INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NA PRÁTICA REGULAR DE EXERCÍCIO FÍSICO EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA

Palavras-Chave: UNTARGETED METABOLOMICS, PHYSICAL EXERCISE, GC-MS

Autores:

BRUNA SILVA DE LACERDA, IQ - UNICAMP

Dra. LUCIELE GUERRA MINUZZI (coorientadora), DEF - UNESP

Prof. Dr. FABIO SANTOS LIRA, DEF - UNESP

Dr. ALEX CASTRO, LNBio - CNPEM

Profa. Dra. ANA VALÉRIA COLNAGHI SIMIONATO (orientadora), IQ - UNICAMP

---

1) INTRODUÇÃO:

1.1 Prática regular de exercício físico

A prática regular de exercício físico é reconhecida por seus benefícios à saúde, em parte, por induzir um ambiente anti-inflamatório sistêmico, que pode reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas[1]. No entanto, embora existam diversos estudos sobre as respostas inflamatórias agudas ao exercício, persistem lacunas quanto às adaptações metabólicas e intracelulares resultantes da exposição repetida a episódios de exercício ao longo de anos de treinamento em atletas. Nesse cenário, a metabolômica oferece uma abordagem abrangente para a identificação de biomarcadores e metabólitos relacionados à inflamação e resposta imune, que refletem adaptações ao exercício[2].

1.2 Metabolômica

A metabolômica é uma ciência ômica que estuda as alterações dos metabólitos, buscando o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. Metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica[3]. Neste estudo, a metabolômica global foi utilizada a fim de encontrar o maior número de metabólitos possível no sistema biológico. Desta forma, a aplicação da metabolômica em atletas de alto rendimento pode revelar mecanismos moleculares subjacentes às adaptações fisiológicas de longo prazo e orientar estratégias personalizadas de saúde e desempenho.

1.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

Previamente a análise por GC-MS, é necessário derivatizar a amostra, tornando os metabólitos termoestáveis e voláteis, essa etapa é feita por uma etapa de metoximação, seguida por sililação[4].

Em GC-MS, a separação dos compostos ocorre de acordo com suas volatilidades e interação com a fase estacionária (FE): compostos com maior afinidade pela FE são eluídos mais lentamente, enquanto os de menor afinidade são carregados ela fase móvel gasosa. Após separação, a amostra é introduzida no espectrômetro de massas, onde ocorre a ionização e fragmentação na fonte de íons, quando se usa a ionização por impacto de elétrons. Posteriormente, os metabólitos são separados no analisador de massas com base em suas respectivas razões massa/carga e finalmente são detectados.

1.4 Análise Quimiométrica

A quimiometria utiliza métodos estatísticos e matemáticos para extrair informações de dados químicos, otimizando experimentos. Métodos não supervisionados, como a análise de componentes principais (PCA), não requerem nenhum conhecimento inicial sobre a identificação das amostras, e é uma técnica de redução de dimensionalidade, que facilita a visualização das regiões de maior variância entre amostras, através dos componentes principais. Já nos métodos supervisionados, como a análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA), são necessários conhecimentos *a priori* sobre cada amostra, e é uma técnica que possibilita obter uma visualização gráfica e entender os padrões dos dados e relações entre variáveis latentes de escores e pesos[5].

2) OBJETIVOS:

O objetivo principal deste projeto é avaliar o perfil metabólico de atletas jovens (~30 anos, ≥ 10 anos de treino) e masters (~50 anos, ≥ 20 anos de treino), comparando o perfil metabólico das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) entre esses grupos em condição basal e após uma sessão de exercício agudo. As amostras foram preparadas, extraídas e derivatizadas para metabolômica global via GC-MS. Espera-se identificar biomarcadores inflamatórios relacionados à prática de exercício físico, a fim de compreender a relação entre exercício e o sistema imunológico.

3) METODOLOGIA:

3.1 Coleta das amostras

As coletas foram realizadas em Presidente Prudente (São Paulo) em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Santos Lira e a Dra. Luciele Guerra Minuzzi, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 38701820.0.0000.5402). Os participantes foram divididos em atletas jovens e masters, todos praticantes de treinamento predominantemente aeróbico. Indivíduos com diabetes tipo 1, distúrbios endócrinos, câncer, inflamação aguda ou outras doenças graves foram excluídos do estudo.

Na primeira visita ao laboratório, após jejum de 12 horas e abstinência de cafeína, álcool e exercício vigoroso por 24 horas, foram coletados 16 mL de sangue da veia antecubital em três momentos: antes do exercício (baseline), 10 minutos após (agudo) e 1 hora após. As coletas ocorreram com, no mínimo, 72 horas de recuperação do último treino, sendo o sangue armazenado em 3 tubos com EDTA (plasma) e 1 tubo seco (soro).

As PBMCs foram isoladas do sangue total utilizando Histopaque 1077 (1:1 v/v), seguido por centrifugação em gradiente iodado. Após a centrifugação, as PBMCs foram lavadas em solução salina

tamponada com fosfato (PBS) e ressuspendidas em meio RPMI suplementado com glutamina (2 mmol/L), HEPES (20 mmol/L), 10% de soro fetal bovino e antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (0,1 mg/mL) em placas de 12 poços (Kasvi; PR, Brasil). Uma alíquota de células foi congelada a -80°C em soro fetal bovino contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) para análises por ressonância magnética nuclear (NMR), que não serão descritas neste trabalho, e subsequente análise metabolômica por GC-MS[6].

3.2 Preparo das amostras

As amostras foram descongeladas, centrifugadas e lavadas três vezes com solução PBS, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, 668 µL de metanol e 332 µL de clorofórmio foram adicionados às amostras, seguidos por agitação em vórtex e transferência para TissueLyser, onde foram homogeneizadas durante 3 ciclos de 1 min com frequência de 20 ciclos por segundo. Posteriormente, 500 µL de clorofórmio e 500 µL de água deionizada foram adicionados e, após a centrifugação, a 15.400 g por 15 minutos a 4 ºC, 1000 µL de sobrenadante foram recuperados e secos.

Para garantir o controle de qualidade, foi preparado um *pool* contendo alíquotas de todas as amostras analisadas (QC, *quality control*), sendo transferido alíquotas de 300 µL para 19 eppendorfs de 2 mL. Adicionou-se 100 µL de solução de padrão interno de ácido mirístico d27, 25 ppm em metanol em cada amostra, seguido por centrifugação, remoção de 200 µL de sobrenadante e secagem a vácuo no SpeedVac, por 1h 30 minutos. Depois de secos, deu-se início a etapa de derivatização: na metoximação, adiciou-se 10 µL de metoxiamina (MeOX) (15 mg/mL em piridina) às amostras, seguido por agitação em vórtex por 5 minutos, 3 ciclos alternados de 2 minutos entre banho de ultrassom e vortex, e incubação por 16 horas em ambiente escuro. Já no processo de sililação, foi adicionado 10 µL de N,O- Bistrifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS) à amostra, que foi deixada em estufa à 70 °C durante 1 hora. Após resfriamento, adicionou-se 100 µL de n-heptano contendo 20 ppm de padrão interno tricosano. Os vials foram então levados para análise no GC-MS, realizada no Laboratório Institucional de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, utilizando o equipamento Agilent 7595 com analisador quadrupolo e coluna HP-5MS (5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). As condições de análise foram as indicadas pela biblioteca Fiehn[7]: injeção splitless a 250 °C, purga de 60 s a 8,2 psi, fluxo de hélio de 10,5 mL/min na purga e 1 mL/min como gás de arraste. A temperatura do forno variou de 60 °C a 325 °C (10 °C/min), totalizando 37,5 min de análise, linha de transferência a 290 °C, fonte de íons a 230 °C, com ionização a 70 eV e varredura de massas de 50–600 Da a 20 Hz.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os dados obtidos foram processados no software MSDial para identificação dos metabólitos e filtrados no Excel com base em RSD > 29,99% e %QC Count < 70%. Após o pré-processamento, os dados foram analisados no MetaboAnalyst por meio das abordagens quimiométricas PCA e PLS-DA.

4.1 Normalização dos dados pelo software Lowess

Os dados foram processados no MS-DIAL com *retention index tolerance* igual a 15 e *fold change* de 3. Em seguida, foram normalizados no Lowess e analisados no Excel e MetaboAnalyst.

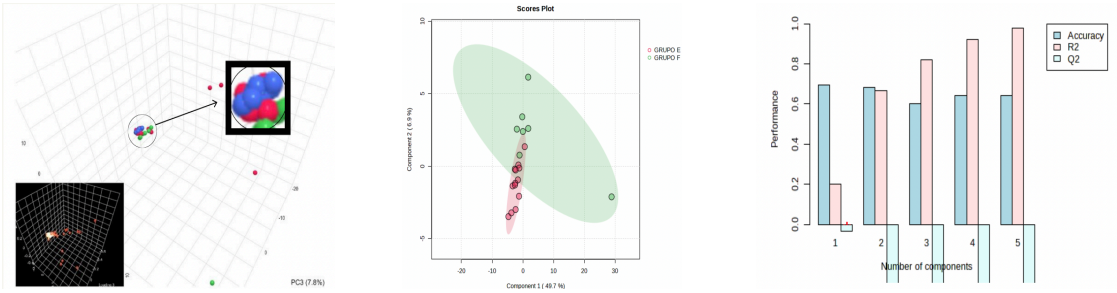

Figura 1 - a) Agrupamento dos QCs (roxo) pela análise PCA. b) PLSDA do momento post (após exercícios), grupo E (vermelho)- master e grupo F (verde)- young. c) Validação cruzada utilizando o método 5-fold CV.

A análise inicial demonstrou um adequado agrupamento dos QCs (Figura 1a), sugerindo que o preparo das amostras foi consistente e que eventuais variações observadas refletiriam diferenças biológicas, e não técnicas. No entanto, os valores obtidos para a validação cruzada do modelo PLS-DA apresentaram Q^2 negativos, indicando ausência de capacidade preditiva do modelo e sugerindo possível overfitting. Diante disso, optou-se por interromper o tratamento estatístico e reavaliar a abordagem de pré-processamento dos dados. Como alternativa, utilizou-se o software Noreva para realizar a normalização dos dados.

4.2 Normalização dos dados pelo software Noreva

Antes da submissão dos dados ao software MSDial, foi elaborado um dicionário em formato .txt correlacionando os tempos de retenção obtidos para o padrão de FAMES com os respectivos números de carbonos dos alcanos. Esse arquivo foi utilizado como referência para o cálculo dos índices de retenção durante o processamento dos dados.

Após submissão ao MSDial, os dados foram processados no NOREVA, com imputação por KNN (K-enésimos vizinhos mais próximos), correção dos QCs via LOWESS, transformação logarítmica, normalização por Auto Scaling e ajuste por EigenMS. Os dados foram por fim tratados no Excel e MetaboAnalyst (Figura 2).

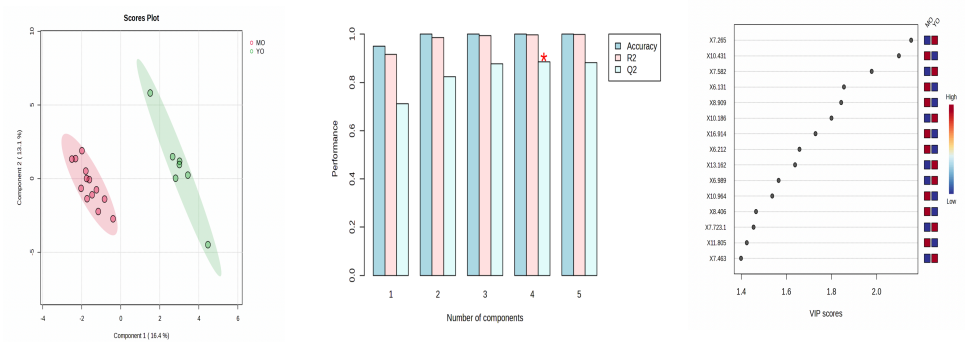

Figura 2 - a) PLSDA do momento post (após exercícios), grupo MO (vermelho)- master e grupo YO (verde)- young. b) Validação cruzada utilizando o método 5-fold CV. c) Gráfico de VIP scores.

Na Figura 2a, observa-se uma clara separação entre os dois grupos ao longo dos componentes principais 1 e 2, que explicam 29,5% da variância dos dados. Essa separação sugere que o modelo é capaz de distinguir as amostras com base no perfil metabolômico. Já na figura 2b, observa-se que o

modelo apresenta excelente ajuste (R^2 entre 0,91 e 0,99) e ótima capacidade preditiva (Q^2 entre 0,71 e 0,88), reforçando a confiabilidade dos resultados.

Observa-se na Figura 2c que alguns metabólitos específicos são determinantes para essa separação, como X7.265, X10.431, X7.582, X6.131 e X8.909, podendo representar biomarcadores diferenciais relacionados à idade. A identificação destes *molecular features* ainda está sendo realizada e, logo após, será feita a etapa de interpretação biológica.

5) CONCLUSÕES:

Este estudo utilizou a metabolômica global por GC-MS para comparar o perfil metabólico de PBMCs de atletas jovens e masters, em condição basal e após exercício agudo. A análise por PCA demonstrou o adequado agrupamento dos QCs, indicando boa reprodutibilidade analítica, enquanto que a PLS-DA demonstrou ser eficaz em discriminar os grupos etários com base no perfil metabolômico. A identificação dos metabólitos será feita no software AMDIS, já a interpretação biológica será realizada na plataforma KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), a fim de encontrar potenciais biomarcadores inflamatórios relacionados à prática regular de exercícios físicos.

BIBLIOGRAFIA

1. GLEESON, M., BISHOP, N. C., STENSEL, D. J., LINDLEY, M. R., MASTANA, S. S., NIMMO, M. A. (2011). **The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease.** Nature Reviews Immunology, 11(9), 607–615. https://doi.org/10.1038/nri3041.

2. NIEMAN, D. C., LILA, M. A., GILLITT, N. D. (2019). **Immunometabolism: A Multi-Omics Approach to Interpreting the Influence of Exercise and Diet on the Immune System**. *Annual Review of Food Science and Technology*, *10*(Volume 10, 2019), 341–363. https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121316

3. REY-STOLLE, F. *et al*. **Low and high resolution gas chromatography-mass spectrometry for untargeted metabolomics: A tutorial**. Analytica Chimica Acta, [*s. l.*], 2022.

4. MASTRANGELO, A., FERRARINI, A., REY-STOLLE, F., GARCÍA, A., BARBAS, C. (2015). **From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Analytica Chimica Acta*, *900*, 21–35.** https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.001

5. JOHN, Danielle Kochenborger. **Potencialidades da espectrometria no infravermelho e quimiometria para caracterização de perfis de medicamentos apreendidos**. 2020. Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. Dissertação (Mestrado em Química).

6. SPOLADOR, B. A. S. et al. **Mild to moderate post-COVID- 19 alters markers of lymphocyte activation, exhaustion, and immunometabolic responses that can be partially associated by physical activity level— an observational sub-analysis fit- COVID study**. Frontiers in immunology, [s. l.], 11 set. 2023.

7. FIEHN, O., **Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling**, Curr. Protoc. Mol. Biol. 2016. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114.