



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR)
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA (PPGFt)



Étore De Favari Signini

**ESTUDO DO PERFIL METABÓLICO NO EXERCÍCIO FÍSICO E
ENVELHECIMENTO: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA INTEGRADA À
MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA.**

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Catai

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Vincenzi Oliveira

SÃO CARLOS-SP
2023

Étore De Favari Signini

**ESTUDO DO PERFIL METABÓLICO NO EXERCÍCIO FÍSICO E
ENVELHECIMENTO: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA INTEGRADA À
MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA.**

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:
Fisioterapia e Desempenho Funcional

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

Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Fisioterapia, Laboratório de
Fisioterapia Cardiovascular, São Paulo, Brasil

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regina Vincenzi Oliveira

Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, Núcleo de Pesquisa em
Cromatografia (SEPARARE), São Paulo, Brasil

SÃO CARLOS-SP
2023

Investigação conduzida no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular (LFCV) – Núcleo de Pesquisas em Exercício Físico (NUPEF) do Departamento de Fisioterapia (DFisio) em colaboração com os laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear, e o Núcleo de Pesquisa em Cromatografia (SEPARARE), ambos do Departamento de Química. Todos os laboratórios são vinculados à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

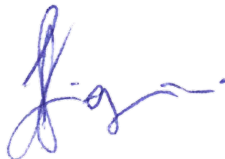
Projeto desenvolvido com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processos 2016/222157 (Auxílio Temático) e 2018/25082-3 (Bolsa Doutorado Direto); e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo 001.

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.



São Carlos, 10 de Março de 2023.
Profa. Dra. Aparecida Maria Catai
(Orientadora)



Étore De Favari Signini
(Candidato ao título de Doutor)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Étore de Favari Signini, realizada em 10/01/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Aparecida Maria Catai (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho (PUC-PR)

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Prof. Dr. Rodrigo Polaquini Simões (UNIFAL - MG)

Profa. Dra. Anielle Cristhine de Medeiros Takahashi (UFSCar)

Dedico esse trabalho a todos que me ajudaram ativamente nos âmbitos científico e pessoal para a execução desse trabalho: Aparecida Maria Catai, Claudio Donisete da Silva, Camila Akemi Sakaguchi, Patrícia Rehder dos Santos, Alex Castro, David Christopher Nieman, Juliana Magalhães de Oliveira, Regina Vincenzi Oliveira, Raphael Martins de Abreu, Alberto Porta, Rafaela Mendes Zambetta, Juliana Cristina Milan-Mattos, Antônio Gilberto Ferreira, e a minha família. A ajuda prestada por vocês foi a causa do meu amadurecimento pessoal e profissional, e assim como essa conquista, será a causa das minhas conquistas futuras.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Carlos Eduardo e Érica Regina, por me trazer a esse mundo e por me orientar e guiar durante todos os momentos. A contribuição de vocês é imensurável para minha vida. Também agradeço imensamente ao meu irmão, Bruno, por estar sempre ao meu lado e contribuir para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Você sempre foi motivo de admiração para mim. Todos vocês são muito especiais pra mim e o principal motivo dessa conquista.

Não menos importante, sou imensuravelmente grato a minha noiva, Rafaella Zambetta, por ser minha maior companheira em todos os momentos. Desde que você entrou em minha vida, tem sido essencial para minha saúde mental e para meu amadurecimento pessoal e profissional. Todos os dias você tem sido a minha fonte de paz e alegria, e consequentemente, a motivação para prosseguir lutando. Essa conquista não aconteceria sem você.

Agradeço a família LFCV (Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular) por ter me acolhido em fevereiro de 2015 e ter me guiado profissionalmente nesses últimos 8 anos. Em especial, sou imensamente grato a minha mãe acadêmica, Profa. Aparecida Maria Catai, pois foi quem abriu as portas da pesquisa e permitiu que eu trilhasse esse caminho com maestria. Todas as experiências e conhecimentos adquiridos com você, como profissional e como pessoa, serão a base para o novo capítulo da minha vida. Muito obrigado por tudo isso.

Ainda sobre a família LFCV, destaco a Patrícia Rehder-Santos, por ter assumido o papel de irmã mais velha nessa família, me ajudando e guiando no passo a passo da trilha liberada pela minha mãe acadêmica. Muito obrigado pelo seu companheirismo, ensinamentos, e ajuda durante todo o tempo que estive no LFCV. Agradeço outros integrantes da família como o meu amigo Claudio Donisete, sempre companheiro e disponível para qualquer trabalho, ajuda, ou *happy hour*. Sua ajuda foi indispensável na execução dessa tese, muito obrigado pelos seus ensinamentos e suporte. A Camila Sakaguchi, sempre muito dedicada e destemida, foi a pessoa que me introduziu na metabolômica e foi a principal companheira nas discussões e no entendimento desse assunto tão complexo. As oportunidades que eu tive durante esses anos foram principalmente devido a você, por isso, minha imensa gratidão. Ao Raphael Abreu, pela sua ajuda e conhecimento em assuntos complexos de controle autonômico e bioengenharia. Com você, o entendimento desse assunto e a escrita dessa tese tornaram-se algo possível, por isso, minha grande gratidão.

Agradeço também a todos os outros integrantes da família LFCV que de forma direta, ou indireta, colaboraram para o meu amadurecimento pessoal e crescimento acadêmico. Em especial a Juliana Milan-Mattos, Vinicius Minatel, Gabriela Galdino, Fiolly Leal, Letícia Sant'Anna e os alunos de iniciações científicas Isabela Eduarda Gouveia de Oliveira, Ana Carolina Aparecida Marcondes Scalli, Giovana Lissa, e Luís Henrique Gomes por ativamente influenciarem meu crescimento profissional. Destaco a Isabela Eduarda Gouveia de Oliveira, minha primeira coorientação de iniciação científica, que além de me dar a oportunidade de ver o outro lado da moeda (o desafio de transmitir o conhecimento), me proporcionou novas experiências e novos conhecimentos, contribuindo imensamente com o meu crescimento acadêmico. Portanto, agradeço muito a contribuição de todos vocês.

A todos os integrantes dos laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear e SEPARARE do Departamento de Química da UFSCar tenho imensa gratidão. Em especial, agradeço aos professores Regina Vincenzi Oliveira (minha co-orientadora), Antônio Gilberto Ferreira, e Thiago Venâncio por abrirem portas e por participarem ativamente na execução desse projeto. Sem o conhecimento e a oportunidade ofertada por vocês, o projeto seria inviável.

Ainda considerando o pessoal dos laboratórios do Departamento de Química, tenho imensa gratidão pela minha equipe de estudos de metabolômica: Alex Castro e Juliana Magalhães de Oliveira. Vocês foram essenciais para o meu conhecimento e amadurecimento nessa ciência ômica, bem como na análise e processamento da infinidade de dados. Sem vocês, o meu conhecimento do assunto seria extremamente restrito e não permitiria uma capacidade crítica sobre os trabalhos relacionados existentes na literatura.

Também agradeço muito ao Professor Dr. David Christopher Nieman por todos os conhecimentos transmitidos. Apesar de a pandemia ter sido a causa de mudanças profundas dos planos iniciais a respeito do estágio no exterior, o senhor foi companheiro e a peça fundamental na publicação do primeiro artigo dessa tese, e suas orientações e conhecimentos repercutiram (e repercutirão) imensamente nos frutos colhidos desse trabalho. Minha imensa gratidão.

A todos os envolvidos no projeto temático FAPESP (projeto que viabilizou a execução dessa tese) que não foram mencionados anteriormente. Agradeço muito pelos conhecimentos, contribuições, e as oportunidades oferecidas.

Agradeço imensamente a todos os voluntários envolvidos nos projetos de pesquisa por viabilizarem o estudo. Sem ter nada em troca, vocês contribuíram para a pesquisa nacional que atualmente está carente de recursos.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPESP que permitiram financeiramente a execução dessa pesquisa.

A todos os profissionais e funcionários do Departamento de Fisioterapia e da Universidade Federal de São Carlos por tornar a execução da pesquisa viável nos aspectos de ambiente de coleta e aspectos burocráticos do departamento. Agradeço a todos os professores e profissionais do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia pelo conhecimento e experiência compartilhados.

Aos professores e organizadores de cursos acadêmicos com temas relacionados a essa pesquisa que permitiram o aumento do meu conhecimento na área (em especial os cursos de “*Immunosenescence*” ofertado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, e de “Fundamentos e Aplicações da Metabolômica” ofertado pelo Grupo de Pesquisa em Bioanalítica e Metabolômica Clínica do IQ-UFBA e IQ-USP). Todos vocês deram os cursos com entusiasmo, e, portanto, foram bem aproveitados por mim. Agradeço também a todos os envolvidos na organização e execução do curso de especialização em “Fisiologia do Exercício” da UFSCar em 2018. Com certeza vocês me embasaram para que eu pudesse interpretar adequadamente parte dos achados desta pesquisa.

Aos meus amigos Acson Gustavo, Diego Gonçalves, Bruno Dantas, e Gabriel Andrade que sempre foram um motivo de descontração durante essa jornada.

E por fim, sou imensamente grato a todos que eu não mencionei acima e que tiveram participação direta ou indireta na realização desse trabalho.

Todas essas palavras são insuficientes para expressar a dimensão da gratidão que eu tenho por cada um de vocês. Muito obrigado!!

*“Uma vida não questionada
não merece ser vivida”*

Platão

RESUMO

O exercício físico e o envelhecimento são estressores naturais com desfechos antagônicos no organismo humano. Tais desfechos são refletidos fenotipicamente no metabolismo, o qual pode ser estudado por meio da metabolômica. Esta permite o estudo de oxilipinas (metabólitos lipídicos que possuem importantes relações com os desfechos do exercício físico) e a integração abrangente do metabolismo com outros componentes relacionados à integridade sistêmica, como a modulação autonômica cardíaca (MAC) e a aptidão cardiorrespiratória (ACR), ajudando a entender os desfechos integrados proporcionados pelo envelhecimento. A melhor compreensão desses estressores pelo uso da metabolômica e de análises integrativas, pode auxiliar na elaboração de estratégias mais eficientes de promoção de saúde para a população em geral. Assim, o **Estudo 1** foi uma revisão sistemática da literatura e procurou investigar as respostas das oxilipinas relacionadas aos efeitos de curto e longo prazos do exercício físico por suas vias enzimáticas e fornecer informações sobre os efeitos fisiológicos potenciais. Após a busca e seleção, apenas 9 estudos, de 1.749 documentos, foram incluídos devidos aos critérios de inclusão e exclusão. Destes, sete enfatizaram os efeitos de curto prazo, enquanto dois avaliaram os de longo prazo sobre o perfil das oxilipinas. Como conclusão, diversas oxilipinas com funções biomoduladoras principalmente relacionadas à inflamação, à função cardiovascular e à adaptação e regeneração tecidual, foram mobilizadas especialmente como consequência dos efeitos de curto prazo do exercício físico, sob a influência da intensidade e duração do exercício físico. Os efeitos de longo prazo do exercício físico sobre os níveis de diferentes oxilipinas foram discretos e relacionam-se com funções variadas. Já o **Estudo 2** investigou, de maneira integrada, o curso temporal de variáveis do metaboloma humano e de variáveis relacionadas à MAC e à ACR no envelhecimento, em diferentes faixas etárias considerando indivíduos aparentemente saudáveis. Indivíduos de 20 a 70 anos foram divididos em cinco faixas etárias (20-29, 30-39, 40-49, 50-59, e 60-70 anos) e submetidos à coleta de sangue, avaliação autonômica cardíaca e teste de exercício cardiopulmonar, para análises da metabolômica, da MAC e da ACR, respectivamente. Foram utilizados *post hoc* de Tukey e o tamanho do efeito com intervalo de confiança para todos os metabólitos e variáveis significativos no modelo de ANOVA *one-way*, com $p < 0,01$, e análise de componentes principais (PCA) sobre as variáveis significativas para o estudo integrado. Expressivas alterações foram observadas na faixa etária de 60-70, onde a ACR, BCAAs (valina, leucina e isoleucina), 3-hidroxiisobutirato e a MAC encontraram-se significativamente reduzidos, enquanto que o ácido hipúrico significativamente elevado em comparação aos grupos mais jovens (especialmente para as faixas etárias de 20-29 e 30-39). O ácido hipúrico, variáveis da MAC e ACR, e os BCAAs foram os principais responsáveis pela distinção das faixas etárias conforme destacado na PCA. Como conclusão, os resultados sugerem alterações significativas no metabolismo, MAC, e ACR, após os sessenta anos como consequência do processo de envelhecimento, entretanto, com algumas alterações no perfil metabólico que podem ser favoráveis em amenizar os efeitos deletérios do envelhecimento. Assim, essa tese evidenciou a complexidade da inter-relação do metabolismo com alguns sistemas do organismo de maneira integrada no contexto de estressores naturais do organismo como o exercício físico e o envelhecimento. Tais informações são importantes considerando a necessidade de uma compreensão menos fragmentada da fisiologia humana.

Palavras-chave: Envelhecimento, Aptidão Cardiorrespiratória, Metabolômica, Exercício Físico, Frequência Cardíaca.

ABSTRACT

Physical exercise and aging are natural stressors with antagonistic outcomes in the human body. Such outcomes are phenotypically reflected in metabolism, which can be studied through metabolomics. The latter allows the study of oxylipins (lipid metabolites that have important relationships with physical exercise outcomes) and the comprehensive integration of metabolism with other components related to systemic integrity, such as cardiac autonomic modulation (CAM) and cardiorespiratory fitness (CRF), helping to understand the integrated outcomes provided by aging. A better understanding of these stressors through the use of metabolomics and integrative analysis can help in the development of more efficient health promotion strategies for the general population. Thus, *Study 1* was a systematic review of the literature and sought to investigate the responses of oxylipins related to the short- and long-term effects of physical exercise through their enzymatic pathways and to provide information about the potential physiological effects. After the search and selection, only 9 studies out of 1,749 documents were included due to the inclusion and exclusion criteria. Of these, seven emphasized short-term effects, while two evaluated long-term effects on the oxylipin profile. In conclusion, several oxylipins with biomodulatory functions mainly related to inflammation, cardiovascular function, and tissue adaptation and regeneration, were mobilized especially as a consequence of the short-term effects of physical exercise, under the influence of the intensity and duration of physical exercise. The long-term effects of physical exercise on the levels of different oxylipins were minimal and related to different functions. *Study 2* investigated, in an integrated manner, the timecourse of variables of the human metabolome and variables related to CAM and CRF in aging, in different age groups considering apparently healthy individuals. The individuals aged 20 to 70 years were divided into five age groups (20-29, 30-39, 40-49, 50-59, and 60-70 years) and submitted to blood collection, cardiac autonomic evaluation and cardiopulmonary exercise test, for metabolomics, CAM and CRF analysis, respectively. Tukey's post hoc and effect size with the confidence interval were used for all metabolites and significant variables in the one-way ANOVA model, with $p < 0.01$, and principal component analysis (PCA) on the significant variables for the integrated study. Significant changes were observed in the 60-70 age group, where CRF, BCAAs (valine, leucine and isoleucine), 3-hydroxyisobutyrate and CAM were found to be significantly reduced, while hippuric acid was significantly elevated compared to younger groups (especially for the 20-29 and 30-39 age groups). Hippuric acid, CAM and CRF variables, and BCAAs were the main responsible for age group distinction as highlighted in the PCA. In conclusion, the results suggest significant changes in metabolism, CAM, and CRF, after the age of sixty as a consequence of the aging process, however, with some changes in the metabolic profile that may be favorable in mitigating the deleterious effects of aging. This thesis showed the complexity of the interrelation between metabolism and some systems of the body in an integrated manner in the context of natural stressors of the body such as physical exercise and aging. Such information is important considering the necessity for a less fragmented understanding of human physiology.

Keywords: Aging, Cardiorespiratory Fitness, Metabolomics, Physical Exercise, Heart Rate.

LISTA DE FIGURAS

Estudo 1

- Figura 1.** Resultados do fluxograma de revisão.57
- Figura 2.** Vias lipídicas e metabólitos relacionados ao exercício físico.....64

Estudo 2

- Figura 1.** Ilustração da execução do teste de exercício cardiopulmonar em esteira ergométrica, no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, e do protocolo utilizado.85
- Figura 2.** Ilustração da execução da avaliação autonômica cardíaca e do processamento e análise dos dados, no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar.86
- Figura 3.** Ilustração do processamento e análise das amostras pela técnica analítica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar.88
- Figura 4.** Ilustração do processamento e análise das amostras pela técnica analítica de cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS), no Laboratório SEPARARE do Departamento de Química da UFSCar.....91
- Figura 5.** Procedimento para a conversão dos valores originais em escore Z.....92
- Figura 6.** Fluxograma de perdas.94
- Figura 7.** Diferenças entre as faixas etárias relativizadas à faixa etária mais jovem..... 102
- Figura 8.** Análise de componentes principais com as variáveis significantes..... 103
- Figura 9.** Dados apresentados por valores médios do escore Z de cada faixa etária para cada variável.....104

LISTA DE TABELAS

Estudo 1

Tabela 1. Estratégia PICOS	54
Tabela 2. Definição de pontuação ajustada para avaliação da qualidade dos estudos de lipidômica.....	56
Tabela 3. Classificações dos estudos de acordo com o sistema de pontuação da Tabela 2.....	58
Tabela 4. Características dos estudos	59
Tabela 5. Oxilipinas medidas em cada estudo como efeito do exercício físico, com suas respectivas magnitudes de mudança.....	61

Estudo 2

Tabela 1. Características dos participantes.....	95
Tabela 2. Exames bioquímicos dos participantes.....	96
Tabela 3. Controle autonômico cardíaco e ACR em diferentes faixas etárias.....	98
Tabela 4. Variáveis metabólicas significativas entre as faixas etárias.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

10E,12Z-CLA	Ácido 10E,12Z-octadecadienóico
11- β -PGF _{2α}	11 β -prostaglandina F _{2α}
12-oxo-LTB ₄	12-oxo-leucotrieno B ₄
13,14-dihydro-15-keto-PGE ₂	13,14-dihidro-15-ceto prostaglandina E ₂
15d-D12,14-PGJ ₃	15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J ₃
15-keto-PGE ₂	15-ceto-prostaglandina E ₂
15-keto-PGF _{2α}	15-ceto-prostaglandina F _{2α}
15R-LXA ₄	15R-lipoxina A ₄
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
20-COOH-AA	Ácido 20-carboxi-araquidônico
20-COOH-LTB ₄	20-carboxi-leucotrieno B ₄
ω -3	Ômega-3
ω -6	Ômega-6
6-keto-PGF _{1α}	6-ceto-prostaglandina F _{1α}
AA	Ácido araquidônico
AAd	Ácido adrênico
ACR	Aptidão cardiorrespiratória
AD	Ácido docosahexaenóico
AD γ L	Ácido dihomo- γ -linolênico
AE	Ácido eicosapentaenóico
Água Milli-Q	Água ultrapura

AL	Ácido linoleico
ANOVA <i>one way</i>	Análise de variância de uma via
A α L	Ácido α -linoleico
BCAAs	Aminoácidos de cadeia ramificada
COX	Enzimas ciclooxigenases
CT	Colesterol total
CV	Coefficiente de variação
CYP	Enzimas citocromo P450
D ₂ O	Água deuterada
dh-PGE ₂	Dihomo-prostaglandina E ₂
DiHD ₀ HE	Ácido dihidróxi-docosaheptaenóico
DiHDPE	Ácido dihidróxi-docosapentaenóico
DiHETE	Ácido dihidróxi-eicosatetraenóico
DiHETrE	Ácido dihidróxi-eicosatrienóico
DiHOME	Ácido dihidróxi-octadecenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiograma
EpDPE	Ácido epóxi-docosapentaenóico
EpETE	Ácido epóxi-eicosatetraenóico
EpETrE	Ácido epóxi-eicosatrienóico
EpOME	Ácido epóxi-octadecenóico
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares

ES	Tamanho de efeito
ES _d	Tamanho de efeito considerando d de Cohen
ESI	Ionização por eletropulverização
eV	Elétron-volt
<i>g</i>	Força gravitacional
G ₂₀₋₂₉	Grupo de pessoas com idade entre 20 e 29 anos
G ₃₀₋₃₉	Grupo de pessoas com idade entre 30 e 39 anos
G ₄₀₋₄₉	Grupo de pessoas com idade entre 40 e 49 anos
G ₅₀₋₅₉	Grupo de pessoas com idade entre 50 e 59 anos
G ₆₀₋₇₀	Grupo de pessoas com idade entre 60 e 70 anos
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
g·mol ⁻¹	Gramas por mol
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDoHE	Ácido hidróxi-docosahexaenóico
HEPE	Ácido hidróxi-eicosapentaenóico
HETE	Ácido hidróxi-eicosatetraenóico
HETrE	Ácido hidróxi-eicosatrienóico
HF	Banda de alta frequência
HHTrE	Ácido hidróxi-heptadecatrienóico
HMDB	<i>The human metabolome database</i>
HODE	Ácido hidróxi-octadecadienóico
HOTrE	Ácido hidróxi-octadecatrienóico

HPC	Calibração de alta precisão
HpDoHE	Ácido hidroperoxi-docosaheptaenóico
HpEPE	Ácido hidroperoxi-eicosapentaenóico
HpETE	Ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico
HpETrE	Ácido hidroperoxi-eicosatrienóico
HpODE	Ácido hidroperoxi-octadecadienóico
HpOTrE	Ácido hidroperoxi-octadecatrienóico
Hz	Hertz
IC 99%	Intervalo de confiança no nível de confiança de 99%
IMC	Índice de massa corpórea
Iso	Isoprostano
IsoPs	Isoprostanos
K	Kelvin
kDa	Quilodalton
km/h	Quilômetro por hora
LC-HRMS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LF	Banda de baixa frequência

LF/HF	Balanco simpato-vagal
LFCV	Laboratório de fisioterapia cardiovascular
L·min ⁻¹	Litros por minuto
LOX	Enzimas lipoxigenases
LPMN	Leucócito polimorfonuclear
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MHz	Mega-hertz
min	Minuto
mL/min ⁻¹	Mililitros por minuto
mm	Milímetro
mmol·L ⁻¹	Milimol por litro
MoTrPAC	<i>Molecular Transducers of Physical Activity in Humans Consortium</i>
MS	Espectrômetro de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico

NMDAR	N-Metil-D-Aspartato
OPLS-DA	Análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais
oxo-ETE	Ácido oxo-eicosatetraenóico
oxo-ODE	Ácido oxo-octadecadienóico
PC	Período cardíaco
PCA	Análise de componentes principais
PCRus	Proteína C reativa ultrasensível
PD ₁	Protectina D ₁
PG	Prostaglandina
PGDM	Metabólito da prostaglandina D
PGFM	Metabólito da prostaglandina F
PICOS	<i>Population Intervention Comparator Outcome Design</i>
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLS-DA	Análise discriminante de mínimos quadrados parciais
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
QC	Controle de qualidade
QqTOF-MS	Analisador de massa híbrido tipo quadruplo-tempo de voo
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância magnética nuclear

Rv	Resolvina
s	Segundo
SNA	Sistema nervoso autonômico
SPM	Mediador lipídico pró-resolutivo
StArt	<i>State of the Art through Systematic Review</i>
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TECP	Teste de exercício cardiopulmonar
tetranor-PGDM	Metabólito de tetranor-prostaglandina D
tetranor-PGEM	Metabólito de tetranor-prostaglandina E
TMSP-d4	Ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetradeutero propiônico
TX	Tromboxano
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem
UPLC-QqQ-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo em tandem
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VO ₂	Consumo de oxigênio
VO ₂ PICO	Consumo de oxigênio pico
σ^2_{PC}	Variância dos períodos cardíacos

Conteúdo

PREFÁCIO	24
CONTEXTUALIZAÇÃO	38
OBJETIVOS	44
1 Geral	44
1.1. <i>Específicos</i>	44
1.1.1. <i>Estudo 1</i>	44
1.1.2. <i>Estudo 2</i>	44
ESTUDO 1	52
1 Introdução	52
2 Materiais e Métodos	53
2.1. <i>Estratégia de Busca</i>	53
2.2. <i>Critério de Inclusão e Exclusão</i>	54
2.3. <i>Extração de Dados</i>	55
2.4. <i>Avaliação da Qualidade dos Estudos</i>	55
3 Resultados	56
4 Discussão	66
4.1. <i>Formação de Oxilipinas Relacionada ao Exercício</i>	66
4.2. <i>Matriz</i>	71
4.3. <i>Limitações</i>	71
5 Conclusão	72
6 Referências	73
ESTUDO 2 – Com inclusão de ilustrações	78
1 Introdução	78
2 Métodos	81
2.1. <i>Participantes</i>	81
2.2. <i>Desenho experimental</i>	82
2.2.1. <i>Amostras de sangue</i>	82
2.2.2. <i>Avaliação da modulação autonômica cardíaca</i>	83
2.2.3. <i>Teste de exercício cardiopulmonar (TECP)</i>	84
2.3. <i>Processamento de dados autonômicos</i>	85
2.4. <i>Análise metabolômica</i>	87
2.4.1. ¹ H RMN	87
2.4.2. LC-HRMS	88
2.5. <i>Score Z</i>	92

2.6. <i>Análise estatística</i>	93
3 Resultados	93
3.1. <i>Influência do sexo e IMC</i>	94
3.2. <i>Testes bioquímicos</i>	95
3.3. <i>MAC e ACR</i>	97
3.4. <i>Metabolômica</i>	99
3.5. <i>PCA</i>	102
4 Discussão	104
5 Conclusão	110
6 Referências	111
CONSIDERAÇÕES FINAIS E DESDOBRAMENTOS FUTUROS	116
ANEXO A: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO – ESTUDO 1	118
ANEXO B: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO – ESTUDO 2	119
ANEXO C: TABELA COM TODOS OS COMPOSTOS DETECTADOS DO ESTUDO 2	120

PREFÁCIO

Esta tese foi desenvolvida pelo aluno Éttore De Favari Signini sob orientação da Profa. Aparecida Maria Catai e sob coorientação da Profa. Regina Vincenzi Oliveira, sendo a primeira vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia (PPGFT; conceito 7 CAPES), no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular (LFCV) do Departamento de Fisioterapia (DFisio) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), e a segunda ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ; conceito 7 CAPES), no Núcleo de Pesquisa em Cromatografia (SEPARARE) do Departamento de Química (DQ) da UFSCar. A tese vincula-se a linha de pesquisa “Fisioterapia Cardiovascular, Respiratória, Fisiologia do Exercício e Desempenho Funcional” do PPGFT.

A tese foi originalmente planejada para investigar as diferenças existentes entre o processo de envelhecimento ativo e sedentário no metabolismo, na modulação autonômica cardiovascular, e na aptidão cardiorrespiratória, em homens aparentemente saudáveis de 20 a 70 anos, avaliado em faixas etárias. Esse projeto ajudaria a esclarecer diversas questões da área, especialmente devido ao uso da metabolômica como ferramenta para o estudo do metabolismo. Como resultado esperado, tal projeto poderia contribuir no desenvolvimento de estratégias públicas de saúde para um envelhecimento mais saudável com a identificação de moléculas com um potencial para serem classificadas como biomarcadores do envelhecimento saudável e com a determinação de uma faixa etária onde há alterações marcantes na fisiologia do organismo (um marco temporal onde a implementação de intervenções pudesse ser melhor indicada).

Após a aprovação do projeto no exame de qualificação (Dezembro de 2018) e a aprovação do doutorado-direto (DD) por meio de pedido ao PPGFT (Janeiro de 2019), foi obtida uma bolsa DD da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Logo após, foi iniciado um estudo por meio de uma revisão sistemática da literatura sobre a relação da metabolômica com o exercício físico com o objetivo de obter um maior esclarecimento sobre o efeito do exercício no metaboloma humano. Entretanto, considerando a existência de outro estudo no laboratório com abordagem semelhante (SAKAGUCHI et. al., 2019) e, considerando que o estudo dos mediadores lipídicos seria algo inédito e interessante para o presente projeto em decorrência das relações que esses metabólitos possuem com o processo inflamatório (algo muito

observado durante o envelhecimento), iniciou-se a elaboração do estudo considerando a lipidômica (uma subárea da metabolômica) como ferramenta utilizada para a avaliação do efeito do exercício físico sobre o metabolismo. Tal estudo originou um manuscrito que após retornar de um periódico científico (Setembro de 2019), contou com a colaboração do Prof. David C. Nieman (experiente na área de imunologia do exercício e nutrição; professor da *Appalachian State University* e diretor do *Human Performance Laboratory* na mesma universidade, Carolina do Norte, EUA). A colaboração se consolidou a partir da visita do professor no Lab de FT Cardiovascular em Outubro de 2019. Assim, após várias discussões e reflexões o manuscrito foi modificado, alterando o foco de estudo para as oxilipinas (uma subclasse dos mediadores lipídicos) devido a importância regulatória que esses metabólitos possuem em diversos processos fisiológicos no organismo, tais como inflamação, função cardiovascular e renal, e estresse oxidativo. Assim, em 25 de Junho de 2020 foi publicado o primeiro artigo da tese no periódico *Metabolites*.

Concomitantemente com a escrita do primeiro manuscrito, foi executado o protocolo experimental do projeto original, com a realização da coleta de sangue, avaliação autonômica cardíaca, e mensuração da aptidão cardiorrespiratória de homens ativos e sedentários. Entretanto, devido à pandemia da COVID-19 (março de 2020), as coletas precisaram ser suspensas até que houvesse a permissão do retorno pelo Núcleo Executivo de Vigilância em Saúde (NEVS) da UFSCar (que ocorreu apenas ao final de Setembro de 2021), comprometendo o cronograma inicial. Além disso, vale ressaltar que as amostras coletadas não podiam ser processadas sem que o número de amostras (n) estivesse completo devido à variabilidade instrumental pertinente ao espectrômetro de massas e, adicionalmente, o aluno tinha prazo de defesa previsto para Fevereiro de 2022 (postergado em Março para Dezembro/2022). Assim, não foi possível finalizar a coleta de dados e nem a realização do estágio de pesquisa no exterior com o professor David C. Nieman (algo pré-estabelecido pelos grupos de pesquisa durante sua visita ao LFCV/SEPARARE/Laboratório de RMN-UFSCar).

Considerando a existência de amostras de soro sanguíneo de participantes de dois projetos anteriores do laboratório (com dados de modulação autonômica cardíaca e de aptidão cardiorrespiratória) e a necessidade da realização do segundo estudo da tese, optou-se por realizar a análise metabólica por meio da metabolômica nessas amostras pré-existentes. Entretanto, devido o propósito divergente dos estudos anteriores do

laboratório com o propósito original do presente estudo, os indivíduos avaliados não foram separados em grupo ativo e sedentário (sendo a maioria dos participantes classificados com indivíduos não treinados). Assim, a presente tese passou por algumas modificações e o segundo estudo procurou ver por meio de diferentes faixas etárias o comportamento de variáveis metabólicas (por meio da metabolômica), autonômicas, e de aptidão cardiorrespiratória de maneira integrada em homens e mulheres aparentemente saudáveis de 20 a 70 anos sem considerar os grupos ativo e sedentário. O estudo em questão foi publicado no periódico *Scientific Reports*, em 09/12/2022.

Atividades realizadas no período (2018-2022)

Artigos completos publicados ou aceitos para publicação em periódicos

1. **SIGNINI, ÉTORE DE F.; CASTRO, ALEX; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; MILLAN-MATTOS, JULIANA C.; DE OLIVEIRA, JULIANA M.; MINATEL, VINICIUS; PANTONI, CAMILA B. F.; DE ARAÚJO, HELOISA S. S.; FABRIZZI, FERNANDO; PORTA, ALBERTO; FERREIRA, ANTONIO G.; OLIVEIRA, REGINA V.; CATAI, APARECIDA M.** *Integrative perspective of the healthy aging process considering the metabolome, cardiac autonomic modulation and cardiorespiratory fitness evaluated in age groups. Scientific Reports*, v.12, p. 1-12, 2022. (fator de impacto: 4,996).
2. **SIGNINI, ÉTORE DE F.; NIEMAN, DAVID C.; SILVA, CLAUDIO D.; SAKAGUCHI, CAMILA A.; CATAI, APARECIDA M.** *Oxylipin Response to Acute and Chronic Exercise: A Systematic Review. Metabolites*, v. 10, p. 264, 2020. (fator de impacto: 5,581).
3. **CASTRO, ALEX; SIGNINI, ÉTORE DE F.; DE OLIVEIRA, JULIANA M.; LEAL, MARIA C. B. D. M.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; MILLAN-MATTOS, JULIANA C.; MINATEL, VINICIUS; PANTONI, CAMILA B. F.; OLIVEIRA, REGINA V.; CATAI, APARECIDA M.; FERREIRA, ANTONIO G.** *The Aging Process: A Metabolomics Perspective. MOLECULES*, v. 27, p. 1-17, 2022. (fator de impacto: 4,927)

4. ABREU, RAPHAEL M.; PORTA, ALBERTO; REHDER-SANTOS, PATRICIA; CAIRO, BEATRICE; SAKAGUCHI, CAMILA A.; DA SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; MILAN-MATTOS, JULIANA C.; CATAI, APARECIDA M. *Cardiorespiratory coupling strength in athletes and non-athletes. **Respiratory Physiology & Neurobiology***, v. 305, p. 103943, 2022. (fator de impacto: 2,821)
5. CAIRO, BEATRICE; ABREU, RAPHAEL M.; BARI, VLASTA; GELPI, FRANCESCA; DE MARIA, BEATRICE; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; CATAI, APARECIDA M.; PORTA, ALBERTO. *Optimizing phase variability threshold for automated synchrogram analysis of cardiorespiratory interactions in amateur cyclists. **Philosophical Transactions of the Royal Society A-Mathematical Physical and Engineering Sciences***, v. 379, p. 1, 2021. (fator de impacto: 4,019)
6. SAKAGUCHI, CAMILA A.; NIEMAN, DAVID C., **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; ABREU, RAPHAEL M.; SILVA, CLAUDIO D.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA.; CAROSIO, MARIA G.; MARIA, ROBERTA M.; DATO, CARLA C.; DE ARAÚJO, HELOISA S. S.; VENÂNCIO, TIAGO; FERREIRA, ANTONIO G.; CATAI, APARECIDA M. *Chronic influence of inspiratory muscle training at diferent intensities on the serum metabolome. **Metabolites***, v. 10, p. 78, 2020. (fator de impacto: 5,581)
7. ABREU, RAPHAEL M.; CATAI, APARECIDA M.; REHDER-SANTOS, PATRICIA; CAIRO, BEATRICE; SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUCHI, CAMILA A.; PORTA, ALBERTO. *A transfer entropy approach for the assessment of the impact of inspiratory muscle training on the cardiorespiratory coupling of amateur cyclists. **Frontiers in Physiology***, v. 11, p. 1-12, 2020. (fator de impacto: 4,755)
8. REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SILVA, CLAUDIO D.; SAKAGUCHI, CAMILA A.; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. *Moderate and High-Intensity inspiratory muscle*

training equally improves inspiratory muscle strength and endurance: a double-blind randomized controlled trial. International Journal of Sports Physiology and Performance, p. 1-9, 2020 (fator de impacto: 4,211).

9. SAKAGUCHI, CAMILA A.; NIEMAN, DAVID C., **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; ABREU, RAPHAEL M.; CATAI, APARECIDA M. *Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review. Metabolites*, v. 9, p. 164, 2019 (fator de impacto: 5,581).
10. ABREU, RAPHAEL M.; PORTA, ALBERTO; REHDER-SANTOS, PATRICIA; CAIRO, BEATRICE; SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUCHI, CAMILA A.; CATAI, APARECIDA M. *Effects of inspiratory muscle training intensity on cardiovascular control in amateur cyclists. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 317, p. R891-R902, 2019. (fator de impacto 3,210)
11. REHDER-SANTOS, PATRICIA; MINATEL, VINICIUS; MILAN-MATTOS, JULIANA C.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; ABREU, RAPHAEL M.; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. *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, p. 1-11, 2019. (fator de impacto: 2,049)

Resumos publicados em anais de congressos ou em periódicos

1. **SIGNINI, ÉTORE F.**; CASTRO, ALEX; REHDER-SANTOS, PATRICIA; MILAN-MATTOS, JULIANA C; MINATEL, VINICIUS; PANTONI, CAMILA B. F.; PORTA, ALBERTO; FERREIRA, ANTONIO G.; OLIVEIRA, REGINA V.; CATAI, APARECIDA M. Relationship between serum metabolites and cardiac autonomic modulation in apparently healthy individuals: a metabolomics approach. *Europhysiology 2022, 2022, Copenhagen. Abstracts of the Europhysiology 2022, Acta Physiologica, 2022, v. 236, p. 968-969.*

2. **SIGNINI, ÉTORE F.**; CASTRO, ALEX; REHDER-SANTOS, PATRICIA; MILAN-MATTOS, JULIANA C; MINATEL, VINICIUS; PANTONI, CAMILA B. F.; FERREIRA, ANTONIO G.; OLIVEIRA, REGINA V.; CATAI, APARECIDA M. Relação entre a complexidade da variabilidade dos períodos cardíacos e o nível sérico de aminoácidos de cadeia ramificada. 42º congresso da SOCESP, 2022, São Paulo, *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2022, v. 32 (2B), p.213.
3. **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; MARCONDES, ANA CAROLINA A.; RIBEIRO, BRUNO A.; MINATEL, VINICIUS; MILAN-MATTOS, JULIANA C.; CARNEIRO, RENATO L.; CATAI, APARECIDA M. Inspiratory muscle metaboreflex during a progressive inspiratory threshold loading test. *European Respiratory Society international congress 2021*, Barcelona. *European Respiratory journal*, 2021, v. 58, p. PA2210.
4. **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; MILAN-MATTOS, JULIANA C.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; SILVA, CLAUDIO D.; MINATEL, VINICIUS; PANTONI, CAMILA B. F.; GALDINO, GABRIELA A. M.; CATAI, APARECIDA M. Análise simbólica univariada do controle autonômico cardiovascular em resposta a mudança postural, durante o processo de envelhecimento. 41º congresso da SOCESP, 2021, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2021, v. 31, p. 220.
5. **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUCHI, CAMILA A.; ABREU, RAPHAEL M.; SILVA, CLAUDIO D.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; DATO, CARLA C.; CAROSIO, MARIA G. A.; MARIA, ROBERTA M.; NIEMAN, DAVID C.; VENÂNCIO, TIAGO; FERREIRA, ANTONIO G.; CATAI, APARECIDA M. Chronic influence of inspiratory muscle training at different intensities on the serum metabolome. *ACSM's 67th Annual Meeting*, 2020, California. *Official Journal of the American College of Sports Medicine*, 2020, v. 52, p. 694.

6. **SIGNINI, ETORE DE F.**; REHDER-SANTOS, P.; ABREU, RAPHAEL M.; SAKAGUSHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; DATO, CARLA. C.; CATAI, APARECIDA 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. 40º congresso da SOCESP, 2019, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2019, v. 29, p. 279.
7. **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; SILVA, ESTER; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. Contribuição dos sistemas cardiovascular, respiratório e metabólico para a manutenção do trabalho mecânico inspiratório externo, durante um teste de resistência muscular respiratória incremental. XIX Simpósio Internacional de Fisioterapia Cardiorrespiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2018, Manaus. *ASSOBRAFIR*, 2018, v. 9, p. 149.
8. **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; SAKAGUSHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. Relação entre as variáveis cardiovasculares, ventilatórias e metabólicas, com o trabalho mecânico inspiratório externo durante um teste de resistência muscular respiratória incremental. 39º congresso da SOCESP 2018, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2018, v. 28, p. 279.
9. ABREU, RAPHAEL M.; PORTA, ALBERTO; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; MILAN-MATTOS, JULIANA C.; CAIRO, BEATRICE; SAKAGUSHI, CAMILA A.; CATAI, APARECIDA M. Cardiorespiratory Coupling is Associated with Exercise Capacity in Athletes. *2022 12th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)*, 2022, Štrbské Pleso. *2022 12th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)*, 2022, p. 1.

10. MILAN-MATTOS, JULIANA C.; PERSEGUINI, NATÁLIA M.; VERLENGIA, R.; ABREU, RAPHAEL M.; MINATEL, VINICIUS; REHDER-SANTOS, PATRICIA; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; TAKAHASHI, ANIELLE C.M.; SANTANA-LEMONS, B.A.; CALADO, R.T.; PORTA, ALBERTO; CATAI, APARECIDA M. Effects of senescence on cardiac autonomic modulation and telomere length. *2022 12th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)*, 2022, Štrbské Pleso. *2022 12th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)*, 2022, p. 1.
11. CASTRO, ALEX; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; MILAN-MATTOS, JULIANA C.; OLIVEIRA, JULIANA M.; MINATEL, VINICIUS; PANTONI, CAMILA B. F.; OLIVEIRA, REGINA V.; CATAI, APARECIDA M.; FERREIRA, ANTONIO G. The Aging Process: A Metabolomics Perspective. *Europhysiology 2022*, 2022, Copenhagen. *Abstracts of the Europhysiology 2022*, Acta Physiologica, 2022, v. 236, p. 84-85.
12. ZAMBETTA, RAFAELLA M.; OLIVEIRA, LEONARDO B.; OCAMOTO, GABRIELA N.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SANTOS, THAINA C. R.; CATAI, APARECIDA M.; VILELA, GUSTAVO H. F.; RUSSO, THIAGO L. Efeito da inclinação negativa da cabeça sobre a morfologia da pressão intracraniana e o controle autonômico cardíaco. 42º congresso da SOCESP, 2022, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2022, v. 32, p. 210.
13. OLIVEIRA, ISABELA E. G.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; SILVA, CLAUDIO D.; MINATEL, VINICIUS; CATAI, APARECIDA M. Potência Circulatória e Ventilatória de homens de meia idade com diferentes níveis de aptidão cardiorrespiratória. 42º congresso da SOCESP, 2022, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2022, v. 32, p. 213.
14. MENDES-ZAMBETTA, RAFAELLA; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; OCAMOTO, GABRIELA N.; SEYEDMADANI, KIMIA; CATAI, APARECIDA M.; RUSSO, THIAGO L. Weightlessness effects in cardiovascular system: a systematic review. *14th Wernher von Braun Memorial Symposium*, 2021, Virtual.

15. ABREU, RAPHAEL M.; PORTA, ALBERTO; REHDER-SANTOS, PATRICIA; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; MILAN-MATTOS, JULIANA; CAIRO, BEATRICE; DE MARIA, BEATRICE; VAINI, EMANUELE; BARI, VLASTA; CATAI, APARECIDA M. Cardiovascular coupling during postural challenge in athletes and non-athletes. *2020 11th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)*, 2020, Pisa. **2020 11th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)**, 2020, p. 1.
16. CAIRO, BEATRICE; ABREU, RAPHAEL M.; BARI, VLASTA; DE MARIA, BEATRICE; VAINI, EMANUELE; REHDER-SANTOS, PATRICIA; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; CATAI, APARECIDA M.; PORTA, ALBERTO. Effects of inspiratory muscle training and postural challenge on cardiorespiratory coupling in amateur athletes. *2020 11th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)*, 2020, Pisa. **2020 11th Conference of the European Study Group on Cardiovascular Oscillations (ESGCO)**, 2020, p. 1.
17. REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; CATAI, APARECIDA M. Pressão inspiratória crítica apresentou melhores resultados para a melhora da força e resistência muscular inspiratória após o treinamento muscular inspiratório. 40º congresso da SOCESP, 2019, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2019, v. 29, p. 281.
18. MARCONDES, ANA CAROLINA A.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; SILVA, CLAUDIO D.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; MINATEL, VINICIUS; CATAI, APARECIDA M. Avaliação do comportamento da frequência cardíaca à medida de pressão inspiratória máxima. 40º Congresso da SOCESP, 2019, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2019, v. 29, p. 282.

19. OLIVEIRA, REGINA V.; SILVA, CLEITON L.; SAKAGUCHI, CAMILA A.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; CATAI, APARECIDA M. Systematic Optimization of Analytical Procedures for the Untarget Metabolomics Profiling of Human Plasma for Analysis of Inspiratory Muscle Training in Healthy Men. 30th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019. *30th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
20. ABREU, RAPHAEL. M.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUSHI, CAMILA. A.; SILVA, CLAUDIO. D.; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. Efeitos do treinamento muscular inspiratório sobre o controle autonômico cardíaco de ciclistas recreacionais. 39º Congresso da SOCESP 2018, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2018, v. 28, p. 318.
21. SILVA, CLAUDIO D.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; SAKAGUCHI, CAMILA A.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. Respostas da frequência cardíaca à diferentes intensidades de treinamento muscular inspiratório em ciclistas recreacionais: estudo clínico e randomizado. 39º Congresso da SOCESP 2018, 2018, São Paulo. *Suplemento da Revista da SOCESP*, 2018, v. 28, p. 323.
22. REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. Médias e altas intensidades de treinamento muscular inspiratório impactam as respostas da resistência e força muscular respiratória em ciclistas recreacionais - estudo clínico randomizado e controlado. 19º Simpósio Internacional de Fisioterapia Cardiorrespiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2018, Manaus. *ASSOBRAFIR*, 2018, v. 9, p. 208-209.
23. REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; ABREU, RAPHAEL M.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUCHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; DATO, CARLA C.; ANICETO, ISABELA A.V.; CATAI, APARECIDA M. A intensidade de treinamento muscular inspiratório interfere na melhora do desempenho físico de

ciclistas recreacionais? Estudo randomizado e controlado. 19º Simpósio Internacional de Fisioterapia Cardiorrespiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2018, Manaus. *ASSOBRAFIR*, 2018, v. 9, p. 101-102.

24. ABREU, RAPHAEL M.; REHDER-SANTOS, PATRÍCIA; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SAKAGUSHI, CAMILA A.; SILVA, CLAUDIO D.; DATO, CARLA C.; CATAI, APARECIDA M. Effects of inspiratory muscle training on cardiac autonomic control. *European Respiratory Society international congress 2018*, Paris. *European Respiratory journal*, 2018, v. 52, p. 1450.

Outros congressos

1. OLIVEIRA, JULIANA M.; LOPES, THAIS DE A.; CASTRO, ALEX; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; CRESCENTE, JULIANA G.; CATAI, APARECIDA M.; CANÇADO, EDUARDO LUIZ R.; OLIVEIRA, REGINA V. Untargeted Metabolomics Profiling of Plasma and Urine from Patients with Primary Biliary Cholangitis. III Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry 2022, Rio de Janeiro, Brasil, 10 a 15 de Dezembro de 2022.
2. CASTRO, ALEX; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; OLIVEIRA, JULIANA M.; LEAL, MARIA CAROLINA B.D.M; REHDER-SANTOS, PATRICIA; MILLAN-MATTOS, JULIANA C.; MINATEL, VINICIUS; PANTONI, CAMILA B.F.; OLIVEIRA, REGINA V.; CATAI, APARECIDA M.; FERREIRA, ANTONIO G. Regulação metabólica com o envelhecimento: um estudo metabolômico baseado em RMN e UHPLC-HRMS. XVII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética 2022, Fortaleza, Brasil, 22 a 25 de Novembro de 2022.
3. MENDES-ZAMBETTA, RAFAELLA; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; SANTOS, THAINA CR; OLIVEIRA, LEONARDO B; OCAMOTO; MICHALISKI, ELOISA S; OCAMOTO, GABRIELA N; CATAI, APARECIDA M; VILELA, GUSTAVO HF; RUSSO, THIAGO L. Is the ICP pulse waveform P2/P1 ratio during -6° head-down tilt associated with relative VO₂MAX? The XVIII

International Symposium on Intracranial Pressure and Brain Monitoring (ICP 2022), 2022, Cidade do Cabo, Africa do Sul, 14 a 18 de Novembro de 2022.

Revisor de periódico

Periódico: *Frontiers in Public Health*
 Qualis CAPES: A2
 Fator de Impacto: 6,461
 Período: 2022 – Atual

Periódico: *Experimental Gerontology*
 Qualis CAPES: A2
 Fator de Impacto: 4,253
 Período: 2022 – Atual

Formação acadêmica

Tipo: Especialização em Curso de Especialização em Fisiologia do Exercício

Período: 2018-2019

Instituição: Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

Título da monografia: Efeitos da atividade física na lipidômica humana: uma revisão sistemática.

Orientador: Aparecida Maria Catai.

Formação complementar

Curso: Fundamentos e Aplicações da Metabolômica 2020
 Carga horária: 36h
 Instituto: Universidade Federal da Bahia e Universidade de São Paulo

Curso: *Immunosenescence* 2019
 Carga horária: 30h
 Instituto: Universidade Federal de São Paulo

Curso: *Lifestyle diseases and risk reduction strategies* 2019
 Carga horária: 8h
 Instituto: Universidade Federal de São Carlos

Curso: Escrita Científica
Carga horária: 24h
Instituto: Universidade Federal de São Carlos

2018

Palestras proferidas

Palestra intitulada "**Alterações cardiometabólicas no envelhecimento**" para os alunos da disciplina FF191A - Envelhecimento e Atividade Física do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Estadual de Campinas, 2022.

Palestra intitulada "**O Processo de Envelhecimento Ativo e Sedentário**" para os alunos de graduação dos cursos de Fisioterapia, Educação Física, e Biomedicina da Universidade Anhanguera de Santo André, 2022.

Bancas de trabalho de conclusão

1. MENDES, RENATA. G.; CASTELLO-SIMÕES, VIVIANE; **SIGNINI, ÉTORE DE F.** Participação em banca de Letícia Menegalli Santos. Marcadores de potência circulatória e ventilatória em pacientes com diabetes mellitus: influência do controle glicêmico. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia)** - Universidade Federal de São Carlos, 2022.
2. CATAI, APARECIDA M.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; LINARES, STEPHANIE N. Participação em banca de Giovana Lissa Alexandre Sanches. Modelagem da aptidão aeróbica por técnicas de inteligência artificial durante exercício físico dinâmico em humanos. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia)** - Universidade Federal de São Carlos, 2021.
3. MENDES, RENATA. G.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; MONTEIRO, CLARA I. Participação em banca de Gabriel de Andrade Souza. Modulação autonômica cardíaca e capacidade cardiorrespiratória de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia)** - Universidade Federal de São Carlos, 2019.
4. RUSSO, THIAGO. L.; **SIGNINI, ÉTORE DE F.**; OCAMOTO, GABRIELA N. Participação em banca de Acon Gustavo da Silva Oliveira. Associação entre comportamento sedentário e resposta da cinética do consumo de oxigênio na transição on e off durante o teste de caminhada de seis minutos em indivíduos pós- acidente vascular cerebral. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia)** - Universidade Federal de São Carlos, 2019.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1394058741261696>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5355-3309>

Descrição da tese para o público leigo:

Essa tese investigou o que se altera nos níveis de moléculas lipídicas específicas com o exercício físico, e o que se altera no metabolismo, na relação existente entre o sistema nervoso e o sistema cardiovascular, e na habilidade que o organismo possui em gerar energia a partir do consumo de oxigênio com o processo de envelhecimento utilizando ferramentas de estudo avançadas em tecnologia e em uma perspectiva integrativa.

CONTEXTUALIZAÇÃO

A prática de exercício físico regular promove diversos efeitos benéficos ao praticante (GRAZIOLI et al., 2017), contrapondo os malefícios decorrentes do comportamento sedentário (BARRY; CAPUTO; KANG, 2018; GRAZIOLI et al., 2017). Alguns dos benefícios compreendem a redução da probabilidade de desenvolvimento de doenças crônicas em todos os sistemas e órgãos ou o auxílio na melhora de quadros clínicos resultantes dessas doenças, redução do risco de morte, auxílio na melhora da condição mental, e promoção de adaptações fisiológicas relacionadas ao aumento do desempenho físico (BARRY; CAPUTO; KANG, 2018; GRAZIOLI et al., 2017; HUGHES; ELLEFSEN; BAAR, 2018; WARBURTON; BREDIN, 2017). Entretanto, a determinação dos ajustes metabólicos ao exercício físico por meio da caracterização concomitante de diversos metabólitos com repercussão sistêmica, e que justificam esses benefícios, ainda não está elucidada, e tem sido foco de estudos apenas na última década (LEWIS et al., 2010; SAKAGUCHI et al., 2019).

Com o avanço tecnológico da bioinformática e de técnicas bioanalíticas como a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear, a análise dos efeitos da prática de exercícios físicos sobre o metabolismo humano por meio do emprego de estratégias metabolômicas tem se expandido (SAKAGUCHI et al., 2019; WALLER et al., 2020). A metabolômica pode ser entendida como uma ciência que procura realizar a descrição analítica de amostras biológicas complexas, com o objetivo de identificar, quantificar e caracterizar o conjunto de metabólitos, os quais se caracterizam por moléculas intermediárias (substratos, cofatores) e produtos do metabolismo com massa molecular menor do que 1.500 *daltons* (GRIFFITHS et al., 2010; NICHOLSON; LINDON, 2008; WALLER et al., 2020). A metabolômica propicia a compreensão de informações biológicas de um sistema (célula, órgão, tecido, biofluido ou organismo), assim como, suas alterações biológicas frente a um processo particular. O conjunto de todos os metabólitos presentes em um sistema biológico é designado de metaboloma e representa de forma direta o fenótipo da amostra (GRIFFITHS et al., 2010; MORRIS et al., 2013; NICHOLSON; LINDON, 2008; WALLER et al., 2020; ZHANG et al., 2018). Assim, a metabolômica é classificada como uma nova ciência “ômica” em complemento a proteômica, transcriptômica, e a genômica, e a mesma permite observar as vias celulares utilizadas para determinados resultados fisiológicos, assim como auxiliar em prognósticos e diagnósticos clínicos à partir da descoberta de

biomarcadores. A utilização da metabolômica apresenta uma relativa vantagem sobre as outras ciências “ômicas” devido à possibilidade de verificar assinaturas bioquímicas (do inglês, *metabolic fingerprinting*), e perfis metabólicos (do inglês, *metabolic profiling*), não somente provindas da genética, mas também provenientes da dieta, tratamentos medicamentosos, estilo de vida e fatores ambientais (CHALECKIS et al., 2016; LAWTON et al., 2008; LUSTGARTEN et al., 2013, 2016; NICHOLSON et al., 2002; RYALS et al., 2007; ZHANG et al., 2018).

Tais características habilitam a metabolômica a observar de maneira fenotípica o efeito de curto e longo prazo do exercício físico sobre o metabolismo tecidual e sistêmico (PECHLIVANIS et al., 2013; SAKAGUCHI et al., 2019; SCHRANNER et al., 2020), tornando-se uma ferramenta valiosa para a compreensão fisiológica e bioquímica do organismo em resposta ao exercício físico. Considerando o efeito de curto prazo, o exercício físico afeta o metaboloma diretamente e indiretamente por meio das duas principais vertentes do metabolismo: o catabolismo e o anabolismo (EGAN; ZIERATH, 2013; NELSON; COX, 2014). O catabolismo predomina durante a prática de exercício físico e possui como objetivo prover substrato para a produção de energia, evidenciando alterações sistêmicas (modulado de acordo com o tipo de exercício e o estado nutricional do sujeito) dos níveis de metabólitos relacionados à produção de energia tais como os intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), aminoácidos, ácidos graxos livres, acetilcarnitinas, piruvato, lactato, glicose, glicerol, corpos cetônicos, e mediadores lipídicos (SAKAGUCHI et al., 2019; SCHRANNER et al., 2020; STANFORD et al., 2018). Por outro lado, o anabolismo ocorre predominantemente após o término da prática de exercício e relaciona-se com processos de reposição dos estoques energéticos e reparação e adaptação tecidual, sendo os metabólitos principalmente relacionados à resolução do processo inflamatório, a síntese proteica, e a produção de substratos energéticos, tais como mediadores lipídicos pró-resolutivos (SPMs), ácidos graxos, e corpos cetônicos (EGAN; ZIERATH, 2013; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; MITMESSER, 2017; SCHRANNER et al., 2020).

Considerando os efeitos a longo prazo do exercício físico (treinamento físico), também é possível observar alterações no metaboloma humano. Tais modificações são observadas durante a prática de exercício (SCHADER et al., 2020) bem como na condição de repouso (LUSTGARTEN et al., 2013; MORRIS et al., 2013). Enquanto os

achados relativos ao metaboloma durante o exercício evidenciam uma menor perturbação metabólica, decorrente de um provável aumento da eficiência da função mitocondrial e das vias bioenergéticas, nos indivíduos mais treinados (SCHADER et al., 2020), os achados relativos ao metaboloma de repouso evidenciaram uma alteração no perfil lipídico e principalmente uma redução dos níveis de aminoácidos no sangue, além de uma alteração favorável no perfil dos metabólitos relacionados à sensibilidade insulínica (como a redução dos níveis de glicerol, glicose, e de aminoácidos de cadeia ramificada - BCAAs) (KELLY; KELLY; KELLY, 2020; LEWIS et al., 2010; LUSTGARTEN et al., 2013; LYNCH; ADAMS, 2014; MORRIS et al., 2013; SCHADER et al., 2020; UM et al., 2013). Entretanto, as alterações do metaboloma decorrentes do treinamento físico (longo prazo) são discretas quando comparadas aos efeitos de curto prazo do exercício (SAKAGUCHI et al., 2019).

Buscando entender melhor sobre os efeitos do exercício físico sobre o metaboloma humano, o nosso grupo de pesquisa realizou uma revisão sistemática intitulada “*Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review*” (SAKAGUCHI et al., 2019). Nesse trabalho foi observado que além das alterações nos níveis de metabólitos em decorrência da realização de exercício físico discutidos anteriormente, a intensidade e a duração do exercício influencia fortemente no número de metabólitos detectados, bem como na magnitude da diferença entre o estado pré- e imediatamente pós-exercício sobre os níveis dos metabólitos. Além disso, foi também verificado que a perturbação metabólica resultante do estresse físico é transiente, evidenciando distúrbios mínimos e com os valores dos metabólitos alterados muito próximos da condição pré-exercício em apenas um dia após o término do exercício, mesmo em condições extenuantes. Tais achados despertaram o interesse em entender sobre a relação entre os efeitos metabólicos de curto e longo prazo decorrentes do exercício físico e as adaptações fisiológicas proporcionadas pela prática de exercício físico.

As adaptações induzidas pelo exercício físico acontecem devido à repetição dos efeitos de curto prazo de maneira equilibrada e com intervalos adequados entre os estresses físicos (NIEMAN; MITMESSER, 2017). Parte das adaptações é governada por metabólitos bioativos, chamados de mediadores lipídicos, que possuem forte influência no processo inflamatório e biomodulação sistêmica (GABBS et al., 2015; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016). Dentro do grupo de

mediadores lipídicos, destacam-se as “oxilipinas”, que são classificadas como ácidos graxos poli-insaturados oxidados derivados do Ômega-3 (ω -3) e Ômega-6 (ω -6), e que participam de processos relacionados à coagulação sanguínea, ativação de células imunes, produção de citocinas, tônus dos vasos sanguíneos e regulação do fluxo sanguíneo, pressão arterial, excreção de sódio, reparação de tecidos lesionados, e adaptação tecidual (DUBOIS et al., 1998; GABBS et al., 2015; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; POWELL; ROKACH, 2015; SERHAN et al., 2015; SHEARER; WALKER, 2018; SHOIEB; EL-SHERBENI; EL-KADI, 2018; SPECTOR; KIM, 2015). Fruto de suas funções biológicas, as oxilipinas têm sido comumente estudadas no contexto do estresse físico de curto prazo, entretanto, alguns estudos também relataram diferenças nos níveis desses metabólitos após semanas de treinamento físico (GARCÍA-FLORES et al., 2018; MEDINA et al., 2012).

Devido à importância biológica das oxilipinas e o avanço tecnológico da bioinformática e de técnicas analíticas como a espectrometria de massas, o estudo do efeito do exercício físico sobre os níveis sistêmico e/ou tecidual desses metabólitos cresceu exponencialmente na última década, sendo a metabolômica a ciência utilizada. Considerando esse contexto, e a necessidade de uma compreensão expandida sobre a relação das oxilipinas com o exercício físico, surgiu o interesse na realização do primeiro estudo dessa tese intitulado: “*Resposta das oxilipinas ao exercício agudo e crônico: uma revisão sistemática*”. Esse estudo foi publicado no periódico *Metabolites* com o título “*Oxylipin Response to Acute and Chronic Exercise: A Systematic Review*” (<https://www.mdpi.com/2218-1989/10/6/264>) (ANEXO A). Tal revisão sistemática teve como propósito sintetizar a dinâmica de geração e consumo de oxilipinas produzidas em resposta ao estresse de curto e longo prazos proporcionados pelo exercício físico, bem como os efeitos dessa dinâmica no organismo.

Considerando o efeito benéfico do exercício físico sobre o perfil metabólico e em processos regulatórios e adaptativos, surgem questionamentos sobre como a prática de exercício físico impacta no perfil metabólico de indivíduos sob influência de diversas condições consideradas patológicas ou fisiológicas. Alguns estudos evidenciaram diferenças no metaboloma entre as condições de pré- e pós-treino em indivíduos obesos, assim como também diferenças no perfil metabólico entre sujeitos saudáveis e com diabetes melitus submetidos ao exercício físico (BRENNAN et al., 2018; BRUGNARA et al., 2012; GRAPOV et al., 2019). Entretanto, pouco se sabe sobre o impacto do

exercício físico no metabolismo na condição do processo natural de envelhecimento, o qual todos os indivíduos estão sujeitos.

O processo de envelhecimento é caracterizado por profundas transformações e alterações de funções em todos os níveis orgânicos, desde órgãos e sistemas a células e organelas (YU et al., 2012). Com a bioquímica celular complexa e constituída por diversas alterações nos níveis de diferentes tipos de moléculas, a metabolômica tem se mostrado uma ferramenta importante para a investigação dessas modificações (HOFFMAN et al., 2017; MENNI et al., 2013; YU et al., 2012). Diversos metabólitos de diferentes classes químicas, como aminoácidos, carboidratos e lipídios, dentre outros, estão associados ao processo de envelhecimento, apresentando comportamentos variados a respeito de seus níveis séricos com o avançar da idade, estando de acordo com os processos que os mesmos se relacionam (JOVÉ et al., 2016; LAWTON et al., 2008; MENNI et al., 2013; SAITO et al., 2016; YU et al., 2012). É possível citar, por exemplo, a redução progressiva da nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD^+) [metabólito intimamente envolvido com a via bioenergética, controle do estresse oxidativo, reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e cofator para proteínas ativadoras de genes de longevidade] e o aumento progressivo da homocisteína (metabólito relacionado com doenças cardiovasculares e processos ateroscleróticos, redução da modulação parassimpática cardíaca, encurtamento de telômeros de células imunes e *inflammaging*) (MENDES et al., 2014; SELHUB, 1999; SPEK et al., 2019; YAKU et al., 2018). Em geral, os metabólitos (que são significativos no processo de envelhecimento) relacionam-se, principalmente, com a alteração da composição da membrana plasmática, a alteração do metabolismo e disfunção mitocondrial, com o processo inflamatório (*inflammaging*) e o estresse oxidativo, porém eles também estão relacionados com diversas outras condições como resultado de múltiplos comprometimentos e limitações de estruturas e processos celulares (CHENG et al., 2015; COLLINO et al., 2013a; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013, 2016; MARTIN; MONTOLIU; KUSSMANN, 2017; REN et al., 2017; YU et al., 2012).

Os metabólitos envolvidos nesse processo comumente refletem a integridade de sistemas orgânicos, como o sistema cardiovascular, o muscular e o nervoso (CANFIELD; BRADSHAW, 2019; COLLINO et al., 2013b; JIANG et al., 2019; SHOIEB; EL-SHERBENI; EL-KADI, 2018). A modulação autonômica cardíaca e o consumo de oxigênio pico ($\text{VO}_{2\text{PICO}}$) são índices que evidenciam a integridade e a

aptidão dos sistemas acima mencionados e são importantes indicativos do estado de saúde e do risco de morte (K WASSERMAN, 2004; PORTA et al., 2014; TASK FORCE, 1996; WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016). No envelhecimento orgânico, observa-se uma redução da modulação parassimpática cardíaca e um aumento da modulação simpática cardíaca, bem como uma redução do VO_{2PICO} , como consequência de alterações como: redução da capacidade de resposta do nó sinusal ao fluxo simpático, modificações morfológicas cardíacas e autonômicas periféricas, alteração da função dos adrenoreceptores, redução de massa muscular e aumento do infiltrado de gordura, prejuízos da função mitocondrial, e alterações morfológicas da caixa torácica e do parênquima pulmonar (PANENI et al., 2017; PORTA et al., 2014; SHARMA; GOODWIN, 2006; TAKAHASHI et al., 2012; TIELAND; TROUWBORST; CLARK, 2018). Tais condições observadas nesses sistemas são estudadas com as modificações verificadas no metabolismo há muito tempo (BENNETT; HOSKING; HAMPTON, 1975; KINGWELL et al., 1994; LUKASKI; BOLONCHUK; KLEVAY, 1989; TOTH et al., 1994, 1996), entretanto, estudos utilizando métodos metabolômicos têm surgido apenas na última década (LAWTON et al., 2008; MATHEW et al., 2019; SAKAGUCHI et al., 2019) e ainda não avaliaram a integração da modulação autonômica cardíaca e do VO_{2PICO} com o metaboloma humano em indivíduos aparentemente saudáveis.

O avanço tecnológico de ferramentas analíticas e de bioinformática, tem propiciado o estudo do metabolismo (por meio da metabolômica) e da modulação autonômica de maneira abrangente. Esse fato é interessante, pois as respostas de ajustes do organismo são complexas e envolvem inúmeros mecanismos regulatórios e metabólicos que ocorrem de maneira integrada e simultânea (K WASSERMAN, 2004; WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016). Posto isso, consideramos que a complexidade do processo de envelhecimento pode ser melhor compreendida com a utilização da metabolômica de maneira integrada com a modulação autonômica cardíaca e a aptidão cardiorrespiratória justamente por possibilitar a investigação abrangente e simultânea de diversos processos fisiológicos envolvidos no envelhecimento.

Considerando os fatos acima expostos, procuramos investigar o impacto do processo de envelhecimento considerando integradamente a modulação autonômica cardíaca, aptidão cardiorrespiratória e o metaboloma do soro sanguíneo. Assim, conduzimos uma investigação intitulada: “*Perspectiva integrativa do processo de*

envelhecimento saudável considerando o metaboloma, modulação autonômica cardíaca e aptidão cardiorrespiratória avaliadas por faixas etárias". Esse estudo foi publicado no periódico *Scientific Reports* com o título "*Integrative perspective of the healthy aging process considering the metabolome, cardiac autonomic modulation and cardiorespiratory fitness evaluated in age groups*" (<https://www.nature.com/articles/s41598-022-25747-5>) (ANEXO B). Este estudo procurou avaliar os efeitos do envelhecimento saudável por meio de faixas etárias considerando a análise integrada do metabolismo, controle autonômico cardíaco, e aptidão cardiorrespiratória em indivíduos aparentemente saudáveis e sem fatores de risco.

Portanto, essa tese é composta de 2 estudos que estão apresentados nas próximas sessões no formato de manuscrito e escritos na língua portuguesa.

OBJETIVOS

1 Geral

O objetivo geral dessa tese foi de investigar, por meio de estratégias metabolômicas, como agentes estressores naturais do organismo, tais como o exercício físico e o envelhecimento orgânico, refletem no perfil das oxilipinas e na integração do metabolismo com a modulação autonômica cardíaca e a aptidão cardiorrespiratória, respectivamente, em indivíduos aparentemente saudáveis.

1.1. Específicos

1.1.1. Estudo 1

Investigar os efeitos fisiológicos potenciais de curto e longo prazos do exercício físico nas respostas das oxilipinas, com ênfase em suas vias enzimáticas.

1.1.2. Estudo 2

Investigar, de maneira integrada, o curso temporal de variáveis do metaboloma humano e de variáveis relacionadas à modulação autonômica cardíaca e à aptidão

cardiorrespiratória no envelhecimento, em diferentes faixas etárias considerando indivíduos aparentemente saudáveis e sem grandes fatores de risco.

Referências

BARRY, V. W.; CAPUTO, J. L.; KANG, M. The Joint Association of Fitness and Fatness on Cardiovascular Disease Mortality: A Meta-Analysis. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 61, n. 2, p. 136–141, ago. 2018.

BENNETT, T.; HOSKING, D. J.; HAMPTON, J. R. Cardiovascular control in diabetes mellitus. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5971, p. 585–587, 14 jun. 1975.

BRENNAN, A. M. et al. Plasma Metabolite Profiles in Response to Chronic Exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 5 mar. 2018.

BRUGNARA, L. et al. Metabolomics approach for analyzing the effects of exercise in subjects with type 1 diabetes mellitus. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e40600, 2012.

CANFIELD, C.-A.; BRADSHAW, P. C. Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases. **Translational Medicine of Aging**, v. 3, p. 70–89, 1 jan. 2019.

CHALECKIS, R. et al. Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 16, p. 4252–4259, 19 abr. 2016.

CHENG, S. et al. Distinct metabolomic signatures are associated with longevity in humans. **Nature Communications**, v. 6, p. 6791, 13 abr. 2015.

COLLINO, S. et al. Metabolic Signatures of Extreme Longevity in Northern Italian Centenarians Reveal a Complex Remodeling of Lipids, Amino Acids, and Gut Microbiota Metabolism. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. e56564, 6 mar. 2013a.

COLLINO, S. et al. Musculoskeletal system in the old age and the demand for healthy ageing biomarkers. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 11–12, p. 541–547, dez. 2013b.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 12, p. 1063–1073, set. 1998.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 5 fev. 2013.

GABBS, M. et al. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 6, n. 5, p. 513–540, set. 2015.

GARCÍA-FLORES, L. A. et al. Aronia-citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: a lipidomic approach using representative oxylipins in urine. **Food & Function**, v. 9, n. 1, p. 463–475, 24 jan. 2018.

GRAPOV, D. et al. Exercise plasma metabolomics and xenometabolomics in obese, sedentary, insulin-resistant women: impact of a fitness and weight loss intervention. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 317, n. 6, p. E999–E1014, 1 dez. 2019.

GRAZIOLI, E. et al. Physical activity in the prevention of human diseases: role of epigenetic modifications. **BMC Genomics**, v. 18, n. 8, p. 802, 14 nov. 2017.

GRIFFITHS, W. J. et al. Targeted metabolomics for biomarker discovery. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 49, n. 32, p. 5426–5445, 26 jul. 2010.

HOFFMAN, J. M. et al. Proteomics and metabolomics in ageing research: from biomarkers to systems biology. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 3, p. 379–388, 15 2017.

HUGHES, D. C.; ELLEFSEN, S.; BAAR, K. Adaptations to Endurance and Strength Training. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 6, 01 2018.

JIANG, Y. et al. Metabolomics in the Development and Progression of Dementia: A Systematic Review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 343, 12 abr. 2019.

JOVÉ, M. et al. Human Aging Is a Metabolome-related Matter of Gender. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 578–585, maio 2016.

K WASSERMAN. **Principles of Exercise Testing and Interpretation**. 4. ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

KELLY, R. S.; KELLY, M. P.; KELLY, P. Metabolomics, physical activity, exercise and health: A review of the current evidence. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 12, p. 165936, 1 dez. 2020.

KINGWELL, B. A. et al. Heart rate spectral analysis, cardiac norepinephrine spillover, and muscle sympathetic nerve activity during human sympathetic nervous activation and failure. **Circulation**, v. 90, n. 1, p. 234–240, jul. 1994.

LAWTON, K. A. et al. Analysis of the adult human plasma metabolome. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 4, p. 383–397, abr. 2008.

LEWIS, G. D. et al. Metabolic Signatures of Exercise in Human Plasma. **Science translational medicine**, v. 2, n. 33, p. 33ra37, 26 maio 2010.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 6 jun. 2013.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. Metabolic Control of Longevity. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 802–821, 11 ago. 2016.

LYNCH, C. J.; ADAMS, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 723–736, dez. 2014.

LUKASKI, H. C.; BOLONCHUK, W. W.; KLEVAY, L. M. Comparison of metabolic responses and oxygen cost during maximal exercise using three treadmill protocols. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 29, n. 3, p. 223–229, set. 1989.

LUSTGARTEN, M. S. et al. Identification of serum analytes and metabolites associated with aerobic capacity. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 5, p. 1311–1320, maio 2013.

LUSTGARTEN, M. S. et al. Serum Predictors of Percent Lean Mass in Young Adults. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 30, n. 8, p. 2194–2201, ago. 2016.

MARKWORTH, J. F.; MADDIPATI, K. R.; CAMERON-SMITH, D. Emerging roles of pro-resolving lipid mediators in immunological and adaptive responses to exercise-induced muscle injury. **Exercise Immunology Review**, v. 22, p. 110–134, 2016.

MARTIN, F.-P. J.; MONTOLIU, I.; KUSSMANN, M. Metabonomics of ageing - Towards understanding metabolism of a long and healthy life. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 165, n. Pt B, p. 171–179, 2017.

MATHEW, A. V. et al. Impaired Amino Acid and TCA Metabolism and Cardiovascular Autonomic Neuropathy Progression in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 68, n. 10, p. 2035–2044, out. 2019.

MENDES, R.H. et al. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.180, p. 43-47, fev. 2014.

MEDINA, S. et al. Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 99, n. 3–4, p. 79–86, dez. 2012.

MENNI, C. et al. Metabolomic markers reveal novel pathways of ageing and early development in human populations. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 4, p. 1111–1119, ago. 2013.

MORRIS, C. et al. The relationship between aerobic fitness level and metabolic profiles in healthy adults. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 7, p. 1246–1254, jul. 2013.

NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l.] Artmed, 2014.

NICHOLSON, J. K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 1, n. 2, p. 153–161, fev. 2002.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054–1056, 23 out. 2008.

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.

PANENI, F. et al. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 15, p. 1952–1967, 18 abr. 2017.

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.

PORTA, A. et al. Effect of Age on Complexity and Causality of the Cardiovascular Control: Comparison between Model-Based and Model-Free Approaches. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89463, 24 fev. 2014.

POWELL, W. S.; ROKACH, J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 340–355, abr. 2015.

REN, R. et al. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 460–474, 5 set. 2017.

RYALS, J. et al. Metabolon, Inc. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 7, p. 863–866, jul. 2007.

SAITO, K. et al. Gender- and Age-Associated Differences in Serum Metabolite Profiles among Japanese Populations. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 7, p. 1179–1186, 2016.

SAKAGUCHI, C. A. et al. Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, p. 164, ago. 2019.

SCHADER, J. F. et al. Metabolite Shifts Induced by Marathon Race Competition Differ between Athletes Based on Level of Fitness and Performance: A Substudy of the Enzy-MagIC Study. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 87, mar. 2020.

SCHRANNER, D. et al. Metabolite Concentration Changes in Humans After a Bout of Exercise: a Systematic Review of Exercise Metabolomics Studies. **Sports Medicine - Open**, v. 6, n. 1, p. 11, 10 fev. 2020.

SELHUB J. HOMOCYSTEINE METABOLISM. *Annu. Rev. Nutr.* v. 19, p. 217-46, 1999.

SERHAN, C. N. et al. Protectins and Maresins: New Pro-Resolving Families of Mediators in Acute Inflammation and Resolution Bioactive Metabolome. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1851, n. 4, p. 397–413, abr. 2015.

SHARMA, G.; GOODWIN, J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. **Clinical Interventions in Aging**, v. 1, n. 3, p. 253–260, set. 2006.

SHEARER, G. C.; WALKER, R. E. An overview of the biologic effects of omega-6 oxylipins in humans. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 137, p. 26–38, 2018.

SHOIEB, S.; EL-SHERBENI, A.; EL-KADI, A. Subterminal hydroxyeicosatetraenoic acids: Crucial lipid mediators in normal physiology and disease states. **Chemico-biological Interactions**, v. 299, p. 140–150, 10 dez. 2018.

SPECTOR, A. A.; KIM, H.-Y. Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 356–365, abr. 2015.

SPEK, A. V. et al. Metabolomics reveals a link between homocysteine and lipid metabolism and leukocyte telomere length: the ENGAGE consortium. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-12, ago. 2019.

STANFORD, K. I. et al. 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 1111- 1120.e3, 1 maio 2018.

TAKAHASHI, A. C. M. et al. Aging reduces complexity of heart rate variability assessed by conditional entropy and symbolic analysis. **Internal and Emergency Medicine**, v. 7, n. 3, p. 229–235, jun. 2012.

TASK FORCE. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–1065, 1 mar. 1996.

TIELAND, M.; TROUWBORST, I.; CLARK, B. C. Skeletal muscle performance and ageing. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 1, p. 3–19, fev. 2018.

TOTH, M. J. et al. Contribution of body composition and physical activity to age-related decline in peak VO₂ in men and women. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 77, n. 2, p. 647–652, ago. 1994.

TOTH, M. J. et al. Rates of free fatty acid appearance and fat oxidation in healthy younger and older men. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 80, n. 2, p. 506–511, fev. 1996.

UM, K. et al. Long-term leisure-time physical activity and serum metabolome. **Circulation**, v. 127, n. 3, 22 jan. 2013.

WALLER, T. C. et al. Compartment and hub definitions tune metabolic networks for metabolomic interpretations. **GigaScience**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2020.

WARBURTON, D. E. R.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. **Current Opinion in Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 541, set. 2017.

WEHRWEIN, E. A.; ORER, H. S.; BARMAN, S. M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1239–1278, 13 jun. 2016.

YAKU, K.; OKABE, K.; NAKAGAWA, T. NAD metabolism: Implications in aging and longevity. **Ageing Research Reviews**, v. 47, p. 1-17, jun. 2018.

YU, Z. et al. Human serum metabolic profiles are age dependent. **Ageing Cell**, v. 11, n. 6, p. 960–967, dez. 2012.

ZHANG, B. et al. Nanoparticle-Assisted Metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 1, 13 mar. 2018.

ESTUDO 1

Resposta das oxilipinas ao exercício de curto e longo prazo: uma revisão sistemática

Étore De Favari Signini¹, David Christopher Nieman², Claudio Donisete Silva¹, Camila Akemi Sakaguchi¹ e Aparecida Maria Catai¹

¹Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

²Laboratório de *Performance* Humana, Campus de Pesquisa da Carolina do Norte, *Appalachian State University*, Kannapolis, Estados Unidos

1 Introdução

As oxilipinas são ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) oxidados e são conhecidas por participarem de diversos processos fisiológicos como mediadores lipídicos (GABBS et al., 2015; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; SPECTOR; KIM, 2015). As PUFAs são liberadas a partir dos fosfolipídios encontrados nas membranas celulares e são oxidadas a partir da atividade de três sistemas enzimáticos, sendo eles constituídos pelas enzimas ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e citocromo P450 (CYP) (GABBS et al., 2015; MASSEY; NICOLAOU, 2011; WILLENBERG; OSTERMANN; SCHEBB, 2015). Os principais ácidos graxos utilizados na geração das oxilipinas são o ácido araquidônico (AA), ácido adrênico (AAd), ácido linoleico (AL), ácido α -linoleico (A α L), ácido docosahexaenóico (AD), ácido eicosapentaenóico (AE) e ácido dihomo- γ -linolênico (AD γ L) (GABBS et al., 2015; MASSEY; NICOLAOU, 2011).

Os níveis plasmáticos das oxilipinas podem ser alterados por alguns estados de doença e sofrem influência do estado nutricional e de estressores mentais e fisiológicos (LYNES et al., 2017; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; MITMESSER, 2017; SHEARER; WALKER, 2018; STARK et al., 2016; ZIMMER et al., 2018). Os efeitos de curto e longo prazos do exercício físico possuem um forte efeito sobre a inflamação e a função imunológica, e as oxilipinas parecem estar envolvidas em um nível regulatório (MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; LILA; GILLITT, 2019; NIEMAN; MITMESSER, 2017;

NIEMAN; PENCE, 2019; NIEMAN; WENTZ, 2019). Tal relação em potencial tem estimulado o interesse em avaliar os efeitos de diferentes cargas de trabalho de exercício sobre a produção de oxilipinas a partir dos sistemas enzimáticos COX, LOX e CYP, considerando também os efeitos interativos com diferentes formas de suporte nutricional (NIEMAN; LILA; GILLITT, 2019; NIEMAN; MITMESSER, 2017). Isto tem sido impulsionado pela medição de um número crescente de oxilipinas como consequência dos avanços na técnica de espectrometria de massas (MS) e do suporte da bioinformática (MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016). Além disso, as oxilipinas não são armazenadas, mas sim geradas por sistemas enzimáticos em resposta a vários tipos de estressores, o que proporciona uma forma efetiva de avaliar as influências das doses dos estressores (LYNES et al., 2017; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; MITMESSER, 2017; STARK et al., 2016).

A área científica que avalia a relação do exercício sobre a geração e consumo das oxilipinas é emergente, porém um número suficiente de estudos já foram publicados, o que proporcionou a tabulação sistemática dos tipos de oxilipinas geradas durante diferentes cargas de trabalho de exercício. Assim, o objetivo desta revisão sistemática foi de investigar as respostas das oxilipinas relacionadas aos efeitos de curto e longo prazos do exercício físico por suas vias enzimáticas e fornecer informações sobre os efeitos fisiológicos potenciais. As conclusões derivadas desta revisão fornecerão informações estruturadas baseadas em evidências para investigações futuras.

2 Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado com base nas diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (LIBERATI et al., 2009). Foi utilizada a ferramenta eletrônica padronizada gratuita *State of the Art through Systematic Review* (StArt) (FABBRI et al., 2016) para a seleção dos estudos e a extração dos dados de maneira sistematizada. A revisão foi registrada Prospero (ID: CRD42020164772) no dia 20 de Janeiro de 2020.

2.1. Estratégia de Busca

A busca eletrônica foi realizada no dia 10 de março de 2020 com os termos MeSH selecionados: “Humans”, “Exercise”, “Physical Activity”, “Sports”, “Oxylipins”,

“*Lipid Mediators*”, com base no modelo PICOS (Tabela 1) (LIBERATI et al., 2009). No dia 25 de maio de 2020 foi realizada uma nova busca, utilizando os mesmos termos, para uma atualização. A extração dos artigos foi feita a partir das bases de dados: *PubMed* (via *National Library of Medicine*), *Web of Science*, *SCOPUS* (*Elsevier*), *Cochrane*, e *Science Direct*. Adicionalmente, a estratégia de busca foi conduzida utilizando os recursos dos bancos de dados para selecionar apenas estudos com humanos e em língua inglesa. Posteriormente ao processo de extração dos artigos das bases de dados, foi realizada a seleção dos artigos com base nas seguintes etapas: (1) avaliação de forma independente dos títulos e resumos quanto à relevância por dois pesquisadores (EFS e CDS); (2) leitura completa do texto dos estudos potencialmente elegíveis. Um terceiro pesquisador independente (CAS) acompanhou o processo de inclusão para solucionar eventuais divergências entre os dois pesquisadores principais. As referências dos estudos incluídos foram verificadas para uma possível adição de documentos relevantes. O fluxograma do processo de seleção dos estudos está representado na figura 1.

Tabela 1. Estratégia PICOS

PICOS	
População	Indivíduos adultos saudáveis
Intervenção	Influência do exercício físico
Comparador	Condição sem exercício/intervenção
Resultado	Oxilipinas relacionadas ao exercício físico
Desenho de Estudo	Estudos Analíticos

PICOS: População, Intervenção, Comparador, Resultado e Desenho de estudo. Tabela adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

2.2. Critério de Inclusão e Exclusão

A inclusão dos estudos esteve em conformidade com os seguintes critérios: (1) Amostra total ou parcial (uma parte separada) composta por humanos adultos e saudáveis; (2) Utilização de amostras de soro, plasma, urina ou biópsia muscular por meio da Espectrometria de Massas (MS) para a mensuração e análise de uma lista de oxilipinas; e (3) exercício como o principal indutor de perturbação metabólica. A exclusão dos artigos aconteceu de acordo com os seguintes critérios: (1) foco em apenas um metabólito; (2) artigo não escrito em língua inglesa; (3) não inclusão de um método de análise apropriado; (4) inclusão de crianças, idosos, ou indivíduos com qualquer

patologia ou fator de risco (como hipertensão, dislipidemia, tabagismo/alcoolismo, e obesidade); (5) amostra composta somente por animais ou modelos *in vitro*.

2.3. Extração de Dados

Os seguintes dados foram extraídos dos estudos selecionados usando procedimentos previamente relatados por nosso grupo (SAKAGUCHI et al., 2019): nome do primeiro autor e ano de publicação, características dos participantes e grupos (população, tamanho da amostra, grupos, sexo, idade, nível de atividade física), elementos do projeto de pesquisa (tipo de pesquisa, modo de exercício), intensidade e duração do exercício, via(s) enzimática(s) analisada(s), procedimentos metabololipidômicos (plataforma analítica, dados de metabólitos), matriz e comentários resumidos. Além disso, as oxilipinas determinadas como consequência do exercício físico foram resumidas em esquema e tabela. Foram utilizados apenas dados dos grupos ou períodos (este último considerado apenas para estudos cruzados) caracterizados como placebo e/ou sem intervenção nutricional.

2.4. Avaliação da Qualidade dos Estudos

Os estudos foram avaliados qualitativamente por meio de um sistema de pontuação criado especificamente para estudos metabolômicos (SAKAGUCHI et al., 2019) (Tabela 2). Os estudos foram classificados de acordo com as pontuações como excelente (11–9), bom (8–6), regular (5–4), e ruim (<4).

Tabela 2. Definição de pontuação ajustada para avaliação da qualidade dos estudos de lipidômica

Critérios de Pontuação			
Secção	Pontuação Máxima	Aspectos	Pontuação Atribuída
Desenho do Estudo	2	Número de Participantes	Estudos Paralelos 0 – $n < 20$ 2 – $n > 20$
			Estudos Cruzados 0 – $n < 13$ 2 – $n > 13$
	2	Característica do Estudo	– Grupo Controle Randomizado – Matriz apropriada – > 2 momentos de coleta – Duração ≥ 3 semanas (somente estudos de longo prazo)
			0 – Nenhum dos itens prévios 1 – Pelo menos 2 critérios dos 3 primeiros listados 2 – Todos os 3 primeiros critérios listados
Metodologia	3	Método de Análise	1 – < 10 oxilipinas mensuradas usando metabolômica global 2 – 10-40 oxilipinas mensuradas usando um painel de oxilipinas <i>target</i> por meio da LC-MS/MS 3 – >40 oxilipinas mensuradas usando um painel de oxilipinas <i>target</i> por meio da LC-MS/MS
			0 – Estatística univariada 1 – Estatística univariada + análises adicionais para classificar e agrupar os dados e para controlar os fatores de confusão 2 – Estatística univariada + PCA, OPLS-DA, PLS-DA, ou procedimentos bioinformáticos avançados semelhantes
	2	Suporte Estatístico	
Novidade	2		0–2 – Nova informação na literatura

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; OPLS-DA: análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais; PCA: análise de componentes principais; PLS-DA: análise discriminante de mínimos quadrados parciais. Tabela adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

3 Resultados

Foram identificados 1.749 documentos (Figura 1) a partir da busca na literatura. Apenas nove artigos foram incluídos na análise final como consequência da exclusão de documentos duplicados e estudos que não atendiam aos critérios de inclusão (Tabela 3). Dentre os motivos de exclusão, os mais destacados durante o processo de seleção foram: estudos com participantes que não se adequavam aos critérios de inclusão (animais, crianças ou idosos, e pessoas com patologia) e que não apresentavam um foco sobre os efeitos do exercício na geração de oxilipinas.

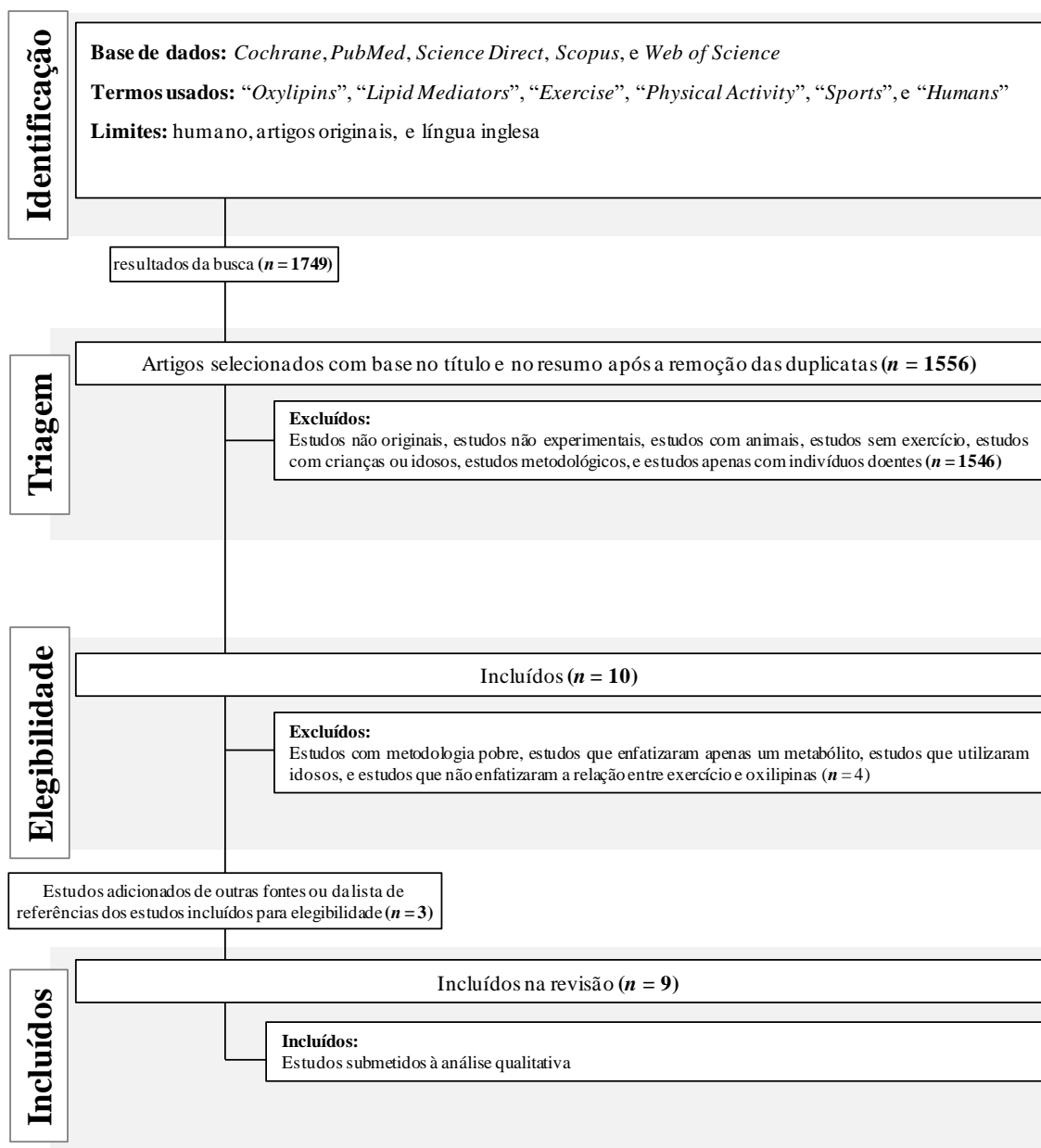


Figura 1. Resultados do fluxograma de revisão. Figura adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

A Tabela 3 evidencia a classificação dos estudos conforme os critérios definidos na Tabela 2. Dois estudos foram classificados com qualidade excelente (NIEMAN et al., 2019, 2020), três como boa (GARCÍA-FLORES et al., 2018; MARKWORTH et al., 2013; VELLA et al., 2019), um como regular (GOLLASCH et al., 2019) e três como pobre (GIORDANO et al., 2011; MEDINA et al., 2012; NIEMAN et al., 2014).

Tabela 3. Classificações dos estudos de acordo com o sistema de pontuação da Tabela 2.

Autores, Ano de publicação	Desenho do Estudo		Metodologia		Novidade	Pontuação Final	Classificação
	Número de Sujeitos	Características do Estudo	Métodos de Análise	Suporte Estatístico			
Nieman et al. (2019)	2	2	3	2	2	11	Excelente
Nieman et al. (2020)	0	2	3	2	2	9	Excelente
García-Flores et al. (2018)	2	2	3	0	1	8	Bom
Markworth et al. (2013)	0	2	3	1	2	8	Bom
Vella et al. (2019)	0	1	3	0	2	6	Bom
Gollach et al. (2019)	0	1	3	0	1	5	Regular
Nieman et al. (2014)	0	1	1	0	1	3	Pobre
Giordano et al. (2011)	0	1	1	0	1	3	Pobre
Medina et al. (2012)	0	0	1	0	1	2	Pobre

Tabela adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

As características e os principais achados de cada estudo estão resumidos na Tabela 4. As respostas das oxilipinas ao efeito de curto prazo do exercício foram observados por 7 estudos (GIORDANO et al., 2011; GOLLASCH et al., 2019; MARKWORTH et al., 2013; NIEMAN et al., 2014, 2019, 2020; VELLA et al., 2019) e o efeito do treinamento físico por 2 estudos (GARCÍA-FLORES et al., 2018; MEDINA et al., 2012). Além disso, os efeitos de curto prazo de exercícios resistidos foram verificados em 2 estudos (MARKWORTH et al., 2013; VELLA et al., 2019), enquanto que 1 estudo verificou o efeito de curto prazo resultante de um teste de esteira incremental executado até o máximo suportado (GOLLASCH et al., 2019), e outros 6 estudos avaliaram os efeitos de curto e longo prazos a partir de exercícios aeróbicos (GARCÍA-FLORES et al., 2018; GIORDANO et al., 2011; MEDINA et al., 2012; NIEMAN et al., 2014, 2019, 2020).

Na Tabela 5 e na Figura 2 estão destacadas as principais vias metabólicas, as oxilipinas, e a magnitude das alterações relatadas nos estudos. Oxilipinas oriundas das vias COX, LOX, CYP, e não enzimáticas, foram estudadas em urina, soro e plasma sanguíneos, ou amostras de biópsia muscular, dependendo do propósito da pesquisa e da plataforma analítica utilizada. Apesar de alguns estudos incluírem intervenção nutricional (GARCÍA-FLORES et al., 2018; NIEMAN et al., 2019, 2020) ou medicamentosa (ibuprofeno) (MARKWORTH et al., 2013), esta revisão sistemática teve como objetivo avaliar apenas o efeito do exercício sobre os níveis das oxilipinas.

Tabela 4. Características dos estudos

Autores, Ano de publicação	População do Estudo	Desenho do Estudo	Exercício, Intensidade e Duração	Vias Enzimáticas	Plataforma Analítica	Matriz	Principais Achados/Efeito do Exercício
Garcia-Flores et al. (2018)	16 triatletas (10 homens 19,0 ± 1,7 anos, e 6 mulheres 21,1 ± 3,0 anos)	Cruzado, randomizado, duplo-cego, e controlado por placebo. Treinamento de triatlo em diferentes condições: Pré intervenção (15 dias), treinamento controlado (15 dias), placebo ou bebida suplementar com desenho cruzado (100 dias) e com intervalo entre as condições (10 dias), e controle pós-treinamento (15 dias). O treinamento foi baseado na escala de carga objetiva (ECOs). Momentos das coletas das amostras de urina: pré e pós-cada condição (durante 24 horas).	Treinamento, alta intensidade, longa duração	COX, LOX, e vias não-enzimáticas	UHPLC-MS/MS	Urina	37 oxilipinas detectadas, com pequenas diminuições em F ₂ -IsoPs e PGF _{1α} , e pequenos aumentos em PGDM, 11-β-PGF _{2α} e PGE ₁ .
Medina et al. (2012)	15 triatletas (10 homens 19,0 ± 1,7 anos e 5 mulheres 21,8 ± 3,0 anos)	Treinamento intenso de triatlo por duas semanas (ciclismo, natação, corrida). Sem grupo controle. Momentos das coletas das amostras de urina: pré e pós treinamento (durante 24 horas).	Treinamento, alta intensidade, longa duração	COX e vias não-enzimáticas	UPLC-QqQ-MS/MS	Urina	13 oxilipinas detectadas, com pequenas diminuições em F ₂ -IsoPs, tetranor-PGEM e 11-β-PGF _{2α} , e um aumento em 6-keto-PGF _{1α} .
Giordano et al. (2011)	14 indivíduos saudáveis de leve a moderadamente ativos (6 homens e 8 mulheres, 36,9 ± 8,4 anos)	Em três visitas, os participantes realizaram aleatoriamente testes de bicicleta submáximos por 20 minutos a 30%, 60%, e 80% da própria carga máxima de trabalho. Em uma visita adicional, um teste foi realizado a 60% da capacidade máxima de trabalho por 40 minutos. Momentos das coletas das amostras de sangue: pré-exercício, durante o exercício (aos 20 minutos) e pós-exercício (2 minutos após) nas três visitas, e pré-exercício e pós-exercício (2 minutos após), e durante o exercício (aos 39 minutos) na visita adicional.	Baixa, moderada e alta intensidade, curta duração	CYP	UPLC-MS/MS	Plasma	6 oxilipinas detectadas, com pequenos aumentos após o exercício à 80% da capacidade máxima de trabalho em 8,9-DiHETrE, 11,12-DiHETrE, 14,15-DiHETrE e após 40 minutos à 60% da capacidade máxima de trabalho para 14,15-EpETrE e 14,15-DiHETrE.
Gollasch et al. (2019)	6 indivíduos saudáveis (5 homens e 1 mulher 38,0 ± 15,0 anos)	Os indivíduos realizaram um teste de esteira incremental máximo. Momentos das coletas das amostras de sangue: pré-exercício (10 minutos antes), durante o exercício (quando a frequência cardíaca atingiu 150 bpm), pós-exercício (0 minutos e 10 minutos).	Alta intensidade, curta duração	LOX e CYP	LC-MS/MS	Plasma	56 oxilipinas detectadas, com pequenos aumentos em 5,6-DiHETrE, 12,13-EpOME, 5,6-DiHETE, 17,18-DiHETE. A maioria deles voltou próximo aos valores pré-exercício 10 minutos após o término do exercício.
Markworth et al. (2013)	16 homens saudáveis (2 grupos com 8 indivíduos cada 23 ± 1,3 anos e 23,0 ± 0,5 anos)	Paralelo randomizado com dois grupos: placebo e medicamento (ibuprofeno). O exercício incluiu um aquecimento de 10 minutos; 3 séries de 8 a 10 repetições de agachamento com barra; <i>leg press</i> 45 °; e extensão do joelho a 80% de 1 RM. Circuito com 1 minuto de recuperação entre as séries, 3 minutos de recuperação entre as estações. Momentos das coletas das amostras de sangue: após jejum de 10 horas; pré-exercício (15 minutos antes), e pós-exercício (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; e 24 horas após).	Resistido de alta intensidade, curta duração	COX, LOX, e CYP	LC-MS/MS	Soro	87 oxilipinas detectadas com aumentos discretos a moderados em 29 oxilipinas, especialmente entre 1 e 3 horas após o exercício. A maioria delas voltaram próximo aos valores pré-exercício entre 3 e 24 horas após o término do exercício.
Nieman et al. (2020)	59 ciclistas saudáveis (38,6 ± 1,5 anos)	Paralelo, randomizado, duplo-cego, e com intervenção controlada por placebo. Período de suplementação de duas semanas (pó de mirtilo liofilizado ou placebo) seguido por um contra-relógio de 75 km (consumindo apenas água ou água com bananas). Quatro grupos (água + mirtilo / mirtilo + banana / banana + placebo / água + placebo). Momentos das coletas das amostras de sangue: pré-exercício, pós-exercício (0; 1,5; 3; 5; 24; e 48 horas após).	Alta intensidade, longa duração	COX, LOX, e CYP	LC-MS/MS	Plasma	Grandes aumentos nas concentrações plasmáticas de 64 de 67 oxilipinas detectadas, com a maioria perto dos níveis pré-exercício dentro de 5 horas pós-exercício.
Nieman et al. (2019)	20 ciclistas saudáveis	Randomizado, cruzado e contrabalanceado. Quatro sessões de contra-relógio de ciclismo de 75 km, 2 semanas de intervalo entre as sessões. Quatro grupos	Alta intensidade,	COX, LOX, e CYP	LC-MS/MS	Plasma	Grandes aumentos nas concentrações plasmáticas de 43 de 45 oxilipinas detectadas,

Tabela 4. Continuação

	(39,1 ± 2,4 anos)	(banana <i>Cavendish</i> / mini banana amarela / bebida com açúcar / água). Momentos das coletas das amostras de sangue: pré-exercício, pós-exercício (0; 0,75; 1,5; 3; 4,5; 21; e 45 horas)	longa duração				com a maioria das oxilipinas com os níveis próximos ao pré-exercício dentro de 4,5 horas pós-exercício
Nieman et al., (2014)	19 ciclistas masculinos (38,1 ± 1,6 anos)	Os participantes realizaram um contra-relógio de 75 km de bicicleta sem qualquer bebida ou alimento contendo energia ou nutrientes. Momentos das coletas das amostras de sangue: pré-exercício e pós-exercício (0; 1,5; e 21 horas após)	Alta intensidade, longa duração	LOX e CYP	UHPLC-MS/MS e GC-MS	Plasma	Grandes aumentos em 9-HODE, 13-HODE, 9,10-DiHOME e 12,13-DiHOME, com a maioria dos níveis próximos ao pré-exercício entre 1,5 e 21 h pós-exercício
Vella et al. (2019)	12 homens ativos recreacionais (22,1 ± 0,6 anos)	Sessão única de exercício de extensão unilateral de joelho concêntrica e excêntrica isocinética máxima, três séries de 12 repetições máximas, 2 minutos de descanso entre as séries. Momentos das coletas das amostras de biópsia: pré-protocolo, pós-protocolo (2; 4; e 24 horas após)	Resistido de alta intensidade, curta duração	COX, LOX, e CYP	LC-MS/MS	Biópsia Muscular	84 oxilipinas detectadas. Aumentos discretos a moderados em 22 oxilipinas 2 horas após o término do exercício, incluindo TXB ₂ , PGE ₂ , PGF _{2α} , 15d-D12,14-PGJ ₃ , 12-oxo-LTB ₄ , 20-COOH-LTB ₄ , 5-HETE, 12-HETE, tetranor 12-HETE, 15-HETE, 12-HEPE, 4-HDoHE, 7-HDoHE, 14-HDoHE, 5,6-EpETrE, 11,12-DiHETrE e 14,15-DiHETrE. A maioria dos níveis das oxilipinas voltaram próximo aos valores pré-exercício 4 horas após o término do exercício

20-COOH-LTB₄: 20-carboxi-leucotrieno B₄; COX: ciclooxigenase; CYP: citocromo P450; DiHETE: ácido dihidróxi-eicosatetraenóico; DiHETrE: ácido dihidróxi-eicosatrienóico; DiHOME: ácido dihidróxi-octadecenóico; 15d-D12,14-PGJ₃: 15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J₃; EpETrE: ácido epóxi-eicosatrienóico; EpOME: ácido epóxi-octadecenóico; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; HDoHE: ácido hidróxi-docosahexaenóico; HEPE: ácido hidróxi-eicosapentaenóico; HETE: ácido hidróxi-eicosatetraenóico; HODE: ácido hidróxi-octadecadienóico; IsoPs: isoprostanos; 6-keto-PGF_{1α}: 6-ceto-prostaglandina F_{1α}; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; LOX: lipoxigenase; LT: leucotrieno; 12-oxo-LTB₄: 12-oxo-leucotrieno B₄; PG: prostaglandina; PGDM: metabólito da prostaglandina D; 11-β-PGF_{2α}: 11β-prostaglandina F_{2α}; tetranor-PGDM: metabólito de tetranor-prostaglandina D; tetranor-PGEM: metabólito de tetranor-prostaglandina E; TX: tromboxano; UHPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem; UPLC-QqQ-MS/MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo em tandem; UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem. Tabela adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

Tabela 5. Oxilipinas medidas em cada estudo como efeito do exercício físico, com suas respectivas magnitudes de mudança.

Vias	Estudos								
	Giordano et al. (2011)	Medina et al. (2012)	Markworth et al. (2013)	Nieman et al. (2014)	Garcia-Flores et al. (2018)	Nieman et al. (2019)	Gollach et al. (2019)	Vella et al. (2019)	Nieman et al. (2020)
	Curto prazo (curta duração)	Longo prazo (longa duração)	Curto prazo (curta duração)	Curto prazo (longa duração)	Longo prazo (longa duração)	Curto prazo (longa duração)	Curto prazo (curta duração)	Curto prazo (curta duração)	Curto prazo (longa duração)
COX	-	↓ Tetranor-PGEM ↓ 11-β-PGF _{2α} ↑ 6-keto-PGF _{1α}	↑↑ TXB ₂ ↑↑ 12-HHTrE ↑ PGD ₂ ↑ PGE ₂ ↑ 15-keto-PGE ₂ ↑ 15-keto-PGF _{2α} ↑ 6-keto-PGF _{1α} ↑ 13,14-dihydro-15-keto-PGE ₂ ↑ RvE ₁	-	↑ PGDM ↑ 11-β-PGF _{2α} ↑ PGE ₁ ↓↓ PGF _{1α}	↑↑ TXB ₂ ↑↑ 12-HHTrE ↑ PGFM ↑↑ 18-HEPE	-	↑ TXB ₂ ↑ 12-HHTrE ↑ PGE ₂ ↑ PGF _{2α} ↑ 15d-D12,14-PGJ ₃	↑↑ TXB ₂ ↑↑ 12-HHTrE ↑ PGFM ↑↑ PGE ₂ ↑ dh-PGE ₂ ↑↑ TXB ₁ ↑↑ TXB ₃ ↑ PGE ₃ ↑ 18-HEPE ↑ RvE ₁
LOX	-	-	↑ 12-HETE ↑ 5,12-DiHETE ↑ Tetranor-12-HETE ↑ 15-HETE ↑ 15-oxo-ETE ↑ LTB ₄ ↑ LXA ₄ ↑ LXB ₄ ↑ 9-oxo-ODE ↑ 13-HODE ↑ 13-oxo-ODE ↑ 10(S),17(S)-DiHDoHE ↑ RvD ₁	↑ 9-HODE ↑ 13-HODE	↑ 5-HETE ↑ 8-HETE ↑↑ 9-HETE ↑↑ 11-HETE ↑↑ 12-HETE ↑↑ Tetranor 12-HETE ↑↑ 15-HETE ↑↑ 9-HODE ↑↑ 9-oxo-ODE ↑↑ 13-HODE ↑ 13-oxo-ODE ↑↑ 5-HETrE ↑↑ 8-HETrE ↑↑ 15-HETrE ↑↑ 4-HdoHE ↑↑ 8-HdoHE ↑↑ 10-HdoHE ↑ 13-HdoHE ↑↑ 14-HdoHE ↑ 16-HdoHE ↑↑ 5-HEPE	↑ 5-HETE ↑ 8-HETE ↑↑ 9-HETE ↑↑ 11-HETE ↑↑ 12-HETE ↑↑ Tetranor 12-HETE ↑↑ 15-HETE ↑↑ 9-HODE ↑↑ 9-oxo-ODE ↑↑ 13-HODE ↑ 13-oxo-ODE ↑↑ 5-HETrE ↑↑ 8-HETrE ↑↑ 15-HETrE ↑ 4-HdoHE ↑ 7-HdoHE ↑↑ 14-HdoHE ↑↑ 12-HEPE	↑ 5-HETE ↑ 5-oxo-ETE ↑↑ 5,15-DiHETE ↑↑ 8-HETE ↑↑ 9-HETE ↑↑ 11-HETE ↑↑ 12-HETE ↑ 12-oxo-LTB ₄ ↑↑ Tetranor 12-HETE ↑ 15-HETE ↑ 20-COOH-LTB ₄ ↑ 4-HdoHE ↑ 7-HdoHE ↑↑ 14-HdoHE ↑↑ 12-HEPE	↑ 5-HETE ↑ 5-oxo-ETE ↑↑ 5,15-DiHETE ↑↑ 8-HETE ↑↑ 9-HETE ↑↑ 11-HETE ↑↑ 12-HETE ↑ 12-oxo-ETE ↑↑ Tetranor 12-HETE ↑ 15-HETE ↑ 15R-LXA ₄ ↑↑ 9-HODE ↑↑ 9-oxo-ODE ↑↑ 13-HODE ↑↑ 13-oxo-ODE ↑↑ 5-HETrE ↑↑ 8-HETrE ↑↑ 15-HETrE ↑ 4-HdoHE ↑↑ 7-HdoHE ↑↑ 8-HdoHE ↑↑ 10-HdoHE ↑↑ 15-HETrE ↑ 4-HdoHE ↑↑ 7-HdoHE ↑↑ 8-HdoHE ↑↑ 10-HdoHE	

↑↑ > 8 vezes; ↑↑ de 4 a 8 vezes; ↑ de 2 a 4 vezes; ↑ < 2 vezes. Respostas tardias (depois de 5 horas do término do exercício) estão representadas em escala descolorida. As setas representam o número de vezes da diferença entre as condições pré e pós-exercício (considerando o maior valor de diferença obtido para cada metabólito). As cores de fundo representam as vias metabólicas: COX (vermelho), LOX (azul), CYP (verde) e via não enzimática (laranja). Os metabólitos reportados são aqueles que apresentaram diferença estatística entre a condição pré e pós-exercício. Tabela adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

Tabela 5. Continuação

Vias	Giordano et al. (2011)	Medina et al. (2012)	Markworth et al. (2013)	Nieman et al. (2014)	Garcia-Flores et al. (2018)	Nieman et al. (2019)	Gollach et al. (2019)	Vella et al. (2019)	Nieman et al. (2020)
LOX	-	-				↑↑ 12-HEPE ↑ 15-HEPE ↑↑ 9-HOTrE ↑↑ 13-HOTrE	-		↑↑ 11-HDoHE ↑↑ 13-HDoHE ↑↑ 14-HDoHE ↑ 16-HDoHE ↑↑ 17-HDoHE ↑↑ PD ₁ ↑↑ 5-HEPE ↑ 8-HEPE ↑↑ 9-HEPE ↑ 11-HEPE ↑↑ 12-HEPE ↑↑ 15-HEPE ↑↑ 9-HOTrE ↑↑ 13-HOTrE
CYP	↑ 8,9-DiHETrE ↑ 11,12-DiHETrE ↓ 14,15-EpETrE ↑ 14,15-DiHETrE	-	↑ 11,12-DiHETrE ↑ 14,15-DiHETrE ↑ 9,10-EpOME ↑ 9,10-DiHOME	↑ 9,10-DiHOME ↑ 12,13-DiHOME	-	↑↑ 8,9-DiHETrE ↑↑ 11,12-DiHETrE ↑ 14,15-DiHETrE ↑↑ 17-HETE ↑ 18-HETE ↑ 19-HETE ↑↑ 20-HETE ↑↑ 20-COOH-AA ↑ 9,10-EpOME ↑↑ 9,10-DiHOME ↑↑ 12,13-DiHOME ↑↑ 19,20-DiHDPE ↑↑ 20-HDoHE	↑ 5,6-DiHETrE ↑ 12,13-EpOME ↑ 5,6-DiHETE ↑ 17,18-DiHETE	↑ 5,6EpETrE ↑ 11,12-DiHETrE ↑ 14,15-DiHETrE	↑↑ 5,6-EpETrE ↑ 5,6-DiHETrE ↑↑ 8,9-DiHETrE ↑↑ 11,12-EpETrE ↑↑ 11,12-DiHETrE ↑↑ 14,15-DiHETrE ↑ 16-HETE ↑↑ 17-HETE ↑↑ 18-HETE ↑↑ 19-HETE ↑↑ 20-HETE ↑ 9,10-EpOME ↑ 9,10-DiHOME ↑ 12,13-DiHOME ↑↑ 19,20-DiHDPE ↑↑ 20-COOH-AA ↑↑ 20-HDoHE
Não enzimático	-	↓ 8-iso-PGF2α	-	-	↓ 15-keto-15-F2t-iso ↓ 9-epi-15-F2t-iso ↓ 5-epi-5F2t-iso	↑↑ 5-iso-PGF2α-VI	-	-	↑ 8,12-iso-Isoprostane-F2α-VI ↑ 13,14-Dihydro-15-keto-PGF2α

↑↑ > 8 vezes; ↑↑ de 4 a 8 vezes; ↑ de 2 a 4 vezes; ↑ < 2 vezes. Respostas tardias (depois de 5 horas do término do exercício) estão representadas em escala descolorida. As setas representam o número de vezes da diferença entre as condições pré e pós-exercício (considerando o maior valor de diferença obtido para cada metabólito). As cores de fundo representam as vias metabólicas: COX (vermelho), LOX (azul), CYP (verde) e via não enzimática (laranja). Os metabólitos reportados são aqueles que apresentaram diferença estatística entre a condição pré e pós-exercício. 20-COOH-AA: ácido 20-carboxi-araquidônico; 20-COOH-LTB₄: 20-carboxi-leucotrieno B₄; COX: ciclooxigenase; CYP: citocromo P450; 15d-D12,14-PGJ₃: 15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J₃; dh-PGE₂: dihome-prostaglandina E₂; 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂: 13,14-dihidro-15-ceto prostaglandina E₂; DiHDoHE: ácido dihidróxi-docosahexaenóico; DiHDPE: ácido dihidróxi-docosapentaenóico; DiHETE: ácido dihidróxi-eicosatetraenóico; DiHETrE: ácido dihidróxi-eicosatrienóico; DiHOME: ácido dihidróxi-octadecenóico; EpETrE: ácido epóxi-eicosatrienóico; EpOME: ácido epóxi-octadecenóico; HDoHE: ácido hidróxi-docosahexaenóico; HEPE: ácido hidróxi-eicosapentaenóico; HETE: ácido hidróxi-eicosatetraenóico; HETrE: ácido hidróxi-eicosatrienóico; HHTrE: ácido hidróxi-

heptadecatrienóico; HODE: ácido hidróxi-octadecadienóico; HOTrE: ácido hidróxi-octadecatrienóico; Iso: isoprostano; 15-keto-PGE₂: 15-ceto-prostaglandina E₂; 6-keto-PGF_{1α}: 6-ceto-prostaglandina F_{1α}; 15-keto-PGF_{2α}: 15-ceto-prostaglandina F_{2α}; LOX: lipoxigenase; LT: leucotrieno; LX: lipoxina; oxo-EET: ácido oxo-eicosatetraenóico; 12-oxo-LTB₄: 12-oxo-leucotrieno B₄; oxo-ODE: ácido oxo-octadecadienóico; PD₁: protectina D₁; PG: prostaglandina; PGDM: metabólito da prostaglandina D; 11-β-PGF_{2α}: 11β-prostaglandina F_{2α}; PGFM: metabólito da prostaglandina F; 15R-LXA₄: 15R-lipoxina A₄; Rv: resolvina; tetranor-PGDM: metabólito de tetranor-prostaglandina D; tetranor-PGEM: metabólito de tetranor-prostaglandina E; TX: tromboxano. Tabela adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

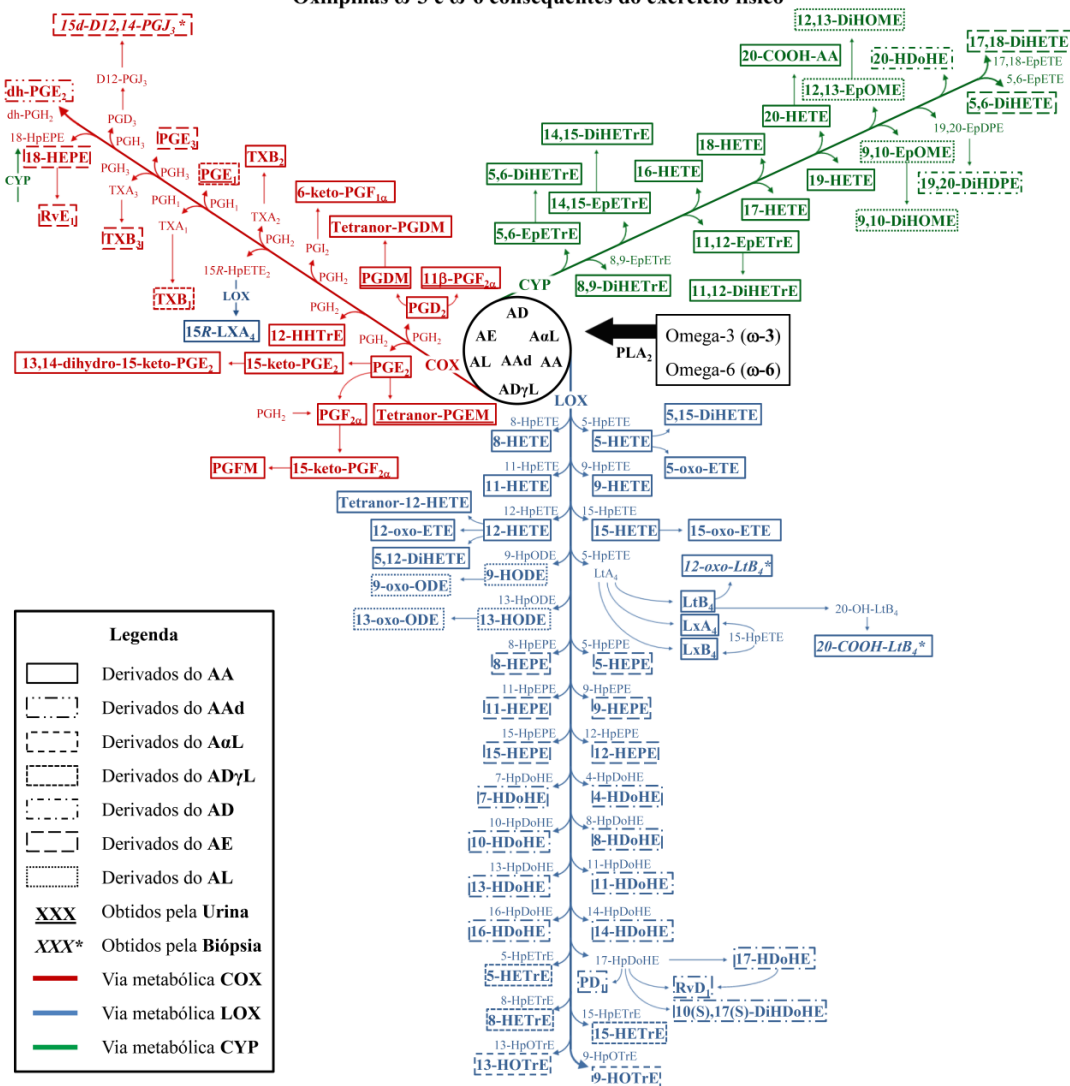
Oxilipinas ω -3 e ω -6 consequentes do exercício físico

Figura 2. Vias lipídicas e metabólitos relacionados ao exercício físico. Os metabólitos dentro das caixas são aqueles discutidos nos artigos, enquanto que os externos não foram discutidos nos artigos, mas estão envolvidos nas vias metabólicas. Os metabólitos sublinhados são aqueles que foram discutidos exclusivamente em amostras de urina. Os metabólitos em itálicos com asterisco são aqueles que foram discutidos exclusivamente em amostras de biópsia muscular. PUFAs: polyunsaturated fatty acids; AA: ácido aracdônico; AAd: ácido adrênico; A α L: ácido α -linoleico; AD: ácido docosahexaenóico; AD γ L: ácido dihomo- γ -linolênico; AE: ácido eicosapentaenóico; AL: ácido linoleico; 20-COOH-AA: ácido 20-carboxi-araquidônico; 20-COOH-LTB $_4$: 20-carboxi-leucotrieno B $_4$; COX: ciclooxigenase; CYP: citocromo P450; 15d-D12,14-PGJ $_3$: 15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J $_3$; dh-PGE $_2$: dihomo-prostaglandina E $_2$; 13,14-dihydro-15-keto-PGE $_2$: 13,14-dihidro-15-ceto prostaglandina E $_2$; DiHDoHE: ácido dihidróxi-docosahexaenóico; DiHDPE: ácido dihidróxi-docosapentaenóico; DiHETE: ácido dihidróxi-eicosatetraenóico; DiHETrE: ácido dihidróxi-eicosatrienóico; DiHOME: ácido dihidróxi-octadecenóico; EpETrE: ácido epóxi-eicosatrienóico; EpOME: ácido epóxi-octadecenóico; HDoHE: ácido hidróxi-docosahexaenóico; HEPE: ácido hidróxi-eicosapentaenóico; HETE: ácido hidróxi-eicosatetraenóico; HETrE: ácido hidróxi-eicosatrienóico; HHTrE: ácido hidróxi-heptadecatrienóico; HODE: ácido hidróxi-octadecadienóico; HOTrE: ácido hidróxi-octadecatrienóico; Iso: isoprostano; 15-keto-PGE $_2$: 15-ceto-prostaglandina E $_2$; 6-keto-PGF $_{1\alpha}$: 6-ceto-prostaglandina F $_{1\alpha}$; 15-keto-PGF $_{2\alpha}$: 15-ceto-prostaglandina F $_{2\alpha}$; LOX: lipoxigenase; LT: leucotrieno; LX: lipoxina; oxo-ETE: ácido oxo-eicosatetraenóico; 12-oxo-LTB $_4$: 12-oxo-leucotrieno B $_4$; oxo-ODE: ácido oxo-octadecadienóico; PD $_1$: protectina D $_1$; PG: prostaglandina; PGDM: metabólito da prostaglandina D; 11- β -PGF $_{2\alpha}$: 11- β -prostaglandina F $_{2\alpha}$; PGFM: metabólito da prostaglandina F; 15R-LXA $_4$: 15R-lipoxina A $_4$; Rv: resolvina; Tetranor-PGDM: metabólito de tetranor-prostaglandina D; tetranor-PGEM: metabólito de tetranor-prostaglandina E; TX: tromboxano. Fonte: elaborada pelo autor. Figura adaptada de Signini et al., 2020, *Metabolites*, DOI: 10.3390/metabo10060264.

Pequenas diminuições nos níveis de oxilipinas na urina de 16 triatletas de elite, como F₂-isoprostanos (F₂-IsoPs) e prostaglandina F_{1α} (PGF_{1α}), e um pequeno aumento nas prostaglandinas (PGs) 11-β-PGF_{2α}, PGDM, e PGE₁, foram verificados após 15 dias de treinamento intenso pelo estudo de García-Flores et al. (GARCÍA-FLORES et al., 2018). Da mesma forma, Medina et al. (MEDINA et al., 2012) observaram pequenas diminuições em F₂-IsoPs e PGs (tetranor-PGEM e 11-β-PGF_{2α}), e um aumento no 6-ceto-prostaglandina F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}), em 15 triatletas considerando os momentos antes e após um período de duas semanas de treinamento intenso.

O estudo de Nieman et al. (NIEMAN et al., 2014) destacou grandes aumentos em ácidos hidroxi-octadecadienóicos derivados do AL (9-HODE e 13-HODE) e ácidos dihidroxi-octadecenóicos (9,10-DiHOME e 12,13-DiHOME) em 19 ciclistas do sexo masculino após um protocolo de ciclismo de 75 km. Em dois outros estudos mais recentes do mesmo autor, por meio do uso do mesmo protocolo de ciclismo de 75 km, foi observado grandes aumentos nos níveis plasmáticos de 43 de 45 (NIEMAN et al., 2019) e 64 de 67 (NIEMAN et al., 2020) oxilipinas detectadas.

Giordano et al. (GIORDANO et al., 2011) relataram pequenos aumentos nos ácidos dihidroxi-eicosatrienóicos (8,9-DiHETrE, 11,12-DiHETrE, 14,15-DiHETrE) após 20 minutos de exercício de ciclismo a 80% da carga máxima. Aumentos discretos foram observados para o ácido epóxi-eicosatrienóico (14,15-EpETrE) e 14,15-DiHETrE após 40 minutos de ciclismo com uma carga de 60% da máxima. Gollasch et al. (GOLLASCH et al., 2019) relataram pequenos aumentos nos ácidos dihidroxi-eicosatetraenóicos (5,6-DiHETE, 17,18-DiHETE), ácido epóxi-octadecenóico (12,13-EpOME) e 5,6-DiHETrE após um teste incremental de esteira realizado até a exaustão.

Markworth et al. (MARKWORTH et al., 2013) submeteram 16 homens em uma série de exercícios de resistência de membro inferior intensos e evidenciou aumentos discretos a moderados no tromboxano B₂ (TXB₂), PGs (PGE₂, PGD₂ e PGI₂) e seus derivados, leucotrieno B₄ (LTB₄), resolvinas (RvE₁ e RvD₁), no isômero da protectina D1 (10(S),17(S)-DiHDoHE), 5,12-DiHETE, ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (12-HETE, tetranor-12-HETE, 15-HETE), ácido 15-oxo-eicosatetraenóico (15-oxo-ETE), ácido 13-oxo-octadecadienóico (13-oxo-ODE), lipoxinas (LXA₄ e LXB₄), 11,12-DiHETrE e 14,15-DiHETrE.

Vella et al. (VELLA et al., 2019) submetem 12 homens à diferentes exercícios de resistência de alta intensidade considerando a extensão de joelho. Foram realizadas biópsias musculares antes e imediatamente após o exercício, e após 2, 4, e 24 horas de recuperação. Discretos a moderados aumentos foram observados para TXB₂, PGE₂, PGF_{2α}, 15-desoxi-delta12,14-prostaglandina J₃ (15d-D12,14-PGJ₃), 12-oxo-leucotrieno B₄ (12-oxo-LTB₄), 20-carboxi-leucotrieno B₄ (20-COOH-LTB₄), 5-HETE, 12-HETE, tetranor-12-HETE, 15-HETE, ácido 12-hidroxi-eicosapentaenóico (12-HEPE), ácidos hidroxi-docosahexanóicos (4-HDoHE, 7-HDoHE e 14-HDoHE) e 5,6-EpETrE, 11,12-DiHETrE e 14,15-DiHETrE.

4 Discussão

Esta revisão sistemática forneceu uma visão geral das oxilipinas que se alteram com o treinamento físico ou que aumentam logo após um exercício resistido e aeróbico em indivíduos saudáveis. Um grande número de oxilipinas se altera em decorrência dos efeitos de curto prazo do exercício físico, especialmente após exercícios prolongados e intensos, e são gerados pelas vias COX, LOX, CYP, e vias não enzimáticas de múltiplos substratos de ácidos graxos (Figura 2). Além disso, os papéis dessas oxilipinas, geradas de acordo com os diferentes níveis de estresse físico proporcionado pelo exercício, ainda estão sendo esclarecidos e podem incluir a regulação de processos inflamatórios e do sistema imunológico, função cardiovascular, e função renal (DUBOIS et al., 1998; GABBS et al., 2015; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; POWELL; ROKACH, 2015; SERHAN et al., 2015; SHEARER; WALKER, 2018; SHOIEB; EL-SHERBENI; EL-KADI, 2018; SPECTOR; KIM, 2015). Por fim, o número de oxilipinas geradas e a magnitude do aumento dos níveis relacionam-se com o tipo de efeito do exercício avaliado (treinamento ou uma única sessão de exercício) e a carga de trabalho, e os níveis plasmáticos da maioria dessas oxilipinas encontram-se próximos aos níveis de pré-exercício dentro de 5 horas de recuperação, mesmo após exercícios de alta intensidade e longa duração.

4.1. Formação de Oxilipinas Relacionada ao Exercício

A liberação de PUFA's das membranas celulares começa através da atividade de um grupo de enzimas identificadas como fosfolipase A₂ (PLA₂) (GABBS et al., 2015). Os fosfolipídios são hidrolisados em ácidos graxos e lisofosfolipídios pelas enzimas

PLA₂. Tal processo pode acontecer quando a célula é estimulada por vários tipos de vias de sinalização, como por exemplo, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), ativadores transcricionais (como o fator nuclear kappa B), citocinas pró-inflamatórias e outros estímulos inflamatórios (GHOSH et al., 2006; GUIJAS et al., 2014; LESLIE, 2015; MURAKAMI et al., 2016; NIEMAN et al., 2019; SATO; TAKETOMI; MURAKAMI, 2016). A ativação destas vias de sinalização pode ser consequente da lesão da membrana do miócito induzida pelo exercício e por meio de processos metabólicos (KRAMER; GOODYEAR, 2007; SON et al., 2013; SUZUKI, 2018), o que resulta no aumentando da liberação de PUFAs e, conseqüentemente, na geração de oxilipinas e na resposta inflamatória.

Os PUFAs liberados pela PLA₂ são posteriormente oxidados pelas três vias enzimáticas COX, LOX e CYP para a geração das oxilipinas (GABBS et al., 2015; MASSEY; NICOLAOU, 2011). A grandeza do aumento dos níveis das oxilipinas, bem como a diversidade de geração das mesmas, a partir dessas três vias atuando sobre PUFAs livres ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3) (AA, AAd, AL, A α L, AD, AE e AD γ L), parecem serem maiores com cargas de trabalho de exercícios aeróbicos de alta intensidade e longa duração (Tabela 5 e Figura 2). Há poucas evidências sobre os papéis fisiológicos das oxilipinas dentro do contexto de exercício físico, mas em geral a literatura sugere papéis reguladores em processos inflamatórios, nas respostas imunes, no sistema cardiovascular e na função renal, no reparo tecidual, bem como na função mitocondrial e no estresse oxidativo (DUBOIS et al., 1998; GABBS et al., 2015; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; MITMESSER, 2017; POWELL; ROKACH, 2015; SERHAN; LEVY, 2018; SHOIEB; EL-SHERBENI; EL-KADI, 2018; SPECTOR; KIM, 2015; STANFORD et al., 2018).

O papel das prostaglandinas na fisiologia muscular, inflamação, e lesão tem sido estudado há décadas (DEMERS et al., 1981; DUBOIS et al., 1998; KALEY; WEINER, 1971; KARAMOUZIS et al., 2001; NOWAK; WENNMALM, 1978). Com o surgimento recente de procedimentos metabololipidômicos e com o avanço da bioinformática, a identificação de um grande número de oxilipinas que são geradas durante o exercício tem sido potencializada, abrindo caminhos infinitos para pesquisas futuras (MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016). A regulação do processo inflamatório durante a recuperação de exercícios físicos exaustivos pode manifestar-se como um papel central para muitas dessas oxilipinas (NIEMAN;

MITMESSER, 2017; NIEMAN; PENCE, 2019). Os estudos incluídos nesta revisão indicam que as oxilipinas pró-inflamatórias que são geradas durante o exercício abrangem tromboxanos (TXs), PGs, HETEs, HODEs e seus derivados (como oxo-ETEs e oxo-ODEs), leucotrienos (LTs), DiHETrEs e DiHOMEs (Tabela 5). Tais oxilipinas são consequentes da oxidação de AA, AAd, AD γ L e AL (Figura 2). A relação existente entre os TXs, PGs e LTs (como TXB₂, PGE₂ e LTB₄) com o exercício tem sido amplamente estudada e relaciona-se com ações pró-inflamatórias como o aumento da agregação plaquetária, a ativação leucocitária e a quimiotaxia, a produção de citocinas pró-inflamatórias, a permeabilidade do vascular, a nocicepção, e a alterações no tônus vascular (CARROLL et al., 2013; DEMERS et al., 1981; DUBOIS et al., 1998; KARAMOUZIS et al., 2001; MARKWORTH; CAMERON-SMITH, 2011; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NOWAK; WENNMALM, 1978; PEAKE et al., 2005). Porém a recente descoberta de elevações plasmáticas no pós-exercício transitórias e expressivas de HETEs, HODEs, DiHETrEs e DiHOMEs ressalta a complexidade desta área científica (GIORDANO et al., 2011; GOLLASCH et al., 2019; MARKWORTH et al., 2013; NIEMAN et al., 2014, 2019, 2020). Essas oxilipinas possuem papéis semelhantes aos TXs, PGs e LTs, mas também podem influenciar na respiração mitocondrial, na captação e consumo de ácidos graxos pelo músculo esquelético, no fluxo sanguíneo para o miocárdio e para o músculo esquelético em atividade, nas respostas da pressão arterial, no tônus dos vasos renais e na excreção de sódio, e no estresse oxidativo (ACKERMANN et al., 2017; GIORDANO et al., 2011; GOLLASCH et al., 2019; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN et al., 2014; POWELL; ROKACH, 2015; SAVAS et al., 2016; SHOIEB; EL-SHERBENI; EL-KADI, 2018; SPECTOR; KIM, 2015; STANFORD et al., 2018).

Os papéis fisiológicos das oxilipinas podem variar dependendo do contexto metabólico. Por exemplo, em algumas condições como a obesidade e em vários estados de doença, algumas oxilipinas podem apresentar-se elevadas, porém também podem funcionar como agentes de sinalização durante o exercício (MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; MITMESSER, 2017; NIEMAN; PENCE, 2019; SHEARER; WALKER, 2018). Determinados tipos de oxilipinas apresentam influências anti-inflamatórias para contrabalancear a ação das oxilipinas pró-inflamatórias durante o exercício (Tabela 5) (MARKWORTH; MADDIPATI;

CAMERON-SMITH, 2016). Tais oxilipinas geralmente são geradas a partir de PUFAs ω -3, como A α L, AD e AE, entretanto algumas delas advêm da oxidação de PUFAs ω -6 (GABBS et al., 2015; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016). Aquelas derivadas de PUFAs ω -3 incluem ácidos hidroxi-octadecatrienóicos (HOTrEs), HDoHEs, HEPEs e mediadores pró-resolutivos especializados (SPMs), sendo que esses grupos de oxilipinas atuam contra as ações pró-inflamatórias de células do sistema imunológico inato (GABBS et al., 2015; KUMAR et al., 2016; SERHAN et al., 2015). É possível destacar outros papéis fisiológicos desses grupos de mediadores lipídicos derivadas de PUFAs ω -3 como a regulação do tônus vascular, a regulação da pressão arterial e a proteção cardíaca contra eventos arritmogênicos, produção de citocinas anti-inflamatórias, a regulação do reparo tecidual, e a participação de processos de coagulação sanguínea (FISCHER et al., 2014; KUMAR et al., 2016; SERHAN et al., 2015; SERHAN; LEVY, 2018; SPECTOR; KIM, 2015; VANROLLINS, 1995). Com relação às oxilipinas derivadas de PUFAs ω -6 que possuem funções semelhantes dessas citadas acima, é possível destacar o 15-HETE, EpETrEs e lipoxinas derivadas do AA (LXs), sendo elas conhecidas por atuarem sinergicamente com as oxilipinas derivadas de PUFAs ω -3 (GABBS et al., 2015; MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; SERHAN; LEVY, 2018; SPECTOR; KIM, 2015).

Os SPMs estão envolvidos principalmente na resolução da inflamação e atualmente têm gerado muito interesse científico. Esses mediadores lipídicos podem ser classificados em quatro famílias sendo elas as lipoxinas, as maresinas, as protectinas e as resolvinas (KIM et al., 2016). Essas oxilipinas são derivadas especialmente do AA [ácido 15-hidroperoxi-eicosatetraenóico (15-HpETE)], AE (18-HEPE), AD (HDoHEs) e de ácidos hidroperoxi-docosahexaenóicos (17-HpDoHE e 14-HpDoHE), e desempenham um papel chave na resolução da inflamação, por meio da regulação dos leucócitos polimorfonucleares (LPMNs) (como por exemplo, reduzindo o recrutamento de LPMNs e da quimiotaxia dos mesmos), dos macrófagos (promovendo a limpeza de detritos e de LPMNs apoptóticos), de processos de regeneração tecidual e das respostas nociceptivas (reduzindo-as) (BANNENBERG et al., 2005; NIEMAN; MITMESSER, 2017; NIEMAN; PENCE, 2019; SCHWAB et al., 2007; SERHAN et al., 2015; SERHAN; LEVY, 2018). É sugerido por alguns estudos que os níveis plasmáticos de SPMs [como o LXA₄, LXB₄, protectinas (PD₁ e 10(S), 17(S)-DiHDoHE) e resolvinas (RvE₁ e RvD₁)] aumentam tardiamente na recuperação do músculo lesionado por um

exercício exaustivo, e podem, além de participar da regulação da regeneração tecidual, participar da adaptação tecidual (Tabela 5 e Figura 2) (MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; MITMESSER, 2017). As maresinas podem não se acumular no plasma mesmo após a prática de exercícios exaustivos, mas o grande aumento de 14-HDoHE pode sugerir algum envolvimento, uma vez que ambos têm o mesmo precursor (14-HpDoHE) (Tabela 5).

Embora o fato dessa área de atuação científica ainda ser nova, os dados disponíveis indicam uma dependência da intensidade e duração do exercício físico na produção de oxilipinas ω -6 e ω -3. Isso é condizente ao que relatamos com metabólitos plasmáticos em geral (SAKAGUCHI et al., 2019). Os estudos que foram incluídos nesta revisão sistemática evidenciam, através de seus dados, pequenas alterações nos níveis plasmáticos de oxilipinas após exercícios com baixa intensidade e curta duração sendo contrastantes com as grandes alterações observadas após exercícios de alta intensidade e longa duração (Tabela 5). Além disso, os dados dos estudos incluídos tendem a apontar para valores aumentados de oxilipinas pró-inflamatórias ocorrendo precocemente na recuperação do exercício (TXs, PGs, HETEs e HODEs) seguido por valores aumentados de SPMs em um período mais tardio (MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; NIEMAN; MITMESSER, 2017). Ademais, os estudos também sustentam que a maior parte das oxilipinas retorna a níveis próximos ao pré-exercício após cinco horas de recuperação (MARKWORTH et al., 2013; NIEMAN et al., 2014, 2019, 2020; VELLA et al., 2019). Tais achados apresentam implicações na avaliação da influência de medicamentos e suplementos nutricionais nas alterações proporcionadas pelo exercício físico nas oxilipinas, uma vez que esses fatores apresentam uma ação direta sobre a atividade das enzimas envolvidas na geração desses metabólitos, podendo ter efeitos na modulação da intensidade da resposta inflamatória e no grau de adaptação tecidual (MARKWORTH et al., 2013, 2016; NIEMAN et al., 2019).

Os efeitos de longo prazo do exercício físico sobre a atuação das vias COX, LOX e CYP, e na geração de oxilipinas, ainda são quase que totalmente desconhecidos, sendo que os estudos publicados até o momento possuem inúmeras limitações em seus desenhos (GARCÍA-FLORES et al., 2018; MEDINA et al., 2012), como por exemplo, a população utilizada (por apresentar uma característica muito específica e pouco representativa da população em geral), a pequena quantidade de sujeitos avaliados, e o

pequeno número de oxilipinas mensuradas. As alterações observadas nas oxilipinas identificadas no plasma e na urina em decorrência do treinamento físico são variáveis e apresentam pequena magnitude. Nesse sentido, estudos maiores com o foco em treinamento físico são necessários para confirmar se a resposta anti-inflamatória tipicamente observada é sustentada ou não por meio das alterações correspondentes no perfil das oxilipinas pró- e anti-inflamatórias. Contudo, dados limitados indicam que indivíduos obesos, em comparação com indivíduos eutróficos, apresentam níveis plasmáticos mais elevados de oxilipinas pró-inflamatórias e outros biomarcadores relacionados (NIEMAN; MITMESSER, 2017; NIEMAN; WENTZ, 2019).

4.2. Matriz

Amostras de sangue (soro ou plasma) foram utilizados por seis estudos incluídos nesta revisão (GIORDANO et al., 2011; GOLLASCH et al., 2019; MARKWORTH et al., 2013; NIEMAN et al., 2014, 2019, 2020), enquanto dois usaram amostras de urina (GARCÍA-FLORES et al., 2018; MEDINA et al., 2012) e um usou amostras de biópsia muscular (VELLA et al., 2019). Um maior esclarecimento sobre a influência da matriz biológica nas alterações provocadas pelo exercício físico sobre as oxilipinas é necessário, considerando que a mesma pode evidenciar condições sistêmicas (soro, plasma e urina) ou especificamente condições teciduais (biópsia muscular). A resposta das oxilipinas aos efeitos de curto prazo do exercício parece ser comparável nas amostras de soro, plasma e músculo. Além disso, as amostras de urina parecem ser mais úteis em estudos de longo prazo (WOLFER et al., 2015), enquanto as amostras de soro e plasma são preferidas em estudos que avaliam o efeito de curto prazo do exercício físico devido ao aparecimento transitório das oxilipinas (MARKWORTH; MADDIPATI; CAMERON-SMITH, 2016; WOLFER et al., 2015). As alterações das oxilipinas em resposta aos efeitos de curto prazo proporcionados pelo exercício resistido em amostras de plasma e biópsia muscular foram razoavelmente comparáveis, porém mais investigações nesta área são necessárias.

4.3. Limitações

É relativamente nova a pesquisa na área de exercício físico e oxilipinas, e nessa revisão de literatura, somente seis estudos, dos nove incluídos, evidenciaram um grande número de oxilipinas mensuradas. Destaca-se também a heterogeneidade dos desenhos

experimentais dos estudos incluídos (como por exemplo, os momentos das coletas das amostras definidos, população utilizada, bem como as restrições, controle nutricional e condições impostas nos dias/semanas anteriores a execução do exercício/treinamento). Nesse sentido, as conclusões geradas nesta revisão sistemática podem mudar de acordo com a publicação de novos artigos que utilizem uma gama mais ampla de modalidades de exercícios e de cargas de trabalho.

5 Conclusão

Melhorias recentes na espectrometria de massas e na bioinformática proporcionaram um avanço na compreensão científica das oxilipinas e seus papéis fisiológicos, e nos efeitos das intervenções no estilo de vida, incluindo o exercício físico. Apenas recentemente foi descrito sobre a produção de oxilipinas induzida pelo exercício, e a pesquisa científica nesta área ainda deve avançar muito durante a próxima década. Tanto o número de oxilipinas geradas como a magnitude do aumento das mesmas durante as sessões pontuais de exercício físico estão diretamente relacionados à carga de trabalho geral. O acúmulo de oxilipinas no plasma é algo transitório e de período relativamente curto, com os níveis da maioria desses metabólitos retornando próximo aos níveis pré-exercício em até cinco horas, mesmo após cerca de três horas contínuas de exercício intenso. Embora os papéis fisiológicos durante o exercício e a recuperação ainda não tenham sido totalmente esclarecidos, dados de estudos auxiliares sugerem amplos efeitos regulatórios centrados em torno da inflamação e da função vascular. Os sistemas enzimáticos envolvidos na produção de oxilipinas são complexos e com múltiplos controles regulatórios, e, portanto, pesquisas futuras, como o projeto do *National Institutes of Health*, “*Molecular Transducers of Physical Activity in Humans Consortium*” (MoTrPAC)(SPARKS, 2017), permitirão uma melhor definição das respostas das oxilipinas ao treinamento físico, exercícios de moderada intensidade versus alta intensidade, dano muscular, nutrição esportiva, intervenções medicamentosas e modalidades variadas de exercícios.

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (Auxílio temático: 2016/22215-7 e Bolsa DD, nº 2018/250823).

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, bolsa: 001).

6 Referências

ACKERMANN, J. A. et al. The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 4, p. 371–381, abr. 2017.

BANNENBERG, G. L. et al. Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4345–4355, 1 abr. 2005.

CARROLL, C. C. et al. The influence of acute resistance exercise on cyclooxygenase-1 and -2 activity and protein levels in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 1, p. R24–R30, 1 jul. 2013.

DEMERS, L. M. et al. Effect of prolonged exercise on plasma prostaglandin levels. **Prostaglandins and Medicine**, v. 6, n. 4, p. 413–418, abr. 1981.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 12, p. 1063–1073, set. 1998.

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 - EASE '16. **Anais...** In: THE 20TH INTERNATIONAL CONFERENCE. Limerick, Ireland: ACM Press, 2016. Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?doid=2915970.2916013>>. Acesso em: 20 mar. 2019

FISCHER, R. et al. Dietary omega-3 fatty acids modulate the eicosanoid profile in man primarily via the CYP-epoxygenase pathway. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 6, p. 1150–1164, 2014.

GABBS, M. et al. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 6, n. 5, p. 513–540, set. 2015.

GARCÍA-FLORES, L. A. et al. Aronia-citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: a lipidomic approach using representative oxylipins in urine. **Food & Function**, v. 9, n. 1, p. 463–475, 24 jan. 2018.

GHOSH, M. et al. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 6, p. 487–510, 1 nov. 2006.

GIORDANO, R. M. et al. Effects of dynamic exercise on plasma arachidonic acid epoxides and diols in human volunteers. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 21, n. 6, p. 471–479, dez. 2011.

GOLLASCH, B. et al. Maximal exercise and plasma cytochrome P450 and lipoxygenase mediators: a lipidomics study. **Physiological Reports**, v. 7, n. 13, p. e14165, jul. 2019.

GUIJAS, C. et al. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 12, p. 1661–1671, dez. 2014.

KALEY, G.; WEINER, R. Prostaglandin E1: A Potential Mediator of the Inflammatory Response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 180, n. 1, p. 338–350, 1971.

KARAMOUZIS, M. et al. The response of muscle interstitial prostaglandin E(2)(PGE(2)), prostacyclin I(2)(PGI(2)) and thromboxane A(2)(TXA(2)) levels during incremental dynamic exercise in humans determined by in vivo microdialysis. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 64, n. 4–5, p. 259–263, maio 2001.

KIM, N. et al. Specialized pro-resolving mediators (SPMs) inhibit human B-cell IgE production. **European journal of immunology**, v. 46, n. 1, p. 81–91, jan. 2016.

KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise, MAPK, and NF- κ B signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 1, p. 388–395, 1 jul. 2007.

KUMAR, N. et al. 15-Lipoxygenase metabolites of α -linolenic acid, [13-(S)-HPOTrE and 13-(S)-HOTrE], mediate anti-inflammatory effects by inactivating NLRP3 inflammasome. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 18 ago. 2016.

LESLIE, C. C. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 8, p. 1386–1402, 1 ago. 2015.

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, p. e1000100, 21 jul. 2009.

LYNES, M. D. et al. The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. **Nature Medicine**, v. 23, n. 5, p. 631–637, maio 2017.

MARKWORTH, J. F. et al. Human inflammatory and resolving lipid mediator responses to resistance exercise and ibuprofen treatment. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 11, p. R1281-1296, dez. 2013.

MARKWORTH, J. F.; CAMERON-SMITH, D. Prostaglandin F $_{2\alpha}$; stimulates PI3K/ERK/mTOR signaling and skeletal myotube hypertrophy. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 300, n. 3, p. C671-682, mar. 2011.

MARKWORTH, J. F.; MADDIPATI, K. R.; CAMERON-SMITH, D. Emerging roles of pro-resolving lipid mediators in immunological and adaptive responses to exercise-induced muscle injury. **Exercise Immunology Review**, v. 22, p. 110–134, 2016.

- MASSEY, K. A.; NICOLAOU, A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1240–1246, 1 out. 2011.
- MEDINA, S. et al. Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 99, n. 3–4, p. 79–86, dez. 2012.
- MURAKAMI, M. et al. The Roles of the Secreted Phospholipase A2 Gene Family in Immunology. **Advances in Immunology**, v. 132, p. 91–134, 2016.
- 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. 2014.
- NIEMAN, D. C. et al. Carbohydrate intake attenuates post-exercise plasma levels of cytochrome P450-generated oxylipins. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. e0213676, 2019.
- NIEMAN, D. C. et al. Blueberry and/or Banana Consumption Mitigate Arachidonic, Cytochrome P450 Oxylipin Generation During Recovery From 75-Km Cycling: A Randomized Trial. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 121, 7 ago. 2020.
- NIEMAN, D. C.; LILA, M. A.; GILLITT, N. D. Immunometabolism: A Multi-Omics Approach to Interpreting the Influence of Exercise and Diet on the Immune System. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 341–363, 2019.
- 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.; PENCE, B. D. Exercise immunology: Future directions. **Journal of Sport and Health Science**, 30 dez. 2019.
- 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, maio 2019.
- NOWAK, J.; WENNMALM, Å. Effect of exercise on human arterial and regional venous plasma concentrations of prostaglandin E. **Prostaglandins and Medicine**, v. 1, n. 6, p. 489–497, 1 dez. 1978.
- PEAKE, J. M. et al. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 5–6, p. 514–521, dez. 2005.
- POWELL, W. S.; ROKACH, J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxo-eicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 340–355, abr. 2015.

SAKAGUCHI, C. A. et al. Metabolomics-Based Studies Assessing Exercise-Induced Alterations of the Human Metabolome: A Systematic Review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, p. 164, ago. 2019.

SATO, H.; TAKETOMI, Y.; MURAKAMI, M. Metabolic regulation by secreted phospholipase A2. **Inflammation and Regeneration**, v. 36, n. 1, p. 7, 21 maio 2016.

SAVAS, Ü. et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (HETE)-dependent Hypertension in Human Cytochrome P450 (CYP) 4A11 Transgenic Mice: NORMALIZATION OF BLOOD PRESSURE BY SODIUM RESTRICTION, HYDROCHLOROTHIAZIDE, OR BLOCKADE OF THE TYPE 1 ANGIOTENSIN II RECEPTOR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 32, p. 16904–16919, 05 2016.

SCHWAB, J. M. et al. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 869–874, jun. 2007.

SERHAN, C. N. et al. Protectins and Maresins: New Pro-Resolving Families of Mediators in Acute Inflammation and Resolution Bioactive Metabolome. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1851, n. 4, p. 397–413, abr. 2015.

SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 02 2018.

SHEARER, G. C.; WALKER, R. E. An overview of the biologic effects of omega-6 oxylipins in humans. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 137, p. 26–38, 2018.

SHOIEB, S.; EL-SHERBENI, A.; EL-KADI, A. Subterminal hydroxyeicosatetraenoic acids: Crucial lipid mediators in normal physiology and disease states. **Chemico-biological Interactions**, v. 299, p. 140–150, 10 dez. 2018.

SON, Y. et al. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. **Methods in Enzymology**, v. 528, p. 27–48, 2013.

SPARKS, L. M. Exercise training response heterogeneity: physiological and molecular insights. **Diabetologia**, v. 60, n. 12, p. 2329–2336, 1 dez. 2017.

SPECTOR, A. A.; KIM, H.-Y. Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 356–365, abr. 2015.

STANFORD, K. I. et al. 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 1111- 1120.e3, 1 maio 2018.

STARK, K. D. et al. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. **Progress in Lipid Research**, v. 63, p. 132–152, 2016.

SUZUKI, K. Cytokine Response to Exercise and Its Modulation. **Antioxidants**, v. 7, n. 1, 17 jan. 2018.

VANROLLINS, M. Epoxygenase metabolites of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit platelet aggregation at concentrations below those affecting thromboxane synthesis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 2, p. 798–804, 1 ago. 1995.

VELLA, L. et al. Intramuscular inflammatory and resolving lipid profile responses to an acute bout of resistance exercise in men. **Physiological Reports**, v. 7, n. 13, p. e14108, 2019.

WILLENBERG, I.; OSTERMANN, A. I.; SCHEBB, N. H. Targeted metabolomics of the arachidonic acid cascade: current state and challenges of LC-MS analysis of oxylipins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 10, p. 2675–2683, abr. 2015.

WOLFER, A. M. et al. Development and Validation of a High-Throughput Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Approach for Screening of Oxylipins and Their Precursors. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 23, p. 11721–11731, 1 dez. 2015.

ZIMMER, B. et al. The oxidized linoleic acid metabolite 12,13-DiHOME mediates thermal hyperalgesia during inflammatory pain. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1863, n. 7, p. 669–678, 2018.

ESTUDO 2 – Com inclusão de ilustrações

Perspectiva integrativa do processo de envelhecimento saudável considerando o metaboloma, modulação autonômica cardíaca e aptidão cardiorrespiratória avaliadas por faixas etárias

Étore F. Signini¹; Alex Castro²; Patrícia Rehder-Santos¹; Juliana C. Millan-Mattos¹; Juliana M. de Oliveira²; Vinicius Minatel¹; Camila B. F. Pantoni^{1,3}; Heloisa S. S. de Araújo⁴; Fernando Fabrizzi⁵; Alberto Porta^{6,7}; Antônio G. Ferreira²; Regina V. Oliveira²; Aparecida M. Catai¹.

¹ Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

³ Departamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

⁴ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

⁵ Fundação Educacional de Penápolis (FUNEPE), Penápolis, São Paulo, Brasil.

⁶ Departamento de Ciências Biomédicas para a Saúde, Universidade de Milão, Milão, Itália.

⁷ Departamento de Cardiotorácica, Anestesia Vascular e Cuidado Intensivo, Policlinico San Donato, San Donato Milanese, Milão, Itália.

1 Introdução

O envelhecimento é um processo complexo reconhecido por alterações em todos os níveis orgânicos: de células e organelas, a órgãos e sistemas (YU et al., 2012). As características da senescência que ocorrem nas células do organismo podem ser resumidas como decorrentes da instabilidade genômica (1), encurtamento de telômeros (2), alterações epigenéticas (3), perda da proteostase (4), desabilitação da macroautofagia (5), detecção desregulada de nutrientes (6), disfunção mitocondrial (7), senescência celular (8), exaustão de células-tronco (9), comunicação intercelular alterada (10), inflamação crônica (11), e da disbiose (12) (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013, 2016, 2023). É possível destacar as cinco primeiras características (1-5) como as principais responsáveis pelos efeitos deletérios do envelhecimento, as três seguintes (6-

8) como amenizadores ou intensificadores (variando de acordo com o grau de comprometimento) das quatro características anteriores, enquanto as quatro últimas (9-12) como consequências das alterações nas oito características anteriores e que retroalimentam os causadores dos efeitos deletérios do envelhecimento (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013, 2016, 2023).

Essas alterações observadas durante o processo de envelhecimento, que são moduladas de acordo com os hábitos de vida e a característica genética, relacionam-se com alterações funcionais e estruturais nos sistemas orgânicos (FAFIÁN-LABORA; O'LOGHLEN, 2020; LÓPEZ-OTÍN et al., 2016; PANENI et al., 2017; SHARMA; GOODWIN, 2006; TIELAND; TROUWBORST; CLARK, 2018), como por exemplo, a integridade do sistema nervoso autônomo (SNA) e a capacidade do organismo de gerar energia a partir do oxigênio, sendo esse último dependente da integridade de vários sistemas (FLEG et al., 2005; KRITSILIS et al., 2018; TAKAHASHI et al., 2012; TIELAND; TROUWBORST; CLARK, 2018). Enquanto o SNA desempenha um papel importante no controle, manutenção e na regulação das funções vitais e viscerais do organismo (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016), o consumo de oxigênio pico (VO_{2PICO}) é o resultado da maior capacidade da atividade integrada do metabolismo com os sistemas muscular, cardiovascular, respiratório e nervoso, e relaciona-se com a aptidão cardiorrespiratória (ACR) (K WASSERMAN, 2004). Nesse sentido, a atividade do SNA e o valor de VO_{2PICO} são importantes marcadores de integridade de saúde sistêmica e metabólica. Vários estudos relataram que um desequilíbrio no SNA, como por exemplo, um aumento da modulação simpática cardíaca atrelada a uma redução da modulação parassimpática cardíaca, bem como a redução progressiva dos valores de VO_{2PICO} , são observados no envelhecimento fisiológico (FLEG et al., 2005; PORTA et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2012).

Recentemente, com o avanço das ciências “ômicas” e da bioinformática, diversos estudos têm utilizado a metabolômica para estudar o metabolismo durante o envelhecimento, principalmente pela vantagem na possibilidade de avaliar características mais fenotípicas do organismo (COLLINO et al., 2013a; JOVÉ et al., 2016; LAWTON et al., 2008; YU et al., 2012). O principal foco desses estudos tem sido em saber quais as alterações e qual o perfil do metaboloma humano que estão relacionadas com os efeitos do envelhecimento e que explicam a longevidade observada em alguns sujeitos, respectivamente (COLLINO et al., 2013a; LAWTON et al., 2008).

Assim, alguns estudos também têm investigado as associações entre as alterações dos sistemas orgânicos observados comumente no envelhecimento e o perfil metabólico (LAWTON et al., 2008; PIEDEPALUMBO; KOCH; DE LUCIA, 2021), incluindo a relação entre metaboloma e ACR, ou metaboloma e o controle do SNA (LEWIS et al., 2010; LUSTGARTEN et al., 2013; ZIEGLER et al., 2021). Alguns estudos evidenciaram diferenças nos níveis séricos de diversos metabólitos envolvidos especialmente nas vias bioenergéticas em indivíduos com uma alta ACR (como reduções de aminoácidos, intermediários do ciclo do ácido cítrico, e glicerol no sangue em repouso) (KELLY; KELLY; KELLY, 2020; MORRIS et al., 2013). Por outro lado, considerando o controle autonômico cardíaco no contexto de doenças como o diabetes mellitus, alguns estudos destacaram um desequilíbrio sérico nos níveis de aminoácidos, ácidos graxos e metabólitos envolvidos no ciclo de Krebs com uma redução da modulação parassimpática cardíaca (MATHEW et al., 2019; ZIEGLER et al., 2021). No entanto, as alterações integradas no perfil metabólico e nos sistemas orgânicos durante o envelhecimento saudável em indivíduos sem grandes fatores de risco cardiovascular (como obesidade, hipertensão, tabagismo, etc.) ainda são pouco esclarecidas, sendo a metabolômica uma ferramenta interessante no auxílio da compreensão dessas alterações integradas.

Considerando o atual interesse emergente em compreender a complexidade do processo de envelhecimento, a avaliação conjunta do perfil metabólico com a modulação autonômica cardíaca (MAC) e da aptidão cardiorrespiratória por meio das décadas de vida pode auxiliar em uma compreensão mais ampla das alterações causadas pelo envelhecimento fisiológico. Além disso, esse conhecimento permitirá verificar se há a existência de uma faixa etária na qual as alterações tornam-se mais evidentes, o que pode contribuir no desenvolvimento de estratégias mais efetivas que objetivam um envelhecimento saudável. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar, de maneira integrada, o curso temporal de variáveis do metaboloma humano e de variáveis relacionadas à MAC e à ACR no envelhecimento, em diferentes faixas etárias considerando indivíduos aparentemente saudáveis e sem grandes fatores de risco.

2 Métodos

2.1. Participantes

Todos os participantes foram recrutados por meio da mídia eletrônica e impressa e por meio de contatos no banco de dados do Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular (LFCV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). No primeiro dia foram realizadas anamnese e exame físico para a aquisição do peso, altura, e índice de massa corporal (IMC) dos indivíduos. Além disso, no mesmo dia, os participantes eram triados por meio de um questionário genérico que incluía questões sobre: histórico de doenças e condições médicas, uso de medicamentos contínuos, histórico prévio de exames clínicos, histórico de doenças familiares, realização de dietas específicas, e atividade física. Os indivíduos só eram incluídos caso fossem aparentemente saudáveis (sem qualquer comprometimento identificável ou diagnosticado de saúde, como problemas cardiovasculares, respiratórios, musculoesqueléticos, metabólicos e neurológicos); não obesos ($IMC < 30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$); não fumantes; não alcoolistas ou usuários de drogas ilícitas ou medicamentos contínuos relacionados a condições crônicas; e livre de qualquer histórico de comprometimento cardiovascular. Os sujeitos incluídos foram solicitados a realizar um teste ergométrico com um cardiologista da Unidade de Saúde Escola da UFSCar antes de realizar o protocolo experimental, no caso de não possuírem um exame recente (<1 ano). Os participantes eram excluídos do protocolo experimental caso apresentassem: alterações cardiovasculares como arritmias excessivas e sinais isquêmicos do miocárdio (como por exemplo, depressão do segmento ST), ou hiperreatividade da pressão arterial (como por exemplo, aumento da pressão arterial de maneira excessiva ou não proporcional ao exercício), verificados por alterações nos sinais do eletrocardiograma (ECG) e na mensuração da pressão arterial, respectivamente, durante o teste ergométrico, no teste de exercício cardiopulmonar (TECP), ou ainda na avaliação autonômica; bem como a ocorrência de hipotensão acentuada ou recorrente durante as avaliações no LFCV; e alterações evidentes nos exames de sangue (por exemplo, hiperglicemia e o alto nível de proteína C-reativa). Assim, participaram do estudo 118 indivíduos aparentemente saudáveis não treinados com idade entre 20 e 70 anos (Figura 6, Tabela 1, e Tabela 2), e com classificação funcional aeróbia variando entre fraca e boa de acordo com a classificação da *American Heart Association* (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 1972) (Tabela 3), sendo

eles divididos em cinco grupos de acordo com a idade: 20-29 anos (G_{20-29}), 30-39 anos (G_{30-39}), 40-49 anos (G_{40-49}), 50-59 anos (G_{50-59}), e 60-70 anos (G_{60-70}). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar (número: 173/2011) e conduzido de acordo com as normas estabelecidas pela Declaração de Helsinque. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido após aceitarem participar do estudo.

2.2. Desenho experimental

O estudo teve um caráter observacional e transversal, e investigou as diferenças existentes entre cinco faixas etárias (por décadas de vida) compostas por indivíduos aparentemente saudáveis, como acima descrito, e teve como variável independente as faixas etárias e as variáveis dependentes aquelas oriundas do metaboloma, MAC, ACR e de testes bioquímicos do sangue.

Quanto ao protocolo experimental, todos os indivíduos incluídos foram submetidos a anamnese e exame físico com um intervalo mínimo de 2 dias antes da execução de qualquer procedimento experimental para que o participante pudesse se ajustar às recomendações. A coleta de sangue para análise metabolômica e bioquímica foi realizada em um laboratório especializado de São Carlos (Laboratório de Análises Clínicas da UNIMED de São Carlos). Todas as outras avaliações do protocolo experimental foram realizadas no LFCV.

2.2.1. Amostras de sangue

A coleta de sangue foi realizada de manhã após jejum de 12 horas, no mesmo dia da avaliação autonômica cardíaca. As amostras de sangue foram utilizadas para a realização das análises metabolômicas e também para a realização de exames bioquímicos na UNIMED para avaliação do estado de saúde dos participantes. Considerando a metabolômica, as amostras de sangue coletadas em tubos separadores de soro (S-Monovette 4,9 ml, Sarstedt, Alemanha) foram imediatamente levadas ao Departamento de Fisioterapia. As amostras de sangue foram então centrifugadas a 1.450 g por 10 min (Sorvall ST 8 Benchtop Centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e o soro coletado. Após, o soro sanguíneo foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a análise posterior.

A condição de saúde dos participantes foi acessada por meio dos valores de jejum de colesterol total (CT), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, glicose, ácido úrico, uréia, creatinina e proteína C-reativa ultrasensível (PCRus). O CT, HDL, VLDL, triglicerídeos, ácido úrico, uréia, glicose e creatinina foram quantificados usando química úmida (exceto para LDL que foi calculado a partir da equação de Friedewald) (Advia 1800, Siemens, Alemanha). A PCRu foi quantificada por turbidimetria (Advia 1800, Siemens, Alemanha).

2.2.2. Avaliação da modulação autonômica cardíaca

No mesmo dia da coleta de sangue, porém no período da tarde, foi realizada a avaliação autonômica cardíaca. A temperatura e a umidade do ar da sala de avaliação foram controladas em valores entre 21°C e 24°C e entre 40% e 60%, respectivamente. Os participantes foram instruídos a não consumir alimentos e bebidas estimulantes (como chá, café e bebidas e alimentos muito açucarados, como doces em geral e refrigerantes), refeições pesadas e bebidas alcoólicas por pelo menos 24 horas antes da avaliação e não realizar atividade física extenuante por pelo menos 48 horas antes da avaliação (CATAI et al., 2020). Além disso, com relação às mulheres em idade reprodutiva, todas foram avaliadas apenas no período folicular do ciclo menstrual (entre o 7º e o 10º dia do ciclo menstrual) (MILAN-MATTOS et al., 2019). Apenas mulheres em idade reprodutiva com ciclos menstruais regulares ou mulheres na pós-menopausa (com amenorreia por pelo menos 1 ano) foram incluídas. Mulheres com os requisitos acima descritos, porém, que faziam uso de anticoncepcionais ou alguma terapia de reposição hormonal, não foram incluídas no estudo (MILAN-MATTOS et al., 2019). O teste fundamentou-se na aquisição de dados cardíacos no repouso e em decúbito dorsal. O participante foi mantido em repouso e em decúbito dorsal em uma maca por no mínimo 10 minutos para estabilização das variáveis cardiovasculares. Após esse período, as variáveis cardíacas e respiratórias (frequência cardíaca e frequência respiratória) foram registradas continuamente por 15 minutos. Todos os sujeitos foram instruídos a evitar qualquer comunicação e movimentos durante a avaliação, com exceção de situações necessárias, como por exemplo, algum mal-estar. Os sinais de ECG foram adquiridos pela derivação MC5 (BioAmp FE132, ADInstruments, New South Wales, Austrália), enquanto que o movimento respiratório adquirido por meio de

uma cinta respiratória (Marazza, Monza, Itália). Todos os sinais foram integrados em um hardware (Power Laboratory 8/35, ADInstruments, New South Wales, Austrália) e foram processados por um software (LabChart, versão 7.3.8, ADInstruments, New South Wales, Austrália).

2.2.3. *Teste de exercício cardiopulmonar (TECP)*

O TECP foi realizado para acessar a ACR dos participantes, que foi definida como o consumo de oxigênio de pico (VO_{2PICO}). Esse teste foi executado no mesmo dia da coleta de sangue, mas sempre após a avaliação autonômica cardíaca (devido à influência do esforço físico sobre as variáveis autonômicas cardiovasculares), ou em algum dia próximo (respeitando os critérios estabelecidos para a realização da avaliação autonômica cardíaca). Além disso, todas as instruções e o controle da temperatura e umidade ambiente, que foram utilizados para avaliação autonômica cardíaca, foram as mesmas para o TECP. O TECP foi realizado em esteira ergométrica (Master ATL, Inbramed, Rio Grande do Sul, Brasil) com protocolo composto por um aquecimento de 4 min a 1,4 km/h com 0% de inclinação; seguido por um incremento proporcional da velocidade a cada 30 s, considerando a velocidade máxima de caminhada do sujeito (determinada em uma sessão prévia) como referência; e após atingir a velocidade máxima de caminhada, o incremento da inclinação de 0,5% a cada 15 s até a exaustão (DE MARIA et al., 2019) ou até o surgimento de critérios de interrupção propostos por Balady et al. (BALADY et al., 2010). As variáveis ventilatórias e metabólicas foram obtidas a cada respiração por meio de um carrinho metabólico (CPX MedGraphics—St Paul, Minnesota, EUA) e processadas em um software específico (Breeze Suite 7.1, MedGraphics – St. Paul, Minnesota, EUA), enquanto que o ECG de 12 derivações foi obtido por um eletrocardiógrafo (CardioPerfect, Welch Allyn, Nova York, EUA). Foi determinado que o maior valor de VO_2 obtido nos últimos 30 segundos de incremento de carga do TECP seria o VO_{2PICO} (DE MARIA et al., 2019) (Figura 1).

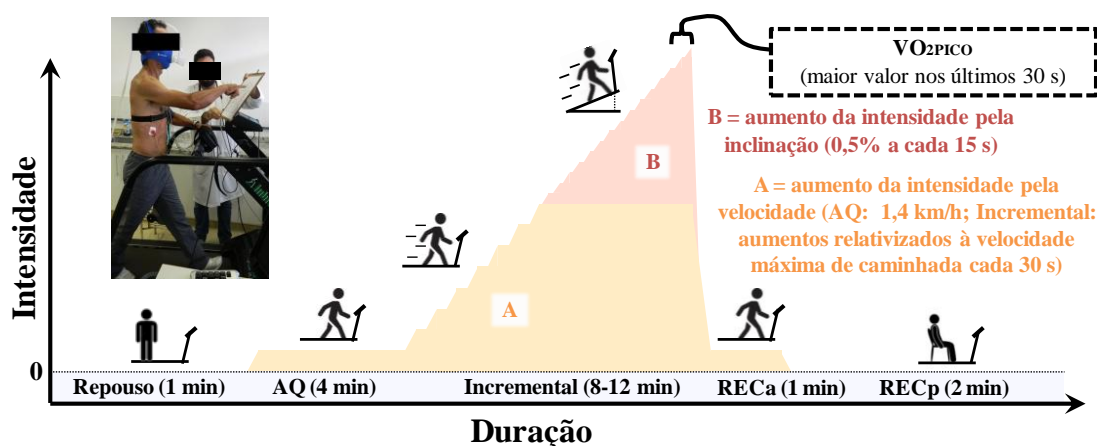


Figura 1. Ilustração da execução do teste de exercício cardiopulmonar em esteira ergométrica, no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, e do protocolo utilizado. AQ: aquecimento; RECa: recuperação ativa; RECP: recuperação passiva; VO₂PICO: consumo de oxigênio pico.

2.3. Processamento de dados autonômicos

Para a análise da MAC foram consideradas sequências de curto prazo (256 valores consecutivos de períodos cardíacos) selecionadas da região mais estável do tacograma (TASK FORCE, 1996) definida na inspeção visual. O período cardíaco (PC) foi adquirido por meio da distância temporal entre dois picos de onda R normais e consecutivos obtidos no ECG (ou seja, a distância temporal entre dois batimentos cardíacos consecutivos em milissegundos), e o tacograma foi obtido a partir da reprodução gráfica de todos os valores de PC gerados a partir de cada batimento cardíaco considerando todos os batimentos cardíacos analisados. O tacograma de todos os participantes foi cuidadosamente verificado para evitar detecções errôneas ou batimentos perdidos devido a alterações nos delineamentos da onda R antes de selecionar as sequências. Os batimentos ectópicos isolados foram corrigidos por interpolação linear usando o valor do PC adjacente não afetado (CATAI et al., 2020; DE MARIA et al., 2019). Variáveis do domínio do tempo, como a média dos PCs e a variância dos PCs (σ^2_{PC}), foram calculadas para cada sequência de curto prazo. A σ^2_{PC} relaciona-se com a MAC global (modulação parassimpática cardíaca + modulação simpática cardíaca).

A análise espectral foi realizada ajustando a potência espectral paramétrica univariada das sequências de curto prazo de acordo com o modelo autorregressivo (PORTA et al., 1998). Após, os componentes espectrais foram decompostos em bandas expressas em unidades absolutas (ms^2) e definidas como bandas de alta frequência

(>0,15 a 0,40 Hz), bandas de baixa frequência (0,04 a 0,15 Hz) e muito baixa frequência (<0,04 Hz) (TASK FORCE, 1996). A análise da MAC foi baseada nas bandas de alta (HF, que indica a modulação parassimpática cardíaca) e baixa (LF, que indica a contribuição conjunta das modulações simpática + parassimpática cardíaca, com predominância da modulação simpática cardíaca) frequências absolutas. A razão entre esses dois índices (LF/HF) para tipificar o equilíbrio simpato-vagal sobre o coração (PAGANI et al., 1986) e o índice normalizado de cada banda também foram calculados (Figura 2).

Todos os processamentos e análises dos dados referentes a MAC foram feitos por meio de um *software* desenvolvido pelo Prof. Alberto Porta, da UNIMI, Milão, colaborador desse estudo.

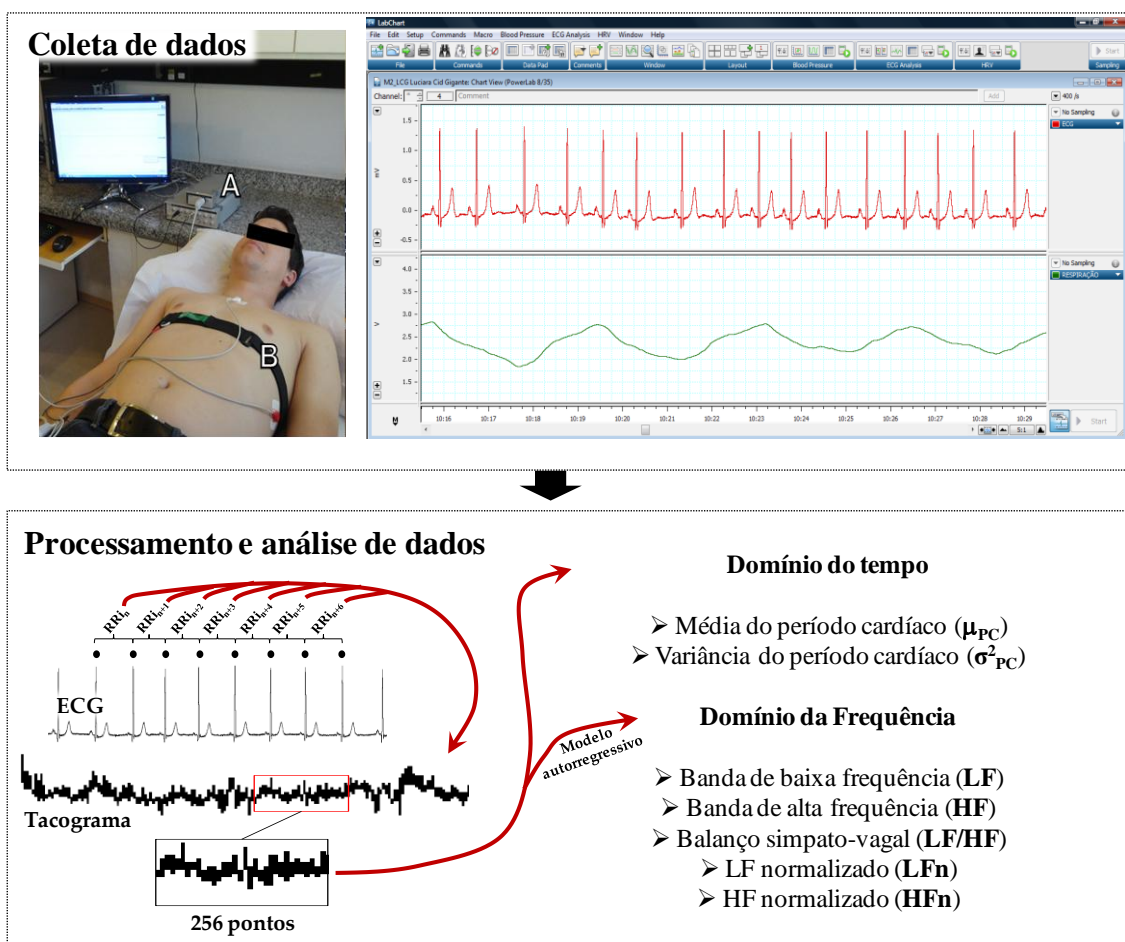


Figura 2. Ilustração da execução da avaliação autônoma cardíaca e do processamento e análise dos dados, no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar. A: sistema de captação do ECG (Bio Amp PowerLab®, ADInstruments, Austrália) e sistema de aquisição de sinais biológicos (PowerLab® 8/35, ADInstruments, Austrália); B: cinta respiratória (Marazza, Monza, Itália).

2.4. Análise metabolômica

A análise metabolômica foi realizada em alíquotas das amostras de soro considerando a cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS) e a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN), com base em uma abordagem *untargeted*. O Processamento dos dados para a análise metabolômica foi realizado nos Laboratórios de RMN e no SEPARARE, ambos do Departamento de Química da UFSCar.

2.4.1. ^1H RMN

Todas as alíquotas das amostras de soro destinadas à técnica de ^1H RMN foram inicialmente descongeladas e filtradas em filtros de 3 kDa (Amicon Ultra) com uma centrifugação a 14.000 g por 30 min a 4°C. Os filtros foram previamente lavados cinco vezes com 500 μL de água Milli-Q, seguido por uma centrifugação a 14.000 g por 5 min a 4°C, e uma centrifugação com o filtro na posição inversa, e rotação a 7.500 g por 60 s, para eliminar qualquer resíduo de água Milli-Q. As amostras filtradas foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm (Wilmad Standard Series 5 mm, Sigma-Aldrich) contendo tampão fosfato [(fosfato de sódio monobásico, NaH_2PO_4 , 119,97 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; fosfato de sódio dibásico, Na_2HPO_4 , 141,96 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), TMS P-d_4 [ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetradeutero propiônico]; 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ como referência interna] e D_2O (99,9%; Cambridge Isotope Laboratories Inc.), com as respectivas proporções: 100 μL , 40 μL e 260 μL . Todas as medições de ^1H RMN foram adquiridas utilizando um espectrômetro de 14,1 Tesla Bruker (600 MHz para frequência de hidrogênio), equipado com uma criosonda TCI de 5 mm usando uma temperatura de 298 K. Para o espectro de ^1H , uma sequência de pulso com sinal de pré-saturação de H_2O (nomeado por Bruker como *noesypr1d*) foi utilizado adotando uma onda contínua, assumindo os seguintes parâmetros de aquisição: tempo de aquisição (AQ = 3,63 s), largura espectral (SW = 30 ppm), atraso de relaxamento (d1 = 4 s), tempo de pulso de 90° (p1 = 9,5 μs) e número de varreduras (ns = 128). Todos os espectros foram processados com alargamento de linha de 0,3 Hz (lb) para atenuar o ruído nos sinais espectrais. Com o espectro adquirido, as correções da linha de base, identificação, e quantificação dos metabólitos presentes nas amostras foram feitas utilizando o *software Suite 8.6 Chenomx* (Chenomx

Inc., Edmonton, AB, Canadá) (Figura 3). O sinal do TMSP-d4 ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) foi utilizado como uma referência interna para quantificar outros metabólitos. Por fim, espectros 2D de RMN (como COSY, HSQC e HMBC) foram realizados a fim de confirmar a identificação feita pelo *Chenomx* ou a identificação de outros compostos.

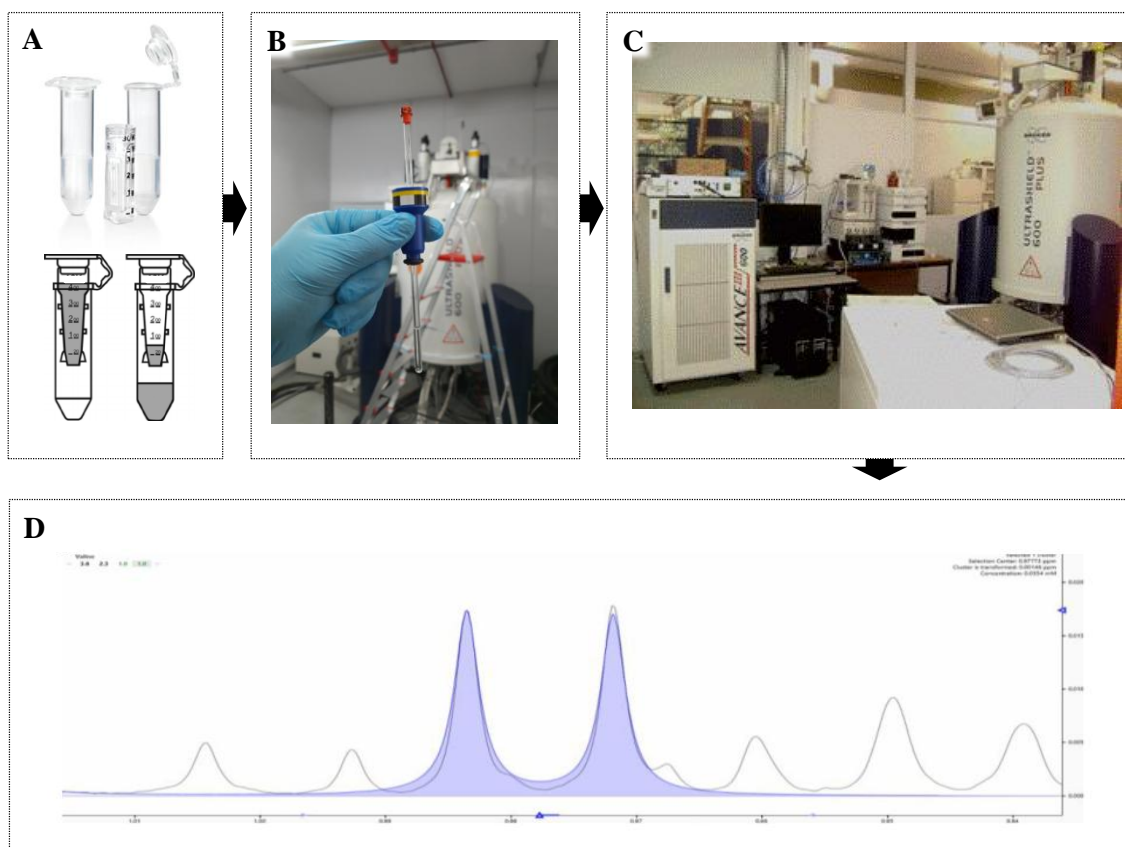


Figura 3. Ilustração do processamento e análise das amostras pela técnica analítica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar. A: Filtros de 3 kDa Amicon Ultra utilizados para filtragem das amostras; B: Tubo de RMN contendo a mistura (amostra + tampão de fosfato + D_2O); C: Aparelho de RMN 14,1 Tesla Bruker Advance III 600 MHz; D: Exemplo do procedimento de identificação/quantificação de um metabólito (Valina) por meio do espectro de hidrogênio adquirido pelo aparelho de RMN e processado no *software Suite 8.6 Chenomx*.

2.4.2. LC-HRMS

As alíquotas das amostras de soro destinadas à técnica de LC-HRMS foram inicialmente descongeladas em gelo e agitadas em vórtex por 15 s. Uma alíquota de 150 μL da amostra foi transferida para um novo *ependorf* e, em seguida, 450 μL de metanol gelado foram adicionados ao mesmo recipiente para iniciar a precipitação de proteínas e a extração de metabólitos. Os *ependorfs* contendo a mistura foram então armazenados a -20°C por 5 min e em seguida, foram agitados em vórtex por 20 segundos e centrifugados a 7.267 g a 4°C por 10 minutos. Após, alíquotas de 200 μL do

sobrenadante foram transferidas para um novo *eppendorf* e 20 μL de solução do padrão interno (5 mmol L^{-1} de acetato de L-Leucina-encefalina anidro) foram adicionados às amostras. As misturas foram armazenadas a -20°C . Em um momento posterior elas foram transferidas para *vials* e direcionadas para a análise por LC-HRMS (Figura 4). A fim de avaliar a presença de interferentes dos solventes de extração, uma amostra branco (sem o soro sanguíneo) foi preparada com 100 μL de metanol. Foram preparadas amostras de controle de qualidade (QC) à partir de alíquotas de 15 μL de cada uma das amostras de soro, as quais haviam anteriormente passado pelo processo de precipitação de proteínas conforme descrito acima.

Um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) Agilent (modelo 1290 Infinity II, Agilent Technologies), composto por uma bomba binária LC- (G7120A), sistema misturador de solvente (G7104A), um autoinjeter (G7129C) e um compartimento de coluna (G7129B) com temperatura controlada. Para a aquisição dos dados foi utilizado o *software HyStar* (HyStar Versão 3.2, Bruker Daltonics) e para análise e processamento de dados foi utilizada o *Compass Data Analysis* (DataAnalysis Versão 3.2, Bruker Daltonics). As análises cromatográficas foram realizadas com emprego de uma coluna Eclipse Agilent XDB-C18 (100 x 3,0 mm i.d; 3,5 μm) empregando eluição no modo gradiente, com emprego de água + 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (solvente B) como fase móvel a uma vazão de $0,4 \text{ mL}/\text{min}^{-1}$ e temperatura da coluna ajustada em 40°C . O tempo total de análise foi de 30 min utilizando um gradiente de múltiplas etapas: 0 min, 1% B; 0-3,0 min, 1-2% B; 3-10 min, 2-30% B; 10-15 min, 30-50% B; 15-18 min, 50-80% B; 18-20 min, 80-90% B; 20-22 min, 90-95% B; 22-26 min, 95-99% B; 26,01-28 min, 99% B, para limpeza da coluna, e um tempo de ciclo de condicionamento de 3 min com as mesmas condições iniciais de 1% B. O volume de injeção da amostra foi de 5 μL .

Os compostos detectados foram monitorados utilizando um espectrômetro de massa de alta resolução com analisador de tempo de voo (QqTOF) (*Impact HD QTOFTM*, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), operada no modo positivo (ESI+) ou no modo negativo (ESI-) de ionização. A aquisição dos dados de MS e MS/MS foram realizadas com o *software Compass QtofControl 3.4* (Bruker Daltonik) e os dados processados usando o *software Data Analysis 4.2* (Bruker Daltonik). Os parâmetros da fonte de ionização foram definidos da seguinte forma: voltagem do capilar, 3,6 kV para o modo positivo e 3,0 kV

para o modo negativo. Todos os outros parâmetros foram os mesmos para os dois modos de ionização, sendo: *end plate offset*, 450 V; gás nebulizador, 4 bar; temperatura do gás de secagem, 180 °C; vazão do gás nebulizador, 8 L·min⁻¹; energia da célula de colisão: 5 eV e faixa de varredura no modo de aquisição *full MS scan*, *m/z* 50-1.300.

Para aquisição no modo MS/MS foi empregada a aquisição dependente de dados (DDA), onde a radiofrequência (RF) de colisão foi definida para variar de 200,0 a 550,0% Vpp; o tempo de transferência de íons foi ajustado para variar de 50,0 a 90,0 µs, com temporização de 50% em cada. Os funis RF 1 e 2 foram 250,0 e 150,0 Vpp, respectivamente. O RF do hexapolo foi de 50,0 Vpp, a energia do quadrupolo foi de 5,0 eV com um armazenamento pré-pulso de 6,0 µs. Os parâmetros usados para acionar a fragmentação no modo de aquisição MS/MS foram 2,0 Hz para contagens *LOW* (50.000 cts) e 4,0 Hz para contagens *HIGH* (500.000 cts), usando um tempo de ciclo total de 3s, com exclusão ativa de 1 espectro, com liberação após 0,90 min. A aquisição no modo *full MS scan* foi definida em 2,0 Hz. A energia de colisão utilizada para fragmentação dos íons foi programada para variar de 250,0 a 100,0% dos 20 eV inicialmente ajustados. A calibração interna do espectrômetro de massa foi realizada com 1 mmol·L⁻¹ de formiato de sódio preparado em acetonitrila, usando o modelo de regressão quadrática de calibração de alta precisão (HPC). Ao final da corrida analítica, a solução de calibração foi injetada e todos os espectros foram recalibrados antes das identificações dos compostos.

Para processar os dados de LC-HRMS foi usado o *software* Bruker Profile Analysis 2.1. A geração do *bucket* foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: limite S/N = 2; limite do coeficiente de correlação = 0,2; aquisição mínima de 10 espectros; largura de atenuação = 1. Os *features* (compostos não identificados) detectados pelo LC-HRMS foram submetidos ao processamento de dados que consiste na inclusão de íons detectados baseados em intensidades superiores a 5% dos valores observados nas amostras branco; coeficiente de variação (CV) das amostras de QCs (média das réplicas) inferior a 20%; quantidade de dados ausentes inferior a 10% em amostras experimentais. Os *features* restantes foram normalizados por uma regressão local não linear (Loess) para verificar a estabilidade instrumental utilizando o *software* 1.1 (TSUGAWA et al., 2014, 2015) e para posterior análise. O *Data Analysis 4.2* (Bruker Daltonics) foi usado para realizar a identificação de fragmentos MS/MS. A identificação dos íons fragmentos foi realizada por comparação de fragmentos no banco

de dados HMDB MS/MS (<https://hmdb.ca>), Mass Bank (<https://massbank.eu/MassBank/>), CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>) somente para os *features* com significância estatística e com base nos adutos: $[M + H]^+$, $[M + H - 2H_2O]^+$, $[M + H - H_2O]^+$, $[M + NH_4 - H_2O]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + CH_3OH + H]^+$, $[M + K]^+$, $[M + ACN + H]^+$, $[M + 2Na - H]^+$, $[M + IsoProp + H]^+$, $[M + ACN + Na]^+$, $[M + 2K - H]^+$, $[M + 2ACN + H]^+$, $[M + IsoProp + Na + H]^+$, $[M + H + HCOONa]^+$, $[2M + H]^+$, $[2M + NH_4]^+$, $[2M + Na]^+$, $[2M + 2H + 3H_2O]^+$, $[2M + K]^+$, $[2M + ACN + H]^+$, $[2M + ACN + Na]^+$, $[2M + H - H_2O]^+$, $[M + 2H]^+$, $[M + H + NH_4]^+$, $[M + H + Na]^+$, $[M + H + K]^+$, $[M + ACN + 2H]^+$, $[M + 2Na]^+$, $[M + H + Na]^+$, $[M + 2ACN + 2H]^+$, $[M + 3ACN + 2H]^+$, $[M + 3H]^+$, $[M + 2H + Na]^+$, $[M + H + 2Na]^+$, $[M + 3Na]^+$, e $[M + H + 2K]^+$ para o modo positivo; e $[M - H]^-$, $[M - H_2O - H]^-$, $[M - Na - 2H]^-$, $[M + Cl]^-$, $[M + K - 2H]^-$, $[M - FA - H]^-$, $[M - Hac - H]^-$, $[M - TFA - H]^-$, $[M - H + HCOONa]^-$, $[2M - H]^-$, $[2M + FA - H]^-$, $[2M + Hac - H]^-$, $[3M - H]^-$, e $[M - 3H]^-$ para o modo negativo.

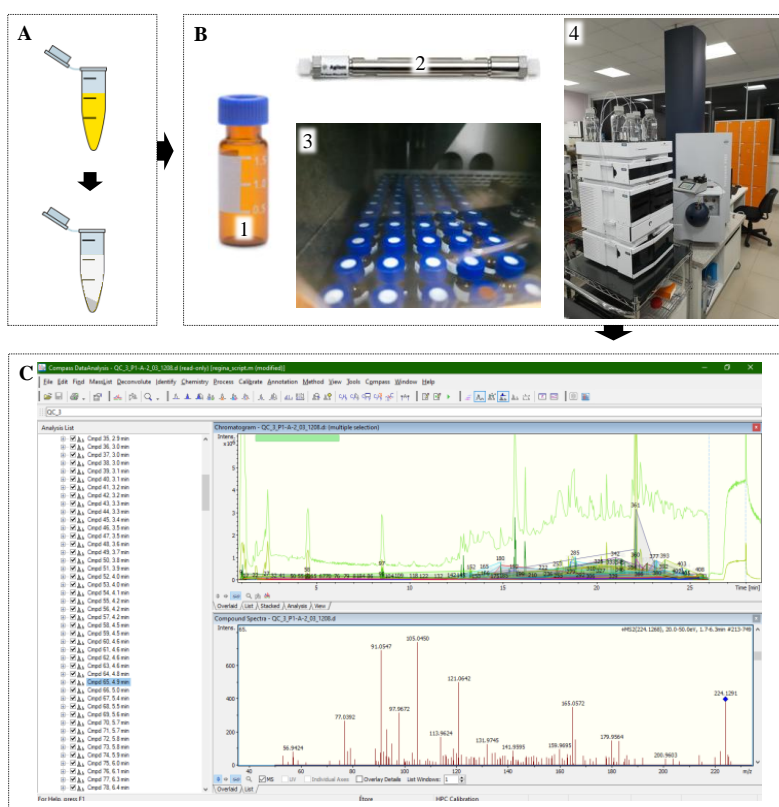


Figura 4. Ilustração do processamento e análise das amostras pela técnica analítica de cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS), no Laboratório SEPARARE do Departamento de Química da UFSCar. A: Precipitação das proteínas existentes na amostra; B: (1) *vial*, (2) exemplo de coluna de cromatografia líquida, (3) *vials* organizados dentro do autoinjeter (G7129C), (4) sistema de LC-HRMS utilizado no estudo (Agilent UHPLC, modelo 1290 Infinity II, Agilent Technologies, e espectrômetro de massa Impact HD QTOF™ Bruker Daltonics); C: Espectro adquirido a partir de um *feature* presente na amostra, evidenciando seus fragmentos.

2.5. Escore Z

Embora todas as análises estatísticas terem sido realizadas sobre os valores não padronizados, algumas análises e representações gráficas (Figuras 7, 8 e 9) foram feitas sobre valores padronizados de acordo com o escore Z. Essa padronização estabelece novos valores relativos ao desvio padrão e define o valor “zero” como a nova média da amostra total para uma determinada variável (permitindo assim o surgimento de valores negativos) (CLARK-CARTER, 2014). Os novos valores podem ser adquiridos de acordo com a equação abaixo:

$$z = \frac{x - \bar{X}}{s}$$

Onde “z” é o novo valor padronizado; “x” é o valor original de uma determinada variável para um sujeito específico; “ \bar{X} ” é a média dos valores originais de todos os sujeitos para a mesma variável; e “s” é o desvio padrão dos valores originais de todos os sujeitos para a mesma variável. Os novos valores da variável foram substituídos para cada sujeito e, então, calculadas as novas médias para cada grupo. Este processo é exemplificado na figura 5.

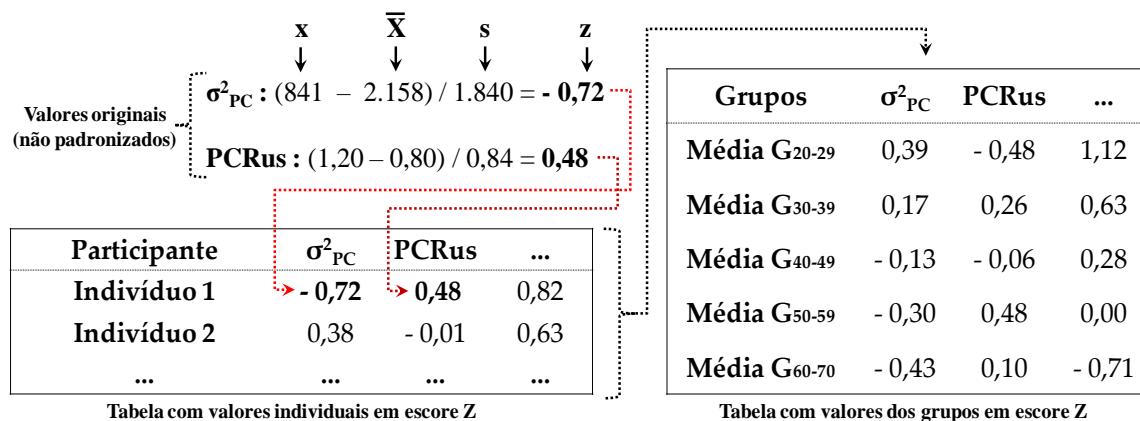


Figura 5. Procedimento para a conversão dos valores originais em escore Z. G₂₀₋₂₉: grupo 20-29 anos; G₃₀₋₃₉: grupo 30-39 anos; G₄₀₋₄₉: grupo 40-49 anos; G₅₀₋₅₉: grupo 50-59 anos; G₆₀₋₇₀: grupo de 60-70 anos; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; σ^2_{PC} : média das variâncias do período cardíaco.

Tal procedimento foi feito com o objetivo de realizar a análise conjunta das variáveis, desconsiderando as diferentes magnitudes de escalas entre elas e evidenciando as diferenças existentes entre os grupos comparados (CLARK-CARTER, 2014). Assim, as principais variáveis, com significância estatística, responsáveis pelas diferenças entre as faixas etárias puderam ser melhor discriminadas (Figuras 7 e 9).

2.6. Análise estatística

Os testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificar a normalidade da distribuição dos dados e os pressupostos de homogeneidade da variância, respectivamente, foram utilizados previamente às análises. Em casos onde as variáveis não atingiram essas suposições, transformações de dados incluindo logarítmica natural ($\ln x$), inversa ($1/x$), raiz cúbica ($\sqrt[3]{x}$), raiz quadrada (\sqrt{x}) ou transformações quadráticas (x^2) foram aplicadas. Ressalta-se, entretanto, que todos os dados foram apresentados em sua escala original para facilitar a interpretação (FIELD, 2009). Para comparar variáveis categóricas entre os grupos, o teste Qui-quadrado foi utilizado. Considerando as variáveis contínuas entre os grupos, o teste de ANOVA *one-way* seguido pelo teste *post-hoc* de *Tukey* foram aplicados quando confirmadas as premissas de normalidade da distribuição dos dados e homogeneidade da variância. Caso as suposições fossem violadas mesmo após a transformação dos dados, o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Mann-Whitney* foram aplicados. Devido ao elevado número de testes estatísticos realizados, o limiar do nível de significância foi ajustado em um valor nominal de $p < 0,01$ para o teste bicaudal, reconhecendo que um ajuste completo de Bonferroni provavelmente reduziria a descoberta de observações falso-negativas, por ser conservador demais. Complementando essa abordagem, foi realizado o tamanho do efeito (ES: diferença média entre os grupos dividido pelo desvio padrão agrupado de todos os sujeitos) considerando um intervalo de confiança de 99% (IC 99%) para cada variável significativa na ANOVA. Quando o IC 99% do ES não cruzava o zero, as diferenças também foram consideradas significativas (NAKAGAWA; CUTHILL, 2007). Por fim, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) como o objetivo de caracterizar os grupos com base nas variáveis significativas. Todas as análises descritas acima foram realizadas utilizando o *software* SPSS 25.0 (Chicago, Illinois, EUA).

3 Resultados

Cento e dezoito indivíduos (Tabela 1 e Figura 6) foram incluídos no estudo após a exclusão daqueles com alterações nas respostas cardiovasculares observadas no protocolo experimental (teste ergométrico, TECP e avaliação autonômica) e alterações expressivas no exame de sangue, bem como aqueles cujas amostras de soro estiveram sujeitas a problemas técnicos na análise metabólica.

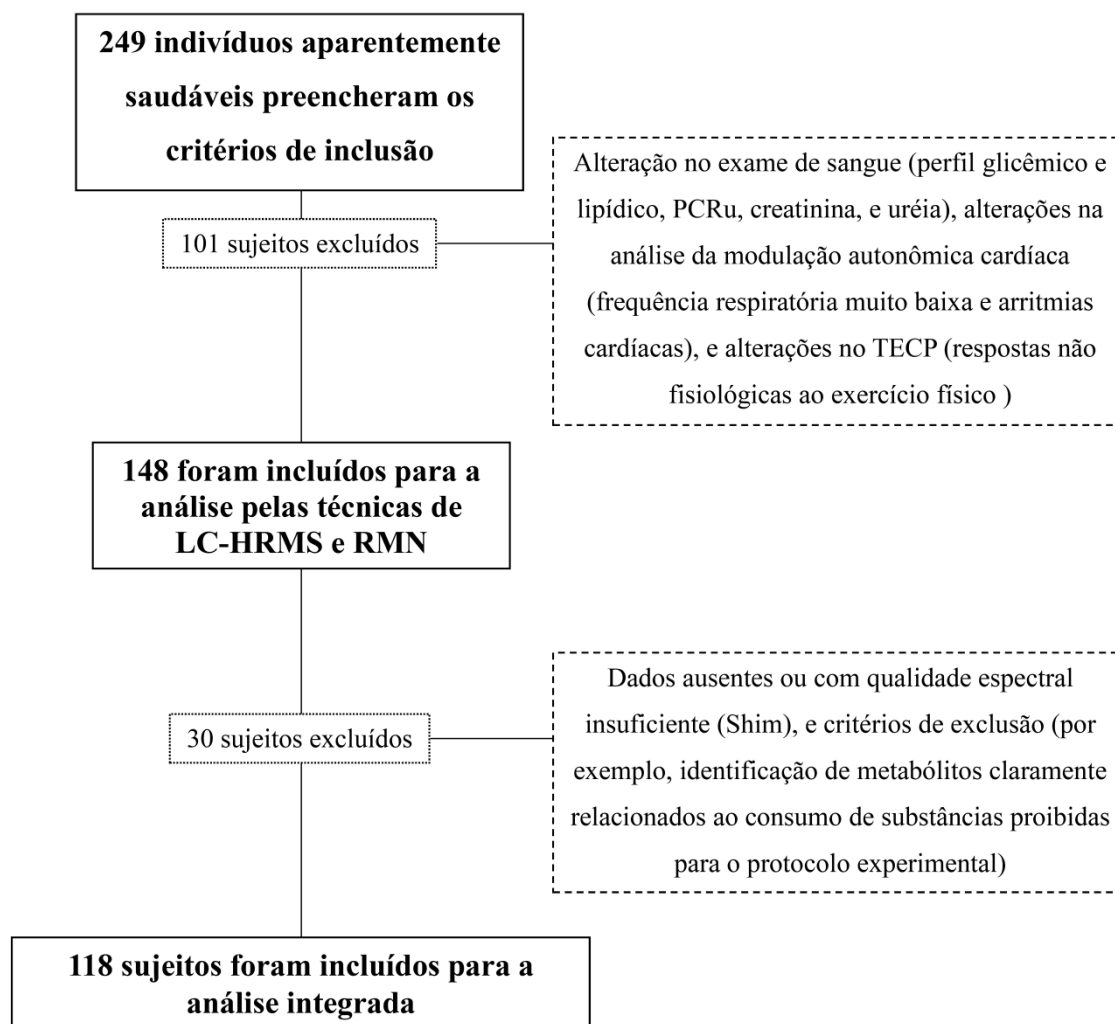


Figura 6. Fluxograma de perdas. LC-HRMS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução; PCRu: proteína C reativa ultrasensível; RMN: ressonância magnética nuclear; TECP: teste de exercício cardiopulmonar. Figura adaptada de Signini et al., 2022, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-25747-5.

3.1. Influência do sexo e IMC

Não foi observada influência significativa do sexo entre as faixas etárias de acordo com o teste de qui-quadrado ($p = 0,220$). Nesse sentido, há uma distribuição homogênea de homens e mulheres em cada faixa etária, permitindo excluir a influência do sexo nos resultados. Da mesma forma, não houve diferenças significativas entre as faixas etárias no teste de ANOVA *one-way* ($p = 0,019$) para a variável IMC, permitindo excluir sua influência nos resultados.

Tabela 1. Características dos participantes.

Características	Todos	G ₂₀₋₂₉	G ₃₀₋₃₉	G ₄₀₋₄₉	G ₅₀₋₅₉	G ₆₀₋₇₀
Participantes (n)	118	29	27	30	14	18
Idade (anos)	41 ± 14	25 ± 2	33 ± 3	44 ± 3	53 ± 3	65 ± 3
Homens/Mulheres (razão)	1,31	0,93	1,45	2,33	1,80	0,64
Altura (m)	1,68 ± 0,09	1,69 ± 0,08	1,70 ± 0,09	1,68 ± 0,07	1,69 ± 0,08	1,63 ± 0,08
Peso (kg)	70,66 ± 12,56	67,93 ± 13,20	71,70 ± 13,18	73,48 ± 12,44	70,30 ± 11,30	69,10 ± 11,81
IMC (kg.m ⁻²)	24,65 ± 2,92	23,36 ± 2,84	24,39 ± 2,67	25,63 ± 3,08	24,41 ± 2,73	25,68 ± 2,59

Dados apresentados em média ± desvio padrão. Testes estatísticos realizados para as variáveis “peso”, “altura”, “IMC” e para a homogeneidade da distribuição dos sexos entre as faixas etárias. **a:** diferença com o grupo G₂₀₋₂₉; **b:** diferença com o grupo G₃₀₋₃₉; **c:** diferença com o grupo G₄₀₋₄₉; **d:** diferença com o grupo G₅₀₋₅₉. G₂₀₋₂₉: grupo 20-29 anos; G₃₀₋₃₉: grupo 30-39 anos; G₄₀₋₄₉: grupo 40-49 anos; G₅₀₋₅₉: grupo 50-59 anos; G₆₀₋₇₀: grupo de 60-70 anos; IMC: índice de massa corporal. A homogeneidade dos sexos entre os grupos foi testada com o teste de Qui-quadrado com $p < 0,05$. *Post hoc* de Tukey com $p < 0,01$ e tamanho do efeito com intervalo de confiança de 99% para todas as variáveis com $p < 0,01$ na ANOVA *one way*. Tabela adaptada de Signini et al., 2022, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-25747-5.

3.2. Testes bioquímicos

Todos os grupos estiveram dentro de valores normais ou limítrofes nas variáveis bioquímicas (Tabela 2) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PROFESSIONAL PRACTICE COMMITTEE, 2021; FALUDI et al., 2017; PEARSON et al., 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2011; SUI et al., 2008). Foi observado um teste de ANOVA significativo apenas para o PCRus ($p = 0,003$), CT ($p < 0,001$), LDL ($p = 0,003$) e uréia ($p = 0,006$). Com relação ao PCRus, os valores foram elevados em G₃₀₋₃₉ ($p = 0,009$, $ES_d = 0,922$, IC 99% = 0,184 a 1,659), G₅₀₋₅₉ ($p = 0,009$, $ES_d = 1,115$, IC 99% = 0,250 a 1,980), e G₆₀₋₇₀ ($p = 0,058$, $ES_d = 0,892$, IC 99% = 0,086 a 1,698) em comparação ao G₂₀₋₂₉. Já o CT apresentou valores mais elevados nos grupos mais velhos quando comparado ao G₂₀₋₂₉, como observado no G₄₀₋₄₉ ($p = 0,003$, $ES_d = 0,801$, IC 99% = 0,092 a 1,511), G₅₀₋₅₉ ($p = 0,016$, $ES_d = 0,909$, IC 99% = 0,063 a 1,754) e G₆₀₋₇₀ ($p = 0,003$, $ES_d = 0,956$, IC 99% = 0,145 a 1,767). Para LDL, valores elevados foram observados apenas no G₄₀₋₄₉ ($p = 0,006$, $ES_d = 0,877$, IC 99% = 0,162 a 1,591) e G₆₀₋₇₀ ($p = 0,018$, $ES_d = 0,930$, IC 99% = 0,121 a 1,739) em comparação ao G₂₀₋₂₉. Por fim, a uréia foi mais elevada no G₃₀₋₃₉ ($p = 0,048$, $ES_d = 0,856$, IC 99% = 0,123 a 1,589), G₅₀₋₅₉ ($p = 0,008$, $ES_d = 1,131$, IC 99% = 0,264 a 1,998) e G₆₀₋₇₀ ($p = 0,068$, $ES_d = 0,803$, IC 99% = 0,004 a 1,602) quando comparado ao G₂₀₋₂₉. Todos esses resultados estão apresentados na Tabela 2 e Figura 7.

Tabela 2. Exames bioquímicos dos participantes.

Variáveis Bioquímicas	Todos	Grupos				
		G ₂₀₋₂₉	G ₃₀₋₃₉	G ₄₀₋₄₉	G ₅₀₋₅₉	G ₆₀₋₆₉
CT (mg/dL)	186,50 (162,00 – 203,00)	171,00 (139,00 – 189,00)	179,00 (159,00 – 197,50)	191,50 (177 – 213,25) ^a	203,00 (170,25 – 207,00) ^a	194,00 (171,00 – 213,00) ^a
HDL (mg/dL)	54,00 (44,00 – 66,00)	50,00 (44,00 – 67,00)	53,00 (44,00 – 62,50)	50,00 (42,50 – 66,00)	61,00 (43,50 – 64,50)	59,50 (54,00 – 65,50)
LDL (mg/dL)	109,50 (90,25 – 123,00)	93,00 (65,00 – 113,00)	102,00 (91,00 – 121,50)	118,50 (94,00 – 130,25) ^a	115,00 (110,00 – 132,50)	110,00 (100,50 – 131,50) ^a
VLDL (mg/dL)	18,00 (14,00 – 25,00)	15,00 (12,00 – 21,00)	18,00 (14,00 – 24,00)	20,00 (14,00 – 27,00)	21,00 (16,00 – 26,50)	19,00 (14,25 – 23,75)
Triglicérides (mg/dL)	90,50 (68,00 – 126,75)	75,00 (60,00 – 105,00)	89,00 (68,50 – 120,50)	99,00 (68,25 – 136,50)	104,00 (81,00 – 131,25)	96,00 (69,25 – 118,50)
Ácido úrico (mg/dL)	5,10 (4,30 – 6,10)	4,80 (4,40 – 5,80)	5,00 (4,23 – 6,00)	5,55 (4,65 – 6,40)	5,15 (4,20 – 7,23)	4,70 (4,23 – 5,55)
Creatinina (mg/dL)	0,89 (0,76 – 1,00)	0,84 (0,72 – 0,98)	0,95 (0,76 – 1,06)	0,95 (0,79 – 1,03)	0,89 (0,80 – 0,94)	0,83 (0,76 – 0,89)
Glicemia de jejum (mg/dL)	91,00 (86,00 – 95,00)	87,00 (83,00 – 93,00)	88,00 (85,00 – 92,00)	92,00 (89,00 – 96,50)	93,50 (90,00 – 95,00)	93,50 (87,50 – 96,75)
Ureia (mg/dL)	31,50 (27,00 – 36,00)	27,00 (23,00 – 32,00)	33,00 (29,50 – 37,00) ^a	32,00 (29,00 – 36,50)	34,00 (30,75 – 37,75) ^a	32,50 (29,25 – 36,50) ^a
PCRus (mg/L)	0,48 (0,16 – 1,18)	0,21 (0,07 – 0,50)	0,76 (0,24 – 1,51) ^a	0,37 (0,16 – 0,97)	1,19 (0,50 – 1,81) ^a	0,66 (0,23 – 1,13) ^a

Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil. **a:** diferença com o grupo G₂₀₋₂₉; **b:** diferença com o grupo G₃₀₋₃₉; **c:** diferença com o grupo G₄₀₋₄₉; **d:** diferença com o grupo G₅₀₋₅₉. As transformações logarítmicas (para VLDL e Triglicérides), quadrática (para CT), raiz quadrada (para creatinina) e raiz cúbica (para HDL e PCRus) foram utilizadas na estatística. Para as variáveis não listadas acima foram usados os valores originais. CT: Colesterol total; G₂₀₋₂₉: grupo 20-29 anos; G₃₀₋₃₉: grupo 30-39 anos; G₄₀₋₄₉: grupo 40-49 anos; G₅₀₋₅₉: grupo 50-59 anos; G₆₀₋₇₀: grupo 60-70 anos; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade. Post hoc de Tukey com $p < 0,01$ e tamanho do efeito com intervalo de confiança de 99% para todas as variáveis com $p < 0,01$ na ANOVA *one way*. Tabela adaptada de Signini et al., 2022, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-25747-5.

3.3. MAC e ACR

Para as variáveis autonômicas, somente LF, HF e σ^2_{PC} tiveram significância (Tabela 3 e Figura 7) entre as faixas etárias, considerando a ANOVA ($p < 0,001$, $p = 0,001$, e $p = 0,002$, respectivamente). Menores valores de LF, HF, e σ^2_{PC} foram observados no grupo mais velho em comparação aos grupos mais jovens, considerando as diferenças entre G_{60-70} e G_{20-29} ($p < 0,001$, $ES_d = -1,349$, IC 99% = -2,200 a -0,498), G_{30-39} ($p = 0,001$, $ES_d = -1,076$, IC 99% = -1,917 a -0,235), e G_{40-49} ($p = 0,007$, $ES_d = -0,884$, IC 99% = -1,680 a -0,088) para LF, G_{60-70} com G_{20-29} ($p = 0,004$, $ES_d = -1,015$, IC 99% = -1,831 a -0,199) e G_{30-39} ($p = 0,029$, $ES_d = -0,946$, IC 99% = -1,775 a -0,117) para HF, e G_{60-70} com G_{20-29} ($p = 0,001$, $ES_d = -1,200$, IC 99% = -2,035 a -0,365) para σ^2_{PC} . Além disso, para LF e σ^2_{PC} , valores reduzidos também foram verificados no grupo G_{50-59} em comparação ao G_{20-29} ($p = 0,085$, $ES_d = -1,010$, IC 99% = -1,865 a -0,155 para LF, e $p = 0,113$, $ES_d = -0,847$, IC 99% = -1,687 a -0,007 para σ^2_{PC}).

Considerando a ACR, o VO_{2PICO} diminui com o aumento da idade (ANOVA: $p < 0,001$) e evidenciou valores reduzidos no grupo mais velho (Tabela 3 e Figura 7) quando comparado ao G_{20-29} ($p = 0,001$, $ES_d = -1,484$, IC 99% = -2,352 a -0,617), G_{30-39} ($p < 0,001$, $ES_d = -1,706$, IC 99% = -2,624 a -0,788) e G_{40-49} ($p = 0,001$, $ES_d = -1,233$, IC 99% = -2,062 a -0,404).

Tabela 3. Controle autonômico cardíaco e ACR em diferentes faixas etárias.

Variáveis Autonômicas e de ACR	Grupos				
	G ₂₀₋₂₉	G ₃₀₋₃₉	G ₄₀₋₄₉	G ₅₀₋₅₉	G ₆₀₋₆₉
MAC					
Domínio do tempo					
μ_{PC} (ms)	911,86 (828,53 – 983,22)	942,06 (854,99 – 1063,28)	924,40 (849,07 – 1026,68)	933,27 (891,21 – 1028,35)	975,17 (852,88 – 1056,47)
σ^2_{PC} (ms ²)	2210,29 (1560,85 – 3355,20)	1709,86 (929,65 – 3496,37)	1345,62 (915,38 – 2210,50)	1189,98 (844,33 – 1843,30) ^a	825,30 (557,82 – 1243,27) ^a
Domínio da frequência					
LF _(ms²)	811,26 (476,83 – 1302,74)	677,18 (264,04 – 1075,83)	460,33 (271,12 – 983,84)	373,88 (204,14 – 445,24) ^a	176,44 (72,29 – 385,29) ^{abc}
HF _(ms²)	798,68 (429,77 – 1854,86)	517,02 (326,89 – 970,09)	340,34 (188,32 – 589,96)	364,90 (122,54 – 627,22)	176,38 (93,68 – 359,37) ^{ab}
LF _(nu)	45,37 (35,49 – 59,70)	49,39 (35,78 – 65,73)	60,43 (45,47 – 73,48)	56,53 (41,85 – 75,13)	44,91 (34,74 – 59,67)
HF _(nu)	51,67 (37,57 – 64,22)	50,46 (33,88 – 63,11)	39,48 (26,07 – 53,48)	42,88 (24,37 – 57,76)	53,52 (39,79 – 63,66)
LF/HF _(razão)	0,88 (0,55 – 1,59)	0,98 (0,56 – 1,96)	1,55 (0,85 – 2,82)	1,32 (0,73 – 3,15)	0,84 (0,55 – 1,51)
ACR					
VO ₂ PICO (ml/kg/min)	32,30 (30,00 – 37,50)	37,00 (31,55 – 40,05)	30,95 (27,68 – 37,95)	29,50 (26,48 – 33,45)	23,85 (19,98 – 27,23) ^{abc}
Classificação funcional aeróbia segundo a AHA	Regular (H) / Fraca (M)	Boa (H) / Regular (M)	Boa (H) / Regular (M)	Boa (H) / Regular (M)	Regular (H) / Regular (M)

Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil. **a:** diferença com o grupo G₂₀₋₂₉; **b:** diferença com o grupo G₃₀₋₃₉; **c:** diferença com o grupo G₄₀₋₄₉; **d:** diferença com o grupo G₅₀₋₅₉. A transformação logarítmica (μ_{PC} , σ^2_{PC} , LF_{ms²}, HF_{ms²} e LF/HF) foi utilizada nas estatísticas. As variáveis não listadas acima foram utilizadas com os dados originais. AHA: *American Heart Association*; G₂₀₋₂₉: grupo 20-29 anos; G₃₀₋₃₉: grupo 30-39 anos; G₄₀₋₄₉: grupo 40-49 anos; G₅₀₋₅₉: grupo 50-59 anos; G₆₀₋₇₀: grupo 60-70 anos; H: homens; HF: banda de alta frequência; LF: banda de baixa frequência; M: mulheres; μ_{PC} : média do período cardíaco; σ^2_{PC} : média das variâncias do período cardíaco. Post hoc de Tukey com $p < 0,01$ e tamanho do efeito com intervalo de confiança de 99% para todas as variáveis com $p < 0,01$ na ANOVA *one way*. Tabela adaptada de Signini et al., 2022, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-25747-5.

3.4. Metabolômica

A técnica de ^1H RMN identificou 47 metabólitos (ANEXO C), no entanto, apenas 5 metabólitos apresentaram diferenças significativas em seus níveis entre as faixas etárias avaliadas (Tabela 4 e Figura 7). A isoleucina (ANOVA: $p < 0,001$) teve um valor reduzido no grupo G_{60-70} , apresentando diferenças com G_{20-29} ($p = 0,002$, $ES_d = -1,197$, IC 99% = -2,032 a -0,363), G_{30-39} ($p < 0,001$, $ES_d = -1,545$, IC 99% = -2,441 a -0,649), G_{40-49} ($p < 0,001$, $ES_d = -1,200$, IC 99% = -2,026 a -0,375) e G_{50-59} ($p = 0,017$, $ES_d = -1,010$, IC 99% = -2,010 a -0,010). Da mesma forma, a valina (ANOVA: $p < 0,001$) evidenciou menores valores no grupo G_{60-70} , sendo os valores observados no G_{20-29} ($p = 0,040$, $ES_d = -0,826$, IC 99% = -1,626 a -0,025), G_{30-39} ($p < 0,001$, $ES_d = -1,747$, IC 99% = -2,671 a -0,823), G_{40-49} ($p = 0,001$, $ES_d = -1,101$, IC 99% = -1,916 a -0,285) e G_{50-59} ($p = 0,006$, $ES_d = -1,223$, IC 99% = -2,249 a -0,197), entretanto, também apresentou valores elevados no grupo G_{30-39} ($p = 0,080$, $ES_d = 0,738$, IC 99% = 0,013 a 1,463) em comparação ao G_{20-29} . A leucina por sua vez (ANOVA: $p = 0,003$) teve valores maiores em G_{30-39} ($p = 0,007$, $ES_d = 1,049$, IC 99% = 0,211 a 1,888) e G_{40-49} ($p = 0,002$, $ES_d = 1,057$, IC 99% = 0,245 a 1,868) quando comparado com o grupo G_{60-70} . Além disso, o 3-hidroxiisobutirato (ANOVA: $p = 0,003$), um metabólito derivado da degradação da valina, teve um padrão semelhante da leucina, com G_{30-39} ($p = 0,001$, $ES_d = 1,219$, IC 99% = 0,363 a 2,074) e G_{40-49} ($p = 0,031$, $ES_d = 0,844$, IC 99% = 0,051 a 1,637) apresentando maiores valores do que no G_{60-70} . Por fim, o aminoácido não essencial aspartato (ANOVA: $p = 0,007$) mostrou-se reduzido nos grupos G_{20-29} ($p = 0,017$, $ES_d = -0,827$, IC 99% = -1,538 a -0,116) e G_{30-39} ($p = 0,067$, $ES_d = -0,746$, IC 99% = -1,464 a -0,027) em comparação ao grupo G_{40-49} . Além disso, o aspartato foi discretamente reduzido nas faixas etárias subsequentes ao G_{40-49} ($ES_d = -0,139$ para G_{50-59} e $ES_d = -0,138$ para G_{60-70} em comparação ao grupo G_{40-49}) devido a perda de significância da diferença com os grupos mais jovens.

Com relação à técnica de LC-HRMS, foram verificados 125 *features* não excluídos pelos filtros acima descritos (valor da média do *feature* nos QCs $> 5\%$ do valor da média das amostras branco; valor do *feature* nas amostras QCs com CV $< 20\%$; *feature* com valores ausentes $< 10\%$ nas amostras experimentais) (ANEXO C). No entanto, apenas 6 *features* apresentaram diferenças significativas em seus níveis entre as faixas etárias, e somente dois eram metabólitos conhecidos (Tabela 4 Figura 7). O ácido

hipúrico (ANOVA: $p < 0,001$) foi mais elevado no G_{60-70} comparativamente aos demais grupos: G_{20-29} ($p < 0,001$, $ES_d = 1,389$, IC 99% = 0,533 a 2,245), G_{30-39} ($p = 0,004$, $ES_d = 0,991$, IC 99% = 0,158 a 1,824), G_{40-49} ($p = 0,001$, $ES_d = 1,170$, IC 99% = 0,347 a 1,992) e G_{50-59} ($p = 0,009$, $ES_d = 1,056$, IC 99% = 0,051 a 2,061). Já o ácido 10E,12Z-octadecadienóico (10E,12Z-CLA) (ANOVA: $p = 0,001$), um ácido linoleico conjugado, foi o outro metabólito identificado e apresenta valores mais elevados no G_{30-39} (comparado ao G_{20-29} : $p = 0,019$, $ES_d = 0,816$, IC 99% = 0,086 a 1,546) e G_{40-49} (em comparação com G_{20-29} : $p = 0,004$, $ES_d = 0,956$, IC 99% = 0,236 a 1,677; G_{60-70} : $p = 0,054$, $ES_d = 0,815$, IC 99% = 0,024 a 1,606).

Tabela 4. Variáveis metabólicas significativas entre as faixas etárias.

Variáveis Metabólicas	Grupos				
	G ₂₀₋₂₉	G ₃₀₋₃₉	G ₄₀₋₄₉	G ₅₀₋₅₉	G ₆₀₋₆₉
3-Hidroxiisobutirato (mM)	0,014 (0,011 – 0,018)	0,016 (0,014 – 0,022)	0,015 (0,012 – 0,020)	0,015 (0,013 – 0,017)	0,012 (0,009 – 0,016) ^{bc}
Aspartato (mM)	0,024 (0,018 – 0,031)	0,025 (0,020 – 0,032)	0,032 (0,028 – 0,035) ^{ab}	0,031 (0,029 – 0,034)	0,031 (0,027 – 0,038)
Isoleucina (mM)	0,069 (0,060 – 0,082)	0,077 (0,065 – 0,084)	0,070 (0,061 – 0,086)	0,067 (0,059 – 0,081)	0,056 (0,049 – 0,063) ^{abcd}
Leucina (mM)	0,098 (0,075 – 0,112)	0,097 (0,087 – 0,116)	0,102 (0,084 – 0,120)	0,096 (0,082 – 0,112)	0,080 (0,070 – 0,092) ^{bc}
Valina (mM)	0,232 (0,204 – 0,274)	0,268 (0,237 – 0,298) ^a	0,249 (0,211 – 0,292)	0,246 (0,230 – 0,278)	0,198 (0,189 – 0,220) ^{abcd}
Ácido hipúrico (a.u.)	0,486 (0,389 – 0,692)	0,661 (0,433 – 0,977)	0,571 (0,394 – 0,855)	0,676 (0,538 – 0,771)	1,365 (0,864 – 2,502) ^{abcd}
10E,12Z-CLA (a.u.)	0,193 (0,129 – 0,287)	0,615 (0,195 – 1,587) ^a	0,831 (0,252 – 1,545) ^a	0,233 (0,132 – 0,471)	0,283 (0,139 – 0,383) ^c

Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil. **a:** diferença com o grupo G₂₀₋₂₉; **b:** diferença com o grupo G₃₀₋₃₉; **c:** diferença com o grupo G₄₀₋₄₉; **d:** diferença com o grupo G₅₀₋₅₉. As transformações utilizadas para a estatística foram: Logaritmo (para ácido hipúrico, 10E,12Z-CLA, isoleucina, 3-hidroxiisobutirato e leucina) e inversa (para valina). Para as variáveis não listadas acima foram utilizados os valores originais na estatística. 10E,12Z-CLA: ácido 10E,12Z-octadecadienóico; G₂₀₋₂₉: grupo 20-29 anos; G₃₀₋₃₉: grupo 30-39 anos; G₄₀₋₄₉: grupo 40-49 anos; G₅₀₋₅₉: grupo 50-59 anos; G₆₀₋₇₀: grupo 60-70 anos. Post hoc de Tukey com p < 0,01 e tamanho do efeito com intervalo de confiança de 99% para todas as variáveis com p < 0,01 na ANOVA *one way*. Tabela adaptada de Signini et al., 2022, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-25747-5.

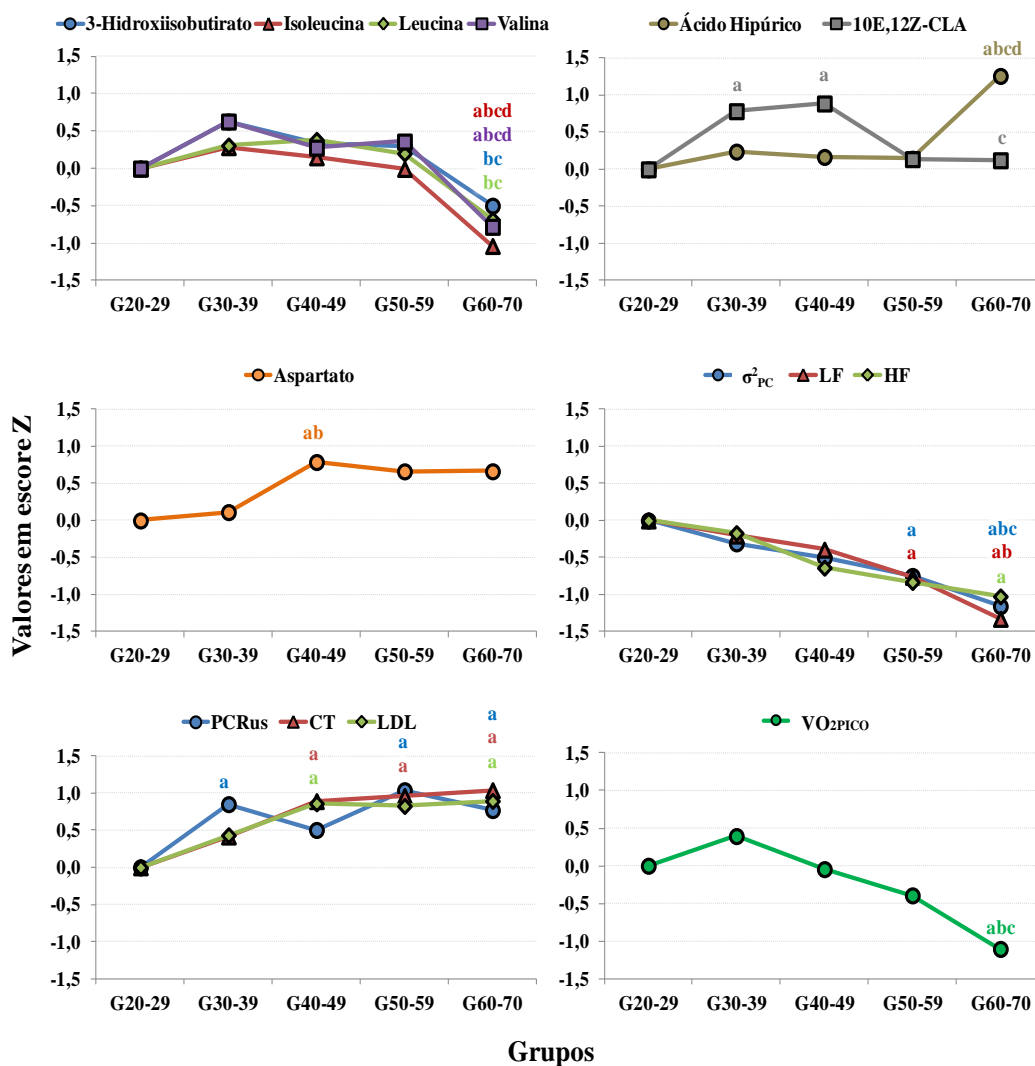


Figura 7. Diferenças entre as faixas etárias relativizadas à faixa etária mais jovem. **a:** diferença com o grupo G₂₀₋₂₉; **b:** diferença com o grupo G₃₀₋₃₉; **c:** diferença com o grupo G₄₀₋₄₉; **d:** diferença com o grupo G₅₀₋₅₉. Valores apresentados em escore Z dos dados transformados considerando a média de cada grupo. As transformações utilizadas para a estatística foram: Logaritmo (para ácido hipúrico, 10E,12Z-CLA, isoleucina, 3-hidroxiisobutirato, leucina, σ^2_{PC} , LF, e HF), raiz cúbica (para PCRus), quadrática (para CT) e inversa (para valina). Para as variáveis não listadas acima foram utilizados os valores originais na estatística. σ^2_{PC} : variância do período cardíaco; 10E,12Z-CLA: ácido 10E,12Z-octadecadienóico; CT: colesterol total; G₂₀₋₂₉: grupo 20-29 anos; G₃₀₋₃₉: grupo 30-39 anos; G₄₀₋₄₉: grupo 40-49 anos; G₅₀₋₅₉: grupo 50-59 anos; G₆₀₋₇₀: grupo 60-70 anos; HF: banda de alta frequência; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LF: banda de baixa frequência; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; VO_{2PICO} : consumo de oxigênio de pico. Post hoc de Tukey com $p < 0,01$ e tamanho do efeito com intervalo de confiança de 99% para todas as variáveis com $p < 0,01$ na ANOVA *one way*.

3.5. PCA

A análise de PCA (Figura 8) evidenciou que o ácido hipúrico foi a variável que mais caracterizou o G₆₀₋₇₀ conforme observado pelo agrupamento das amostras no quadrante inferior esquerdo. As variáveis LF, HF, σ^2_{PC} e VO_{2PICO} parecem estar positivamente relacionadas (localizadas no quadrante superior direito) e encontram-se reduzidas no grupo G₆₀₋₇₀ devido ao agrupamento das amostras no quadrante oposto.

Além disso, os aminoácidos de cadeia ramificada [BCAAs (leucina, isoleucina, e valina)] e o 3-Hidroxiisobutirato parecem estar positivamente relacionados como consequência da proximidade dessas variáveis no gráfico de *loadings*, e as mesmas têm seus valores expressivamente reduzidos no grupo G₆₀₋₇₀, devido à distância gráfica dessas variáveis da região de agrupamento das amostras. Por fim, o aspartato, a PCRus, uréia, o LDL, o CT, e o 10E,12Z-CLA parecem possuir uma relação positiva entre eles devido ao fato de estarem no mesmo quadrante, porém, a relação entre aspartato, CT, e LDL deve ser destacada em razão do agrupamento dessas variáveis no gráfico de *loadings*. Resultados semelhantes são observados na figura 9, onde é possível observar uma maior projeção dos grupos mais velhos para as variáveis representadas a direita e um comportamento contrário para os grupos mais novos.

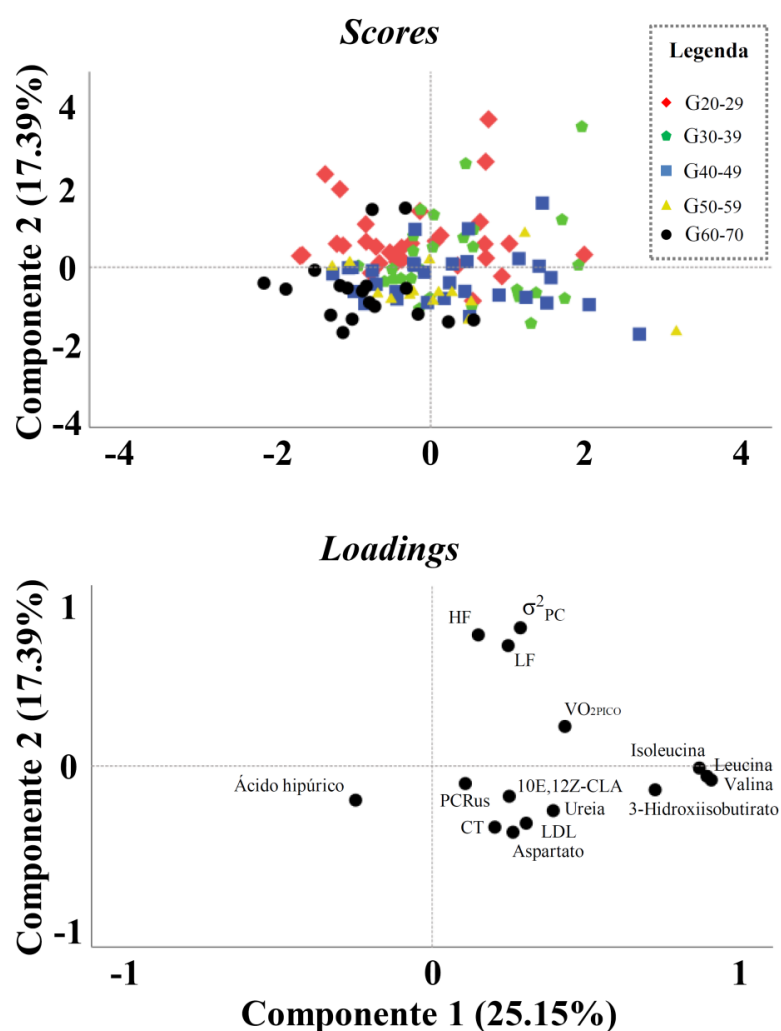


Figura 8. Análise de componentes principais com as variáveis significantes. σ^2_{PC} : variância do período cardíaco; 10E,12Z-CLA: ácido 10E,12Z-octadecadienóico; CT: colesterol total; G₂₀₋₂₉: grupo 20-29 anos; G₃₀₋₃₉: grupo 30-39 anos; G₄₀₋₄₉: grupo 40-49 anos; G₅₀₋₅₉: grupo 50-59 anos; G₆₀₋₇₀: grupo 60-70 anos; HF: banda de alta frequência; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LF: banda de baixa frequência; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; VO_{2PICO}: consumo de oxigênio de pico. Figura adaptada de Signini et al., 2022, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-25747-5.

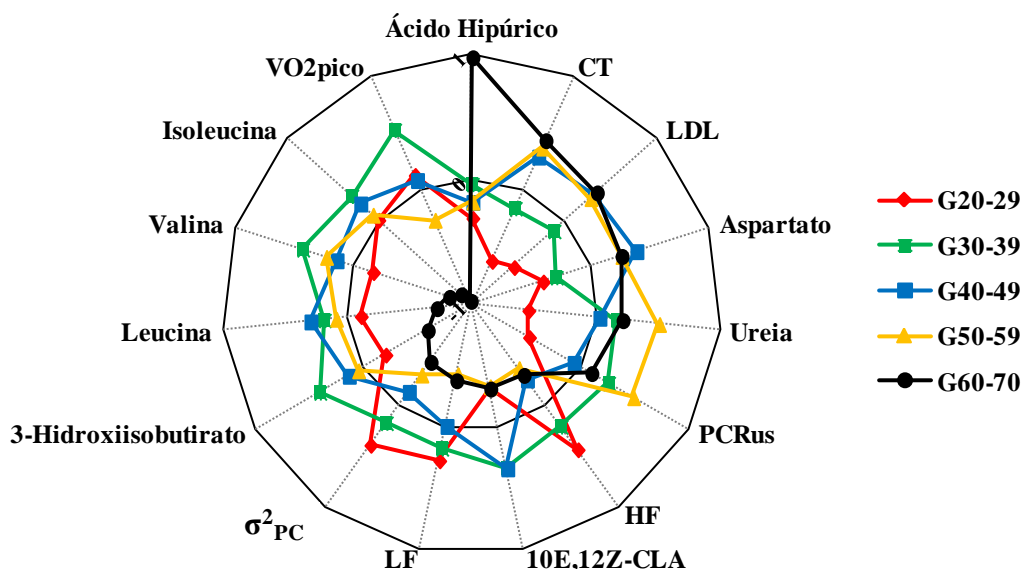


Figura 9. Dados apresentados por valores médios do escore Z de cada faixa etária para cada variável. Valores elevados são representados na periferia do gráfico, enquanto que valores reduzidos são representados na região central (linha periférica do gráfico = 1 e ponto central do gráfico = -1). σ^2_{PC} : variância do período cardíaco; 10E,12Z-CLA: ácido 10E,12Z-octadecadienóico; CT: colesterol total; G_{20-29} : grupo 20-29 anos; G_{30-39} : grupo 30-39 anos; G_{40-49} : grupo 40-49 anos; G_{50-59} : grupo 50-59 anos; G_{60-70} : grupo 60-70 anos; HF: banda de alta frequência; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LF: banda de baixa frequência; PRCus: proteína C reativa ultrasensível; VO_{2PICO} : consumo de oxigênio de pico. Figura adaptada de Signini et al., 2022, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-25747-5.

4 Discussão

Com base em nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a avaliar conjuntamente as variáveis relacionadas ao metaboloma, MAC e ACR no processo de envelhecimento em indivíduos aparentemente saudáveis. Os achados indicaram que os BCAAs (leucina, isoleucina, e valina), 3-hidroxiisobutirato, ácido hipúrico, VO_{2PICO} e MAC global são influenciados durante o processo de envelhecimento saudável e são principalmente afetados por alterações que ocorrem logo após os sessenta anos. Os níveis séricos de BCAAs e 3-hidroxiisobutirato e VO_{2PICO} se mantiveram relativamente estáveis até o grupo G_{50-59} sendo observada uma diminuição significativa dessas variáveis no G_{60-70} , enquanto que o ácido hipúrico teve um comportamento inverso na faixa etária mais velha. Além disso, a MAC global reduziu com o avançar da idade e está nitidamente reduzida no G_{60-70} , sendo as maiores perdas observadas para a modulação parassimpática cardíaca. Com relação à integração dos resultados, foi observado na PCA uma maior representação do ácido hipúrico no grupo G_{60-70} e uma indicação de uma menor representação das demais variáveis citadas acima para o mesmo grupo em relação aos demais grupos (Figuras 8 e 9).

O metabolismo de aminoácidos no envelhecimento tem sido discutido há vários anos (CANFIELD; BRADSHAW, 2019; KOUCHIWA et al., 2012; LE COUTEUR et al., 2020a). Alguns estudos relatam um aumento dos níveis séricos da maioria dos aminoácidos com o passar da idade, enquanto outros evidenciam um comportamento contrário (LAWTON et al., 2008; LE COUTEUR et al., 2020a). O aumento dos níveis séricos de aminoácidos na condição de jejum está relacionado a distúrbios metabólicos e degradação proteica (LAWTON et al., 2008; LYNCH; ADAMS, 2014; MATHEW et al., 2019). Tais circunstâncias são comumente observadas durante o envelhecimento como consequência de alterações no estado nutricional e do nível de atividade física, aumento do estresse oxidativo e do dano ao DNA, e ao *inflammaging* (LE COUTEUR et al., 2020b; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). No entanto, os níveis séricos de aminoácidos também se relacionam positivamente com a quantidade de massa muscular (LE COUTEUR et al., 2020b) e portanto, um nível reduzido de aminoácidos no soro sanguíneo durante o jejum pode ser resultado de uma massa muscular reduzida (KOUCHIWA et al., 2012; LE COUTEUR et al., 2020a). Os BCAAs, em especial a leucina, são aminoácidos importantes na regulação de processos relacionados à síntese e degradação de proteínas, bem como na sensibilidade muscular à captação de aminoácidos, na produção de glicogênio, produção de neurotransmissores, na função mitocondrial, nas respostas do sistema imunológico, no comprimento dos telômeros e no controle do estresse oxidativo (CANFIELD; BRADSHAW, 2019; LE COUTEUR et al., 2020b). A maior parte desses efeitos relaciona-se com a influência positiva que os BCAAs possuem sobre a ativação da proteína alvo da rapamicina de mamíferos (mTOR) (LE COUTEUR et al., 2020b), cujos efeitos dessa ativação ainda são intensamente discutidos quanto aos benefícios e malefícios no processo de envelhecimento (LE COUTEUR et al., 2020b). Contudo, aparentemente, uma redução na atividade da mTOR relaciona-se com uma maior expectativa de vida (COLLINO et al., 2013a; WEICHHART, 2018).

Um dos achados de maior destaque do nosso estudo foi a evidência de redução nos níveis séricos de BCAAs e 3-hidroxiisobutirato no grupo mais velho. Esse achado está de acordo com o que foi observado em estudos anteriores e possivelmente está relacionado à menor massa muscular em indivíduos mais velhos (KOUCHIWA et al., 2012; LE COUTEUR et al., 2020a; PITKÄNEN et al., 2003). Considerando que todos os participantes não estavam fazendo uso de medicação contínua e não apresentavam

nenhuma doença, alterações sistêmicas e fatores de risco (tais como, tabagismo, uso excessivo de álcool, ou obesidade), as faixas etárias mais velhas provavelmente foram compostas de indivíduos com boa saúde e, portanto, as reduções séricas observadas de BCAAs e 3-hidroxiisobutirato provavelmente não se relacionam com processos patológicos. O ácido hipúrico reforça essa hipótese, uma vez que os níveis séricos desse metabólito foram significativamente mais elevados em indivíduos mais velhos e por relacionar-se negativamente com a resistência à insulina e positivamente à produção de agentes anti-inflamatórios e antivirais, e à biodiversidade e maturidade da microbiota intestinal (BRUNELLI et al., 2021; DE SIMONE et al., 2021).

A concentração sanguínea e urinária de ácido hipúrico tende a aumentar ao longo do envelhecimento saudável (DE SIMONE et al., 2021) e apresenta relação com a função renal, da mesma forma que os níveis séricos de creatinina e uréia (MUSCH; VERFAILLIE; DECAUX, 2006; STANIMIROVA et al., 2020; ZIMMERMAN; JÖRNVALL; BERGSTRÖM, 1990). Um aumento do nível sérico desse metabólito poderia indicar uma função renal prejudicada (STANIMIROVA et al., 2020; ZIMMERMAN; JÖRNVALL; BERGSTRÖM, 1990), entretanto, recentemente também tem sido proposto esse metabólito como um marcador e mediador da saúde metabólica (DE SIMONE et al., 2021). O ácido hipúrico pode ser derivado da atividade da microbiota intestinal enriquecida sobre compostos altamente antioxidantes e imunomoduladores (como polifenóis) comumente encontrados em frutas e vegetais, e proporciona efeitos protetores nas células beta do pâncreas (BRUNELLI et al., 2021; DE SIMONE et al., 2021). O enriquecimento da microbiota intestinal, observado em indivíduos com níveis elevados de ácido hipúrico sanguíneo/urinário, também está relacionado à melhor absorção de nutrientes no intestino e possui relação inversa com a síndrome da fragilidade em idosos (DE SIMONE et al., 2021; MARTINEZ-GURYN et al., 2018). Portanto, provavelmente o aumento dos níveis séricos desse metabólito no grupo G₆₀₋₇₀ está mais relacionado ao enriquecimento da microbiota intestinal do que a um comprometimento da função renal, considerando que os níveis de uréia e creatinina estiveram dentro dos valores de normalidade em todas as faixas etárias (Tabela 2) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2011).

Apesar dos maiores valores de ácido hipúrico na faixa etária mais velha, o que pode indicar uma alteração favorável, os índices relacionados a MAC (HF, LF, e σ^2_{PC}) reduzem com o processo de envelhecimento e apresentam os menores valores na faixa

etária mais velha, assim como observado no estudo de Voss et al. (VOSS et al., 2015). Isso provavelmente indica um comprometimento da MAC em faixas etárias mais velhas. Especificamente, considerando a análise espectral, a redução de ambas as bandas espectrais (LF e HF) se traduz em uma provável redução da modulação simpática cardíaca e, principalmente, uma redução da modulação parassimpática cardíaca, pois o LF representa um componente misto (modulação simpática e parassimpática cardíaca) com uma predominância simpática, enquanto o HF representa unicamente a modulação parassimpática cardíaca (CATAI et al., 2020; VANDERLEI et al., 2009). A redução da modulação parassimpática cardíaca é esperada com o envelhecimento e ocorre como consequência de diversos fatores como alterações estruturais e funcionais nos cardiomiócitos, estresse oxidativo, *inflammaging*, comprometimento de mecanismos regulatórios, e perda de interação entre os subsistemas (LAKATTA, 1999; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; PORTA et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2012; YOUNG; BENTON, 2018). Tal contexto torna o sistema cardiovascular mais suscetível a limitações, sobrecargas, e doenças cardiovasculares (PORTA et al., 2014; VOSS et al., 2015).

Concordante com os comprometimentos na MAC, observamos um aumento da PCRus em indivíduos mais velhos (HAARALA et al., 2011). Elevados valores de LDL e CT também foram observados nas faixas etárias mais velhas, porém nenhum desses índices possuía valores patológicos (FALUDI et al., 2017; POTSCH et al., 2006). Tais achados são consequências do *inflammaging* e de alterações no metabolismo lipídico, e são vastamente discutidos na literatura no contexto do envelhecimento (CHUNG, 2021; MILAN-MATTOS et al., 2019). Além disso, foi verificada uma provável relação positiva entre os valores de colesterol (LDL e CT) e os valores de aspartato (Figura 8), possivelmente em virtude da relação de ambos com comprometimentos cardiovasculares (BONILHA et al., 2021; XUAN et al., 2021).

O aspartato é um aminoácido não essencial e tem uma relação ainda indefinida com o envelhecimento saudável, apesar de, aparentemente, haver uma tendência ascendente dos valores séricos de aminoácidos não essenciais (KOUCHIWA et al., 2012). Há um aumento desse aminoácido no grupo G_{40-49} com uma redução muito discreta nas faixas etárias subsequentes ($ES_d < -0,2$ para ambas as faixas etárias: G_{50-59} e G_{60-70}), de acordo com nossos dados. O aspartato desempenha um papel significativo no controle da produção de espécies reativas de oxigênio, uma vez que é indispensável no

equilíbrio de NAD^+ /nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) nas mitocôndrias devido a sua atuação na lançadeira malato-aspartato (BORST, 2020). Está envolvido também no ciclo da uréia e tem participação como co-neurotransmissor excitatório, agindo de maneira combinada com o glutamato sobre o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) no sistema nervoso central (CANFIELD; BRADSHAW, 2019; DALANGIN; KIM; CAMPBELL, 2020; HERRING et al., 2015). Entretanto, o aumento do aspartato sérico tem sido relacionado com comprometimentos cardiovasculares (XUAN et al., 2021). Estudos recentes realizados em ratos evidenciaram a presença de NMDAR nos vasos sanguíneos e no coração, sendo que a sua ativação está relacionada com a redução da modulação parassimpática cardíaca e ao aumento da suscetibilidade a arritmias cardíacas (SHI et al., 2017). Contudo, contrastante com o glutamato e a homocisteína (que foram insignificantes em nossos dados) (GOVORUSKINA et al., 2020), o papel do aspartato sobre o NMDAR no sistema cardiovascular ainda não foi verificado.

Com o avançar da idade, espera-se que haja uma diminuição progressiva do $\text{VO}_{2\text{PICO}}$ (FLEG et al., 2005) devido a diversos fatores que envolvem alterações funcionais, estruturais e interativas nos tecidos e sistemas (LAKATTA, 1999; PANENI et al., 2017; SEALS et al., 1994; SHARMA; GOODWIN, 2006; TIELAND; TROUWBORST; CLARK, 2018). O $\text{VO}_{2\text{PICO}}$ mostrou-se significativamente reduzido no G_{60-70} , indicando menor capacidade de produzir energia a partir do oxigênio. É possível destacar nesse contexto, dentre os diversos fatores que estão envolvidos na redução do $\text{VO}_{2\text{PICO}}$ ao longo do envelhecimento (LAKATTA, 1999; PANENI et al., 2017; SEALS et al., 1994; SHARMA; GOODWIN, 2006; TIELAND; TROUWBORST; CLARK, 2018), o decréscimo dos níveis séricos de BCAAs, uma vez que esse fato pode estar relacionado com a redução do consumo de oxigênio por meio da relação existente entre os BCAAs e a síntese proteica e a função mitocondrial (CUNNINGHAM et al., 2007; LE COUTEUR et al., 2020b; SCHIEKE et al., 2006). O controle autônomo cardiovascular também pode ter influenciado na redução do $\text{VO}_{2\text{PICO}}$ no G_{60-70} (SEALS et al., 1994), uma vez que verificamos alterações na MAC nessa mesma faixa etária. Com o envelhecimento, há a redução progressiva do débito cardíaco, especialmente decorrente da redução da frequência cardíaca máxima, como consequência da estimulação beta-adrenérgica prejudicada no cronotropismo cardíaco (SEALS et al., 1994). Vale ressaltar, entretanto, que as alterações da MAC foram

verificadas na condição de repouso e os fatores periféricos responsáveis pela redução do VO_{2PICO} (como a redução da massa muscular, disfunção mitocondrial, e alterações metabólicas intracelulares) também estão sendo fortemente influenciados no envelhecimento (HAWKINS; WISWELL, 2003; TIELAND; TROUWBORST; CLARK, 2018).

Resumindo, o envelhecimento saudável provoca alterações metabólicas, autonômicas e na ACR. Comprometimento da função e estrutura dos sistemas orgânicos, reduções na massa muscular, acúmulo de danos no DNA, aumento da inflamação sistêmica e do estresse oxidativo, e desequilíbrios no controle autonômico são as principais causas discutidas na literatura para explicar tais alterações (COLLINO et al., 2013b; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; PANENI et al., 2017; PORTA et al., 2014; SHARMA; RAMANATHAN, 2020; TAKAHASHI et al., 2012). Entretanto, o organismo tenta contrabalancear os comprometimentos decorrentes do envelhecimento com mecanismos homeostáticos, que são limitados e sua depleção relaciona-se com o aparecimento de limitações fisiológicas e doenças (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013, 2016). Espera-se, portanto, que com o avançar da idade o indivíduo tenha uma maior depleção dos mecanismos homeostáticos e, como resultado, maior dependência de hábitos saudáveis para manutenção da saúde (LÓPEZ-OTÍN et al., 2016). No presente estudo, apesar das acentuadas reduções na modulação parassimpática cardíaca e na ACR na faixa etária mais velha, é verificado um perfil metabólico compatível com o observado no processo de envelhecimento saudável discutido na literatura (DE SIMONE et al., 2021; LE COUTEUR et al., 2020a). Os níveis reduzidos de BCAAs e 3-hidroxiisobutirato, e o aumento de ácido hipúrico, são destacados no G_{60-70} e podem estar atrelados a processos fisiológicos e estados metabólicos que atenuam os efeitos deletérios existentes no envelhecimento pela menor ativação da proteína mTOR (LE COUTEUR et al., 2020b; LÓPEZ-OTÍN et al., 2016), por não contribuir com o transporte de ácidos graxos pelo endotélio e com a resistência à insulina (JANG et al., 2016), e devido aos efeitos benéficos que os altos níveis de ácido hipúrico podem indicar (BRUNELLI et al., 2021; DE SIMONE et al., 2021). Contudo, considerando a natureza transversal do presente estudo, é impossível concluir que o perfil metabólico dos indivíduos do grupo mais velho seja uma consequência de hábitos mais saudáveis durante a vida.

Este estudo é um estudo observacional e transversal, e é baseado em uma amostra relativamente pequena quando comparado a outros estudos que abordam essa temática (LAWTON et al., 2008; MENNI et al., 2013; YU et al., 2012). No entanto, este foi o primeiro estudo que avaliou os efeitos do envelhecimento saudável com uma perspectiva integrativa, considerando os marcadores de atividade metabólica e sistêmica (VO_{2PICO} e controle autonômico). Além disso, duas técnicas complementares (RMN e LC-HRMS) foram utilizadas para obter o metaboloma de cada participante. Não foi realizado o registro alimentar e nem foi medido o nível de atividade física dos indivíduos. Entretanto, todos os sujeitos se encontravam na mesma condição no dia da coleta de sangue (jejum de 12 horas e com restrição de alguns alimentos/bebidas, além da restrição de realizar atividades físicas extenuantes), e foram classificados como aparentemente saudável de acordo com critérios rigorosos, conforme descrito na seção de metodologia.

5 Conclusão

A faixa etária que apresentou as alterações mais expressivas foi a mais velha (G_{60-70}), na qual houve menores valores dos níveis séricos de BCAAs e seus derivados, bem como da ACR, da MAC global (especialmente na modulação parassimpática cardíaca) e elevados valores dos níveis séricos de ácido hipúrico. Nesse sentido, o perfil metabólico, a ACR e a MAC se alteram em decorrência dos comprometimentos proporcionados pelo envelhecimento, entretanto, algumas alterações no perfil metabólico de idosos aparentemente saudáveis e sem fatores de risco cardiovasculares podem ser favoráveis para atenuar os efeitos deletérios do envelhecimento. São necessários estudos longitudinais para avaliar os efeitos dos bons hábitos de vida sobre o perfil metabólico, assim como sobre a ACR e a MAC para uma melhor compreensão do envelhecimento saudável.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (23028.007721/2013-41 e código de financiamento 001) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (#2016/22215-7, #2018/25082-3, #2010/52070-4, #2020/05965-8, #2020/13939-7, e #2019/15040-4). A fonte de financiamento não teve participação na concepção do estudo, coleta, e análise de dados ou redação do manuscrito.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os indivíduos que participaram da pesquisa; a equipe de laboratório pelo suporte técnico [Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular, Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear e SEPARARE (Núcleo de Pesquisa em Cromatografia)]; e fontes de financiamento CAPES e FAPESP.

6 Referências

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PROFESSIONAL PRACTICE COMMITTEE. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. **Diabetes Care**, v. 45, n. Supplement_1, p. S17–S38, 16 dez. 2021.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Committee on Exercise. Exercise testing and training of apparently healthy individuals: a handbook for physicians. **American Heart Assoc.**, 1972.

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, 13 jul. 2010.

BONILHA, I. et al. The Reciprocal Relationship between LDL Metabolism and Type 2 Diabetes Mellitus. **Metabolites**, v. 11, n. 12, p. 807, 28 nov. 2021.

BORST, P. The malate-aspartate shuttle (Borst cycle): How it started and developed into a major metabolic pathway. **IUBMB life**, v. 72, n. 11, p. 2241–2259, nov. 2020.

BRUNELLI, L. et al. Plasmatic Hippuric Acid as a Hallmark of Frailty in an Italian Cohort: The Mediation Effect of Fruit-Vegetable Intake. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 76, n. 12, p. 2081–2089, 15 nov. 2021.

CANFIELD, C.-A.; BRADSHAW, P. C. Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases. **Translational Medicine of Aging**, v. 3, p. 70–89, 1 jan. 2019.

CATAI, A. M. et al. Heart rate variability: are you using it properly? Standardisation checklist of procedures. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 24, n. 2, p. 91–102, 2020.

CHUNG, K. W. Advances in Understanding of the Role of Lipid Metabolism in Aging. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 880, 13 abr. 2021.

CLARK-CARTER, D. Z Scores. **Wiley StatsRef: Statistics Reference Online**, set. 2014

COLLINO, S. et al. Metabolic Signatures of Extreme Longevity in Northern Italian Centenarians Reveal a Complex Remodeling of Lipids, Amino Acids, and Gut Microbiota Metabolism. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. e56564, 6 mar. 2013a.

COLLINO, S. et al. Musculoskeletal system in the old age and the demand for healthy ageing biomarkers. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 11–12, p. 541–547, dez. 2013b.

CUNNINGHAM, J. T. et al. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 736–740, 29 nov. 2007.

DALANGIN, R.; KIM, A.; CAMPBELL, R. E. The Role of Amino Acids in Neurotransmission and Fluorescent Tools for Their Detection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. E6197, 27 ago. 2020.

DE MARIA, B. et al. Cardiac baroreflex hysteresis is one of the determinants of the heart period variability asymmetry. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 317, n. 4, p. R539–R551, 1 out. 2019.

DE SIMONE, G. et al. Hippuric acid: Could become a barometer for frailty and geriatric syndromes? **Ageing Research Reviews**, v. 72, p. 101466, dez. 2021.

FAFIÁN-LABORA, J. A.; O'LOGHLEN, A. Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 8, p. 628–639, 1 ago. 2020.

FALUDI, A. et al. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

FIELD, A. **Discovering Statistics Using SPSS**. [s.l.] SAGE Publications, 2009.

FLEG, J. L. et al. Accelerated longitudinal decline of aerobic capacity in healthy older adults. **Circulation**, v. 112, n. 5, p. 674–682, 2 ago. 2005.

GOVORUSKINA, N. et al. The Role of Cardiac N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Heart Conditioning—Effects on Heart Function and Oxidative Stress. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 1065, jul. 2020.

HAARALA, A. et al. Heart rate variability is independently associated with C-reactive protein but not with Serum amyloid A. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 41, n. 9, p. 951–957, set. 2011.

HAWKINS, S.; WISWELL, R. Rate and mechanism of maximal oxygen consumption decline with aging: implications for exercise training. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 33, n. 12, p. 877–888, 2003.

HERRING, B. E. et al. Is Aspartate an Excitatory Neurotransmitter? **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 28, p. 10168–10171, 15 jul. 2015.

JANG, C. et al. A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 22, n. 4, p. 421–426, abr. 2016.

JOVÉ, M. et al. Human Aging Is a Metabolome-related Matter of Gender. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 578–585, maio 2016.

K WASSERMAN. **Principles of Exercise Testing and Interpretation**. 4. ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

KELLY, R. S.; KELLY, M. P.; KELLY, P. Metabolomics, physical activity, exercise and health: A review of the current evidence. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 12, p. 165936, 1 dez. 2020.

KOUCHIWA, T. et al. Age-related changes in serum amino acids concentrations in healthy individuals. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 5, p. 861–870, 4 jan. 2012.

KRITSILIS, M. et al. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 2937, 27 set. 2018.

LAKATTA, E. G. Cardiovascular Aging Research: The Next Horizons. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 47, n. 5, p. 613–625, 1999.

LAWTON, K. A. et al. Analysis of the adult human plasma metabolome. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 4, p. 383–397, abr. 2008.

LE COUTEUR, D. G. et al. Branched Chain Amino Acids, Cardiometabolic Risk Factors and Outcomes in Older Men: The Concord Health and Ageing in Men Project. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 75, n. 10, p. 1805–1810, 25 set. 2020a.

LE COUTEUR, D. G. et al. Branched chain amino acids, aging and age-related health. **Ageing Research Reviews**, v. 64, p. 101198, dez. 2020b.

LEWIS, G. D. et al. Metabolic Signatures of Exercise in Human Plasma. **Science translational medicine**, v. 2, n. 33, p. 33ra37, 26 maio 2010.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 6 jun. 2013.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. Metabolic Control of Longevity. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 802–821, 11 ago. 2016.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. Hallmarks of aging: An expanding universe. **Cell**, v. 186, n. 2, p. 243–278, 19 jan. 2023.

LUSTGARTEN, M. S. et al. Identification of serum analytes and metabolites associated with aerobic capacity. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 5, p. 1311–1320, maio 2013.

LYNCH, C. J.; ADAMS, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 723–736, dez. 2014.

MARTINEZ-GURYN, K. et al. Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 4, p. 458- 469.e5, 11 abr. 2018.

MATHEW, A. V. et al. Impaired Amino Acid and TCA Metabolism and Cardiovascular Autonomic Neuropathy Progression in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 68, n. 10, p. 2035–2044, out. 2019.

MENNI, C. et al. Metabolomic markers reveal novel pathways of ageing and early development in human populations. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 4, p. 1111–1119, ago. 2013.

MILAN-MATTOS, J. C. et al. Effects of natural aging and gender on pro-inflammatory markers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 9, p. e8392, 12 ago. 2019.

MORRIS, C. et al. The relationship between aerobic fitness level and metabolic profiles in healthy adults. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 7, p. 1246–1254, jul. 2013.

MUSCH, W.; VERFAILLIE, L.; DECAUX, G. Age-related increase in plasma urea level and decrease in fractional urea excretion: clinical application in the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 1, n. 5, p. 909–914, set. 2006.

NAKAGAWA, S.; CUTHILL, I. C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 82, n. 4, p. 591–605, nov. 2007.

PAGANI, M. et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circulation Research**, v. 59, n. 2, p. 178–193, ago. 1986.

PANENI, F. et al. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 15, p. 1952–1967, 18 abr. 2017.

PEARSON, T. A. et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 499–511, 28 jan. 2003.

PIEDEPALUMBO, M.; KOCH, W. J.; DE LUCIA, C. Metabolomics, heart disease and aging. **Ageing (Albany NY)**, v. 13, n. 5, p. 6231–6232, 10 mar. 2021.

PITKÄNEN, H. T. et al. Serum amino acid concentrations in aging men and women. **Amino Acids**, v. 24, n. 4, p. 413–421, 1 jun. 2003.

PORTA, A. et al. Performance assessment of standard algorithms for dynamic R-T interval measurement: comparison between R-Tapex and R-T(end) approach. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 36, n. 1, p. 35–42, jan. 1998.

- PORTA, A. et al. Effect of Age on Complexity and Causality of the Cardiovascular Control: Comparison between Model-Based and Model-Free Approaches. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89463, 24 fev. 2014.
- POTSCH, A. A. et al. C-reactive protein diagnostic and prognostic value in patients presenting at the emergency room with chest pain. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 87, n. 3, p. 275–280, set. 2006.
- SCHIEKE, S. M. et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 27643–27652, 15 set. 2006.
- SEALS, D. R. et al. Exercise and aging: autonomic control of the circulation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 26, n. 5, p. 568–576, maio 1994.
- SHARMA, G.; GOODWIN, J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. **Clinical Interventions in Aging**, v. 1, n. 3, p. 253–260, set. 2006.
- SHARMA, R.; RAMANATHAN, A. The Aging Metabolome—Biomarkers to Hub Metabolites. **Proteomics**, v. 20, n. 5–6, p. 1800407, mar. 2020.
- SHI, S. et al. Activation of N-methyl-d-aspartate receptors reduces heart rate variability and facilitates atrial fibrillation in rats. **Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology**, v. 19, n. 7, p. 1237–1243, 1 jul. 2017.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Biomarcadores na Nefrologia**. 1. ed. [s.l.] Hugo Abensur, 2011. v. 1
- STANIMIROVA, I. et al. Serum metabolomics approach to monitor the changes in metabolite profiles following renal transplantation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17223, 14 out. 2020.
- SUI, X. et al. Uric acid and the development of metabolic syndrome in women and men. **Metabolism - Clinical and Experimental**, v. 57, n. 6, p. 845–852, 1 jun. 2008.
- TAKAHASHI, A. C. M. et al. Aging reduces complexity of heart rate variability assessed by conditional entropy and symbolic analysis. **Internal and Emergency Medicine**, v. 7, n. 3, p. 229–235, jun. 2012.
- TASK FORCE. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–1065, 1 mar. 1996.
- TIELAND, M.; TROUWBORST, I.; CLARK, B. C. Skeletal muscle performance and ageing. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 1, p. 3–19, fev. 2018.
- TSUGAWA, H. et al. MRMPROBS suite for metabolomics using large-scale MRM assays. **Bioinformatics**, v. 30, n. 16, p. 2379–2380, 15 ago. 2014.

TSUGAWA, H. et al. MS-DIAL: Data Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. **Nature methods**, v. 12, n. 6, p. 523–526, jun. 2015.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, n. 2, p. 205–217, jun. 2009.

VOSS, A. et al. Short-Term Heart Rate Variability—Influence of Gender and Age in Healthy Subjects. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0118308, 30 mar. 2015.

WEHRWEIN, E. A.; ORER, H. S.; BARMAN, S. M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1239–1278, 13 jun. 2016.

WEICHHART, T. mTOR as regulator of lifespan, aging and cellular senescence. **Gerontology**, v. 64, n. 2, p. 127–134, 2018.

XUAN, C. et al. Quantitative Assessment of Serum Amino Acids and Association with Early-Onset Coronary Artery Disease. **Clinical Interventions in Aging**, v. 16, p. 465–474, 15 mar. 2021.

YOUNG, H. A.; BENTON, D. Heart-rate variability: a biomarker to study the influence of nutrition on physiological and psychological health? **Behavioural Pharmacology**, v. 29, n. 2-, p. 140–151, abr. 2018.

YU, Z. et al. Human serum metabolic profiles are age dependent. **Aging Cell**, v. 11, n. 6, p. 960–967, dez. 2012.

ZIEGLER, D. et al. Association of cardiac autonomic dysfunction with higher levels of plasma lipid metabolites in recent-onset type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 64, n. 2, p. 458–468, fev. 2021.

ZIMMERMAN, L.; JÖRNVALL, H.; BERGSTRÖM, J. Phenylacetylglutamine and hippuric acid in uremic and healthy subjects. **Nephron**, v. 55, n. 3, p. 265–271, 1990.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E DESDOBRAMENTOS FUTUROS

Os mecanismos moleculares envolvidos com o exercício físico e o processo de envelhecimento saudável ainda carecem de mais investigações, apesar do grande número de trabalhos relacionados com esses temas. Os desfechos da presente tese colaboram para o esclarecimento de possíveis mecanismos que mostram influências diretas e indiretas do perfil metabólico com os processos fisiológicos observados nessas duas condições.

Embora não tenha sido possível avaliar o impacto da prática de exercício físico regular ao longo das décadas de vida, associado a mudanças de hábitos de vida, é possível ressaltar a importância de hábitos de vida saudáveis, como uma boa nutrição e a prática de exercícios físicos, para que o metabolismo e os sistemas orgânicos mantenham-se equilibrados e, conseqüentemente, estando menos sujeitos a incidência de doenças crônicas não transmissíveis.

Dessa forma, um maior esclarecimento sobre como o exercício físico e a boa nutrição interferem diretamente no envelhecimento saudável poderá ocorrer em estudos futuros utilizando-se de uma abordagem multiômica (genômica, transcriptômica, proteômica, e metabolômica). Isso será possível devido ao aprimoramento das técnicas e ferramentas de análise. Entretanto, a integração de respostas entre variáveis das ciências ômicas e a modulação autonômica cardiovascular sobre os sistemas orgânicos ainda é pouco explorada. O estudo aprofundado dessa integração, considerando a influência do exercício físico e da nutrição, poderá ajudar a elucidar a relação fisiológica existente entre a biologia do organismo e as respostas de ajustes autonômicos cardiovasculares do organismo. Assim, como desdobramentos futuros, iremos investigar a relação do metaboloma com outros índices que refletem o controle autonômico cardiovascular, como a variabilidade da pressão arterial e o acoplamento cardiorrespiratório, considerando o processo de envelhecimento e os níveis de condicionamento físico.

ANEXO A: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO – ESTUDO 1



Review

Oxylipin Response to Acute and Chronic Exercise: A Systematic Review

Étore F. Signini ^{1,*}, David C. Nieman ², Cláudio D. Silva ¹, Camila A. Sakaguchi ¹ and Aparecida M. Catai ¹

¹ Physical Therapy Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil; claudiods@estudante.ufscar.br (C.D.S.); sakaguchicamila@estudante.ufscar.br (C.A.S.); mcatai@ufscar.br (A.M.C.)

² North Carolina Research Campus, Appalachian State University, Kannapolis, NC 28081, USA; niemandc@appstate.edu

* Correspondence: efsignini@estudante.ufscar.br

Received: 28 May 2020; Accepted: 19 June 2020; Published: 25 June 2020



Abstract: Oxylipins are oxidized compounds of polyunsaturated fatty acids that play important roles in the body. Recently, metabololipidomic-based studies using advanced mass spectrometry have measured the oxylipins generated during acute and chronic physical exercise and described the related physiological effects. The objective of this systematic review was to provide a panel of the primary exercise-related oxylipins and their respective functions in healthy individuals. Searches were performed in five databases (Cochrane, PubMed, Science Direct, Scopus and Web of Science) using combinations of the Medical Subject Headings (MeSH) terms: “Humans”, “Exercise”, “Physical Activity”, “Sports”, “Oxylipins”, and “Lipid Mediators”. An adapted scoring system created in a previous study from our group was used to rate the quality of the studies. Nine studies were included after examining 1749 documents. Seven studies focused on the acute effect of physical exercise while two studies determined the effects of exercise training on the oxylipin profile. Numerous oxylipins are mobilized during intensive and prolonged exercise, with most related to the inflammatory process, immune function, tissue repair, cardiovascular and renal functions, and oxidative stress.

Keywords: inflammation; lipid mediators; lipidomics; metabolites; metabolomics; physical exercise

1. Introduction

Oxylipins are oxidized polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and function as lipid mediators for multiple physiological processes [1–3]. Polyunsaturated fatty acid oxidation following release from cell phospholipid membranes occurs from the activity of three enzyme systems including cyclooxygenases (COX), lipoxygenases (LOX), and cytochrome P450 (CYP) enzymes [1,4,5]. The primary fatty acids for oxylipin generation include arachidonic acid (AA), adrenic acid (AdA), linoleic acid (LA), α -linoleic acid (ALA), docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), and dihomo- γ -linolenic acid (DGLA) [1,5].

Plasma oxylipin levels can be altered in some disease states and are influenced by nutritional status and mental and physiological stressors [2,6–10]. Acute and chronic exercise have a strong effect on inflammation and immune function, and oxylipins may be involved at a regulatory level [2,10–13]. This potential linkage has generated interest in evaluating the effect of varying exercise workloads on oxylipin generation from COX, LOX, and CYP enzyme systems, and the interactive effects with different forms of nutritional support [10,11]. This interest has been fueled by advances in mass spectrometry (MS) and bioinformatics support that have allowed an ever increasing number of oxylipins to be



OPEN Integrative perspective of the healthy aging process considering the metabolome, cardiac autonomic modulation and cardiorespiratory fitness evaluated in age groups

Étore De Favari Signini¹✉, Alex Castro², Patrícia Rehder-Santos¹, Juliana Cristina Millan-Mattos¹, Juliana Magalhães de Oliveira², Vinicius Minatel¹, Camila Bianca Falasco Pantoni^{1,3}, Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo⁴, Fernando Fabrizzi⁵, Alberto Porta^{6,7}, Antônio Gilberto Ferreira², Regina Vincenzi Oliveira² & Aparecida Maria Catai^{2,8}✉

The aging process causes changes at all organic levels. Although metabolism, cardiac autonomic modulation (CAM), and cardiorespiratory fitness (CRF) are widely studied as a function of age, they are mainly studied in isolation, thus making it difficult to perceive their concomitant variations. This study aimed to investigate the integrated changes that occur in the metabolome, CAM, and CRF throughout aging in apparently healthy individuals. The subjects (n = 118) were divided into five groups according to age (20–29, 30–39, 40–49, 50–59, and 60–70 years old) and underwent blood collection, autonomic assessment, and a cardiopulmonary exercise test for metabolomics analysis using mass spectrometry and nuclear magnetic resonance, cardiac autonomic modulation analysis, and CRF by peak oxygen consumption analysis, respectively. The Tukey's post hoc and effect size with confidence interval were used for variables with a significant one-way ANOVA effect ($P < 0.01$). The main changes were in the oldest age group, where the CRF, valine, leucine, isoleucine, 3-hydroxyisobutyrate, and CAM reduced and hippuric acid increased. The results suggest significant changes in the metabolome, CAM, and CRF after the age of sixty as a consequence of aging impairments, but with some changes in the metabolic profile that may be favorable to mitigate the aging deleterious effects.

Aging is a complex process characterized by changes at all organic levels¹. There are several hallmarks of senescence that can be summarized in genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, loss of proteostasis, unregulated nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, stem cell exhaustion, and altered intercellular communication^{2,3}. The first four hallmarks are primarily responsible for the deleterious effects of aging, the next three are the positive or negative influencers of the four previous hallmarks, while the last two are consequences of changes in the previous seven hallmarks, and provide feedback on the deleterious effects^{2,3}.

¹Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil. ²Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil. ³Department of Gerontology, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil. ⁵Penápolis Educational Foundation (FUNPEP), Penápolis, São Paulo, Brazil. ⁶Department of Biomedical Sciences for Health, University of Milan, Milan, Italy. ⁷Department of Cardiothoracic, Vascular Anesthesia and Intensive Care, Policlinico San Donato, San Donato Milanese, Milan, Italy. ⁸Cardiovascular Physical Therapy Laboratory, Department of Physical Therapy, Nucleus of Research in Physical Exercise, Federal University of São Carlos, Via Washington Luiz, Km 235, CP: 676, São Carlos, SP 13565-905, Brazil. ✉email: signinietof@gmail.com; mcatai@ufscar.br

**ANEXO C: TABELA COM TODOS OS COMPOSTOS DETECTADOS DO
ESTUDO 2**

Técnica Analítica	Metabólitos (nomes) ou <i>m/z</i> dos <i>features</i> (números)
¹H RMN	Isoleucina; Valina; 3-Hidroxiisobutirato; Leucina; Aspartato; Colina; Dimetil Sulfona; Lactato; 2-Hidroxiisovalerato; Serina; Succinato; Treonina; Acetoacetato; Ornitina; Fenilalanina; Glutamina; Creatinina; Metionina; Betaína; Formiato; Lisina; 2-Hidroxibutirato; N,N-Dimetilglicina; Glicose; Alanina; Anserina; 3-Hidroxibutirato; Cetoleucina; Tirosina; Piruvato; Asparagina; Dimetilamina; Ascorbato; Glicina; Prolina; Histidina; O-Acetilcarnitina; 2-Oxoglutarato; 3-Metil-2-oxovalerato; Trimetilamina; Glicerol; Acetato; Citrato; Hipoxantina; Sarcosina; Creatina; Etanol
LC-HRMS[†]	Ácido Hipúrico*; 129,0560*; 10E,12Z-CLA; 537,4164*; 872,6302; 593,4791*; 586,3139*; 655,2784; 467,3731*; 696,5247; 144,9234*; 145,0619*; 916,6549; 100,9334*; 868,5977; 652,4982; 167,0212*; 293,1759*; 698,7851; 1086,1771; 617,7374*; 731,3168*; 195,0873; 203,0824*; 191,0196*; 619,7504; 195,8108*; 599,3807; 942,3430*; 173,0816*; 564,4467; 612,3302*; 853,5210; 415,2107; 117,0555*; 284,2944; 256,2635; 384,3453; 187,0973*; 484,2277*; 199,8048*; 853,5209; 663,2650; 686,4438; 130,0872*; 359,3168; 380,2553; 381,1734*; 187,0071*; 281,2480*; 228,1953; 702,5082; 766,4569; 162,8390*; 648,3784; 603,7898; 696,7722*; 350,2103; 746,4421; 310,3093; 824,4991*; 432,2786; 737,4358; 686,3570; 628,4038; 604,3523; 89,0242*; 744,4863; 708,4155; 128,0353*; 540,3310*; 282,2792; 112,9856*; 180,0665*; 355,1578*; 164,0714*; 183,0840; 145,0504*; 388,2532; 766,4569; 426,3569; 568,3611*; 255,2325*; 833,5036; 383,1894*; 283,2637*; 452,2026; 824,4991; 773,5058; 426,1868; 164,8360*; 802,5591*; 395,2744*; 337,1666; 1102,1848; 653,2665*; 614,3443*; 452,2029; 378,2411*; 118,0863; 795,4797; 158,9781*; 303,2325*; 119,0863; 158,1537; 516,3006; 717,7568; 532,2993*; 775,4643; 795,4788; 103,0398*; 147,0759; 538,3141; 279,2327*; 657,4222; 583,2555*; 583,2560*; 379,1576*; 476,2775*; 271,2270*; 161,0955; 560,3259; 636,2596*; 692,4049; 500,2775*

[†] Compostos remanescentes após a aplicação dos filtros (vide metodologia na sessão *LC-HRMS*) Compostos em ordem crescente do valor de “p”, sendo aqueles em negrito com $p < 0,01$; em preto com $0,01 \leq p < 0,05$; em cinza com $0,05 \leq p < 0,1$; e em cinza claro com $p \geq 0,1$. Compostos não identificados (*features*) pelo LC-HRMS foram representados em *m/z*. Os compostos com “*” representam aqueles oriundos do modo de ionização negativa e o restante do modo de ionização positiva. 10E,12Z-CLA: ácido 10E,12Z-octadecadienóico; LC-HRMS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução; ¹H RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio; *m/z*: Razão massa-carga.