another group of participants under the same conditions, who did not perform the IMT but participated in all procedures, was included as controls (CG, $n = 6$). Blood samples were collected one week before and after 11 weeks of IMT and analyzed for metabolite shifts using ¹H NMR. Statistical analysis included a 4 (group) × 2 (time) repeated measures ANOVA using the general linear model (GLM), and multivariate principal component analysis (PCA). Untargeted metabolomics analysis of serum samples identified 22 metabolites, including amino acids, lipids, and tricarboxylic acid cycle intermediates. Metabolites shifts did not differ between groups, indicating that IMT at three intensity levels did not alter the serum metabolome relative to the control group. These results reveal novel insights into the metabolic effects of the IMT and are consistent with the results from other studies showing negligible chronic alterations in the serum metabolome in response to physical training.

Keywords: breathing exercises; muscle strength; muscle endurance; inspiratory muscle; metabolomics; metabolism