



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

JOÃO PEDRO DA CRUZ

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO LIPIDOMA DE JOGADORES DE FUTEBOL SUB-22
INSERIDOS EM DIFERENTES NÍVEIS COMPETITIVOS E COM DISTINTAS
CAPACIDADES AERÓBIAS**

LIMEIRA

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas

JOÃO PEDRO DA CRUZ

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO LIPIDOMA DE JOGADORES DE FUTEBOL SUB-22
INSERIDOS EM DIFERENTES NÍVEIS COMPETITIVOS E COM DISTINTAS
CAPACIDADES AERÓBIAS**

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Aplicadas da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Doutor em
Ciências da Nutrição e do Esporte e
Metabolismo na área de Ciências do Esporte.*

Orientador: Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO JOÃO PEDRO DA CRUZ, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO

LIMEIRA

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

C889a Cruz, João Pedro da, 1997-
Análise exploratória do lipidoma de jogadores de futebol sub-22 inseridos em diferentes níveis competitivos e com distintas capacidades aeróbias / João Pedro da Cruz. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Claudio Alexandre Gobatto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Lipidômica. 2. Metabolismo. 3. Antropometria. 4. Glicerofosfolídeos. 5. Futebol. I. Gobatto, Claudio Alexandre, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Exploratory analysis of the lipidome of U-22 soccer players at different competitive levels and with distinct aerobic capacities

Palavras-chave em inglês:

Lipidomics

Metabolism

Anthropometry

Glycerophospholipids

Soccer

Área de concentração: Ciências do Esporte

Titulação: Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Claudio Alexandre Gobatto [Orientador]

Cláudia Regina Cavaglieri

Sergio Augusto Cunha

Luiz Fernando Martins Kruehl

Gustavo Gomes de Araújo

Data de defesa: 16-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5320-1066>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7397561632388451>

Folha de Aprovação

Autor: João Pedro da Cruz

Título: ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO LIPIDOMA DE JOGADORES DE FUTEBOL SUB-22 INSERIDOS EM DIFERENTES NÍVEIS COMPETITIVOS E COM DISTINTAS CAPACIDADES AERÓBIAS

Natureza: Tese

Área de Concentração: Ciências do Esporte

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 16 de DEZEMBRO de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto – Presidente da Comissão Examinadora
(Faculdade de Ciências Aplicadas – Universidade Estadual de Campinas)

Profa. Dra. Claudia Regina Cavaglieri
(Faculdade de Educação Física – Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr. Sergio Augusto Cunha
(Faculdade de Educação Física – Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo
(Instituto de Educação Física e Esporte – Universidade Federal de Alagoas)

Prof. Dr. Luiz Fernando Martins Kruehl
(Escola de Educação Física, Fisioterapia e Dança - Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, familiares, professores e todos meus amigos que me auxiliaram nessa conquista com grande êxito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Jesus, Nossa Senhora Aparecida e todos que nos acompanham e permitem nossos avanços durante a vida. Alcançar essa etapa não teria sido possível sem a colaboração, auxílio, carinho e dedicação por parte de várias pessoas ao longo de todo o percurso da minha formação. Por essa mesma razão, não quero deixar passar essa oportunidade para agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu sucesso e a minha chegada até aqui.

Ao meu pai Jeronimo e minha mãe Nadia que sempre me motivaram a fazer aquilo que eu mais gostava e acreditava, independente do resultado. Admiro tantos pontos em vocês que nem consigo citar aqui. Obrigado por me ensinarem tantas coisas. Só posso agradecer, nunca vou conseguir agradecer o suficiente. Mas, MUITO OBRIGADO! Amo vocês!

Gostaria de agradecer meus avós. Muitas vezes paro no tempo e me pego a recordar dos bons tempos com eles, ouvir as histórias de como tudo começou e de como pouco a pouco, tudo se ajeitou. Devo tudo e muito respeito a todos (Creuza, Pedro, Aparecida). Só tenho que agradecer por todo amor e carinho, em especial aqueles que foram morar com Deus (Luzia e Brito) durante meu processo de Doutorado.

À Estela, minha namorada, minha parceira, minha dupla. Você tornou todo o processo muito mais leve. Deixa a vida mais leve. Obrigado por me ajudar a aprender mais e querer mais. Te amo muito!

A toda minha família que sempre me apoiou em todos os momentos, aos meus amigos, a quem tenho muito a agradecer pela infinita disponibilidade auxiliando e ensinando em todos os momentos, o carinho e paciência que sempre tiveram comigo. O tempo que passamos juntos foi de grande alegria e aprendizagem, agradeço a todos pelos belos momentos vividos. A todos os professores que tanto me ensinaram ao decorrer da minha vida, desde ensino fundamental até a minha pós-graduação. Aos professores, Dr. Felipe Marroni Rasteiro, Dra. Anita Brum Marostegan e Dr. Joao Raul Belinato de Souza pela amizade e grande ajuda durante esses anos. Em especial, Dr. Fábio Neves dos Santos, Dr. Pedro Paulo Menezes Scariot e Dr. Leonardo Henrique Dalcheco Messias.

Gostaria de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante meu processo de

doutorado direto (Número do Processo = 2019/02286-5). Além disso, gostaria de agradecer os coordenadores Prof. Dr. Sergio Augusto Cunha, Prof. Dr. Ricardo da Silva Torres e Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto responsáveis pelo projeto temático da FAPESP denominado “O segredo de jogar futebol: Brasil versus Holanda” (Número do Processo = 16/50250-1) pela oportunidade e confiança dentro de todo o processo. Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – 001) que, por meio do Programa de Pós Graduação (Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo), apoiou a execução desse trabalho. Adicionalmente, agradeço o Serviço de Apoio ao Estudante – SAE UNICAMP pelo apoio financeiro durante o começo da minha pós-graduação, sem o auxílio seria impossível me sustentar em Limeira.

Agradeço os professores Profa. Dra. Claudia Regina Cavaglieri, Prof. Dr. Sergio Augusto Cunha, Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo e Prof. Dr. Luiz Fernando Martins Krueel por fazerem parte da banca examinadora, o incentivo e exemplo inspirador de excelentes professores e pesquisadores. Além disso, gostaria de agradecer os professores Prof. Dr. Homero Gustavo Ferrari, Profa. Dra. Carolina Cirino e Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck por fazerem parte da banca como suplentes, os exemplos de excelentes professores e pesquisadores. Por fim, guardo um agradecimento especial aos meus orientadores, Professor Dr. Claudio Alexandre Gobatto e Professora Dra. Fúlvia de Barros Machado-Gobatto. Pelos ensinamentos, orientações, conselhos e oportunidades que me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente. No ano de 2016 comecei a estudar e trabalhar no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte – LAFAE durante a minha graduação em ciências do esporte sob orientação da Professora Dra. Fúlvia de Barros Machado-Gobatto durante os processos de iniciação científica. No início de 2019 entrei na pós-graduação e fui orientado pelo Professor Dr. Claudio Alexandre Gobatto. Desde lá, pude perceber ao longo do tempo, o que também foi falado em outra Tese: você não orienta seus alunos apenas academicamente. E o fato de se importarem também com o lado pessoal os fazem orientadores muito especiais. Desde sempre, com o professor Claudio e a professora Fúlvia pude aprender e evoluir muito, tanto academicamente quanto como pessoa. Integridade, honestidade e ética profissional e pessoal são alguns dos milhares de adjetivos que podem caracterizar ambos. MEU SINCERO MUITO OBRIGADO!!! Serei eternamente grato pela dedicação de

ambos e ainda mais por apostarem e acreditarem no meu potencial.

“Um vencedor caminha sem pisar em ninguém.” (Eduardo Menga)

RESUMO

O objetivo da presente Tese de Doutorado foi investigar diferenças fisiológicas em relação aos níveis de capacidade física bem como o nível competitivo dos jogadores de futebol masculinos sub-22. Para isso, a Tese foi dividida em dois estudos, o primeiro teve como objetivo usar lipidômica para investigar diferenças metabólicas entre jogadores de futebol masculinos sub-22 com maior e menor capacidade aeróbia. Além de buscar identificar associações entre o perfil metabólico sérico em jejum com a velocidade crítica (VCrit). O segundo utilizou avaliações físicas tradicionais, juntamente com uma abordagem lipidômica para comparar o perfil antropométrico, o nível de aptidão física e o perfil metabólico sérico de jejum entre os jogadores de futebol de sub-22 inseridos em diferentes níveis de competição. No delineamento experimental, foram avaliados 36 jogadores de futebol Sub-22. Estudo 1: Grupo de baixa aptidão aeróbia com 21 atletas (idade= 19 ± 1 anos) e grupo de alta aptidão aeróbia com 15 atletas (idade= 19 ± 2 anos). Estudo 2: Equipe não-elite com 20 atletas (idade = 20 ± 2 anos) e elite com 16 atletas (idade = 18 ± 1 ano). Para ambos os estudos, amostras de sangue do lóbulo da orelha foram coletadas e os metabólitos foram extraídos após jejum noturno (12h). Lipidômica por meio da cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC-MS) e avaliação antropométrica foram realizadas. A VCrit foi aplicada para determinar a capacidade aeróbia (VCrit) e anaeróbia (CCA). No estudo 1, os jogadores de futebol com diferentes capacidades aeróbias apresentaram perfis metabólicos séricos distintos em jejum. Os metabólitos PC(32:3), PE(18:1(9z)/16:1(9z)), 1-(2-metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoserina, PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)), PS(48:0) e PG(38:7) foram relacionados ao metabolismo de glicerofosfolipídeos (glicerofosfoserinas, glicerofosfoetanolaminas, glicerofosfocolinas e glicerofosfogliceróis) podendo cautelosamente ser considerados como marcadores de capacidade aeróbia em jogadores de futebol. No estudo 2, altura ($t=-0,95$; $p=0,348$), índice de massa corporal ($t=0,16$; $p=0,870$), massa corporal ($t=-0,45$; $p=0,654$), massa corporal magra ($t=-0,74$; $p=0,462$), gordura corporal ($t=0,53$; $p=0,597$), percentual de gordura corporal ($t=1,28$; $p=0,207$), hematócrito ($t=-0,58$; $p=0,563$), VCrit ($t=1,98$; $p=0,06$), e CCA ($t=-1,63$; $p=0,110$) não apresentaram diferenças significativas entre os times de elite e não elite. O modelo multivariado de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) mostrou uma clara separação entre as equipes de elite e não elite para os dados lipidômicos. Ou seja, as avaliações físicas clássicas não foram capazes de diferenciar as equipes inseridas em diferentes níveis competitivos. No entanto, a abordagem lipidômica mostrou-se capaz de diferenciar o perfil metabólico em jejum entre equipes de elite e não elite. Adicionalmente, os metabólitos com alta abundância relativa na equipe de elite foram relacionados com melhor nível de potência aeróbia, maior eficiência no processo de recuperação e melhora do humor, imunidade, tomada de decisão e precisão, além de atuar na preservação mitocondrial e manutenção da cadeia de transporte.

Palavras-chave: lipidômica, perfil metabólico, antropométrico, glicerofosfolipídios, velocidade crítica, biomarcadores, futebol.

ABSTRACT

The aim of this Doctoral Thesis was to investigate physiological differences in relation to levels of physical capacity as well as the competitive level of male U22 soccer players. For this, the thesis was divided into two studies, the first aimed to use untargeted lipidomics to investigate metabolic differences between U22 male soccer players with higher and lower aerobic capacity. In addition, we seek to identify associations between the fasting serum metabolic profile with critical velocity (VCrit). The second study used classical physical assessments and a lipidomics approach to compare the anthropometric, physical fitness level, and serum fasting metabolic profile among U22 soccer players from different competitive levels. In the experimental design, 36 soccer players U22 were evaluated. Study 1: Low aerobic fitness group with 21 athletes (age= 19 ± 1 years) and high aerobic fitness group with 15 athletes (age= 19 ± 2 years). Study 2: Non-elite team with 20 athletes (age = 20 ± 2 years) and elite team with 16 athletes (age = 18 ± 1 year). For both studies, earlobe blood samples were collected and the metabolites were extracted after overnight fasting (12h). Untargeted lipidomics through LC-MS analysis and anthropometric evaluation was performed. Critical velocity was applied to determine aerobic (VCrit) and anaerobic (ARC) capacity. In study 1, the low and high aerobic fitness groups presented different metabolic profiles based on heatmap and volcano plot analysis. The metabolites PC(32:3), PE(18:1(9Z)/16:1(9Z)), 1-(2-methoxy-19Z-hexacosenyl) sn-glycero-3-phosphoserine, PE(22: 2(13Z,16Z)/18:2(9Z,12Z)), and PS(48:0) were related to the metabolism of glycerophospholipids (glycerophosphoserines, glycerophosphoethanolamines, glycerophosphocholines, and glycerophosphoglycerols) and can cautiously be considered as aerobic capacity markers in soccer players. In study 2, Height ($t=-0.95$; $p=0.348$), body mass index ($t=0.16$; $p=0.870$), body mass ($t=-0.45$; $p=0.654$), lean body mass ($t=-0.74$; $p=0.462$), body fat ($t=0.53$; $p=0.597$), body fat percentage ($t=1.28$; $p=0.207$), hematocrit ($t=-0.58$; $p=0.563$), VCrit ($t=1.98$; $p=0.06$), and ARC ($t=-1.63$; $p=0.110$) showed no significant differences between the elite and non-elite teams. The multivariate PLS-DA model showed a separation between the elite and non-elite teams. That is, the classic physical assessments were not able to differentiate the teams inserted in different competitive levels. However, the lipidomics approach was able to differentiate the fasting metabolic profile between elite and non-elite teams. Additionally, metabolites with a high relative abundance in the elite group were related with a better level of aerobic power, greater efficiency in the recovery process, and improvement of mood, immunity, decision making, and accuracy, in addition to acting in mitochondrial preservation, and electron transport chain maintenance.

Keywords: lipidomics, metabolic profile, anthropometric, glycerophospholipids, critical velocity, biomarkers, soccer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos teóricos clássicos utilizados para representar os domínios de intensidade de exercício e o conceito da Potência Crítica. **PCrit** – Potência Crítica; **VCrit** – Velocidade Crítica; **CTA** – Capacidade de Trabalho Anaeróbio; **CCA** – Capacidade de Corrida Anaeróbia.....42

Figura 2. Modelos matemáticos usualmente utilizados para a determinação da Potência Crítica (PCrit) e Capacidade de Trabalho Anaeróbio (CTA). **a)** Modelo não linear de Potência-tlim (hiperbólico). **b)** Modelo linear Trabalho-tempo. **c)** Modelo linear Potência-1/tempo.....43

Figura 3. Tecnologias ômicas, moléculas alvo de estudo e exercício físico considerado como fenótipo ambiental.....50

Figura 4. Fluxograma de trabalho resumido envolvendo a análise metabolômica após definição do problema biológico (CANUTO et al., 2018).....59

Figura 5. *Layout* resumido do acoplamento da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) com o Espetrômetro de Massa (MS).....61

Figura 6. Desenho experimental conduzido no presente estudo. Inicialmente a triagem foi realizada seguindo os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. Na primeira visita, os avaliados receberam todas as informações sobre o projeto e assinaram TCLE. Também responderam os questionários (PAR-Q e IPAQ). Na segunda sessão, amostras de sangue do lóbulo da orelha foram extraídas para análise lipídômica sendo também utilizadas para a determinação do hematócrito. Adicionalmente, os participantes foram submetidos a avaliação antropométrica. Nas visitas subsequentes, os participantes foram submetidos a cargas preditivas randomizadas referentes ao protocolo de velocidade crítica.....77

Figura 7. Coleta e processamento das amostras de sangue realizadas no presente estudo. As amostras foram coletadas em repouso respeitando o jejum noturno de 12 horas. **1)** Coleta de sangue do lóbulo da orelha do avaliado utilizando capilar de vidro. **2)** Vedação do capilar cheio de sangue com massa de oclusão específica. **3)** Centrifugação dos capilares coletados. **4)** Corte entre a faixa do soro e dos eritrócitos utilizando um cortador de capilar (*Capillary Tube Cutter, Master Tool*) para obtenção do soro. **5)** Soro depositado no tubo criogênico.....79

Figura 8. Coleta e processamento das amostras de sangue realizadas para análise do hematócrito. **1)** Coleta de sangue do lóbulo da orelha do avaliado utilizando capilar de vidro. **2)** Vedação do capilar cheio de sangue com massa de oclusão específica. **3)** Centrifugação dos capilares coletados. **4)** Capilar de vidro após a centrifugação. **5)** Ilustração da determinação da porcentagem do hematócrito por régua graduada.....80

Figura 9. Aplicação do protocolo de velocidade crítica no campo de futebol. O atleta percorreu correndo em máxima intensidade em dias diferentes e de maneira randomizada as distâncias de **a)** 800m, **b)** 1200m, **c)** 1600m e **d)** 2000m e o tempo total foi registrado.....81

Figura 10. Exemplo do ajuste matemático utilizado para a determinação dos parâmetros referentes ao modelo de velocidade crítica para um dos atletas componentes da amostra. **VCrit** – Velocidade Crítica; **CCA** – Capacidade de Corrida Anaeróbia.....82

Figura 11. Fluxo de trabalho metabólico. Etapas, materiais e procedimentos que foram necessários para a realização da análise lipidômica do soro dos jogadores avaliados.....83

Figura 12. Preparação das amostras para análise por LC-MS/MS. **a)** Representação real da formação bifásica após centrifugação refrigerada. **b)** Extração da fase inferior e superior em microtubos individualizados. **1.)** Fase superior orgânica apolar rica em lipídeos. **2.)** Fase inferior aquosa polar.....84

Figura 13. Sistema de secagem manual desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (LAFAE). **1.)** Cilindro de Nitrogênio gasoso grau 6.0, pureza mínima 99,9999% (N60 AIR LIQUID) acoplado com regulador de pressão para cilindros de nitrogênio (FAMABRAS). **2.)** Registro abre e fecha para liberação do gás para secagem. **3.)** Suporte com cinco saídas de gás nitrogênio utilizado para concentração das amostras.....85

Figura 14. Antes e depois de uma amostra submetida ao sistema de secagem manual.....85

Figura 15. Volume de 100 µL do extrato ressuspenso foi adicionado no insert com mola presente dentro do vial e encaminhado para análise LC-MS/MS. **1.)** Vial. **2.)** Insert com mola. **3.)** Exemplo de amostra ressuspensa pronta para análise LC-MS/MS.....86

Figura 16. Foto do sistema HPLC *UltiMate™ 3000 Standard Binary System* (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) acoplado com um espectrômetro de massas Orbitrap Q Exactive™ Focus (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) equipado com uma fonte *eletrospray* (ESI) utilizado na presente tese de doutorado.....88

Figura 17. Cromatograma (A) e espectro de massas (B) brutos de íons extraídos de uma amostra de soro pela técnica de LC-MS/MS no modo ESI (+).....89

Figura 18. Cromatograma (A) e espectro de massas (B) brutos de íons extraídos de uma amostra de soro pela técnica de LC-MS/MS no modo ESI (-).....90

Figura 19. Gráfico do desvio de tempo de retenção em função dos tempos de retenção em minutos obtidos depois de um alinhamento dos dados no XCMS. **a)** Para o modo de ionização positivo ESI(+). **b)** Para o modo de ionização negativo ESI(-).....91

Figura 20. Sobreposição dos cromatogramas LC-MS/MS das amostras de controle de qualidade e do soro dos jogadores de futebol de ambas as equipes. **a)** Sobreposição dos cromatogramas sem correção do tempo de retenção para ESI(+). **b)** Sobreposição dos cromatogramas após correção do tempo de retenção para ESI(+). **c)** Sobreposição dos cromatogramas sem correção do tempo de retenção para ESI(-). **d)** Sobreposição dos cromatogramas após correção do tempo de retenção para ESI(-). **TIC** - Cromatogramas de íons totais.....92

Figura 21. Comportamento e boxplot dos dados após o processo de normalização. **a)** Normalização para o modo ESI(+). **b)** Normalização para o modo ESI(-).....93

Figura 22. Distribuição final dos controles de qualidade (QC) após normalização. **a)** Para o modo ESI(+). **b)** Para o modo ESI(-).....94

ESTUDO 1: METABÓLITOS DO SORO EM JEJUM ASSOCIADOS À CAPACIDADE AERÓBIA DE JOGADORES SUB-22 DE FUTEBOL: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA

Figura 1. Os resultados de LC-MS derivados do soro coletado após jejum noturno de 12 horas são mostrados como mapas de calor para o modo ESI (+) (Painel A) e ESI (-) (Painel B). As caixas coloridas indicam a abundância relativa dos *features* correspondentes. A cor vermelha indica alta abundância relativa e a cor azul indica baixa abundância relativa.....101

Figura 2. *Features* importantes selecionadas pelo *volcano plot* para o modo ESI (+) (Painel A) e ESI (-) (Painel B). Os *features* diferentes (vermelho e azul) e os *features* não diferentes (cinza) foram determinados sob as condições de *fold change* ≥ 2 e P valor $\leq 0,01$ do teste t. Os valores de P são transformados por $-\log_{10}$ para que os *features* mais significativamente diferentes (com valores de P menores) sejam maiores no eixo y. O *fold change* é transformado em log, de modo que valores negativos representam uma diminuição nos níveis dos *features* e valores positivos representam um aumento nos níveis dos *features*. Quanto mais distante de (0,0) estiver sua posição, mais significativo será o *feature*. Para cima (vermelho) e para baixo (azul) indicam *features* significantes para grupos de alta e baixa aptidão aeróbia.....102

Figura 3. Visão geral gráfica e tabela da análise *enrichment over representation* (ORA). Gráfico de barras da ORA para os metabólitos séricos suportados pelo 1º e 2º nível de evidência contra a biblioteca de lipídios da classe super química no soro. ^a – Metabólitos classificados por conjuntos lipídicos de classe superquímica ou conjuntos lipídicos; ^b – Número total de metabólitos no conjunto de metabólitos; ^c – Número de acertos de metabólitos suportados pelo 1º e 2º nível de evidência envolvidos no conjunto de metabólitos; ^d – P Valor original calculado a partir da ORA; ^e – Holm p, P Valor original ajustado pelo método de Holm-Bonferroni; ^f – FDR, taxa de falsa descoberta (*false discovery rate*). Os limites de $p < 0,05$ e $FDR < 0,1$ foram usados para considerar se os conjuntos de lipídios da classe superquímica foram impactantes. Valores em negrito representam lipídios impactantes.....105

ESTUDO 2: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA E AVALIAÇÕES FÍSICAS TRADICIONAIS PARA COMPARAR JOGADORES DE FUTEBOL SUB-22 DE ACORDO COM SEU NÍVEL COMPETITIVO

Figura 1. Comparação dos perfis fisiológicos dos jogadores de futebol das equipes elite e não-elite para os modos ESI (+) (A) e ESI (-) (B) por análise com limiar 2. Os círculos rosas representam *features* diferentes entre as equipes. Os círculos rosas superiores representam *features* acima do limiar da *fold change* mostrando maior abundância relativa para a equipe não-elite, enquanto os círculos rosas inferiores representam *features* acima do limiar da *fold change* mostrando maior abundância relativa para a equipe elite.....116

Figura 2. Gráficos de pontuação PCA de todas as amostras de soro de ambos os times de futebol para os modos ESI (+) (A) e ESI (-) (B). As cores representam diferentes times de futebol (vermelho: atletas não-elite; verde: atletas de elite).....119

Figura 3. (A,C): Gráficos de pontuação 2D da Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) comparando os dois grupos nos modos ESI (+) e ESI (-), respectivamente. **(B,D):** Gráficos de pontuação PLS-DA mostrando os principais *features* que discriminaram os grupos amostrais de acordo com a pontuação VIP para os modos ESI (+) e ESI (-), respectivamente. As cores representam diferentes times de futebol (vermelho: atletas não-elite; verde: atletas de elite). As caixas de espectro de cores azul e vermelho à direita indicam os valores da abundância relativa dos metabólitos correspondentes em cada equipe. Os recursos M404T1_3, M286T3, M209T2_2, M417T2_1 no modo ESI (+) e M338T1_4, M449T0, M369T1_4, M961T23, M993T9, M495T1, M949T7_1 no modo ESI (-) não foram identificados.....120

Figura 4. Abundâncias relativas em média e desvio padrão dos metabólitos putativos correspondentes em cada equipe para o modo ESI (+). Todos os metabólitos são estatisticamente diferentes pela análise *fold change* com limite de 2.....123

Figura 5. Abundâncias relativas em média e desvio padrão dos metabólitos putativos correspondentes em cada equipe para o modo ESI (-). Todos os metabólitos são estatisticamente diferentes pela análise *fold change* com limite de 2.....124

LISTA DE TABELAS

ESTUDO 1: METABÓLITOS DO SORO EM JEJUM ASSOCIADOS À CAPACIDADE AERÓBIA DE JOGADORES SUB-22 DE FUTEBOL: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA

Tabela 1. Características antropométricas e capacidade aeróbia dos jogadores de futebol..... 100

Tabela 2. *Features* importantes identificados pelo *volcano plot* para o modo ESI (+) e ESI (-)..... 103

Tabela 3. Coeficientes de correlação parcial de Pearson (r) acima de |0,2| e valores de P para a associação entre velocidade crítica e abundância relativa dos *features* séricos em jejum..... 104

Tabela 4. Informações sobre os glicerofosfolipídios suportados pelos três níveis de evidência estatística..... 106

ESTUDO 2: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA E AVALIAÇÕES FÍSICAS TRADICIONAIS PARA COMPARAR JOGADORES DE FUTEBOL SUB-22 DE ACORDO COM SEU NÍVEL COMPETITIVO

Tabela 1. Caracterização de ambas as equipes considerando variáveis antropométricas e composição corporal.....114

Tabela 2. Cargas preditivas, capacidade aeróbia e anaeróbia de ambas as equipes a partir da aplicação do protocolo de velocidade crítica.....115

Tabela 3. *Features* diferenciados dos perfis fisiológicos de jogadores de futebol de times de elite e não elite para o modo ESI (+) por análise fold-change com limiar 2.....117

Tabela 4. *Features* diferenciados dos perfis fisiológicos de jogadores de futebol de times de elite e não elite para o modo ESI (-) por análise fold-change com limiar 2.....118

Tabela 5. *Features* anotados e selecionados pela análise de pontuação VIP como os mais capazes de diferenciar as duas equipes.....122

LISTA DE ABREVIATURAS

VCrit – Velocidade Crítica
CCA – Capacidade de Corrida Anaeróbia
CK – Creatina Quinase
HIIT – *High Intensity Interval Training*
VO₂max – Consumo Máximo de Oxigênio
ATP – Adenosina Trifosfato
ATP-CP – ATP-Fosfocreatina
ADP – Adenosina Difosfato
NAD – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
FAD – Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
DTP – Distância Total Percorrida
GPS – Sistema de Posicionamento Global
TLM – Teste de Lactato Mínimo
LAn – Limiar Anaeróbio
RAST – *running anaerobic sprint test*
MFEL – Máxima Fase Estável de Lactato
MAOD – Máximo Déficit Acumulado de Oxigênio
PCrit – Potência Crítica
CTA – Capacidade de Trabalho Anaeróbio
tlim – Tempo Limite
RNA – Ácidos Ribonucleicos
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
HMDB – *Human Metabolome Database*
MTBE – Éter Metil Terc-Butílico
QC – Controle de Qualidade
LC-MS – *Chromatograph Mass Spectrometer*
NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*
GC-MS – *Gas Chromatography Mass Spectroscopy*
CE-MS – *Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry*
MS – Espectrometria de Massas
m/z – Massa/Carga
HPLC – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
MS/MS – Espectrometria de Massa em Tandem

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada com a Espectrometria de Massa

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada com a Espectrometria de Massa Tandem

PCA – *Principal Component Analysis*

PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*

OPLS-DA – *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*

PC – Componentes Principais

FC – Fold Change

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PAR-Q – Questionário Internacional de Atividade Física

IPAQ – *International Physical Activity Questionnaire*

ESI – Fonte *Eletrospray*

ESI (+) – Modo Positivo da Fonte de Ionização

ESI (-) – Modo negativo da fonte de ionização

DP – Desvio Padrão

ES – Effect Size

ORA – *Over Representation Analysis*

FDR – *False Discovery Rate*

VIP – *Variable Importance for Projection*

PS – Fosfatidilserina

PC – Fosfatidilcolina

PE – Fosfatidiletanolamina

CL – Cardiolipina

PG – Fosfatidilglicerol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
2.3 Resultados esperados e hipóteses do projeto.....	28
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	30
3.1 Características do futebol.....	30
3.1.1 Características bioquímicas do futebol.....	30
3.1.2 Demandas físicas e fisiológicas do futebol.....	32
3.1.3 Diferenças físicas e fisiológicas entre jogadores de futebol inseridos em distintos níveis competitivos.....	38
3.1.4 Conceito de potência crítica e velocidade crítica para determinação da capacidade aeróbia e anaeróbia em diversos esportes e no futebol.....	41
3.2 Alterações metabólicas no Futebol.....	47
3.2.1 Avaliações de biomarcadores no futebol: Bioquímica tradicional.....	48
3.3 Ciências ômicas.....	49
3.3.1 Ciências ômicas: Genômica.....	51
3.3.2 Ciências ômicas: Transcriptômica.....	53
3.3.3 Ciências ômicas: proteômica.....	55
3.4 Ciências ômicas: metabolômica e lipidômica.....	57
3.4.1 Fundamentos da análise metabolômica e lipidômica.....	59
3.4.2 Aplicações da análise metabolômica e lipidômica.....	63
3.4.3 Aplicações da metabolômica no futebol.....	68
4. METODOLOGIA GERAL.....	75
4.1 Fase pré-analítica.....	75
4.1.1 Participantes.....	75
4.1.2 Desenho experimental.....	76
4.1.3 Detalhamentos das avaliações antropométricas realizadas.....	78
4.1.4 Coleta e processamento das amostras.....	78
4.1.5 Análise do hematócrito.....	79
4.1.6 Aplicação do protocolo de velocidade crítica à atletas de futebol.....	80
4.2 Fase de preparação das amostras.....	82
4.2.1 Extração de metabólitos para análise por LC-MS/MS.....	83
4.2.2 Ressuspensão das amostras para análise LC-MS/MS.....	86

4.3 Fase analítica.....	86
4.3.1 Análise lipidômica por LC-MS/MS.....	86
4.3.2 Pré-processamento no software XCMS versão online.....	91
4.3.3 Normalização dos dados.....	92
4.3.4 Identificação dos metabólitos.....	94
5. ESTUDO 1: METABÓLITOS DO SORO EM JEJUM ASSOCIADOS À CAPACIDADE AERÓBIA DE JOGADORES SUB-22 DE FUTEBOL: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA.....	96
5.1 Introdução.....	96
5.2 Metodologia específica.....	98
5.2.1 Grupos experimentais.....	98
5.2.2 Análise estatística.....	98
5.3 Resultados.....	99
5.3.1 Características dos atletas de futebol.....	99
5.3.2 Análise de LC-MS e perfil de metabólitos séricos em jejum.....	100
5.3.3 Diferenças entre jogadores de futebol com baixa e alta capacidade aeróbi.....	101
5.3.4 Associação entre capacidade aeróbia e <i>features</i> suportadas pelo 1º nível de evidência.....	103
5.3.5 Enriquecimento ORA de metabólitos retidos pelo 1º e 2º nível de evidência.....	104
5.4 Discussão.....	106
5.5 Conclusão.....	109
6. ESTUDO 2: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA E AVALIAÇÕES FÍSICAS TRADICIONAIS PARA COMPARAR JOGADORES DE FUTEBOL SUB-22 DE ACORDO COM SEU NÍVEL COMPETITIVO.....	110
6.1 Introdução.....	110
6.2 Metodologia específica.....	111
6.2.1 Participantes.....	111
6.2.2 Análise estatística.....	112
6.3 Resultados.....	113
6.3.1 Características antropométricas, composição corporal, aeróbia e anaeróbia.....	113
6.3.2 Metabólitos com diferenças entre os times de futebol.....	116
6.3.3 Anotação dos Metabólitos.....	121
6.4Discussão.....	125

6.5 Conclusão.....	128
7. PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES.....	130
8. CONCLUSÃO GERAL.....	131
9. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....	132
ANEXOS.....	158

1. INTRODUÇÃO

O futebol é caracterizado por atividades intermitentes e imprevisíveis. Os indivíduos praticantes da modalidade executam inúmeros esforços (acíclicos ou cíclicos) repetidos com alta intensidade (mudança brusca de direção, dribles, chutes, *sprints*), intercalados por períodos de recuperação ativa ou passiva (repouso, andar e trotar). Essas características complexas tornam o futebol uma modalidade esportiva extremamente desafiadora do ponto de vista científico (O'REILLY e WONG, 2012; DATSON et al., 2014; NÉDÉLEC et al., 2015).

Considerando as particularidades da modalidade (DI SALVO et al., 2007; BLOOMFIELD et al., 2007; ZHOU et al., 2020), a via anaeróbia desempenha papel indispensável na produção energética para a realização de ações técnicas e táticas específicas de alta intensidade (BANGSBO et al., 2007). Já a via aeróbia auxilia predominantemente na produção energética de adenosina trifosfato (ATP) (STØLEN et al., 2005; BANGSBO et al., 2007) e durante os instantes de recuperação entre esforços, apresenta função imprescindível no reequilíbrio ácido-básico celular a nível tecidual e sistêmico (TOMLIN e WENGER, 2001).

Protocolos avaliativos como Lactato Mínimo (SILVA et al., 2007), circuito de Hoff para determinação específica da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) (LOURES et al., 2015), Máximo Déficit Acumulado de Oxigênio (MAOD) (ANDRADE et al., 2015) e velocidade crítica (VCrit) (KARSTEN et al., 2016) vêm sendo estudados e utilizados para quantificar ambos metabolismos. A VCrit (WAKAYOSHI et al., 1992) trata-se de uma avaliação inspirada no conceito intensidade por tempo de exaustão, inicialmente aplicado no modelo de potência crítica (PCrit) (MONOD e SCHERRER, 1965) onde a VCrit é alusiva à estimativa de capacidade aeróbia, sendo relacionada com a taxa máxima de trabalho realizado por longo período sem fadiga e a Capacidade de Corrida Anaeróbia (CCA), corresponde a quantidade finita de trabalho que pode ser utilizado em intensidade superiores à VCrit (JONES et al., 2010). Ambos os parâmetros podem ser determinados por meio da aplicação de esforços preditivos com diferentes intensidades, executados aleatoriamente em dias alternados, em ambientes específicos da modalidade, a partir do uso de ferramentas simples, como um cronômetro e um ergômetro.

de estudos envolvendo protocolos com avaliação física, outros

aspectos também foram considerados. Visando o entendimento das respostas metabólicas dos praticantes e jogadores de futebol, estudos utilizaram a bioquímica tradicional para determinar marcadores biológicos específicos (DJAOUI et al., 2017). Embora a bioquímica tradicional tenha possibilitado o avanço no conhecimento dos biomarcadores sobre os processos fisiológicos no futebol, essas abordagens tradicionais são reducionistas quando o objetivo é buscar uma resposta global e integrada das perturbações metabólicas. Sabendo da complexidade do futebol, a biologia de sistemas se torna uma estratégia interessante para investigar a fisiologia dos atletas. Essa estratégia objetiva fornecer uma perspectiva ampla e integrada das vias metabólicas de um organismo (NIELSEN e LEE, 2012).

As ciências ômicas incluídas dentro da biologia de sistemas objetivam descobrir novas associações integradas entre as vias biológicas, tentando também identificar biomarcadores relevantes para o melhor entendimento da fisiologia humana em diversas situações (YAN et al., 2015; HOFFMAN, 2017; RAI et al., 2018). As ômicas são divididas em estudos do ácido desoxirribonucleico (DNA) (genômica), RNA (transcriptômica), proteínas (proteômica), metabólitos (metabolômica) e lipídeos (lipidômica) (HOFFMAN, 2017). Atualmente, os autores têm considerado que tais ferramentas são as melhores e mais elaboradas para o entendimento do funcionamento celular, do organismo e suas modificações biológicas.

Dentre as ciências ômicas, a metabolômica e a lipidômica tem como principal objetivo responder perguntas voltadas aos processos químicos que envolvem os metabólitos (GORROCHATEGUI et al., 2016; KLASSEN et al., 2017). Mais especificamente, essa área estuda alterações no perfil do metaboloma em situações comparativas de grupos em terapias e doenças, confrontando níveis de estresse, modulação alimentar e exercício físico (AL-KHELIFI et al., 2018; HOANG et al., 2019). Existem duas maneiras de desenvolver estudos em metabolômica e lipidômica, sem alvo (*untargeted metabolomic*) e com alvo (*targeted metabolomic*). A lipidômica sem alvo objetiva a identificação e/ou quantificação total do lipidoma, enquanto a lipidômica com alvo atua na mensuração de grupos definidos de metabólitos lipídicos quimicamente caracterizados e bioquimicamente conhecidos. Para os estágios iniciais de uma pesquisa com o intuito de descobrir novos biomarcadores, o uso da abordagem sem alvo é mais aconselhado, ao passo que o uso da abordagem com alvo é recomendado para a validação e

implementação dos biomarcadores (PATTI et al., 2012).

Diversos pesquisadores usaram a metabolômica e a lipidômica para elucidar questionamentos envolvendo a fisiologia do futebol. Devido a importância da nutrição e suplementação no esporte, AL-KHELAIFI et al. (2018) estudaram o perfil dos metabólitos presentes no soro de atletas de elite de diversos esportes, inclusive no futebol. Com o olhar voltado para as mudanças no metaboloma perante o estresse agudo, PITTI et al. (2019) investigaram as respostas dos metabólitos após uma partida de futebol. Em complemento PRADO et al. (2017) avaliaram alterações metabólicas no sangue e na urina durante e após uma partida. RA et al. (2014) buscaram biomarcadores de fadiga após sequência de 3 jogos recreativos consecutivos. Além das alterações agudas, sabe-se que o metaboloma humano sofre adaptações a longo prazo, por isso PINTUS et al. (2020) investigaram a variação do metaboloma da urina ao decorrer da pré-temporada e QUINTAS et al. (2020) buscaram traçar relações entre a carga externa e as modificações no metaboloma perante as adaptações fisiológicas do treinamento realizado em uma temporada completa.

Pesquisadores também questionaram as respostas dos metabólitos frente a aplicação de protocolos avaliativos. SANTONE et al. (2014) objetivaram detectar variações metabólicas após execução do *Yo-Yo level-1 intermittent recovery test*. Além de investigar as respostas dos metabólitos frente as avaliações físicas, os fisiologistas do futebol também buscam entender o comportamento do metaboloma após sessões de treinamento utilizando diferentes meios e métodos. Aplicando o jogo reduzido, CICERO et al. (2015) buscaram traçar alterações no metaboloma da saliva após uma sessão em jogadores de futebol de elite. ZAFEIRIDIS et al. (2016) aplicaram a metabolômica para investigar as alterações dos metabólitos após a realização de exercícios contínuo, *high intensity interval training* (HIIT) longo e curto. Ainda investigando o HIIT, ZHAO et al. (2020) integraram a proteômica e a metabolômica a fim de investigar com profundidade as respostas metabólicas e proteicas. Todos os estudos supracitados utilizaram distintos fluidos biológicos (plasma/soro, urina, saliva) para visualizarem o perfil e as alterações no metaboloma dos atletas. Por outro lado, ALZHARANI et al. (2020) utilizaram amostras de urina, plasma e saliva no mesmo experimento para analisar o impacto do exercício de alta intensidade no perfil do metaboloma.

Os trabalhos citados envolvendo metabolômica, lipidômica e futebol buscaram compreender o comportamento dos metabólitos em situações de estresse fisiológico gerado pelo exercício na modalidade e, também, apontaram possíveis novos biomarcadores de estresse, fadiga e desempenho. Embora esses estudos sejam importantes, corriqueiramente as pesquisas não consideram o nível de condicionamento físico e o nível competitivo em que os atletas estão inseridos. Uma vez que além das características em comum relacionadas à modalidade, os jogadores de futebol apresentam variações fisiológicas que podem ser influenciadas pelo nível de condicionamento físico e/ou nível competitivo (por ex., profissional, semiprofissional, amador) (MORRIS et., 2013; LUSTGARTEN et al., 2013; MORRIS et al., 2015).

Dessa forma, torna-se evidente a importância de analisar diferenças físicas e metabólicas considerando o nível de condicionamento físico bem como o nível competitivo em que os jogadores de futebol estão inseridos. Essa abordagem fornece conexões entre diferentes linhas de pesquisa e campos de atuação, caracterizando o perfil fisiológico dos atletas e sendo capaz de diminuir as barreiras entre treinadores esportivos e cientistas, melhorar significativamente o desempenho atlético.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral da presente tese de doutorado foi usar diferentes avaliações físicas e a abordagem lipidômica *untargeted* para investigar diferenças fisiológicas em relação aos níveis de capacidade física bem como o nível competitivo dos jogadores de futebol masculinos sub-22.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente Tese de Doutorado foram organizados em dois estudos, os quais foram conduzidos no intuito de investigar:

Estudo 1: O objetivo primário da presente tese de doutorado foi usar lipidômica *untargeted* para investigar diferenças metabólicas entre jogadores de futebol masculinos sub-22 com maior e menor capacidade aeróbia. Além disso, procuramos identificar associações entre o perfil metabólico sérico em jejum com a capacidade aeróbia.

Estudo 2: Objetivo secundário foi utilizar avaliações físicas clássicas juntamente com a abordagem lipidômica para comparar o perfil antropométrico, nível de aptidão física e perfil metabólico sérico em jejum entre jogadores de futebol sub-22 inseridos em diferentes níveis de competição.

2.3 Resultados esperados e hipóteses do projeto

São hipóteses da presente tese de doutorado:

Estudo 1: O nível de capacidade aeróbia influenciará o perfil metabólico sérico de jejum dos atletas de futebol. Adicionalmente, alguns metabólitos identificados e diferenciados serão relacionados com nível de capacidade aeróbia dos jogadores de futebol.

Estudo 2: Jogadores futebol inseridos em diferentes níveis competitivos apresentarão valores diferentes nos parâmetros advindos da aplicação das avaliações físicas tradicionais. Além disso, jogadores futebol inseridos em diferentes níveis competitivos apresentarão diferenças no perfil metabólico sérico de jejum.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características do futebol

O futebol é o esporte mais popular do mundo, praticado tanto por mulheres quanto por homens em diferentes faixas etárias (crianças, jovens e adultos) com diferentes níveis competitivos (O'REILLY e WONG, 2012; DATSON et al., 2014; NÉDÉLEC et al., 2015). Os indivíduos praticantes de futebol realizam grande número de esforços de alta intensidade intercalados com baixa intensidade. Tais características tornam o futebol uma modalidade esportiva extremamente complexa, carente de estudos que possam ser aplicados para a aquisição do melhor desempenho no âmbito da fisiologia do exercício (O'REILLY e WONG, 2012; DATSON et al., 2014; NÉDÉLEC et al., 2015). O desempenho do futebol depende de uma infinidade de fatores como as áreas da bioquímica, fisiológica, física, biomecânica, técnico, tática e mental (STØLEN et al., 2005).

3.1.1 Características bioquímicas do futebol

O futebol é caracterizado por atividades intermitentes e abertas. Essas características em regime de esforço e pausa demandam alta resposta dos sistemas energéticos durante o treinamento ou uma partida (90 minutos) (STØLEN et al., 2005). A disponibilidade intramuscular de ATP é escassa, supre apenas poucos segundos de contração muscular (STATHIS et al., 1994). Dessa maneira, o corpo humano faz uso de diferentes substratos energéticos para produzir ATP visando sustentar as mudanças de direção, acelerações, desacelerações, dribles, chutes, saltos e giros presentes na modalidade. A fosfocreatina, glicogênio, glicose, ácido graxo livre e proteínas são utilizados pelos metabolismos anaeróbio e aeróbio para produzir energia.

O metabolismo anaeróbio é subdividido em alático e láctico, ambos fornecem energia rápida para realização de esforços de alta intensidade e curta duração. O metabolismo anaeróbio alático denominado também como sistema ATP-fosfocreatina (ATP-CP) envolve apenas uma reação química. Apesar de não produzir elevada quantidade de ATP, essa via tem alto poder de ressíntese, sendo catalisada pela enzima creatina quinase (CK). Esse sistema funciona como um tampão energético, sendo extremamente sensível

a alterações nas concentrações intracelulares de ATP e adenosina difosfato (ADP) (JONES et al., 1985). Ou seja, quando ATP é maior que ADP o sistema ATP-CP está inibido, mas quando ATP é menor que ADP, o sistema ATP-CP é estimulado. Com o aumento da durabilidade do exercício físico, os estoques de fosfocreatina são depletados, sendo insuficientes para suprir a demanda energética solicitada. Dentro dessa demanda, o sistema anaeróbio láctico ou glicólise anaeróbia passa a ser mais requisitado. Esse sistema energético é constituído por 12 reações, que vai desde a degradação de glicogênio muscular até a formação de ATP tendo como produtos finais da via o lactato e os íons H^+ . Acredita-se que a via da glicólise anaeróbia é responsável por fornecer 80% do ATP exigido durante esforços de alta intensidade (SPRIET, 1995). A via anaeróbia é extremamente importante no futebol, principalmente nos momentos em que ocorre uma sequência de *sprints* repetidos e quando a intensidade do esforço aumenta repentinamente (BOOBIS et al., 1987; WRAGG et al., 2000; STØLEN et al., 2005).

A via aeróbia ou metabolismo oxidativo sustenta atividades que perduram por mais tempo no futebol (STØLEN et al., 2005; BANGSBO et al., 2007). Essa via sintetiza alto nível energético, porém demanda mais tempo devido ao número de processos bioquímicos ocorridos. Carboidratos (glicólise aeróbia), proteínas (proteólise) e lipídeos (β -oxidação dos ácidos graxos) são convertidos em acetil-CoA. O acetil-CoA passa por 9 reações no ciclo de Krebs. Esse ciclo atua como redutor de coenzimas, sendo completamente degradado a dióxido de carbono. Ao decorrer dessas reações as coenzimas Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NAD) e Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD) são convertidas em $NADH + H^+$ e $FADH_2$. Dessa forma, na cadeia transportadora de elétrons, ambas coenzimas são reoxidadas pelo oxigênio molecular em NAD^+ e FAD^+ . Esse processo sintetiza a maior quantidade de ATP celular (FEO et al., 2003).

A demanda energética se altera de acordo com a intensidade e a duração da atividade realizada (FEO et al., 2003). Considerando as particularidades do futebol, a via aeróbia fornece maior aporte na produção energética de ATP (STØLEN et al., 2005; BANGSBO et al., 2007). Atua principalmente em esforços em domínio moderado, pesado e durante os momentos de recuperação após execução de intensidades severas (GAESSER e POOLE, 1996; TOMLIN e WENGER, 2001). Já os sistemas anaeróbios alático e láctico desempenham papel indispensável na produção de

energia para a realização de ações técnicas e táticas específicas realizadas nos domínios severo ou extremo (WRAGG et al., 2000; STØLEN et al., 2005).

3.1.2 Demandas físicas e fisiológicas do futebol

Buscando caracterizar as ações de jogo realizadas e as demandas físicas da modalidade, REILLY (1976) mostrou que a distância total percorrida (DTP) em partidas por jogadores de futebol é em média 8.680 metros, sendo 36% trotando, 24,8% andando, 20,5% correndo em velocidade submáxima, 11,25% correndo em velocidade máxima e 6,7% correndo para trás. Na mesma linha, BANGSBO et al. (1991) revelaram que 40,16% dos esforços realizados por jogadores de futebol são andando, 35,1% trotando lentamente, 17,1% trotando mais rapidamente, 5,3% correndo rapidamente, 2,1% correndo em velocidade alta e 0,7% correndo em velocidade máxima. Devido ao avanço tecnológico, houve aumento na diversidade e disponibilidade de ferramentas tecnológicas utilizadas para realização da análise de desempenho em times de futebol. BARROS et al. (2007) filmaram quatro partidas do campeonato brasileiro da primeira divisão, e observaram que a DTP foi de 10.012 ± 1.024 m. Os jogadores avaliados caminharam ou trotaram 5.537 ± 263 m, correram 1.615 ± 351 m em baixa velocidade, 1.731 ± 399 m em velocidade moderada, 691 ± 190 m em alta velocidade e executaram *sprints* máximos totalizando 437 ± 171 m. Igualmente VARLEY et al. (2014) acompanharam os movimentos de atletas de futebol, utilizando o sistema de posicionamento global (GPS) de 5 Hz. Os jogadores percorreram uma DTP de 10.274 ± 946 m, sendo que 9.757 ± 859 m foram percorridos em baixa intensidade, 517 ± 239 m em alta velocidade e 93 ± 77 m executando *sprints* em máxima intensidade. Com a aplicação do sistema Digital.Stadium® VTS durante uma partida, BEATO e JAMIL (2018) realizaram análise em duplicata do mesmo jogo para verificar reprodutibilidade do sistema. Os autores mostraram que DTP para primeira análise foi de 8.095 ± 3.271 m e para segunda análise 8.073 ± 3.26 m, sendo que a distância média dos esforços realizados a 5 km/h = 1.605 ± 885 m e 1.601 ± 879 m; 20 km/h = 518 ± 340 m e $518,5 \pm 332$ m; 19-22 km/h = 356 ± 206 m e 358 ± 206 m; 22 km/h = 304 ± 230 m e 307 ± 227 m na primeira e segunda análise, respectivamente. Mesmo considerando os avanços tecnológicos e diversificados métodos de mensuração, as ações realizadas pelos jogadores em diferentes décadas e a

demanda energética corroboram com dois estudos clássicos. BANGSBO (1994) afirmou que aproximadamente 90% da energia utilizada durante uma partida de futebol está associada ao metabolismo aeróbio e MAYHEW e WENGER (1985) mostraram que exigência energética anaeróbia é de apenas 12% do tempo total de jogo. Além disso, os jogadores de futebol apresentam particularidades em relação a DTP. Buscando caracterizar a DTP específica de cada posição de jogo, BARROS et al. (2007), mostraram que os zagueiros externos ($10.642 \pm 663\text{m}$), meio-campistas centrais ($10.476 \pm 702\text{m}$) e meio-campistas externos ($10.598 \pm 890\text{m}$) exibiram maior DTP em relação aos atacantes ($9.612 \pm 772\text{m}$). Os autores afirmam também que os atacantes apresentaram maior DTP em relação aos defensores centrais ($9.029 \pm 860\text{m}$). Na mesma linha, DI SALVO et al. (2007) visualizaram que os defensores centrais percorreram menor DTP ($10.627 \pm 893\text{m}$) em relação aos meio-campistas centrais ($12.027 \pm 625\text{m}$), meio-campistas externos ($11.990 \pm 776\text{m}$), defensores externos ($11.410 \pm 708\text{m}$) e atacantes ($11.254 \pm 894\text{m}$). Além disso, os meio-campistas centrais e meio-campistas externos transitaram maior DTP.

Parâmetros de potência e capacidade aeróbia e anaeróbia devem ser levados em consideração no futebol. A potência aeróbia, ou consumo máximo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{max}}$), refere-se à quantidade máxima de oxigênio que um indivíduo pode utilizar durante o exercício intenso ou máximo (LEE et al., 2021). Entre 1989 e 2012 pesquisadores mensuraram o $\text{VO}_{2\text{max}}$ de 1.545 jogadores de futebol do sexo masculino. O conjunto de dados indicaram que os valores que atendem às demandas de potência aeróbia no futebol profissional masculino está aproximadamente entre 62 - 64 $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (TØNNESSEN et al., 2013). Em uma revisão de literatura abordando as características fisiológicas de jogadores de futebol de elite, TUMILTY, (1993) mostrou que os valores de $\text{VO}_{2\text{max}}$ é aproximadamente 60 $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Por outro lado, ANDRADE et al. (2015) determinou o $\text{VO}_{2\text{max}}$ de jogadores de futebol com o valor de 51,1 $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Já STØLEN et al. (2005) afirmaram que $\text{VO}_{2\text{max}}$ de jogadores masculinos de futebol varia entre 50 - 75 $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, enquanto os goleiros têm 50 - 55 $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Resultado similar ao encontrado na literatura, onde os goleiros têm menor $\text{VO}_{2\text{max}}$ estimado ($56,4 \pm 3,9 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) do que os laterais ($60,7 \pm 2,3 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), zagueiros centrais ($59,5 \pm 3,2 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), meio campistas ($61,4 \pm 3,4 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e atacantes ($60,1 \pm 4,2 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Já os meio-campistas apresentaram

maior $VO_2\text{max}$ do que os zagueiros (DAVIS et al., 1992). Tais informações corroboram com outro estudo, onde os meio-campistas apresentaram maior $VO_2\text{max}$ em relação aos zagueiros, atacantes e goleiros (TØNNESSEN et al., 2013).

Além de determinar a potência aeróbia, pesquisadores buscaram avaliar a capacidade aeróbia de jogadores de futebol em diversos contextos. O limiar anaeróbio (LAn) referente a capacidade aeróbia, tem como definição como a maior intensidade de exercício sustentada para a qual a medição do consumo de oxigênio pode ser responsável por toda a necessidade energética (POOLE et al., 2021). Na intensidade de LAn, a produção e depuração de lactato está em equilíbrio (WASSERMAN e MCILROY, 1964; KINDERMANN et al., 1979). O LAn tem como objetivo aumentar a eficiência dos programas de treinamento. A medição do LAn fornece uma intensidade referência para prescrição de exercício. O exercício realizado em intensidade próxima ao LAn é considerado pesado, enquanto o exercício abaixo dessa intensidade seria moderado. Quando a intensidade do exercício excede substancialmente o LAn (ou seja, aproxima-se de $VO_2\text{max}$), é considerado severo (GAESSER e POOLE, 1996).

Entre inúmeros protocolos existentes para determinação do LAn a MFEL é considerado padrão ouro (BILLAT et al., 2003). A MFEL é estabelecida como a maior intensidade de exercício na qual a concentração de lactato sanguíneo não aumenta além do transitório inicial durante o exercício de carga constante (TEGTBUR et al., 1993). Ou seja, a intensidade de MFEL representa um ponto de equilíbrio entre o transporte de lactato para o sangue e a remoção de lactato do sangue (HECK et al., 1985). Aplicada no futebol, vinte jogadores masculino juniores da primeira divisão espanhola profissional apresentaram intensidade média de $12,2 \pm 0,6$ km/h correspondente a MFEL (LLODIO et al., 2015). Da mesma forma, a intensidade média correspondente a MFEL de quinze jogadores de futebol de um clube espanhol da quarta divisão foi de $13,2 \pm 1,0$ km/h (GARCIA-TABAR et al., 2019). Além disso, LOURES et al. (2015) obtiveram o valor médio de $10,6 \pm 1,3$ km/h na intensidade da MFEL de 16 jogadores brasileiros de futebol amador. Adicionalmente, 18 jogadores de futebol universitário exibiram MFEL de $13,3 \pm 0,8$ km/h (CARMINATTI et al., 2021). Além da MFEL, o Teste de Lactato Mínimo (TLM) também é utilizado para determinação do LAn e apresenta vantagens na aplicação prática para o futebol (TEGTBUR et al., 1993). O TLM requer apenas uma

sessão de avaliação e apresenta três distintas fases: a) indução à hiperlactacidemia; b) recuperação passiva; e c) aplicação de protocolo incremental. Desse modo, o teste de exercício incremental iniciado na presença de acidose láctica produz uma curva de lactato em forma de “U”. Para determinação da intensidade mínima de lactato (LAn), a curva passa por ajuste polinomial de segunda ordem. O TLM mostrou alta sensibilidade em identificar melhora da capacidade aeróbia de jogadores de futebol após realização de um programa de treinamento específico (Antes = $14,94 \pm 0,21$ km/h; Após = $15,44 \pm 0,42$ km/h) (SILVA et al., 2007). Adicionalmente, o TLM também identificou adaptações no LAn ao final de um programa do treino aplicado em jogadores de futebol (14,60 km/h) em relação começo (13,17 km/h) e meio (14,24 km/h) (SILVA et al., 2008). Do mesmo modo, jogadores de futebol sub-17 apresentaram adaptações significativas no LAn (Antes = $9,93 \pm 0,51$ km/h; Após = $11,21 \pm 0,60$ km/h) captadas pelo TLM após treinamento de futebol com duração de 10 semanas (MIRANDA et al., 2013).

Embora o metabolismo aeróbio domine o fornecimento de energia durante um jogo de futebol, as ações mais decisivas são realizadas por meio do metabolismo anaeróbio. Para realizar sprints curtos, saltos, desarmes, chutes, dribles, a liberação de energia anaeróbia é determinante para o resultado da partida (BANGSBO et al., 2007). Nesse sentido, mensurar a potência e capacidade anaeróbia em jogadores de futebol é essencial para o sucesso. Como definição a potência anaeróbia pode ser definida como o máximo de energia liberada por unidade de tempo por esse sistema, enquanto a capacidade anaeróbia pode ser definida como a quantidade total de energia disponível nesse sistema (FRANCHINI, 2002; ASANO et al., 2013). Além disso, a capacidade anaeróbia pode ser definida como o rendimento total de energia dos sistemas metabólicos anaeróbios durante o exercício exaustivo de curta duração (PATE et al., 1983). Autores como MEDBO et al. (1988) estabeleceram que a capacidade anaeróbia é a quantidade máxima de ATP formada por esses processos anaeróbios (hidrólise de creatinafosfato e produção de lactato) durante o exercício e CAMUS e THYS (1991) afirmaram que a capacidade anaeróbia máxima é a máxima quantidade de energia produzida por processos anaeróbios.

Dessa forma, NIKOLAÏDIS (2011) investigou o desenvolvimento da potência anaeróbia de jogadores de futebol ao longo da adolescência em um ambiente de laboratório. Adolescentes entre 12 e 21 anos do sexo masculino

(N = 217) participaram do estudo. Os jogadores de futebol foram divididos em 10 categorias (sub-13, sub-14, sub-15, sub-16, sub-17, sub-18, sub-19, sub-20, sub-21 e profissional). Por meio do 30-s Wingate Anaerobic Test (BAR-OR, 1987) a potência anaeróbia foi determinada. A potência pico, potência média, potência mínima e índice de fadiga das categorias sub-13 ($P_{\text{pico}} = 452,3 \pm 114,8\text{W}$; $P_{\text{média}} = 356,7 \pm 82,5\text{W}$; $P_{\text{min}} = 264,1 \pm 51,0\text{W}$; $\text{IF} = 40,4 \pm 7,6\%$), sub-14 ($P_{\text{pico}} = 566,1 \pm 111,4\text{W}$; $P_{\text{média}} = 450,9 \pm 91,9\text{W}$; $P_{\text{min}} = 338,3 \pm 70,1\text{W}$; $\text{IF} = 39,3 \pm 8,7\%$), sub-15 ($P_{\text{pico}} = 626,4 \pm 115,0\text{W}$; $P_{\text{média}} = 490,6 \pm 92,3\text{W}$; $P_{\text{min}} = 359,6 \pm 87,9\text{W}$; $\text{IF} = 42,2 \pm 10,8\%$), sub-16 ($P_{\text{pico}} = 714,2 \pm 122,7\text{W}$; $P_{\text{média}} = 564,5 \pm 90,9\text{W}$; $P_{\text{min}} = 359,6 \pm 80,5\text{W}$; $\text{IF} = 42,5 \pm 9,1\%$), sub-17 ($P_{\text{pico}} = 769,4 \pm 142,3\text{W}$; $P_{\text{média}} = 601,1 \pm 91,1\text{W}$; $P_{\text{min}} = 427,4 \pm 70,5\text{W}$; $\text{IF} = 42,2 \pm 8,7\%$), sub-18 ($P_{\text{pico}} = 774,2 \pm 149,6\text{W}$; $P_{\text{média}} = 614,3 \pm 89,9\text{W}$; $P_{\text{min}} = 442,9 \pm 57,5\text{W}$; $\text{IF} = 41,7 \pm 7,8\%$), sub-19 ($P_{\text{pico}} = 769,6 \pm 94,3\text{W}$; $P_{\text{média}} = 605,6 \pm 58,9\text{W}$; $P_{\text{min}} = 427,6 \pm 73,6\text{W}$; $\text{IF} = 44,3 \pm 7,9\%$), sub-20 ($P_{\text{pico}} = 839,3 \pm 75,3\text{W}$; $P_{\text{média}} = 662,0 \pm 75,3\text{W}$; $P_{\text{min}} = 468,5 \pm 87,3\text{W}$; $\text{IF} = 44,2 \pm 9,2\%$), sub-21 ($P_{\text{pico}} = 852,9 \pm 80,5\text{W}$; $P_{\text{média}} = 686,4 \pm 55,9\text{W}$; $P_{\text{min}} = 513,0 \pm 59,7\text{W}$; $\text{IF} = 39,5 \pm 7,5\%$) e profissional ($P_{\text{pico}} = 867,8 \pm 89,0\text{W}$; $P_{\text{média}} = 686,0 \pm 62,0\text{W}$; $P_{\text{min}} = 521,8 \pm 54,1\text{W}$; $\text{IF} = 39,5 \pm 6,1\%$) foram determinadas, respectivamente. Esse trabalho mostra que a potência anaeróbia evolui ao longo da adolescência e dos treinamentos. Adicionalmente, 23 jogadores de futebol de elite representando a seleção saudita foram avaliados por meio do 30-s Wingate Anaerobic Test (BAR-OR, 1987) para determinação potência anaeróbia. Em média os jogadores apresentaram $P_{\text{pico}} = 873,6 \pm 141,8\text{W}$; $P_{\text{média}} = 587,7 \pm 55,4\text{W}$. Separados por posição tática, a potência anaeróbia dos laterais ($P_{\text{pico}} = 816,5 \pm 98,9\text{W}$ e $P_{\text{média}} = 565,3 \pm 22,9\text{W}$), zagueiros ($P_{\text{pico}} = 1097,8 \pm 119,5\text{W}$ e $P_{\text{média}} = 673,5 \pm 52,6\text{W}$), meio-campistas ($P_{\text{pico}} = 783,8 \pm 80,3\text{W}$ e $P_{\text{média}} = 544,2 \pm 17,1\text{W}$), atacantes ($P_{\text{pico}} = 870,4 \pm 48,4\text{W}$ e $P_{\text{média}} = 598,3 \pm 34,2\text{W}$) foi exibida. De maneira geral, apenas a potência pico absoluta dos zagueiros foi significativamente superior as demais posições táticas (AL'HAZZAA et al., 2001). Outro estudo objetivou validar o Running Anaerobic Sprint Test (RAST) (ZAGATTO et al., 2009) para avaliar potência anaeróbia no futebol. Para isso, 31 jovens jogadores foram submetidos ao 30-s Wingate Anaerobic Test e ao RAST. Para o 30-s Wingate Anaerobic Test, os jogadores apresentaram valores absolutos de $P_{\text{pico}} = 609,3 \pm 130,6\text{W}$, $P_{\text{média}} = 483,7 \pm 94,7\text{W}$, $P_{\text{min}} = 343,5 \pm 67,5\text{W}$ e $\text{IF} = 42,9 \pm 7,8\%$. Para o RAST, os valores absolutos obtidos foram de $P_{\text{pico}} = 587,6 \pm 152,9\text{W}$, $P_{\text{média}} = 458,5 \pm 105,4\text{W}$,

$P_{\min} = 366,9 \pm 84,2W$ e $IF = 36,7 \pm 7,8\%$. Em suma, o RAST foi considerado validado para avaliar potência anaeróbia de jovens jogadores de futebol de maneira mais específica para modalidade (HAZIR et al., 2018). ANDRADE et al. (2015) também aplicaram o RAST (ZAGATTO et al., 2009). Os jogadores de futebol avaliados nesse estudo apresentaram potência anaeróbia absoluta de $P_{\text{pico}} = 723,7 \pm 134,0W$, $P_{\text{média}} = 562,4 \pm 95,9W$ e $IF = 39,6 \pm 8,7\%$.

Além da potência anaeróbia, a capacidade anaeróbia de jogadores de futebol também vem sendo avaliada. Tradicionalmente, o MAOD (MEDBO et al., 1988) é definido como a quantidade de ATP que pode ser ressintetizada pela hidrólise de fosfocreatina e pela glicólise anaeróbia (MIYAGI et al., 2017). Ao longo do tempo, o MAOD tem sido aplicado para determinar a capacidade anaeróbia, sendo considerado um método padrão ouro (MIYAGI et al., 2017). Em jovens jogadores de futebol profissional, LOURES et al. 2012 aplicaram o MAOD. Os jogadores apresentaram valores médios de capacidade anaeróbia de $3,4 \pm 1,3 L$ e $52,1 \pm 19,8 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$. Adicionalmente, os jogadores de futebol sub-20 avaliados por ANDRADE et al. (2015) exibiram capacidade anaeróbia de $3,2 \pm 0,7 L$ e $43,5 \pm 9,8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ mensurada pelo MAOD.

As características físicas e somatotipos também devem ser levadas em consideração nas estimativas rotineiras aplicadas nos jogadores de futebol. No aspecto antropométrico, jogadores profissionais de futebol da liga inglesa apresentaram massa corporal de $77,1 \pm 5,6\text{kg}$ e percentual de gordura de $10,5 \pm 1,8\%$, sendo que goleiros apresentam maior massa total ($86,1 \pm 5,5\text{kg}$) e percentual de gordura ($13,3 \pm 2,1\%$) em relação as outras posições (Laterais = $75,4 \pm 4,6\text{kg}$ e $10,8 \pm 1,6\%$; zagueiros = $83,3 \pm 6,36\text{kg}$ e $10,7 \pm 2,0\%$; meio-campistas = $73,2 \pm 4,8\text{kg}$ e $10,6 \pm 2,1\%$; atacantes = $76,4 \pm 7,2\text{kg}$ e $10,0 \pm 1,8\%$) (DAVIS et al., 1992). GIL et al. (2010) mostraram a massa corporal, altura, índice de massa corporal, percentual de gordura e percentual de massa muscular dos goleiros ($73,9 \pm 7,9\text{kg}$; $179,5 \pm 5,9\text{cm}$; $22,8 \pm 1,7\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$; $12,2 \pm 1,7\%$; $46,9 \pm 1,8\%$), defensores ($68,8 \pm 9,1\text{kg}$; $175,4 \pm 7,6\text{cm}$; $22,3 \pm 2,1\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$; $11,6 \pm 1,9\%$; $47,0 \pm 1,6\%$), meio-campistas ($68,4 \pm 9,7\text{kg}$; $174,6 \pm 7,6\text{cm}$; $22,3 \pm 2,2\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$; $11,8 \pm 2,3\%$; $46,1 \pm 1,7\%$) e atacantes ($68,3 \pm 9,0\text{kg}$; $174,8 \pm 6,8\text{cm}$; $22,2 \pm 2,2\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$; $10,9 \pm 1,3\%$; $47,9 \pm 1,3\%$), respectivamente. Do mesmo modo, HAMMAMI et al. (2013) mostraram que a altura, massa corporal e percentual de gordura de jogadores de futebol sub-16 após um programa de treinamento estavam em torno de $178,8 \pm 4,1\text{cm}$, $67,7 \pm 5,6\text{kg}$ e $11,8 \pm 2,6\%$, respectivamente. Além disso, CORLUKA et al. (2019) avaliaram

as características antropométricas de jogadores de futebol de elite da Bósnia e Herzegovina e Montenegro. Os jogadores da Bósnia e Herzegovina apresentaram altura de $182,5 \pm 4,8\text{cm}$, massa corporal de $78,8 \pm 5,8\text{kg}$, índice de massa corporal de $23,6 \pm 1,1\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$, percentual de gordura de $8,7 \pm 3,1\%$ e massa muscular de $40,6 \pm 2,6\text{kg}$. Já os atletas de futebol de Montenegro demonstraram altura de $181,9 \pm 5,8\text{cm}$, massa corporal de $78,1 \pm 8,5\text{kg}$, índice de massa corporal de $23,4 \pm 1,45\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$, percentual de gordura de $23,4 \pm 1,4\%$ e massa muscular de $39,5 \pm 3,6\text{kg}$. Diversos métodos tem sido utilizados para determinar os somatotipos (mesomorfo, endomorfo e ectomorfo) de jogadores de futebol. De maneira geral, os resultados têm demonstrado a prevalência de mesomorfismo em atletas de futebol adultos e jovens (RIENZI et al., 2000; RIBEIRO et al., 2007; PERRONI et al., 2015).

3.1.3 Diferenças físicas e fisiológicas entre jogadores de futebol inseridos em distintos níveis competitivos

Além das características em comum da modalidade, os jogadores de futebol apresentam particularidades. Fator que pode contribuir para tais variações nas ações de jogo, nível de capacidade e potência aeróbia e anaeróbia, característica antropométricas e somatotipo é o nível competitivo que o jogador de futebol está inserido. Dessa maneira, o sistema de análise de jogo ProZone® foi utilizado para monitorar uma equipe de futebol. Os dados mostraram que a equipe monitorada foi influenciada pelo nível competitivo do adversário. Variáveis como DTP (menos competitivo = 10827 ± 760 metros; mais competitivo = 11097 ± 778 metros; $p < 0,05$), corrida de alta intensidade (menos competitivo = 2630 ± 536 metros; mais competitivo = 2770 ± 528 metros; $p < 0,05$) e corrida de muito alta intensidade (menos competitivo = 883 ± 268 metros; mais competitivo = 902 ± 237 metros; $p < 0,05$) aumentaram quando a equipe monitorada jogou com adversário com nível competitivo maior (RAMPININI et al., 2007). Ou seja, o desempenho da equipe pode ser influenciado pelo nível de competição do adversário. Do mesmo grupo de pesquisadores, os autores investigaram o desempenho técnico e físico dos jogadores das equipes com maior nível competitivo (classificadas nas 5 primeiras posições) com os jogadores inseridos nas equipes com menor nível competitivo (classificadas nas últimas 5 posições) da mesma liga. Foi observado que os jogadores inseridos nas equipes com

maior nível competitivo apresentaram maior DTP e maior distância de corrida de alta intensidade com a bola quando comparados com os jogadores das equipes com menor nível competitivo. Adicionalmente, as equipes com maior nível de competição tiveram mais interação com a bola, completaram mais passes curtos, passes curtos bem sucedidos, desarmes, dribles, chutes e chutes a gol em comparação com as equipes menos competitivas (RAMPININI et al., 2009). Com o título provocativo “Quais são as diferenças entre a primeira e a segunda divisão dos times de futebol espanhóis?”, CASTELLANO e CASAMICHANA (2015) analisaram 320 partidas da primeira divisão (maior nível competitivo) e 335 partidas da segunda divisão (menor nível competitivo). As equipes mais bem colocadas na primeira divisão apresentaram melhor desempenho para quase todas as variáveis em relação aos demais níveis competitivos. Quando as equipes mais bem colocadas na primeira divisão foram comparadas com as equipes mais bem colocadas na segunda divisão, as equipes da primeira divisão tiveram um desempenho significativamente melhor em termos de largura e profundidade de jogo e altura de defesa. As demandas físicas de jogo entre as equipes da liga espanhola da primeira e segunda divisão foram comparadas (DTP e metros percorridos em faixas de alta velocidade). Nesse estudo a DTP foi igual para as equipes com maior ($109,373 \pm 2,303$ metros) e menor ($108,224 \pm 1,881$ metros) nível competitivo, porém DTP em altíssima intensidade foi maior nas equipes com maior nível competitivo (GOMEZ-PIQUERAS et al., 2019).

Notamos que o nível competitivo dos atletas tem influência no desempenho tático e técnico no futebol. Além disso, a literatura aponta que o nível competitivo também interfere no nível de condicionamento físico. Jogadores de futebol gregos profissionais, semiprofissionais e amadores realizaram testes de composição corporal, desempenho aeróbio e desempenho do salto vertical. Os valores absolutos de $VO_2\text{max}$ foram maiores nos profissionais (4620 ± 371 ml/min) em relação aos semiprofissionais (4328 ± 444 ml/min; $p < 0,05$) e amadores (4014 ± 433 ml/min; $p < 0,001$). Além disso, os atletas profissionais apresentaram valores significativamente maiores no *squat jump* e salto contramovimento em relação aos semiprofissionais em 11,3% e 10,5% e amadores em 10,5% e 9,4%, respectivamente ($p < 0,001$ e $p < 0,01$). De maneira geral, os atletas com maior nível competitivo obtiveram maiores valores de potência aeróbia, força muscular e capacidade de salto (PAPAEVANGELOU et al., 2012). O $VO_2\text{max}$ de diversos jogadores de futebol

inseridos em diferentes níveis competitivos foi mensurado durante o período de 23 anos. Como resultado, os jogadores amadores de equipes participantes da terceira até a quinta divisão demonstraram menor VO_2max do que os grupos com maior nível competitivo apresentando diferença média de $2 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ (TØNNESSEN et al., 2013). Jogadores gregos com diferentes níveis competitivos foram avaliados pelos testes de *sprint* de 30 metros, *Illinois agility test*, salto contra movimento, *squat jump*, YoYo IR, sentar e alcançar e medidas antropométricas. Os atletas amadores apresentaram maior percentual de gordura (amador = $16,8 \pm 5,9\%$; semiprofissional = $9,8 \pm 3,0\%$; $p < 0,05$). Os atletas semiprofissionais apresentaram VO_2max 26,5% maior ($p < 0,001$), *sprint* de 30 metros 7,6% maior ($p < 0,001$), *Illinois agility test* 8,2% maior ($p < 0,001$), *squat jump* 27% maior ($p < 0,001$) e salto contra movimento 16,4% maior ($p < 0,05$) em relação aos valores obtidos dos atletas amadores (MICHAILIDIS et al., 2018). O nível do VO_2max é um dos discriminadores mais poderoso entre jogadores de futebol com maior e menor nível competitivo. Uma revisão de meta-análise comparou o VO_2max de 2.385 jogadores de futebol masculinos com idades entre 10 e 39 anos em relação ao seu nível competitivo. Avaliando em torno de 16 artigos científicos sendo que 4 deles discutiram especificamente o VO_2max de jogadores de futebol de acordo com o nível competitivo, os pesquisadores mostraram que os atletas inseridos em um nível competitivo mais elevado apresentaram maior VO_2max em relação aos níveis competitivos mais baixos (SLIMANI et al., 2019). Com média de idade de $25,2 \pm 4,7$ anos, 1.095 jogadores de futebol masculino pertencentes as ligas gregas de futebol da primeira, segunda e terceira divisão (profissional) e semiprofissional (4ª divisão) foram caracterizados. Para todas as variáveis, (idade, altura, massa corporal, percentual de gordura, velocidade do VO_2max , limiar ventilatório, lactato pico, *squat jump*, *sprint* de 35 metros e índice de fadiga do RAST) a ANOVA fatorial mostrou que os jogadores profissionais inseridos na primeira, segunda e terceira divisão tiveram melhor desempenho quando comparados com os jogadores semiprofissionais inseridos na quarta divisão do futebol grego. Além disso, jogadores profissionais da primeira divisão apresentaram maiores valores para os parâmetros aeróbios (VO_2max e limiar ventilatório) em relação a terceira e quarta divisão. Já as variáveis anaeróbias, como o índice de fadiga do RAST mostrou valores significativamente maiores nas três divisões profissionais do que no futebol semiprofissional. Da mesma forma, *squat jump* e o *sprint* de 35

metros foram significativamente melhores para atletas da primeira divisão comparados com atletas da segunda divisão e entre as duas últimas divisões com a terceira tendo melhor desempenho em comparação com a quarta (ROUSOPOULOS et al., 2021). Durante 15 anos (entre 1995 e 2010) 939 atletas com média de idade de $22,1 \pm 4,3$ anos inseridos em diferentes níveis competitivos (inclusive a seleção da Noruega) tiveram o desempenho do sprint de 40 metros e o salto contramovimento avaliados. A seleção norueguesa e os jogadores da primeira divisão foram mais velozes do que os jogadores da segunda divisão (1,0 - 1,4 %), da terceira à quinta divisão (3,0 - 3,8%), da seleção da categoria de base (1,7 - 2,2%) e dos jogadores da categoria de base dos clubes (2,8 - 3,7%) ($P < 0,05$) (HAUGEN et al., 2013). Recentemente, pesquisadores buscaram comparar o desenvolvimento físico de jogadores profissionais de futebol de elite e não elite. Setenta e oito jogadores de futebol masculino foram divididos em elite, não elite A, não elite B e sub-23. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre jogadores de elite e não-elite nos parâmetros de composição corporal. No entanto, o grupo elite apresentou maior desempenho em força estática, potência dos membros inferiores, flexibilidade e equilíbrio (FRANÇA et al., 2022).

3.1.4 Conceito de potência crítica e velocidade crítica para determinação da capacidade aeróbia e anaeróbia em diversos esportes e no futebol

Como mostra a literatura, diversos estudos recentes buscaram caracterizar o futebol de elite e realizar comparações com as categorias com jogadores não-elite para encontrar uma relação entre os resultados dos testes fisiológicos e o nível de competição. Nessa busca por conhecimento, diferentes testes físicos como como Lactato Mínimo (SILVA et al., 2007), circuito de Hoff para determinação específica da MFEL (LOURES et al., 2015), MAOD (ANDRADE et al., 2015), VCrit e PCrit (KARSTEN et al., 2016) foram utilizados para determinação de diferentes aspectos físicos e fisiológicos.

A PCrit foi sugerida por MONOD e SCHERRER, (1965) no artigo intitulado “A capacidade de trabalho de um grupo muscular sinérgico”. Os autores encontraram uma relação hiperbólica entre a potência gerada por grupos musculares isolados durante a execução do protocolo e o tempo de exaustão do avaliado. O protocolo proposto fornece a estimativa de

capacidade aeróbia (PCrit), sendo relacionada com a taxa máxima de trabalho realizado por longo período sem fadiga e, a capacidade de trabalho anaeróbio (CTA), correspondente à quantidade finita de trabalho que pode ser utilizado em intensidade superiores à PCrit.

GAESSER e POOLE (1996) propuseram a existência de três domínios de intensidade de exercício físico: moderado, pesado e severo (**Figura 1**). A PCrit corresponde ao limite superior entre o domínio pesado e severo (GAESSER e POOLE, 1996; HILL et al., 2002). Ou seja, quando a intensidade de exercício está abaixo da PCrit o organismo apresenta equilíbrio fisiológico, conseguindo sustentar a demanda energética proveniente do exercício sem entrar em exaustão. Para suprimir a demanda energética quando a intensidade está acima da PCrit, o organismo utiliza predominantemente o estoque energético anaeróbio limitado (CTA), levando o praticante à exaustão em pequena faixa de tempo. BISHOP et al. (1998) desenvolveram uma analogia para explicar o modelo (**Figura 1**). O modelo da PCrit é análogo a um compartimento bioenergético com um estoque limitado de energia. Com a realização de exercício acima da intensidade de PCrit, esse estoque bioenergético (CTA) é utilizado e por ser finito, caso haja o seu esgotamento, o indivíduo entra em exaustão.

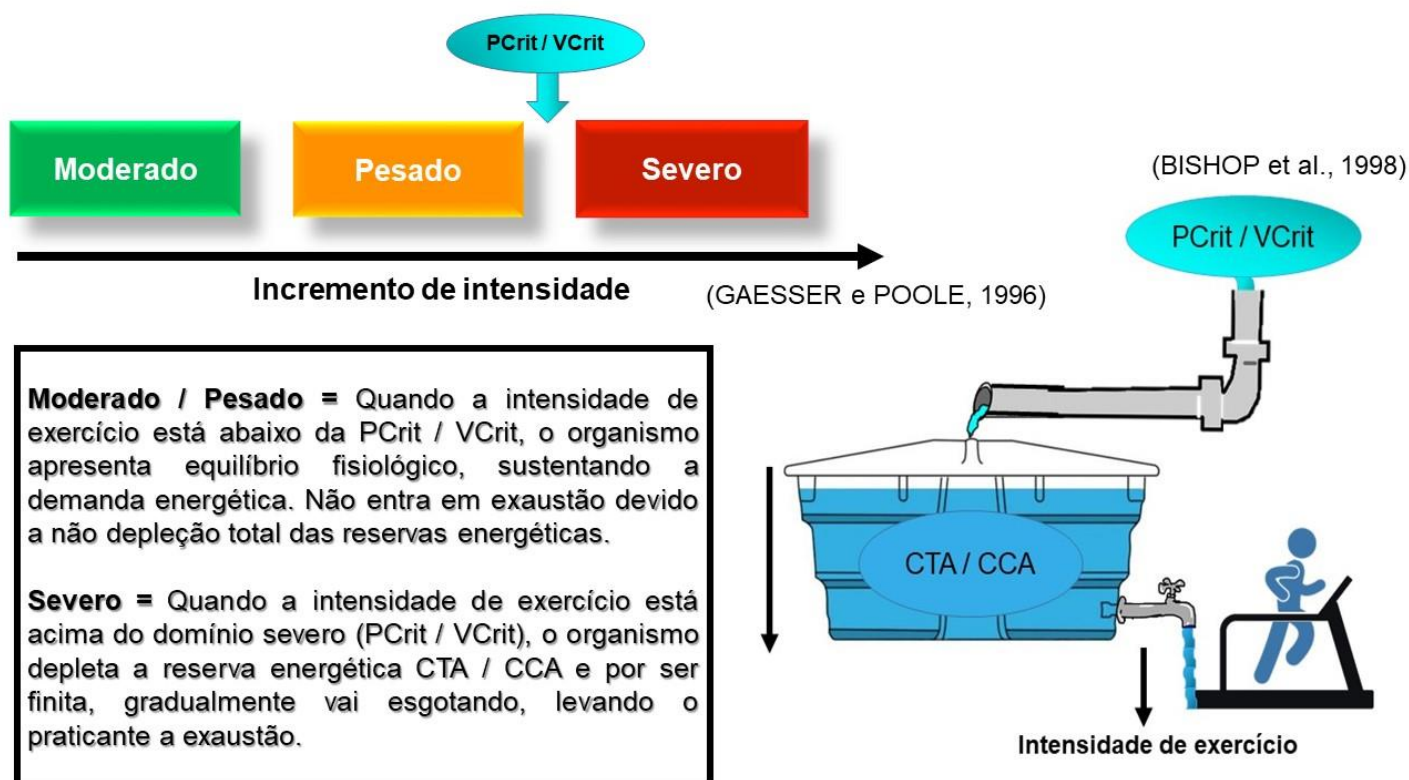


Figura 1. Modelos teóricos clássicos utilizados para representar os domínios de intensidade de exercício e o conceito da Potência Crítica. **PCrit** – Potência Crítica; **VCrit** – Velocidade Crítica; **CTA** – Capacidade de Trabalho Anaeróbio; **CCA** – Capacidade de Corrida Anaeróbia.

Para determinação da PCrit e da CTA é necessário a aplicação aleatória de cargas preditivas até a exaustão voluntária em um ergômetro devidamente calibrado. Com a utilização de um simples cronômetro é possível a mensuração do tempo limite (tlim) para cada intensidade. Após a aplicação das cargas preditivas é fundamental a utilização de modelos matemáticos para determinar as capacidades. Três modelos matemáticos (**Figura 2**) são usualmente aplicados (MONOD e SCHERRER., 1965; JONES et al., 2010):

a) Modelo não linear de Potência-tlim (hiperbólico): $tlim = CTA / (P - PCrit)$

b) Modelo linear Trabalho-tempo: $Trabalho = PCrit \cdot tlim + CTA$

c) Modelo linear Potência-1/tempo: $Potência = PCrit + CTA \cdot (1/tlim)$

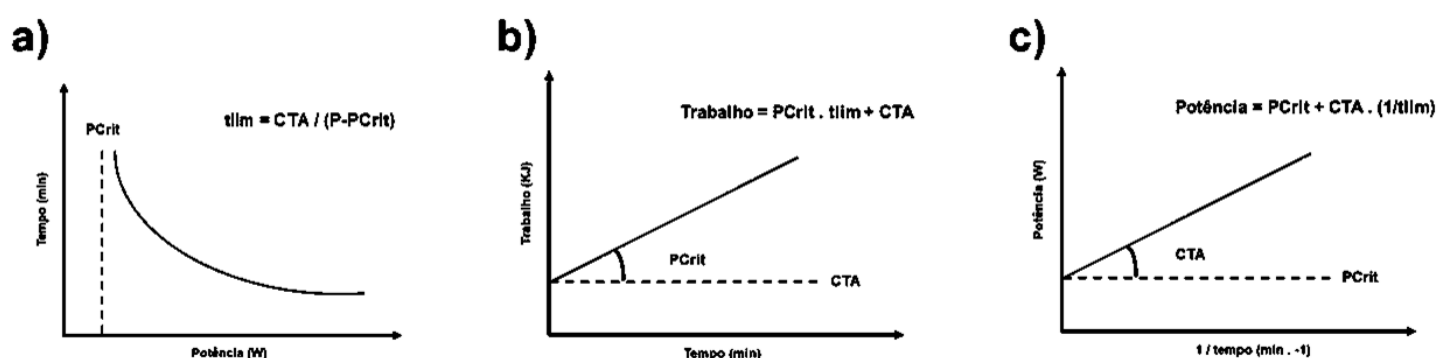


Figura 2. Modelos matemáticos usualmente utilizados para a determinação da Potência Crítica (PCrit) e Capacidade de Trabalho Anaeróbio (CTA). **a)** Modelo não linear de Potência-tlim (hiperbólico). **b)** Modelo linear Trabalho-tempo. **c)** Modelo linear Potência-1/tempo.

Por muitos anos esse modelo de avaliação física vem sendo estudado, MORITANI et al. (1981), associaram o modelo de PCrit ao LAn. Nesse estudo, oito universitários do sexo masculino (400, 350, 300 e 275 W) e oito do sexo feminino (300, 250, 200 e 175 W) foram submetidos a quatro cargas preditivas em cicloergômetro. Após o tlim ser determinado, o ajuste matemático linear utilizado apresentou alto r^2 variando de 0,982 a 0,998. O coeficiente de inclinação da reta ou PCrit apresentou média de $203,9 \pm 36,5$ W para homens e $144,5 \pm 20,9$ W para mulheres. Os resultados experimentais indicaram que a PCrit foi correlacionada com o LAn determinado pelo método de troca gasosa ($r = 0,928$, $p < 0,01$) sendo dependente da oferta de O_2 . Outro estudo clássico buscou definir a relação entre PCrit e o limiar de fadiga estimado por meio da eletromiografia integrada do quadríceps durante o ciclismo. Além

disso, os autores buscaram correlacionar os valores do limiar de fadiga com o LAn. A taxa de variação do aumento da atividade da eletromiografia integrada em função do tempo foi calculada em cada uma das cargas preditivas para 11 indivíduos pedalando em uma intensidade constante 4 cargas preditivas (400, 350, 300, 275 W para homens e 350, 300, 250 e 225 W para mulheres). Substituindo o tlim utilizado no modelo matemático original, as inclinações da eletromiografia integrada obtidas a partir da taxa de variação de cada carga preditiva foram plotadas em relação à carga de trabalho. Gráficos lineares com r^2 entre 0,88 até 0,99 foram obtidos e a interceptação no eixo y foi considerado como limiar de fadiga. A PCrit foi altamente correlacionada com o limiar de fadiga ($r = 0,869$), porém o limiar de fadiga ($190,5 \pm 14,0$ W) superestimou os valores de PCrit ($169,5 \pm 12,8$ W; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre o limiar de fadiga e a potência no LAn ($187,1 \pm 15,9$ W; $p < 0,05$). Adicionalmente, ambas variáveis apresentaram alta correlação de 0,903. Os autores do presente estudo mostraram que a determinação do limiar de fadiga por meio da eletromiografia integrada pode fornecer uma alternativa atraente para a medição do LAn (DEVRIES et al., 1982). O modelo de PCrit fornece estimativa tanto de capacidade aeróbia quanto anaeróbia. Buscando aumentar a confiabilidade da CTA e a PCrit, relações foram traçadas com o teste de Wingate considerado padrão ouro para determinação da potência anaeróbia. Para isso, 25 mulheres realizaram em cicloergômetro o teste de Wingate e três cargas preditivas entre 156 até 313 W para determinação da PCrit e CTA (r^2 entre 0,98 até 1,00). A potência anaeróbia (438 ± 61 W) e a CTA (10083 ± 2923 J) foram significativamente relacionadas ($r = 0,74$; $p < 0,05$). Além disso, quando a reprodutibilidade do modelo de PCrit foi testada, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre teste (PCrit = 156 ± 34 W; CTA = 9614 ± 2735 J) e reteste (PCrit = 158 ± 38 W; CTA = 10083 ± 2923 J) e as correlações para teste e reteste para PCrit ($r = 0,94$) e CTA ($r = 0,87$) foram significantes (NEBELSICK-GULLETT et al., 1988). Os resultados desse estudo indicaram que o modelo de PCrit foi uma avaliação física válida e confiável para determinar as capacidades anaeróbia e aeróbia (NEBELSICK-GULLETT et al., 1988).

Inicialmente o modelo de PCrit era aplicado somente em cicloergômetros, dessa forma a especificidade da corrida não era respeitada. HUGHSON et al. (1984), buscaram encontrar o comportamento hiperbólico

encontrado em cicloergômetros na esteira motorizada. Para isso, seis corredores de cross-country foram avaliados no estudo. Seis cargas preditivas entre 19,2 até 22,4 km/h foram realizadas até a exaustão e o tlim foi captado por um cronômetro. As regressões lineares ajustadas para velocidade versus 1/tempo tiveram coeficientes de correlação entre $r = 0,979$ e $0,997$. Além disso, a relação entre velocidade e resistência (VCrit) apresentou elevada correlação com o VO_2max ($r = 0,84$; $p < 0,05$). Dessa forma, a associação da velocidade e resistência (VCrit) para corridas de 2 até 12 minutos de duração aplicadas em esteira motorizada apresentou uma função hiperbólica semelhante à descrita em bicicletas. Seguindo a linha da especificidade, WAKAYOSHI et al. (1992) foram os primeiros a aplicarem o conceito de PCrit em nadadores. Os autores nomearam essa aplicação como VCrit e definiram como a velocidade de natação em um período de tempo muito longo sem exaustão (estimativa de capacidade aeróbia dos nadadores). Nesse estudo, foram avaliados 9 nadadores universitários treinados. Os avaliados nadaram seis cargas preditivas em velocidade constante de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6 e 1,7 m/s. Os nadadores apresentaram uma VCrit média de $1,17 \pm 0,06$ m/s com r^2 de 0,998. A VCrit foi correlacionada com a captação de oxigênio no LAn ($r = 0,818$; $p < 0,01$), velocidade de natação a 4 mmol. 1^{-1} ($r = 0,949$; $p < 0,01$) e velocidade média de 400m livre ($r = 0,864$; $p < 0,01$).

A proposta da VCrit (WAKAYOSHI et al., 1992) é alusiva à estimativa de capacidade aeróbia, sendo relacionada com a taxa máxima de trabalho realizado por longo período sem fadiga e a CCA, corresponde a quantidade finita de trabalho que pode ser utilizado em intensidade superiores à VCrit (JONES et al., 2010). Ambos os parâmetros podem ser determinados por meio da aplicação de esforços preditivos com diferentes intensidades, executados aleatoriamente em dias alternados, em ambientes específicos da modalidade, a partir do uso de ferramentas simples, como um cronômetro e um ergômetro. Adicionalmente, a VCrit é um protocolo não invasivo, de fácil aplicabilidade prática e extremamente adaptável à especificidade da modalidade. Nos últimos anos a VCrit vem sendo aplicada em diversos esportes.

O protocolo de VCrit mostrou ser um teste de aptidão aeróbia apropriado ao rugby de sete, produzindo parâmetros similares ao Yo-Yo IR1 e sendo associada moderadamente com os dados capturados durante o jogo (GPS). Jogadoras realizaram três cargas preditivas (100, 400 e 1500 metros) com

tempos médios de $13,8 \pm 0,6$ s, $1,24 \pm 0,06$ min e $7,25 \pm 0,39$ min e apresentaram VCrit de $3,2 \pm 0,3$ m/s (CLARKE et al., 2014). Essa avaliação física também foi aplicada respeitando à especificidade do basquetebol. Doze atletas foram avaliadas pela VCrit, quatro cargas preditivas (10,8, 12,0, 13,0, 14,5 km/h) foram executadas em *shuttle run* (vai-vem). As atletas apresentam nível de capacidade aeróbia de $10,3 \pm 0,2$ km/h e a capacidade anaeróbia estimada em $73,0 \pm 3,4$ m (CAMARGO et al., 2013). Na canoagem slalom, quatorze praticantes do sexo masculino da seleção brasileira realizaram quatro cargas preditivas de 150, 300, 450 e 600 metros em um lago. Por diferentes ajustes matemáticos (Hiperbólico, linear 1 e 2) a VCrit foi determinada. Os atletas apresentaram VCrit de $7,70 \pm 0,08$ km/h (Linear 1), $7,78 \pm 0,10$ km/h (Linear 2) e $7,54 \pm 0,10$ km/h (Hiperbólico). Além disso, capacidade de remada anaeróbica dos avaliados foi de $44,5 \pm 9$ m (Linear 1), $41,4 \pm 8,7$ m (Linear 2) e $51,3 \pm 14,3$ m (Hiperbólico). Os autores concluíram que a VCrit é um protocolo que pode ser utilizada para determinação de parâmetros aeróbios na canoagem e que os modelos matemáticos influenciam na determinação da VCrit (MESSIAS et al., 2015). No futsal as cargas preditivas da VCrit foram testadas em *shuttle run* (vai-vem) com a mesma perspectiva do estudo de CAMARGO et al. (2013). Os jogadores de futsal apresentaram capacidade aeróbia de $11,10 \pm 0,55$ km/h para o modelo matemático linear e $10,70 \pm 0,65$ km/h para o hiperbólico (MESSIAS et al., 2015). Em uma pista ao ar livre, doze jogadores de futebol (idade = $19,5 \pm 1,2$ anos; altura = $175,9 \pm 7,4$ cm; massa corporal = $71,7 \pm 10,1$ kg) executaram três cargas preditivas contra o tempo (1200, 2400, 3200 m) para a determinação do VCrit e CCA. Três modelos matemáticos foram utilizados para calcular a capacidade aeróbia e anaeróbia (*Linear Total Distance*, *Linear-Velocity* e *Nonlinear-2*). Além disso, o VO_{2max} dos jogadores também foi determinado por um teste de corrida máxima incremental até a exaustão. Associação positiva entre VCrit e o VO_{2max} relativo foi observada ($r = 0,744$, $p < 0,01$). Adicionalmente, a VCrit mostrou-se sensível para captar adaptações do treinamento de força e de futebol. Os Jogadores de futebol antes das sessões de treinamento apresentaram VCrit de 12,3 km/h e após a intervenção apresentaram VCrit de 13,5 km/h (KARSTEN et al., 2016).

Recentemente, verificou-se que a CCA pode ser utilizada como ferramenta para indicar desempenho de sprint repetido (RAST) e de resistência de sprint (sprint 800 m) em jogadores de futebol, enquanto a VCrit

é um ótimo preditor de capacidade aeróbia (ARİ et al., 2021) desses atletas. Questões relacionadas a metodologia do modelo de VCrit também foram alvo desse grupo de pesquisa. ARİ et al. (2021) examinaram as relações entre o desempenho no *Yo-Yo intermittent recovery level 1* e a VCrit aplicada de forma linear e com mudança de direção. Doze jovens jogadores de futebol com idade média de 17 ± 1 anos realizaram corridas máximas com duração de 6, 9 e 12 minutos em pista com trajeto linear ou com mudança de direção. Foi encontrada diferença significativa na CCA e a velocidade média de corrida entre o trajeto linear e o trajeto com mudança de direção ($p < 0,05$). Já a VCrit não foi afetada pela especificidade do trajeto. Além disso, os pesquisadores observaram uma associação entre a VCrit em linha reta e o desempenho do *Yo-Yo intermittent recovery level 1*. ($p < 0,05$). De forma semelhante, pesquisadores adicionaram movimentos não lineares e aproximaram a VCrit da realidade da modalidade. O protocolo foi aplicado em *shuttle run* (vai-vem) no campo de futebol em que os jogadores estavam acostumados a treinar. Os jogadores de futebol apresentaram em média uma VCrit de $3,1 \pm 0,4$ m/s para atletas não elite e $3,0 \pm 0,2$ para atletas de elite (DA CRUZ et al., 2022).

3.2 Alterações metabólicas no Futebol

Devido a característica intermitente do futebol os indivíduos praticantes realizam esforços acíclicos e cíclicos repetidos com alta intensidade, intercalados por períodos de recuperação ativa e passiva. Nessas condições, diversas alterações fisiológicas e metabólicas agudas e a longo prazo são esperadas devido ao nível significativo de estresse ao qual o corpo é sujeito (CARLING et al., 2018). Sabendo disso, o conhecimento e o entendimento das respostas fisiológicas e metabólicas dos praticantes, principalmente dos atletas de alto rendimento dessa modalidade tem grande importância. Em uma revisão, BANGSBO et al. (2007) discutiram as respostas metabólicas agudas durante uma partida de futebol. Os autores estabeleceram que frequência cardíaca média está em torno de 85% dos valores máximos, o consumo médio de oxigênio está acerca de 70% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ e a concentração média de lactato sanguíneo gira entre 2 a 10 mM. Afirmaram também que logo após períodos de exercício intenso, os níveis de creatina-fosfato diminuem. Ao final dos jogos o ATP muscular e o glicogênio estão em menores concentrações em relação

ao repouso. Além disso, os níveis de glicose, ácidos graxos livres e hormônios também foram declarados alterados. Em relação ao monitoramento das variáveis metabólicas a longo prazo, SILVA et al. (2007) aplicaram 8 semanas de treinamento em jogadores profissionais de futebol. Os pesquisadores visualizaram elevação na concentração de lactato sanguíneo no TLM, provavelmente devido ao aumento na capacidade e eficiência de transporte lactato / H^+ no músculo esquelético. Além da elevação na concentração de lactato, parâmetros hematológicos também foram alterados, havendo acréscimo significativo na concentração de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (SILVA et al., 2008). Os mesmos autores em outro estudo, notaram o aumento nos níveis de creatinina sérica em conjunto com a queda de vigor e desempenho da equipe no momento final da preparação física (SILVA et al., 2008). Atualmente, cerca de uma década depois da produção dos estudos supracitados, os fisiologistas do esporte ainda buscam pela produção de novos conhecimentos que expliquem as lacunas associadas a recuperação e ao processo de fadiga dos atletas (NÉDÉLEC et al., 2012; NÉDÉLEC et al., 2015; REY et al., 2018; CARLING et al., 2018; NOWAKOWSKA et al., 2019). É possível incluir aqui a busca de biomarcadores relacionados com a carga de treinamento (DJAOUI et al., 2017).

3.2.1 Avaliações de biomarcadores no futebol: Bioquímica tradicional

Os esforços empenhados para compreender as alterações metabólicas no futebol possibilitaram a descoberta de novos biomarcadores. Esses biomarcadores são utilizados para monitorar a fadiga, diminuir o risco de lesões e demarcar adaptações após sessões de treinamento. Parâmetros e biomarcadores como hemograma completo, incluindo contagem de eritrócitos, leucócitos, linfócitos, trombócitos, hemoglobina e hematócrito (Sysmex K-1000, Sysmex, Norderstedt, Alemanha), aspartato aminotransferase (medição da atividade enzimática, AST, MDH, teste óptico), alanina aminotransferase (medição da atividade enzimática, ALT, LDH, teste óptico), CK (medição da atividade enzimática, CK, HK, G6PDH, teste óptico), creatinina (método de Jaffé, medição cinética), ureia (teste de urease-GLDH-UV), ácido úrico (método da uricase de acordo com Trinder), colesterol total (método inteiramente enzimático de acordo com Trinder), HDL-colesterol (fotometria,

2ª e 3ª geração), LDL-colesterol (fotometria, 3ª geração), sódio (potenciometria, eletrodo seletivo de íons), potássio (potenciometria, eletrodo ion-seletivo), magnésio (fotometria de complexos de magnésio, Calmagit) ferritina, (imunoensaio enzimático), proteína C reativa (imunoturbidimetria, PCR) e hormônio estimulador da tireoide (imunoensaio enzimático) tornaram-se parte dos exames laboratoriais cotidianos aplicados em atletas de elite de futebol (MEYER e MEISTER, 2011; NOWAKOWSKA et al., 2019). No entanto, a maioria dos estudos utilizaram a bioquímica tradicional para determinar marcadores biológicos específicos (DJAOUI et al., 2017). Embora a bioquímica tradicional tenha viabilizado o avanço no conhecimento dos biomarcadores sobre os processos fisiológicos no futebol, essas abordagens tradicionais são reducionistas e limitadas quando o objetivo é buscar uma resposta global e integrada das perturbações metabólicas. Sabendo da complexidade do futebol, a biologia de sistemas se torna uma estratégia interessante para investigar a fisiologia dos atletas. Essa estratégia objetiva fornecer uma perspectiva ampla e integrada das vias metabólicas de um organismo (NIELSEN e LEE, 2012). As ciências ômicas está localizada dentro desse ramo.

3.3 Ciências ômicas

Pesquisadores do exercício utilizam essa abordagem em busca de respostas inovadoras pautadas na multidisciplinaridade. Dentro desse contexto, a aplicação das ciências ômicas ao exercício possibilitou novas oportunidades para elucidar a complexidade dos sistemas fisiológicos dos praticantes e atletas (HOFFMAN, 2017), uma vez que o sistema biológico do corpo humano é extremamente complexo e sua resposta adaptativa frente ao exercício físico é pouco compreendida em esfera integrada.

Nesse sentido, pesquisas relacionadas ao esporte de elevado rendimento passaram a introduzir essa abordagem como uma nova perspectiva para estudos envolvendo atletas de elite, em cenários de esforços físicos agudos e crônicos. A abordagem *sportomics* teve início em 2008 (BESSA et al., 2008) e o termo foi utilizado pela primeira vez em 2011 (RESENDE et al., 2011). Essa abordagem faz uso da combinação entre as técnicas laboratoriais tradicionais com novas tecnologias analíticas. Tem como objetivo principal avaliar moléculas em condições reais ou simuladas no

esporte (BASSINI e CAMERON, 2014). Ou seja, o conhecimento gerado por essa vertente, pode ser convertido em benefícios para os atletas de alto rendimento esportivo, podendo influenciar positivamente na prescrição do treinamento, nos hábitos alimentares, em período recuperativo após treinamento e na prevenção e recuperação de lesões.

Após a descoberta do DNA (WATSON e CRICK, 1953) houve o aparecimento e crescimento exponencial de pesquisas envolvendo a temática. ADAMS et al. (1991) afirmaram em seu estudo que a abordagem visando a caracterização do DNA poderia vir a contribuir com a identificação da maioria dos genes humanos em poucos anos. A partir do sequenciamento genômico completo, portas se abriram para a descoberta de novos marcadores genéticos que serviram para auxiliar pesquisas em diversos campos da biologia. Com o início dessas abordagens, houve o surgimento das ciências ômicas. O termo “ômica” refere-se a uma linha de pesquisa na qual são subdividas em genômica, transcriptômica, proteômica, lipidômica e metabolômica (**Figura 3**).

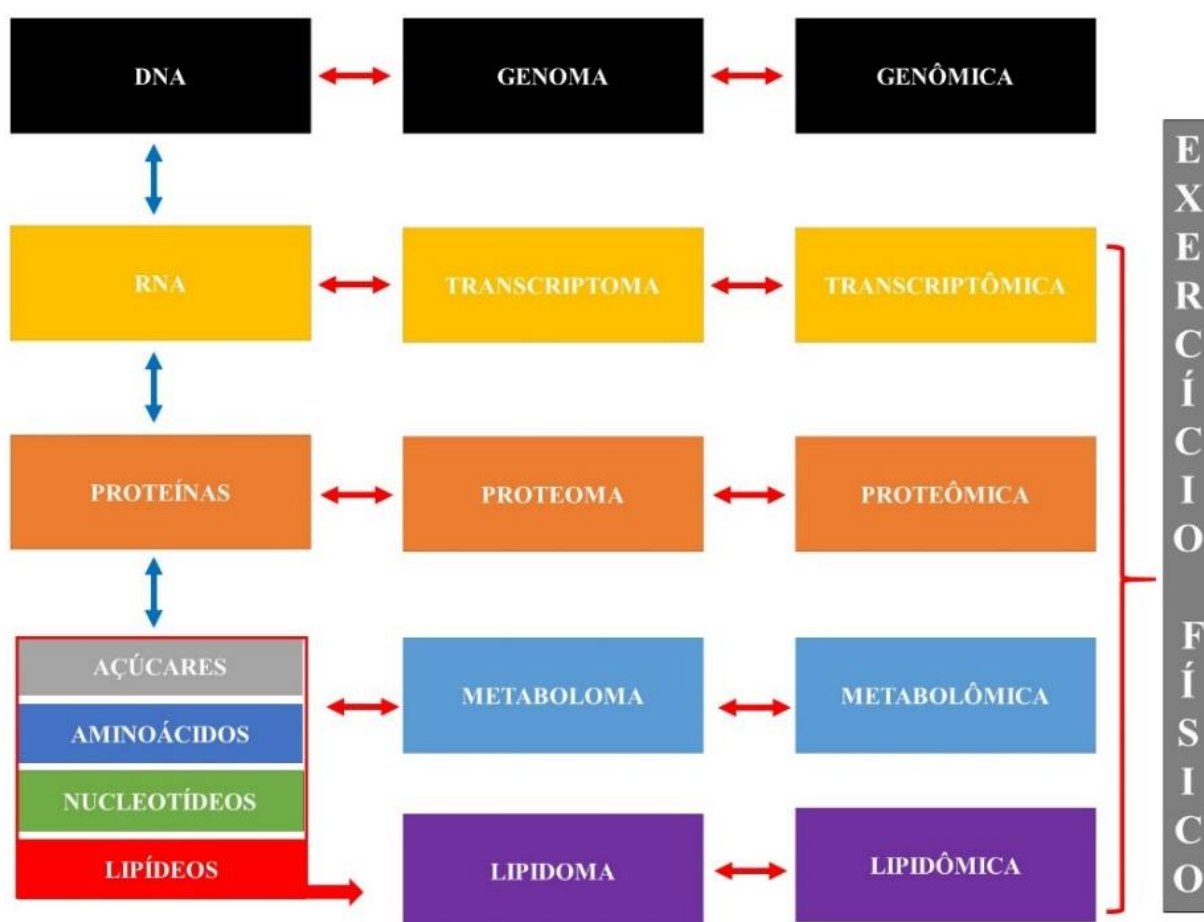


Figura 3. Tecnologias ômicas, moléculas alvo de estudo e exercício físico considerado como fenótipo ambiental.

3.3.1 Ciências ômicas: Genômica

O Genoma é definido como toda informação genética hereditária de um organismo que está codificada em seu DNA. Isto inclui tanto os genes como as sequências não-codificadoras. Mais especificamente, a genômica é a ciência que estuda a estrutura, função, evolução e o mapeamento dos genomas. Visa também a caracterização e quantificação dos genes. Como marco inicial da genômica considera-se a descrição dos primeiros genomas virais, (*Bacteriófago phi X 174*) (SANGER et al., 1977), primeira bactéria, (*Haemophilus influenzae*) (FLEISCHMANN et al., 1995), primeiro eucarioto, (*Saccharomyces cerevisiae*) (GOFFEAU et al., 1996), primeiro animal, (*Caenorhabditis elegans*) (SCIENCE, 1998), primeira planta, (*Arabidopsis thaliana*) (KAUL et al., 2000), primeiro patógeno de plantas, (*Xylella fastidiosa*) (SIMPSON et al., 2000) e o sequenciamento completo do genoma humano (OTA et al., 2004), extremamente relevante para evolução das ômicas em seres humanos. O conhecimento científico gerado por essa linha de pesquisa é diversificado. Existem aplicações na agricultura, (GOFF et al., 2002; YU et al., 2002; INTERNATIONAL, 2005; EDWARDS e BATLEY, 2010), em estudos históricos das espécies que habitavam o planeta (MILLER et al., 2008) e no auxílio da sobrevivência de aves sob ameaça de extinção (LI et al., 2014). Nos seres humanos a genômica desempenha papel extremamente importante para compreensão da evolução da espécie. Investiga fatores que moldaram o genoma ao decorrer do tempo (LALAND et al., 2010) e busca a compreensão de fenômenos fisiológicos em torno da longevidade humana (SLAGBOOM et al., 2011; BUDOVSKY et al., 2013; DEELEN et al., 2014). Essa abordagem também gera positivas contribuições no desenvolvimento de tratamentos alternativos contra o câncer (GLINSKY, 2008; KATOH et al., 2013; SAMEEK e CHINNAIYAN, 2014; KADOCH e CRABTREE, 2015).

Nas últimas décadas, propostas utilizando a genômica como ferramenta analítica para sanar questionamentos atrelados ao exercício gerou impacto significativo na ciência do esporte. NORTH e BEGGS (1996) relataram pela primeira vez a variante nula comum do gene ACTN3. Posteriormente, YANG et al. (2003) sugeriram uma associação do polimorfismo com o desempenho esportivo, apontando grande potencial do gene como preditor de desempenho em atletas de elite. A partir desse conhecimento, outros estudos afirmaram que a presença da α -actinina-3 influencia o desempenho de força e potência.

Quando há ausência da forma funcional da α -actinina-3 (polimorfismo ACTN3), o organismo tende a regular a utilização de substratos energéticos durante o exercício, priorizando o metabolismo oxidativo. Essa tendência afeta positivamente a recuperação do glicogênio muscular, favorecendo o desempenho em atividades de longa duração (NIEMI e MAJAMAA, 2005; EYNON et al., 2009). No esporte de alto rendimento, a genômica vem auxiliando no desenvolvimento de métodos para identificação de talentos. AHMETOV e FEDOTOVSKAYA (2015) mostraram que há, pelo menos, 120 marcadores genéticos relacionados com o desempenho de atletas de elite, sendo 77 desses associados com exercício de longa duração e 43 relacionados à força e potência. Posteriormente AHMETOV et al. (2016) atualizaram a lista para 155 biomarcadores genéticos com associação ao desempenho esportivo dos atletas de elite, sendo 93 marcadores relacionados com característica de exercício de longa duração e 62 à força e potência. Visto o potencial promissor da genômica, os fisiologistas do futebol seguiram com investigações sobre os polimorfismos e afirmaram que jogadores de futebol de elite tendem a ter um genótipo orientado para potência e força (JUFFER et al., 2009). Seguindo a linha de raciocínio, KAMBOURIS et al. (2014) traçaram o perfil do DNA genômico de jogadores de futebol de elite. Os autores associaram o perfil dos jogadores com o desempenho esportivo (capacidade de resistência e desempenho muscular), suscetibilidade a lesões ósseas e de tendão, com o índice de massa corporal e com os aspectos nutricionais. Ao final do estudo, os pesquisadores relataram quais as vantagens genéticas devem ser exploradas e quais barreiras genéticas devem ser superadas. Essa temática tem papel em auxiliar o atleta a maximizar a utilização de seu potencial e melhorar o desempenho na modalidade. Além da caracterização do perfil genético dos jogadores de futebol, essa ferramenta vem auxiliando pesquisas com objetivo de encontrar novos biomarcadores. Por exemplo, os polimorfismos encontrados nos genes de fator de crescimento em hepatócitos têm importante papel como biomarcador da fragilidade dos processos biológicos relacionados com as lesões musculares. Esse biomarcador está atrelado à taxa de lesão, gravidade e longo tempo de recuperação (PRUNA et al., 2017). Esses biomarcadores podem ajudar a prevenir ou minimizar os riscos de lesões musculares.

3.3.2 Ciências ômicas: Transcriptômica

O transcriptoma é definido como o conjunto total de transcrições realizadas pela RNA polimerase. Corresponde a fração do código genético (DNA) de uma célula, tecido ou organismo, constituindo o conjunto de todas as moléculas de ácidos ribonucleicos (RNA) (WANG et al., 2009). A transcriptômica é a ciência responsável por estudar os RNA mensageiros (possuem informações genéticas que codificam a sequência de aminoácidos das proteínas), RNA ribossômicos (localizados nos ribossomos e efetuam importante papel durante síntese proteica), RNA transportadores (identificam e transportar os aminoácidos até o ribossomo, tendo papel fundamental na síntese proteica) e micro RNA (atuam como silenciadores pós-transcricionais). Assim como todas as ômicas, a transcriptômica apresenta vasta área de aplicação e tem como fundamentos principais o reconhecimento de todos os RNA expressos em uma célula, tecido ou organismo (MOROZOVA e MARRA, 2008). Na agricultura a vertente é comumente utilizada em estudos envolvendo o arroz (LU et al., 2010), a pimenta (LIU et al., 2013), o milho (HANSEY et al., 2012). Devido à importância e as vantagens do modelo animal, os camundongos, em conjunto com a transcriptômica, são utilizados para estudar os mecanismos relacionados com a morte das células ganglionares da retina causadora do glaucoma (YASUDA et al., 2014).

A transcriptômica quando é aplicada em humanos, auxilia na elucidação de problemáticas envolvendo doenças complexas, tais como diabetes (XIN et al., 2016), doenças neurológicas (LIN et al., 2011), doenças neurodegenerativas relacionadas com traumatismo craniano (CHO et al., 2020), diferentes casos de câncer (MACRAE et al., 2013) e na identificação de biomarcadores para diagnóstico molecular de doenças (LI et al., 2004; SIEMELINK e ZELLER, 2014). Contribui também em aspectos menos graves como distúrbios do sono (ARCHER et al., 2014), caracterização de polimorfismos (ROSTOKS et al., 2005; TRICK et al., 2009; FISCHER et al., 2015), na determinação das diferenças sexuais (LINDHOLM et al., 2014) e no exercício físico.

O exercício físico provoca alterações dinâmicas na transcrição do gene, estimulando diversas proteínas quinases e vias de sinalização celular. Estímulos repetidos de treinamento reforçam as adaptações transcricionais dos tecidos em resposta ao esforço físico. Em conjunto, os efeitos agudo e

crônico do exercício rearranjam o perfil do transcriptoma. Essas modificações englobam biomarcadores atrelados com benefícios para a saúde. Em artigos prevalentes nessa área, pesquisadores descobriram novos *insights* sobre indivíduos obesos portadores de diabetes tipo 2 submetidos ao treinamento de força ou *endurance* (ROWLANDS et al., 2014). Reforçando o efeito que o exercício exerce, um estudo demonstrou que houve regulação do transcriptoma muscular durante a recuperação após realização de exercício de *endurance* (NEUBAUER et al., 2014). Antes e depois de uma corrida de longa distância, HICKS et al. (2019) avaliaram os níveis de RNA salivar. Os autores correlacionaram as concentrações de miRNA relacionados com os genes implicados endorfina, endocanabinóide e sinalização GABAérgica com os sintomas subjetivos e com as mudanças fisiológicas. Os resultados suportaram a ideia de que miRNA provavelmente atua como regulador do sentimento de euforia associado a ansiedade reduzida e menor capacidade de sentir dor relatada por atletas após longo período de exercício aeróbico. A suplementação proteica pós-exercício também foi abordada. Estudos comprovaram que essa intervenção alimentar foi capaz de regular algumas respostas adaptativas do músculo esquelético frente ao exercício de *endurance*, (ROWLANDS et al., 2011; ROWLANDS et al., 2016).

3.3.3 Ciências ômicas: proteômica

O termo proteoma teve origem em 1995 para se referir a uma porção de proteínas de um genoma (WASINGER et al., 1995) e atualmente faz alusão à soma de todas as proteínas em uma célula, tecido ou organismo (MALLICK e KUSTER, 2010), englobando as isoformas, modificações pós-traducionais e polimorfismos (NAIR et al., 2004; GRAHAM et al., 2005). As proteínas apresentam tarefas relacionadas ao controle de quase todas as funções biológicas. Existem inúmeros fatores, propriedades, condições celulares e ambientais que influenciam e determinam a expressão gênica e proteica (LARANCE e LAMOND, 2015). O processo da expressão gênica e tradução das proteínas não ocorre de maneira linear como proposto em modelos de livros didáticos. Existem diversos eventos que modulam a tradução e conseqüentemente as funções desempenhadas no proteoma (BANKS et al., 2000). Devido a sua diversidade e dinâmica, considera-se o proteoma muito complexo.

A Proteômica tem como principal objetivo investigar e elucidar tal complexidade de forma global, direcionada e integrada. Existem duas maneiras de desenvolver estudos em proteômica, aquelas sem alvo (*untargeted proteomic*) e com alvo (*targeted proteomic*). A proteômica sem alvo objetiva a cobertura do proteoma quase completa, ou seja, a identificação e/ou máxima quantificação possível de proteínas em um conjunto de amostras, enquanto a proteômica com alvo atua na mensuração de grupos definidos de proteínas quimicamente caracterizadas e bioquimicamente conhecidas. Para os estágios iniciais de uma pesquisa com o intuito de descobrir novos biomarcadores proteicos, o uso da abordagem sem alvo é mais aconselhado, ao passo que o uso da abordagem com alvo é recomendado para a validação e implementação dos biomarcadores (MEYER e SCHILLING, 2017; SOBSEY et al., 2020). A problemática em ênfase vai além do que simplesmente descobrir e catalogar novas proteínas, a proteômica busca identificar, quantificar e definir a estrutura e propriedades bioquímicas. Investiga também as funções e as interações proteína-proteína, evidenciando como as características do proteoma se alteram em diferentes contextos celulares ou em resposta a estímulos internos e externos (PANDEY e MANN, 2000).

As informações geradas por essa metodologia são aplicadas em diversas áreas e estudos multidisciplinares, contribuindo no conhecimento da biologia básica (ANDERSON et al., 2000) e em pesquisas envolvendo plantas (BAGINSKY, 2009). Em humanos, a proteômica tem aplicações diversificadas, sendo que essa ferramenta contribui para estudos envolvendo epidemiologia genética (SELLERS e YATES, 2003), pesquisas sobre o sistema renal e urinário (THONGBOONKERD e MALASIT, 2005; GÜNTHER et al., 2014; SONG et al., 2020), no tratamento e prevenção de diversos tipos de cânceres (WEI et al., 2013; MACKLIN et al., 2020; ZHU et al., 2020) e diabetes tipo 2 (ZOU et al., 2020).

Essa abordagem também é aplicada na área da fisiologia do exercício. O exercício é um fator estressor que causa modificações na expressão de proteínas e alterações pós-tradução (AL-KHELAIFI et al., 2018). Em uma revisão de literatura, BURNISTON e HOFFMAN (2011) afirmaram que a proteômica ainda está dando os primeiros passos para compreender as adaptações agudas e crônicas na expressão das proteínas no organismo frente ao exercício físico. Dentro dessa revisão, os autores mostraram as

adaptações das proteínas presentes no músculo esquelético em relação ao esforço agudo e crônico. O estímulo agudo pode modular proteínas relacionadas com glicólise, glicogenólise, metabolismo de fosfato de alta energia, metabolismo lipídico, β -oxidação, regulação transcricional, proteínas sarcômicas e chaperonas. O estímulo crônico de *endurance* gera adaptações nas proteínas relacionadas com a glicólise, glicogenólise, ciclo do ácido tricarboxílico, cadeia de transporte de elétrons, metabolismo lipídico, β -oxidação e metabolismo de fosfato de alta energia. Os autores também relataram estudos que mostraram adaptações proteicas cardíacas frente a diferentes estímulos de exercício. Ou seja, a prática regular de atividade física gera resultados positivos na capacidade aeróbia, promovendo efeito protetor contra doenças cardiometabólicas. Em outro estudo proteômico, mais de 4.000 proteínas foram quantificadas, e ao final os autores afirmaram que manter um estilo de vida ativo diariamente pode proteger o músculo esquelético do envelhecimento (UBAIDA-MOHIEN et al., 2019). Os projetos envolvendo proteômica e exercício físico, até o momento, estão concentrados principalmente no mapeamento das adaptações do proteoma do músculo esquelético após sessões de exercício agudo e de longa duração (PETRIZ et al., 2016).

A proteômica vem ajudando a desvendar a dinâmica integrada das proteínas em resposta ao exercício físico. Deslumbrando o potencial dessa abordagem, fisiologistas do futebol buscaram identificar e quantificar proteínas presentes no plasma de jogadores profissionais e recreativos de futebol. Além disso, os autores mediram o estado inflamatório dos jogadores em resposta ao programa de treinamento. Após investigação, os autores concluíram que jogadores profissionais, em relação aos jogadores recreativos, apresentaram menor concentração de proteínas no plasma relacionadas ao estado inflamatório, oxidativo e de trombose (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2011). Em outro estudo, as alterações no proteoma urinário frente a uma sessão de HIIT também foi estudada. Com perspectiva multi-ômica, ZHAO et al. (2020) integraram a proteômica e a metabolômica para estudar os efeitos de uma sessão de HIIT em jogadores de futebol. Os autores visualizaram alterações na expressão de proteínas das vias metabólicas envolvidas com metabolismo energético, estresse oxidativo e vias imunológicas.

3.4 Ciências ômicas: metabolômica e lipidômica

O metabolismo é muito instável e sensível a uma série de processos internos e externos (perturbações genéticas, condições fisiológicas, estado nutricional, intensidades de exercício) (MO et al., 2009). Os metabólitos apresentam baixo peso molecular (<1500 Daltons) e são os produtos intermediários ou finais dos processos essenciais do metabolismo, como produção de energia, estocagem, transdução de sinais e apoptose (FIEHN, 2002; DUNN et al., 2011; JOHNSON et al., 2016). Os metabólitos são compostos heterogêneos que apresentam diversas características físico-químicas. Normalmente são classificados como moléculas não polares hidrofóbicas (ácidos graxos e lipídios de membrana) ou moléculas polares hidrofílicas (aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos e compostos fosforilados) (AU, 2018). O agrupamento de todos os metabólitos presentes em uma célula, tecido, órgão ou organismo biológico é denominado metaboloma. (OLIVER et al., 1998). O metaboloma é estudado pela metabolômica e, por definição, é a ciência que tem como principal objetivo responder perguntas voltadas aos processos químicos envolvendo os metabólitos (FIEHN, 2002; DUNN et al., 2011; GORROCHATEGUI et al., 2016; KLASSEN et al., 2017). Mais especificamente, busca evidências químicas estabelecidas pelas reações celulares durante sua função. Ou seja, é o estudo dos perfis de metabólitos em situações comparativas de grupos submetidos a distintas abordagens como terapias, níveis de estresse, modulação alimentar, doenças, exercício físico (ROWLANDS et al., 2014; HOANG et al., 2019; BELHAJ et al., 2021). Considerando que as outras ciências ômicas (genômica, transcriptômica e a proteômica) ofertem *insights* relacionados ao que pode acontecer dentro de um organismo biológico, a metabolômica proporciona informações instantâneas sobre o fenômeno, de modo a indicar o que está acontecendo atualmente ou o que ocorreu recentemente no organismo biológico (RIEKEBERG e POWERS, 2019; SINCLAIR e DUDLEY, 2019).

Uma subárea da metabolômica responsável por estudar os lipídios é denominada lipidômica (**Figura 3**) (HAN, 2016). O lipidoma é definido como o conjunto das diferentes classes de lípideos das células, tecidos, órgãos ou organismos biológicos (SEPPÄNEN-LAAKSO e ORESIC, 2009). Os lípideos presentes no lipidoma são moléculas orgânicas insolúveis em água, formadas

a partir da associação entre ácidos graxos e álcool. Apresentam também papel diversificado dentro das células, exercendo funções na sinalização celular como primeiro e segundo mensageiros, no transporte de proteínas, no controle dos gradientes eletroquímicos, em componentes da membrana e no estoque de energia (RIETVELD et al., 1995).

Existem duas maneiras de desenvolver estudos em metabolômica e lipidômica, aquelas sem alvo (*untargeted metabolomic; untargeted lipidomic*) e com alvo (*targeted metabolomic; targeted lipidomic*). A metabolômica e lipidômica sem alvo objetiva a cobertura total do metaboloma ou lipidoma, permitindo a identificação e/ou quantificação da maior quantidade de metabólitos ou lipídeos possíveis em um conjunto de amostras. Enquanto a abordagem com alvo atua na mensuração de grupos definidos de metabólitos ou lipídeos quimicamente caracterizados e bioquimicamente conhecidos. Para os estágios iniciais de uma pesquisa com o intuito de descobrir novos biomarcadores, o uso da abordagem sem alvo é mais aconselhado, ao passo que o uso da abordagem com alvo é recomendado para a validação e implementação (GORROCHATEGUI et al., 2016; HAN, 2016; KLASSEN et al., 2017).

No momento atual, a *Human Metabolome Database* (HMDB) é responsável por descrever todos os metabólitos já reportados na literatura. Apresenta 114.304 moléculas com característica que variam desde as mais hidrofílicas às mais lipofílicas. Segundo o HMDB, atualmente são detalhados 25.789, 4.730 e 1.245 metabólitos referentes ao sangue, urina e saliva, respectivamente. Dessa forma, o sangue é o principal material biológico quando o objetivo é alcançar um espectro maior de metabólitos (ALZHARANI et al., 2020).

3.4.1 Fundamentos da análise metabolômica e lipidômica

As análises metabolômica e lipidômica exigem cuidados minuciosos em todas as etapas (**Figura 4**).

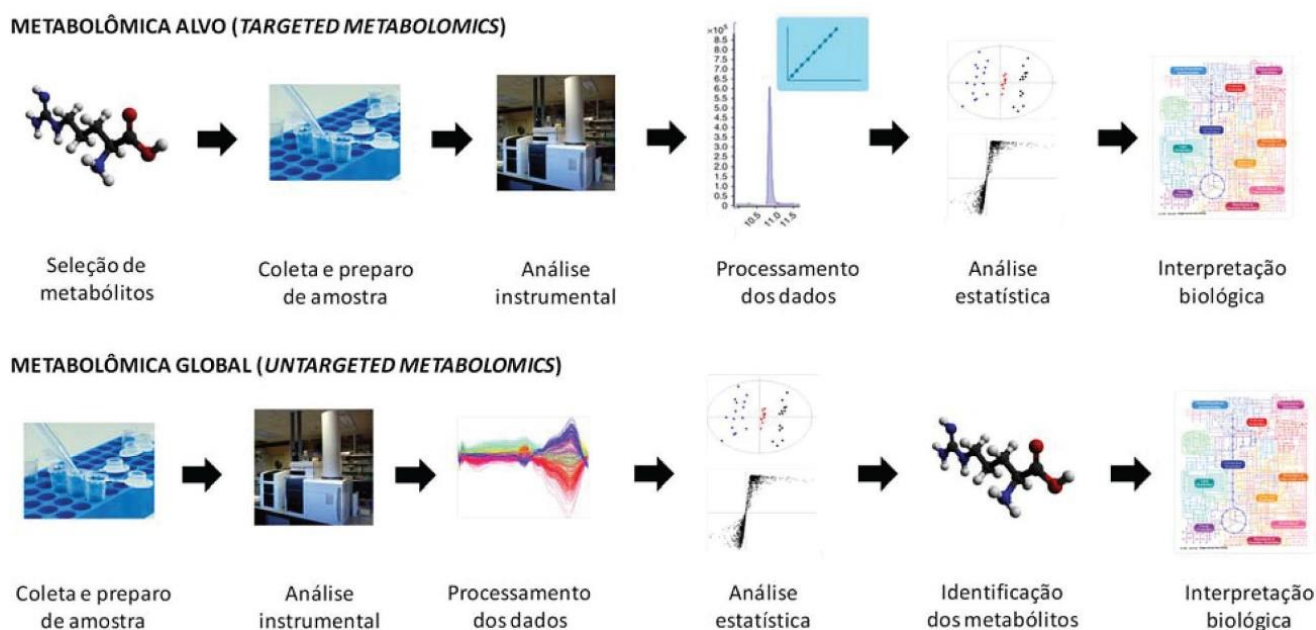


Figura 4. Fluxograma de trabalho resumido envolvendo a análise metabolômica após definição do problema biológico (CANUTO et al., 2018).

A etapa de coleta e preparação das amostras são extremamente críticas, uma vez que muitos vieses podem ser introduzidos, podendo alterar a composição metabólica ou lipídica da amostra biológica (BI et al., 2020). Seguindo o fluxograma de trabalho proposto por CANUTO et al. (2018), durante a fase de coleta das amostras, o *quenching* é fundamental para evitar degradação dos metabólitos. Para a realização do *quenching*, geralmente o nitrogênio líquido é utilizado imediatamente. Em seguida, as amostras são armazenadas em freezers -80°C para a preparação e análise.

Em cada abordagem é necessário a realização de um método de preparação de amostra específica. A amostra deve ser minimamente preparada para metabolômica e lipidômica sem alvo, visando a separação dos metabólitos polares e apolares. Os métodos geralmente utilizados para extração dos lipídeos e outros metabólitos das amostras são: Bligh-Dyer constituído por uma mistura de clorofórmio e metanol (BLIGH e DYER, 1959), Matyash formado por metanol frio, éter metil terc-butílico (MTBE) e água (MATYASH et al., 2008) e Folch, um protocolo de extração composto por clorofórmio, metanol e água (FOLCH e LEES, 1957). Para método com alvo, é necessário a preparação que selecione os metabólitos e lipídeos de interesse. Concomitantemente na fase da preparação das amostras, misturas nomeadas de controle de qualidade (QC), contendo todas as amostras, precisam ser preparadas. Essas amostras auxiliam na avaliação do desempenho e na estabilidade instrumental durante a aquisição de dados

(DUNN et al., 2012; GORROCHATEGUI et al., 2016; KLASSEN et al., 2017; BROADHURST et al., 2018).

Após a preparação, as amostras são analisadas por diferentes equipamentos. Em relação as técnicas analíticas sofisticadas, a *Liquid Chromatograph Mass Spectrometer* (LC-MS), *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), *Gas Chromatography Mass Spectroscopy* (GC-MS) e *Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry* (CE-MS) são, atualmente, as mais aplicadas na metabolômica e na lipidômica (MOCO et al., 2007; LI et al., 2014; DJUKOVIC et al., 2020; SEGERS et al., 2020; WALLACE et al., 2020). Em especial, a LC-MS é a junção entre duas técnicas analíticas, a cromatografia e a espectrometria de massas (MS).

Os métodos cromatográficos de análise estão entre as grandes técnicas de separação, em especial na análise de moléculas presentes em matrizes complexas, tais como produtos naturais e fluidos biológicos (TOUCHSTONE, 1993). Apesar de ser uma exímia ferramenta de separação, quando a validação da identidade química e a análise qualitativa é necessária, o auxílio de uma técnica confirmatória se torna imprescindível.

Entre as técnicas confirmatórias presentes na atualidade, a MS é a ferramenta com melhor desempenho para fornecer informações estruturais necessárias. A MS tem o seu princípio baseado na razão massa/carga (m/z), conseguindo rastrear e detectar os íons de forma qualitativa e quantitativamente. No século XX, aproximadamente nos anos de 1980 e 1990, o surgimento de métodos de ionização para substâncias biológicas com pesos moleculares altos possibilitou a determinação de muitos elementos presentes em uma amostra biológica em apenas um único experimento (LU et al., 2008; KUMAR et al., 2016). A popularização de ambas as técnicas demonstrou aos pesquisadores o potencial de cada ferramenta e as vantagens do acoplamento. A **Figura 5** mostra o acoplamento da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) com a MS.

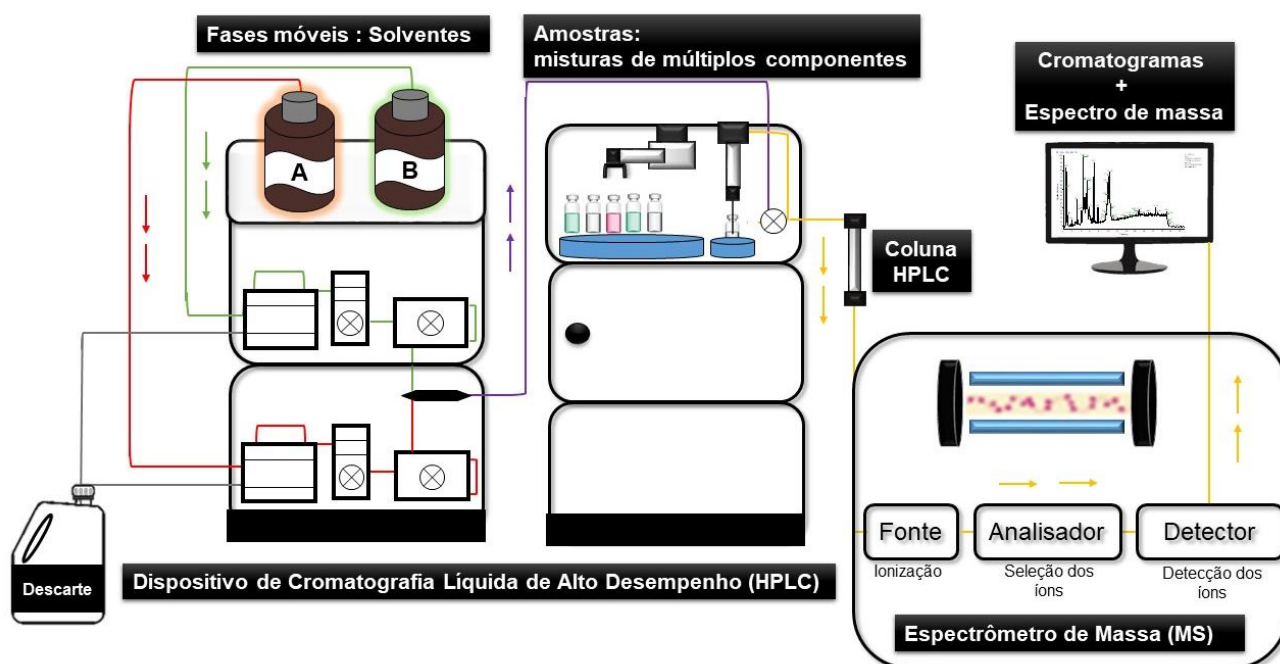


Figura 5. Layout resumido do acoplamento da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) com o Espetrômetro de Massa (MS).

As fases móveis, ficam reservadas em frascos de vidro específicos no HPLC. Com o início do procedimento, a bomba de alta pressão impulsiona ou aspira a fase móvel para dentro do cromatógrafo. De acordo com a programação utilizada, o gradiente da fase móvel é formado. No meio do caminho, a amostra de interesse é injetada por um amostrador automático em conjunto com a fase móvel. Essa mistura é encaminhada em direção a coluna HPLC, onde ocorre a interação entre os compostos presentes na amostra com a fase estacionária da coluna. Essa interação promove a separação dos compostos. Após isso, o efluente da coluna é direcionado para a fonte de ionização do MS. Existem diversos modelos de fonte de ionização como Electrospray, Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI), etc (EL-ANEED et al., 2009). Cada modelo, com suas particularidades, apresentam o mesmo objetivo que é gerar grande número de íons para permitir a identificação da substância em estudo. Após a ionização, o efluente da coluna cromatográfica ionizado é encaminhado para o analisador de massas sob vácuo. Distintos modelos de analisadores de massas são utilizados, como exemplos, os baseados em setores elétricos e magnéticos, analisadores de massas do tipo Quadrupolo, *Ion Trap*, Tempo de Voo (BERGER et al., 2004). Todos apresentam diferenças, mas a função de separar os íons de acordo com a razão m/z é a mesma. Os íons são encaminhados para o detector após passarem pelo analisador. Esse setor é

responsável por identificar os íons e sua abundância gerando um espectro individual. Esses espectros são armazenados em um computador que posteriormente efetua os cálculos por *software* específico.

A espectrometria de massa em tandem (MS/MS) é utilizada quando compostos analisados apresentam valores m/z idênticos. Nesse momento da análise, os íons precursores intactos ou íons já fragmentados durante MS são fracionados em pequenos íons, fornecendo características estruturais adicionais sobre um determinado composto e, assim, aumentando a capacidade de distinguir e identificar os compostos (PITT, 2009; ZHOU et al., 2012).

A análise metabolômica e lipidômica constituem dados extremamente extensos e complexos, tornando necessário o uso de ferramentas adequadas para o tratamento dos dados, a fim de evitar erros e garantir a veracidade dos resultados. Após a aquisição, os dados brutos de intensidade de pico são submetidos a processamentos que possibilitam análises adicionais futuras. O processamento de dados tem etapas diversificadas, como a conversão de picos brutos em matrizes de dados, filtragem de ruído, correção de tempo de retenção, alinhamento de cromatograma, detecção de pico, normalização de dados e extração dos íons. Esse processamento dos dados pode ser realizado no *software* XCMS versão online (SMITH et al., 2006). Logo após essa etapa, os dados são processados para filtrar os íons correspondentes a maioria das amostras, normalizados, redimensionados, centralizados para colocar todas as amostras e variáveis em uma escala comparável para construção de modelos multivariados ou univariados. Os métodos de análise estatística multivariada (*Principal Component Analysis* – PCA, *Partial Least Squares Discriminant Analysis* – PLS-DA e *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis* – OPLS-DA) e análise univariada (ANOVA, teste t de *Student*, ou U de Mann-Whitney) são comumente empregues no corpo de dados afim de organizar e extrair conhecimento científico (SUGIMOTO et al., 2012). Nesse caso, os dados podem ser preparados no *software* *Metaboanalyst* 5.0 versão online (XIA et al., 2015; XIA et al., 2016).

Além da análise estatística, a identificação dos metabólitos e a interpretação biológica são análises fundamentais para responder as perguntas em pauta e gerar novos questionamentos sobre organismo estudado. O processo de identificação consiste em combinar os espectros presentes na amostra com os armazenados em bibliotecas e bancos de dados

disponíveis (METLIN, HMDB, ou LIPID MAPS) (NAZ et al., 2014; HUAN et al., 2017).

3.4.2 Aplicações da análise metabolômica e lipidômica

Tendo consciência da importância e do impacto na comunidade científica, investigações metabolômicas e lipidômicas são frequentemente aplicadas na agricultura (TAYLOR et al., 2002; DIXON et al., 2006; RIGHETTI et al., 2018; FENG et al., 2020), ecologia (JONES et al., 2013; KOELMEL et al., 2020), ambiental e botânica (WELTI et al., 2007; HORN e CHAPMAN, 2014; SAMPAIO et al., 2016). Na biologia celular, ambas técnicas fornecem suporte no entendimento do papel vital dos metabólitos e lipídeos dentro da célula animal, especialmente no transporte da membrana e na sinalização celular (ZHANG et al., 2013). Além de estudos com a biologia básica, tanto a metabolômica quanto a lipidômica têm contribuído com resultados relevantes em pesquisas aplicadas na biologia humana.

Fazendo uso de células humanas e animais, estudos optaram pela abordagem metabolômica para identificar biomarcadores em resposta a intervenções com fármacos, drogas, etc (ČUPERLOVIĆ-CULF et al., 2010; ARTATI e TOKARZ, 2020). Essa vertente também é aplicada em áreas da medicina. A oncologia e cardiologia utilizam a metabolômica para desenvolver métodos de detecção de biomarcadores e diagnóstico precoces de câncer e doenças cardíacas (LEWIS et al., 2008; SPRATLIN et al., 2009; BEGER, 2013; SINCLAIR e DUDLEY, 2019). Na medicina de precisão, os resultados provenientes dessa técnica apontam novos alvos para medicamentos e auxiliam no monitoramento das respostas em intervenções terapêuticas (WISHART, 2016). Na mesma linha, a lipidômica também tem auxiliado a medicina. Na neurociência, essa ferramenta busca compreender de forma interativa o papel do lipídoma no cérebro (PIOMELLI et al., 2007). Na oncologia essa estratégia ajuda em prognóstico, diagnóstico e eficácia do tratamento contra o câncer (ARMITAGE e SOUTHAM, 2016; FARROKHI YEKTA et al., 2017).

Devido as informações relevantes obtidas em humanos, fisiologistas do exercício deslumbraram grande potencial de ambas as abordagens na ciência do esporte. As aplicações dessas ferramentas têm trazido benefícios tanto para área da saúde pública quanto para o desempenho esportivo de elite. A realização de pesquisas com base na metabolômica sem alvo possibilita que

as modificações sistêmicas do metaboloma e lipidoma sejam analisadas e confrontadas com situações clássicas investigadas pelos fisiologistas do exercício. Como exemplo, logo após uma sessão aguda de exercício ou após períodos de treinamento (HEANEY et al., 2017; HOFFMAN et al., 2017).

Em relação as sessões agudas de exercício, uma recente revisão de literatura interpretou 25 artigos originais. Todos envolviam a aplicação da metabômica e lipidômica em humanos e mamíferos. Os estudos selecionados destacaram as principais vias metabólicas impactadas pelo estímulo de exercício agudo. Resumidamente, os metabólitos que foram regulados após uma sessão de exercício foram os produtos finais da glicólise e intermediários do ciclo do ácido cítrico, acilcarnitinas, triacilgliceróis, corpos cetônicos, nucleotídeos e derivados, aminoácidos e derivados, vitaminas, hormônios esteroides. Assim como lipídios complexos menos caracterizados com várias funções, propriedades pró e anti-inflamatórias e propriedades vasoativas também foram modulados. De maneira geral os autores concluíram que a abordagem metabolômica e lipidômica na última década, possibilitou a identificação de centenas a milhares de metabólitos (incluindo espécies de lipídeos) em um único experimento. O volume elevado de metabólitos permitiu uma visão integrada do fenômeno. A partir disso, os estudos revelaram biomarcadores de capacidade e intensidade de exercício, estado de treinamento, fadiga, entre outros (BELHAJ et al., 2021). Com similaridade, a revisão proposta por SAKAGUCHI et al. (2019) contou com 24 estudos que descreveram alterações consideráveis em distintos lipídios. Após análise de todos os artigos, os autores afirmaram que o lipidoma tende a aumentar duas vezes ou mais depois de algumas horas após a execução de exercício físico. Mostraram também que lipídeos modificados voltam ao nível basal dentro de um dia de recuperação, mesmo se o indivíduo executar sessões de exercício com intensidade extenuante. Ainda sobre os efeitos agudos do exercício, na revista científica *Cell*, um artigo foi publicado abordando a resposta do metaboloma, lipidoma, imunoma, proteoma, e transcriptoma frente a uma sessão de exercício aeróbio agudo. Fazendo uso integrado das ciências ômicas, os autores visualizaram alterações em milhares de moléculas e um comportamento sincronizado dos processos biológicos foi formado envolvendo metabolismo energético, estresse oxidativo, inflamação, reparo de tecidos e resposta do fator de crescimento, bem como vias regulatórias. Os pesquisadores descobriram também as

principais vias biológicas relacionadas com a resposta ao exercício. Esse achado possibilitou o desenvolvimento de modelos de predição que revelaram biomarcadores em repouso presentes no sangue associados com o VO_2max (CONTREPOIS et al., 2020). Os atletas de alto rendimento também são investigados após uma sessão aguda de treinamento (HEANEY et al., 2017).

Embora a literatura, indubitavelmente, defenda a existência de efeitos agudos provenientes do exercício no metaboloma e lipidoma, muitas adaptações físicas se manifestam em períodos de semanas, meses, anos e décadas. Portanto, é importante compreender as alterações dos metabólitos e lipídeos associados a longo prazo. No presente estudo, os autores utilizaram modelo animal para realização dos experimentos. Logo após a aplicação de seis semanas de treinamento físico crônico e 12 semanas de uma dieta rica em gordura, as análises lipidômicas relevaram alterações qualitativas nos fosfolipídios, tanto para a dieta quanto para o exercício. Frente ao treinamento físico, os lipídios crônicos modificados foram a fosfatidilcolina contendo ácido linoléico e esfingomielina e fosfatidilcolina contendo ácido docosahexanóico (GOTO-INOUE et al., 2013). Já STARNES et al. (2017) realizaram um desenho experimental utilizando dois grupos de ratos, sedentário (controle) e treinados. O grupo treinado correu em uma esteira motorizada por 5 dias por semana, durante 6 a 7 semanas. Logo após, os pesquisadores analisaram os tecidos alvos (músculo esquelético plantar, sóleo, fígado, soro e coração) de ambos os grupos utilizando a abordagem metabolômica *untargeted* por GC-MS. O ácido cítrico, ácido isocítrico e ácido linoleico foram alterados no fígado e no músculo plantar. Os metabólitos hidrocarboneto C13, inosina, adenosina, frutose-6-fosfato, glicose-6-fosfato, ácido 2-aminoadípico, ácido heptadecanóico, ácido esteárico, alfa-tocoferol e ácido oleico foram alterados apenas no músculo plantar. Já as concentrações de ácido málico, serina, ácido aspártico, mioinositol, glutamina, ácido glucônico-6-fosfato, ácido glutâmico, pirofosfato, campesterol, ácido fosfórico e creatinina foram modificadas no coração em resposta ao treinamento físico. Tendo em vista todas as modificações no metaboloma devido ao exercício físico, os autores concluíram que o treinamento físico foi capaz de gerar adaptações no metaboloma em diversos tecidos além do músculo esquelético, indicando também comunicação dos processos biológicos entre os tecidos, além de reforçar os benefícios de longo alcance do exercício de *endurance* para os sistemas como um todo.

Embora o modelo animal forneça informações relevantes, aplicações utilizando a metabolômica e lipidômica em humanos se tornam importantes para o entendimento das alterações lipídicas e metabólicas frente ao exercício crônico. Nessa linha, KUEHNBAUM et al. (2015) aplicaram a metabolômica para estudar as respostas adaptativas de uma coorte de mulheres frente a intervenção de HIIT com duração de 6 semanas. Os autores visualizaram adaptações do metaboloma ao treinamento. Houve regulação positiva em repouso da L-carnitina plasmática devido à melhora da capacidade oxidativa muscular. A diminuição do dissulfeto misto de glutationil-L-cisteína circulante foi relacionado com a maior capacidade antioxidante. O declínio na hipoxantina plasmática e aumento da concentração de O-acetil-L-carnitina pós-exercício apontaram estresse energético reduzido para mulheres treinadas. Assim como as mulheres, pesquisadores se atentaram em investigar as adaptações metabólicas e lipídicas após treinamento físico em homens. Com duração de 80 dias, metaboloma e lipidoma de jovens saudáveis do sexo masculino foram avaliados. O metabolismo global dos participantes foi modificado drasticamente. Diversas classes de substratos metabólicos foram alteradas, incluindo lipídios, corpos cetônicos, metabólitos de arginina, endocanabinoides, nucleotídeos, marcadores de proteólise, produtos de oxidação de ácidos graxos, metabólitos originários do microbioma, biomarcadores de estresse e substratos de coagulação. Os substratos energéticos usados pelos músculos durante exercício (ácidos graxos e corpos cetônicos) foram reduzidos no plasma em resposta ao aumento da aptidão aeróbia dos avaliados. Os participantes que possuíam concentração elevada de ácido dimetilguanidino valérico após treinamento, apresentaram correlações positivas com aumento de gordura corporal, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL colesterol) e pressão arterial sistólica, por isso, o ácido dimetilguanidino foi apontado como biomarcador de má adaptação ao treinamento (KOAY et al., 2021). No geral, os resultados apresentados até então na literatura sugerem que o programa de treinamento físico gera adaptações nos lipídios e aminoácidos em modelo animal e humanos. Porém, além do exercício físico, outros fatores podem influenciar e interferir a homeostase do metaboloma e lipidoma de um organismo biológico.

Em uma revisão de literatura direcionada para experimentos em humanos, os autores discutiram a interferência de situações adversas como

condições climáticas, temperatura, vento e umidade. Além de considerarem respostas metabólicas devido a hábitos irregulares de sono e alimentação próximos à época do experimento em metabolômica (BASSINI e CAMERON, 2014). Além dessas variações, a idade e nível de treinamento são fatores que também pode influenciar na resposta do metaboloma frente ao exercício. Nesse contexto, MUKHERJEE et al. (2014) investigaram o comportamento das vias genéticas e metabólicas em participantes não treinados e atletas veteranos da mesma idade. Após os experimentos, os autores puderam afirmar que os dois grupos apresentaram variações distintas na expressão de genes e metabólitos envolvendo metabolismo energético, lipídios, sinalização de insulina e função cardiovascular. Abordando a importância da nutrição e suplementação para a saúde e melhora do desempenho esportivo em atletas, AL-KHELAIFI et al. (2018) estudaram o perfil dos metabólitos presentes no soro de atletas de elite de diversos esportes, com foco em xenobióticos potencialmente provenientes de suplementos nutricionais. Para isso atletas de futebol, atletismo, ciclismo, rugby, natação, boxe e remo foram avaliados. Fazendo uso da abordagem metabolômica *untargeted* com auxílio do HPLC-MS, foram identificados 102 xenobióticos, sendo 38% de produtos químicos e medicamentos, 27% de componentes alimentares, 17% de metabólitos de benzoato, 15% de metabólitos de xantina, 2% de metabólitos de tabaco e 1% de metabólitos bacterianos e fúngicos. Os autores puderam concluir que os perfis do metaboloma de atletas de diferentes esportes variam de acordo com o uso de suplementos, dieta e exposição a vários produtos químicos e que o conhecimento gerado pode contribuir futuramente para melhor avaliação e prescrição de suplementos alimentares em atletas.

De maneira geral, os artigos citados retrataram o estado da arte da aplicação da metabolômica no esporte, exercício e todas variáveis que podem influenciar as respostas do metaboloma (idade, intensidade de exercício, alimentação, sono etc). Como visto nas pesquisas, a metabolômica, lipidômica, exercício físico e esporte de alto rendimento vem sendo relacionados em distintos contextos, variando desde experimentos com modelo animal, até intervenções em atletas de alto rendimento esportivo em diferentes modalidades como atletismo, ciclismo, rugby, natação, boxe, remo e *halfpipe snowboarders*. Essa abordagem integrada estimula o caráter multidisciplinar da pesquisa científica. Podendo ser convertido em benefícios para os atletas de alto rendimento esportivo, podendo influenciar

positivamente a prescrição do treinamento, hábitos alimentares, período recuperativo após treinamento, prevenção e recuperação de lesões, intervindo diretamente no desempenho esportivo.

3.4.3 Aplicações da metabolômica no futebol

Ainda que a bioquímica tradicional venha possibilitando a progressão do entendimento dos biomarcadores sobre os processos fisiológicos no futebol, essa abordagem é limitada, quando o propósito do estudo é investigar as perturbações do metaboloma dos atletas de maneira global e integrada. Indagar o metaboloma (incluindo o lipidoma) é interessante para amplificar a compreensão dos sistemas biológicos complexos envolvidos no futebol, uma vez que o metaboloma reflete as mudanças cumulativas decorrentes dos processos envolvendo o genoma, o transcriptoma e o proteoma, bem como suas interações com o meio ambiente (exercício físico).

Tendo em vista essas informações, a metabolômica tem mostrado elevado potencial para responder questões integradas dentro da modalidade. Alguns pesquisadores aplicaram a metabolômica para questionar alguns aspectos do futebol. Devido a importância da nutrição e suplementação no desempenho esportivo, AL-KHELAIFI et al. (2018) traçaram o perfil dos metabólitos presentes no soro de atletas de elite de diversos esportes inclusive em 315 jogadores de futebol, com foco em xenobióticos potencialmente provenientes da alimentação. No presente estudo, os autores mostraram que os jogadores de futebol apresentaram níveis mais elevados de vários xenobióticos que possivelmente se originaram de produtos alimentares e/ou suplementos. Esses incluem ácido 3,4-dihidroxicinâmico, ácido ferúlico 4-sulfato, ectoína, quinato, hipurato, 4 vinilguaiacol sulfato, 2-furoil glicina e 1.3.7-trimetilurato, um metabólito menor da cafeína.

Com o olhar voltado para as mudanças no metaboloma perante o estresse agudo gerado pelo exercício, PITTI et al. (2019) investigaram a resposta dos metabólitos após uma partida de futebol. Para isso, amostras de saliva de 17 jogadores foram coletadas antes e após uma partida. Mudanças foram detectadas nos marcadores relacionados à energia, estado de hidratação, aminoácidos e outros compostos. Em complemento, PRADO et

al. (2017) avaliaram 30 jogadores de equipes associadas à Confederação Brasileira de Futebol por dois dias. As amostras de sangue e urina foram coletadas na noite pré-jogo, na manhã da partida, no pré-jogo, no intervalo e final do jogo. Com base nessas análises, 1091 metabólitos foram identificados na urina, onde 565 não sofreram alterações, 338 diminuíram a concentração e 188 aumentaram os níveis após a partida. Nesse estudo, a Hipoxantina e metabólitos relacionados foram regulados positivamente na urina após a partida de futebol. Além dos metabólitos provenientes do estresse gerado após uma partida, RA et al. (2014) buscaram entender o comportamento do metaboloma após sequência de 3 jogos recreativos consecutivos. Visando encontrar novos biomarcadores de fadiga, os autores avaliaram 122 jogadores do sexo masculino. Amostras de saliva antes e após os três dias de jogos foram coletadas e os sintomas tradicionais de fadiga (frequência cardíaca, massa corporal e humor) foram mensurados. A análise metabolômica sem alvo foi capaz de identificar 144 metabólitos na saliva e traçar o perfil do metaboloma dos 37 jogadores fadigados. Além disso, os autores observaram que todos os metabólitos identificados aumentaram após a sequência de jogos, dando destaque aos relacionados com o catabolismo do músculo esquelético, metabolismo da glicose, metabolismo lipídico, metabolismo de aminoácidos e energético (3-metil-histidina, glicose 1- e 6-fosfato, taurina e alguns aminoácidos). Já MARINHO et al. (2022) avaliaram as alterações no metaboloma urinário por RMN de jogadores brasileiros pertencentes a categoria sub-20 em amostras coletadas imediatamente e 20 horas após duas partidas de futebol. As vias metabólicas associadas à produção de energia, danos celulares e estresses orgânicos foram modificadas logo após o jogo. Já, 20 h após os dois jogos, foram identificadas vias antioxidantes e anti-inflamatórias relacionadas à recuperação celular (ácido gálico, ascorbato e betaína). Adicionalmente, o perfil metabolômico entre atletas com maiores e menores valores na escalada de percepção subjetiva de esforço (PSE) foi diferente. Jogadores com maiores valores de PSE apresentaram metabólitos relacionados ao dano muscular (creatina, creatinina e glicina) e produção de energia (creatina, formiato, piruvato, 1,3 diidroxiacetona) 20 horas após a partida de futebol.

Além das alterações agudas, sabe-se que o metaboloma humano sofre adaptações a longo prazo, por isso PINTUS et al. (2020) investigaram a variação do metaboloma da urina no decorrer da pré-temporada do

campeonato da seria A na Itália. A urina de 21 jogadores de futebol profissional foi coletada durante o começo, meio e fim da pré-temporada. O perfil do metaboloma da urina foi modificado durante o período experimental. Variações significativas foram observadas para trimetilamina-N-óxido, dimetilamina, ácido hipúrico, hipoxantina, ácido guanidoacético, ácido 3-hidroxibutírico, ácido cítrico e creatina. O trimetilamina-N-óxido e o ácido hipúrico são de origem alimentar, mas também relacionados à microbiota, enquanto o ácido 3-hidroxibutírico está associado ao exercício físico. Os autores ao final do experimento afirmam que as alterações presentes na urina podem estar associadas à dieta, treinamento e com a microbiota. Investigar as repostas do metaboloma frente ao treinamento em uma pré-temporada fornece informações preciosas para a preparação física dos jogadores. QUINTAS et al. (2020) foram além nessa questão, os autores buscaram traçar relações entre a carga externa e as modificações no metaboloma perante as adaptações fisiológicas frente ao treinamento realizado em uma temporada completa. Foram avaliados 80 jogadores de futebol do Barcelona Futebol Clube. As amostras de urina e os dados do GPS foram coletados entre julho de 2017 e maio de 2018 (10 meses). A urina foi analisada por UPLC-MS e os metabólitos mais associados com as variáveis obtidas pelo GPS foram hormônios esteróides, metabólitos de hipoxantina, aminoácidos acetilados, metabolismo da fenilalanina intermediária, tirosina, metabólitos de triptofano e riboflavina. Com essas análises, os autores detectaram pequenas alterações no metaboloma urinário relacionadas com a carga externa de treinamento ao longo de uma temporada, revelando potenciais biomarcadores de estresse e lesão a longo prazo.

O entendimento das respostas agudas em partidas de futebol e adaptações no metaboloma frente ao treinamento proporciona informações relevantes para modalidade. Porém, para que os atletas de futebol alcancem o máximo desempenho esportivo, é preciso que protocolos avaliativos sejam aplicados para monitorar a carga de treinamento e que diferentes meios e métodos de treinamento sejam aplicados. Considerando isso, pesquisadores tem questionado o comportamento do metaboloma após a aplicação de protocolos avaliativos. Objetivando detectar variações metabólicas da saliva após execução do *Yo-Yo level-1 intermittent recovery test*, SANTONE et al. (2014) utilizaram a abordagem metabolômica para avaliar 14 atletas de elite. Para cada atleta foram coletadas amostras antes e após a realização do Yo-

Yo level-1 intermittent recovery test. A análise estatística multivariada utilizada foi análise por PCA, definida para o estudo como uma técnica não supervisionada que descreve as integrais do sinal de NMR da saliva com relação a uma ou mais variáveis latentes denominadas como componentes principais (PC). Os metabólitos mais relevantes encontrados em relação a variação dos metabólitos pré e pós teste foram uréia, glicose (PC1), lactato, citrato e acetato (PC2), glicerol, glutamato, leucina, alanina e lisina (PC3). Quando os autores fizeram uma relação com o desempenho obtido no teste (bom, normal e ruim), as variações vistas dos metabólitos foram glicose, citrato e acetato (PC2), leucina, ornitina, mioinositol (PC3), lactato e glutamato (PC4), podendo ser considerados como futuros biomarcadores para melhor ou pior performance. Sendo assim, os autores concluíram que talvez existam diferenças no perfil metabólico dos jogadores com melhor ou pior desempenho. Já CASIMIRO-LOPES et al., (2021) mostraram por meio da NMR níveis aumentados para o lactato e diminuídos para as N-acetil glicoproteínas após aplicação do teste de Wingate no plasma sanguíneo de dez atletas de futebol da primeira divisão. Adicionalmente, alanina e glutamato apresentaram aumento moderado após o teste de exercício, enquanto piruvato e acetato mostraram alterações irrelevantes. Além de investigar a resposta frente as avaliações físicas, os fisiologistas do futebol também buscam entender o estresse do metaboloma frente a meios e métodos utilizados na preparação física. Aplicando o jogo reduzido, CICERO et al. (2015) buscaram traçar alterações no metaboloma da saliva após uma sessão. Os autores também buscaram correlacionar as variações metabólicas com desempenho do atleta conforme DTP medida por GPS. Para isso, 10 jogadores de futebol de elite com menos de 20 anos participaram do estudo. O jogo reduzido durava 24 minutos no total e consistia em 4 séries de 6 minutos de duração com 2 minutos de recuperação passiva entre as sessões de exercício. Amostras de saliva foram coletadas antes e depois do jogo e analisada por NMR. A análise multivariada dos dados mostrou que a aplicação aguda do jogo reduzido afetou os níveis de metabólitos salivares dos jogadores. Entre os metabólitos identificados e alterados, a taurina apresentou correlação com a DTP pelos atletas durante o jogo. Utilizando outros métodos de treinamento, ZAFEIRIDIS et al. (2016) aplicaram a metabolômica para investigar as variações dos metabólitos após a realização de exercícios contínuo, HIIT longo e curto. Os autores contaram com a participação de 9

jogadores durante 4 sessões de avaliação. Primeiramente os participantes realizaram um teste incremental máximo em uma esteira motorizada para avaliação do VO_2max , velocidade aeróbia máxima e frequência cardíaca máxima. Nas visitas subsequentes, os jogadores foram submetidos, de maneira randomizada, aos protocolos de exercício. Amostras de sangue foram coletadas antes e após a execução de cada protocolo. Em sequência foram analisadas por NMR e pela estatística multivariada. Os pesquisadores notaram que os três tipos de treinamento causaram mudanças consideráveis no metaboloma do plasma. Havendo extensa regulação positiva do metabolismo de carboidratos, lipídios e ativação do ciclo de TCA devido ao aumento de lactato, piruvato, glicerol, citrato e succinato. Com base nas alterações, os autores mostraram que os métodos aplicados induzem o estresse metabólico e energético celular global de forma semelhante. Ainda, indagando as modificações metabólicas frente aos meios e métodos de treinamento aplicado, ZHAO et al. (2020) integraram a proteômica e a metabolômica a fim de investigar com profundidade as respostas metabólicas e proteicas frente ao HIIT. Foram coletadas amostras de urina de 23 jovens jogadores de futebol antes, após e na recuperação da sessão de HIIT. Foram identificadas 1.146 proteínas e um total de 1.568 metabólitos. Os metabólitos encontrados foram associados ao metabolismo de glicose, lipídio, aminoácido e energia, como 6-acetil-glicose, adenosina, desoxiadenosina, hipoxantina, 3-cetolactose, tirosina, lisina, timina, glutatona, cisteína, γ -gultamil-cisteína, testosterona, cortisol, creatina, fosfato de creatina e outros. Entre esses, 59 metabólitos foram diferenciados quando comparados com os momentos pré, pós-exercício e recuperação, sendo associados com o metabolismo de aminoácidos e com a biossíntese de hormônios esteróides. Paralelamente, um total de 12 adolescentes jogadores de futebol foram submetidos a uma combinação de exercício aeróbio e anaeróbio em um cicloergômetro. Os jogadores avaliados realizaram exercício aeróbio seguido de recuperação passiva de 1 min (entre 55 até 60 rpm/min por 6 min com 150 W) e exercício anaeróbio seguido de recuperação passiva com duração de 3 min (Wingate, 30 s na máxima intensidade) tendo que repetir essa sequência por 3 vezes. Amostras de urina foram coletadas antes (30 min) a sessão de exercício e após (3 h) a aplicação da sessão. A técnica de GC-MS detectou 635 metabólitos nas amostras de urina. Por meio de PCA e OPLS-DA, 25 metabólitos foram diferentes (3 $\uparrow$ e 22 $\downarrow$) em relação ao basal. Os metabólitos

diferenciados pertenciam a 5 vias metabólicas: metabolismo da glicina-serina-treonina, ciclo do citrato, metabolismo da tirosina, metabolismo do nitrogênio e metabolismo dos glicerofosfolípides. Durante a sessão de exercício combinado (aeróbico e anaeróbico), os jogadores de futebol apresentaram decréscimo na capacidade anaeróbia após a fadiga. Além disso, o mecanismo metabólico da fadiga ao exercício foi relacionado a distúrbios no metabolismo de aminoácidos e energia (CAO et al., 2020). Adicionalmente, a resposta aguda do metaboloma global de dez jogadores recreativos de futebol após uma sessão de exercício resistido (4 séries de 10 repetições a 70% de uma repetição máxima no leg press) foi monitorada por NMR. A sessão aguda de exercício aumentou as concentrações de 2-hidroxibutirato, 2-oxoisocaproato, 3-hidroxiisobutirato, alanina, hipoxantina, lactato, piruvato e succinato. Enquanto, isoleucina, leucina, lisina, ornitina e valina diminuíram a concentração após a sessão de exercício (BERTON et al., 2017).

Todos os estudos supracitados utilizaram distintas amostras biológicas (sangue, urina e saliva) para identificar as alterações no perfil do metaboloma dos atletas em diversas situações aplicadas na modalidade. Uma das premissas da abordagem ômica é buscar o entendimento do funcionamento integrado de um organismo biológico frente a um fator estressor. Nesse sentido, visando obter conhecimento integrado, ALZHARANI et al. (2020) utilizaram amostras de urina, plasma e saliva para analisar o impacto causado pelo exercício de alta intensidade no perfil do metaboloma de 26 jogadores de futebol durante 2 dias consecutivos. Amostras de urina, plasma e saliva foram coletadas antes e após a sessões de exercício. Os gráficos de PCA e OPLS mostraram variações antes e depois do programa de exercício para metabólitos polares e apolares presentes no plasma, urina e saliva. Os autores demonstraram que a hipoxantina foi o único metabólito polar, que se alterou em todos os fluidos biológicos (plasma, urina e salivar) no primeiro dia. Além disso, houve aumento significativo nas acilcarnitinas após dois dias de exercício. Esses metabólitos estão envolvidos com a oxidação dos ácidos graxos, indicando que esses jogadores de futebol altamente treinados queimam mais gordura em vez de glicose. Esses achados fortaleceram a ideia de potenciais biomarcadores, uma vez que os produtos finais da carnitina no plasma, pós-exercício, podem fornecer informações acerca do nível de aptidão física.

Na área da medicina esportiva, uma coorte 6 jogadores de basquete, 22

de futebol americano, 4 de hóquei no gelo, 4 de lacrosse e 26 de futebol foram avaliados e o presente estudo apontou 6 biomarcadores presentes no plasma desses atletas que aparecem 6 horas após lesão cerebral traumática leve durante a prática esportiva. Sendo FA 2-OH C16:0, FA C18:0, TUDCA, PE ae C36:4, PE aa C38:6 e LysoPC a C20:4. Dessa forma, esse grupo de metabólitos apontados podem contribuir com uma identificação precoce da lesão, possibilitando diagnóstico e tratamento mais acelerados (FIANDACA et al., 2018). Além do mais, metabólitos provenientes do soro como glutamina, N-acetilglutamina, xantina, beta-sitosterol, N2-acetilisina, estearoil-araquidonoil-glicerol (18:0/20:4), N-acetilserina e 3-7- dimetilurato foram eleitos bons preditores de envelhecimento biológico (comprimento dos telômeros dos leucócitos) de uma amostra composta por 126 jovens jogadores de futebol masculino de elite (AL-MURAIKHY et al., 2021).

Os estudos supracitados aplicaram a metabolômica no futebol para avaliar as variações do metaboloma perante o estresse gerado pelo exercício físico, após aplicação de testes físicos, ao final de partidas de futebol, durante a preparação física na pré-temporada, temporada completa e medicina esportiva. Esses estudos construíram conhecimento integrado e global para a modalidade, apontado metabólitos como possíveis biomarcadores de estresse, fadiga, desempenho. O conhecimento gerado por essa ferramenta fornece conexões interdisciplinares entre diferentes linhas de pesquisa e campos de atuação, caracterizando o perfil fisiológico dos atletas e sendo capaz de diminuir as barreiras entre treinadores esportivos e cientistas, para melhorar significativamente o desempenho atlético.

4. METODOLOGIA GERAL

4.1 Fase pré-analítica

Os procedimentos a seguir foram realizados antes da análise lipidômica.

4.1.1 Participantes

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP (CAAE - 15540619.6.0000.5404) (**ANEXO 1**). Respeitando todas as premissas e instruções éticas, todos os participantes receberam explicação verbal e por escrito acerca dos objetivos do projeto, riscos e benefícios dos testes aos quais foram submetidos, bem como informados sobre a liberdade em desistir de participar do projeto por quaisquer motivos. Após receberem as instruções, os participantes foram convidados a assinar o TCLE, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas.

Os avaliados responderam uma anamnese contendo uma breve entrevista sobre a sua condição física e hábitos alimentares e um questionário referente ao histórico esportivo contendo questões sobre sua inserção atual no ambiente esportivo, regularidade competitiva, nível das competições das quais participou nos últimos dois anos e classificação nessas competições.

Foi adotado como critério de inclusão sua participação em competições regulares nos últimos dois anos (em nível mínimo regional). Foram excluídos da amostra participantes que não tinham autorização médica para realização de esforços e que, por meio da anamnese, relataram ser tabagistas, fazer uso de medicamentos contínuos, esteroides anabólicos ou apresentarem dores articulares.

Os participantes foram instruídos a realizarem jejum noturno de 12 horas antes das coletas de sangue do lóbulo da orelha realizadas na segunda sessão e também foram orientados a manterem uma dieta leve e hidratação, realizarem a última refeição pelo menos duas horas antes dos testes físicos, não consumirem bebidas contendo álcool e cafeína pelo menos 24 horas antes dos procedimentos; além de não poderem praticar exercícios

extenuantes durante o período experimental (PEREIRA et al., 2015; GAMA et al., 2018). Adicionalmente, os participantes tiveram acesso a refeições fornecidas pelos clubes (embora a quantidade de alimentos individuais não fosse controlada) (**ANEXO 2**) e estavam na segunda semana de preparação física da pré-temporada. Tais instruções objetivam evitar que diferenças em termos de desempenho em cada teste fossem provocadas por mudanças bruscas na dieta, no consumo de estimulantes ou prática de exercícios.

Inicialmente haviam 58 jogadores da categoria sub-22 do sexo masculino e ao final do experimento foram avaliados 36 participantes que finalizaram todas as avaliações do desenho experimental.

4.1.2 Desenho experimental

O projeto foi conduzido em campo de tamanho oficial ao requisitado pela Confederação Brasileira de Futebol. As avaliações foram efetuadas em condições ambientais naturais, visando uma aproximação com a especificidade do esporte em pesquisa. Durante as sessões avaliativas o local foi reservado para aplicação do estudo, minimizando interferências externas. Equipamentos de segurança (e.g. kit de primeiros socorros, desfibrilador) estavam à disposição da equipe de avaliadores durante as sessões de avaliação, visando a prevenção e cuidado dos avaliados durante a aplicação dos procedimentos experimentais.

Seis sessões de avaliação separadas por 24 horas foram realizadas no presente estudo (**Figura 6**). A última sessão de treinamento de futebol realizada pelos avaliados foi 3 dias antes do início das sessões avaliativas. Os procedimentos experimentais foram aplicados no mesmo horário, sendo todos os testes realizados no período do dia em que os atletas já realizavam as sessões de treinamento.

Em uma primeira visita ao clube, os participantes foram informados sobre os testes e procedimentos, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Quando necessário os participantes menores assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido e os responsáveis pelos participantes menores assinaram o TCLE específico. Logo após, os participantes da pesquisa responderam os questionários de anamnese, histórico esportivo-competitivo, o Questionário Internacional de Atividade Física (PAR-Q) e *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ)

(THOMAS et al., 1992). Atendendo os critérios de inclusão e exclusão, para a segunda sessão os participantes foram instruídos a realizarem jejum noturno de 12 horas (LUSTGARTEN et al., 2013; MORRIS et al., 2015). Na segunda sessão, amostras de sangue do lóbulo da orelha foram coletadas para análise metabômica (*Untargeted*) e determinação do hematócrito. Ainda na segunda sessão os avaliados foram submetidos a avaliações de composição corporal.

Na terceira, quarta, quinta e sexta sessões, os avaliados foram submetidos a cargas preditivas em exercício de corrida vai-e-vem com distância de 20 metros no campo de futebol. Todos os avaliados foram estimulados a correrem sempre o máximo, até que as distâncias estabelecidas fossem atingidas. Em todas as sessões envolvendo o teste físico, o tempo total foi mensurado. Posteriormente os registros de tempo foram submetidos a ajustes matemáticos objetivando a determinação dos parâmetros fisiológicos (capacidade aeróbia e anaeróbia).

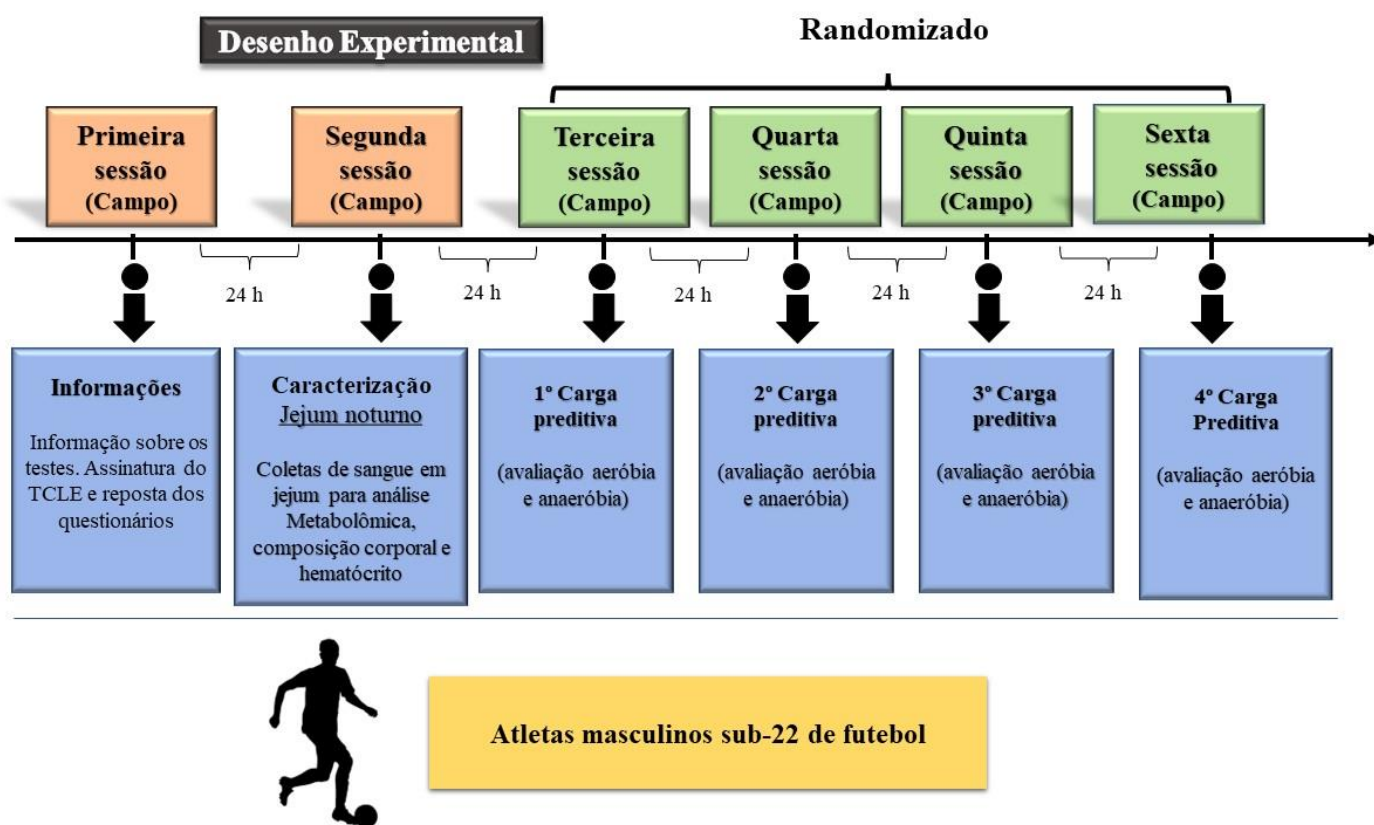


Figura 6. Desenho experimental conduzido no presente estudo. Inicialmente a triagem foi realizada seguindo os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. Na primeira visita, os avaliados receberam todas as informações sobre o projeto e assinaram TCLE. Também responderam os questionários (PAR-Q e IPAQ). Na segunda sessão, amostras de sangue do lóbulo da orelha foram extraídas para análise lipídômica sendo também utilizadas para a determinação do hematócrito. Adicionalmente, os participantes foram submetidos a avaliação antropométrica. Nas visitas subsequentes, os participantes foram submetidos a cargas preditivas randomizadas referentes ao protocolo de velocidade crítica.

4.1.3 Detalhamentos das avaliações antropométricas realizadas

Para a análise da antropometria e composição corporal foram mensuradas a massa corporal (Kg) (balança digital portátil da marca Carrion®, com capacidade máxima de 150Kg e precisão de 100g), estatura (cm), diâmetro biepicôndilo umeral (cm) e diâmetro biepicôndilo femural (cm) (Paquímetro ósseo da marca Precision®). Foram também mensuradas a circunferência da perna direita (cm) e circunferência do braço contraído direito (cm) (fita antropométrica flexível da marca Cardiomed®). O percentual de gordura (% gordura) foi estimado seguindo a proposta de FAULKNER (1966), considerando a subsequente equação:

$$\% \text{ gordura} = \sum 4DC \times 0,153 + 5,783$$

onde $\sum 4DC$ refere-se à somatória das espessuras das dobras cutâneas tríceps, subscapular, abdômen e suprailíaca (mensuradas por um adipômetro da marca Lange®). Todas as dobras cutâneas foram mensuradas em triplicata pelo mesmo avaliador, sendo utilizada a média dos valores advindos das três mensurações. O avaliador que conduziu as mensurações possuía elevada experiência na realização desses procedimentos.

O somatotipo foi determinado pelo método proposto por HEATH e CARTER (1967) a partir de variáveis antropométricas, que permitiram estimar três componentes morfológicos: endomorfo, ectomorfo e mesomorfo. Para as medidas de todas as variáveis foram adotados os procedimentos da *International Society for the Advancement of Kinanthropometry* (STEWART et al., 2011).

4.1.4 Coleta e processamento das amostras

No período da manhã após jejum noturno de 12 horas, 4 capilares de vidro cheios de sangue ($\cong 150\mu\text{L}$) foram coletados do lóbulo da orelha dos avaliados em condições padronizadas. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 11000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Microprocessada para Tubos - Q222TM) no local da coleta em temperatura ambiente. Logo

após a separação do soro, as amostras foram armazenadas em tubos criogênicos de 1,5 mL e submetidas ao congelamento imediato em nitrogênio líquido (**Figura 7**). Posteriormente foram levadas ao biorepositório localizado na cidade de Limeira – SP, onde foram criopreservadas em freezer -80C° para futuramente serem analisadas pela técnica de metabômica (*Untargeted*).



Figura 7. Coleta e processamento das amostras de sangue realizadas no presente estudo. As amostras foram coletadas em repouso respeitando o jejum noturno de 12 horas. **1)** Coleta de sangue do lóbulo da orelha do avaliado utilizando capilar de vidro. **2)** Vedação do capilar cheio de sangue com massa de oclusão específica. **3)** Centrifugação dos capilares coletados. **4)** Corte entre a faixa do soro e dos eritrócitos utilizando um cortador de capilar (*Capillary Tube Cutter, Master Tool*) para obtenção do soro. **5)** Soro depositado no tubo criogênico.

4.1.5 Análise do hematócrito

Visando a análise do hematócrito (**Figura 8**), um capilar cheio de sangue foi coletado e centrifugado por 11000 x rpm por 5 minutos em microcentrífuga específica (Centrífuga Microprocessada para Tubos - Q222TM) e a porcentagem do hematócrito foi procedida por régua graduada (FERREIRA et al., 2010).



Figura 8. Coleta e processamento das amostras de sangue realizadas para análise do hematócrito. **1)** Coleta de sangue do lóbulo da orelha do avaliado utilizando capilar de vidro. **2)** Vedação do capilar cheio de sangue com massa de oclusão específica. **3)** Centrifugação dos capilares coletados. **4)** Capilar de vidro após a centrifugação. **5)** Ilustração da determinação da porcentagem do hematócrito por régua graduada.

4.1.6 Aplicação do protocolo de velocidade crítica à atletas de futebol

Para obtenção da VCrit e CCA, respectivamente parâmetros aeróbio e anaeróbio sugeridos pelo modelo de PCrit, os atletas foram submetidos a 4 execuções máximas de corrida nas distâncias equivalentes à 800, 1200, 1600 e 2000m (**Figura 9**), em um campo de futebol no qual habitualmente realizam sessões de treinamento. Os testes máximos foram executados em quatro dias, de maneira aleatória, com intervalo de 24 horas entre cada esforço. Foram registrados os tempos obtidos para cada uma das distâncias solicitadas, com a utilização de um cronômetro.

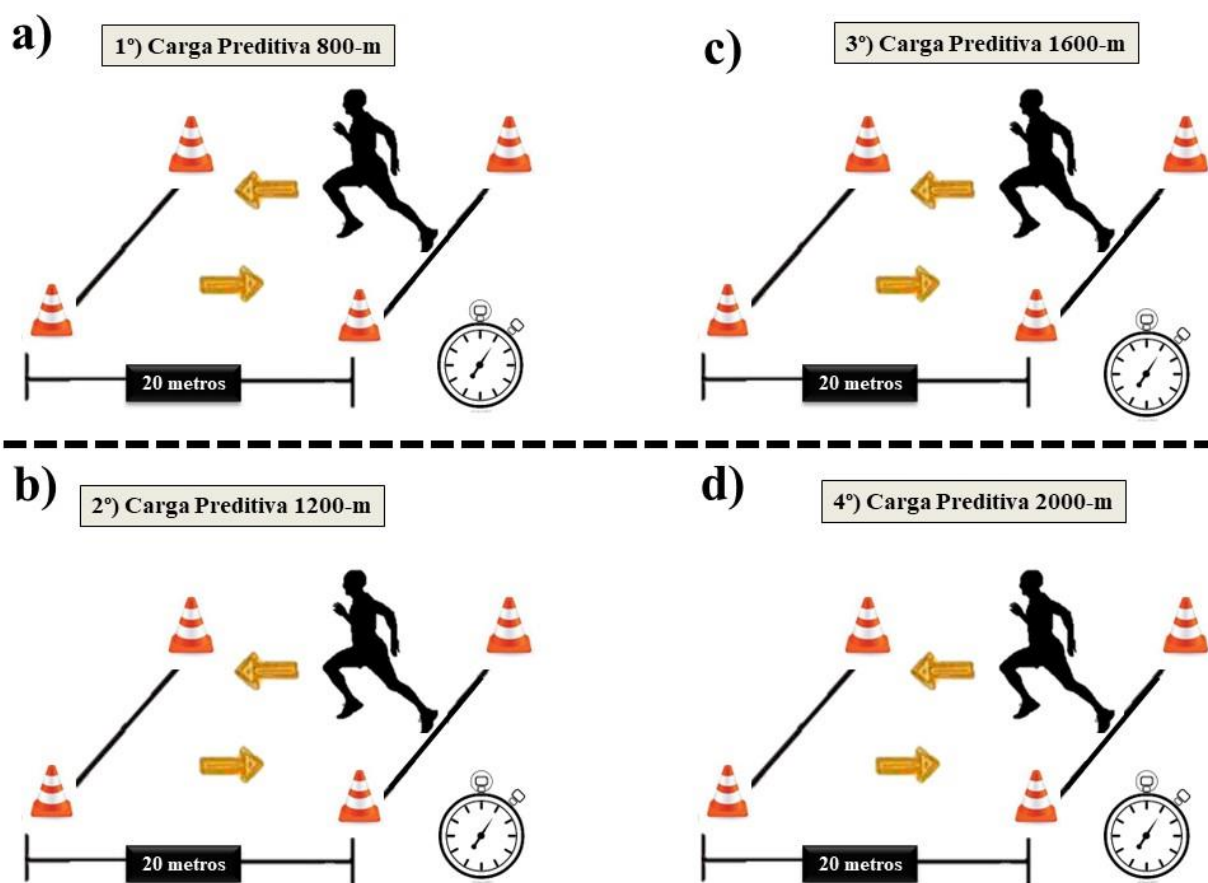


Figura 9. Aplicação do protocolo de velocidade crítica no campo de futebol. O atleta percorreu correndo em máxima intensidade em dias diferentes e de maneira randomizada as distâncias de **a)** 800m, **b)** 1200m, **c)** 1600m e **d)** 2000m e o tempo total foi registrado.

Para determinação das condições aeróbia (VCrit) e anaeróbia (CCA), um gráfico individual foi plotado contendo os valores de distância (metros, m) no eixo y e tempo (segundos, s) no eixo x (**Figura 10**). O modelo matemático adotado para o ajuste dos dados foi o linear, distância *versus* tlim, no qual a VCrit e a CCA equivalem, respectivamente, aos componentes angular e linear da regressão. Os resultados de R^2 para as regressões foram considerados para verificar a exequibilidade do procedimento matemático adotado.

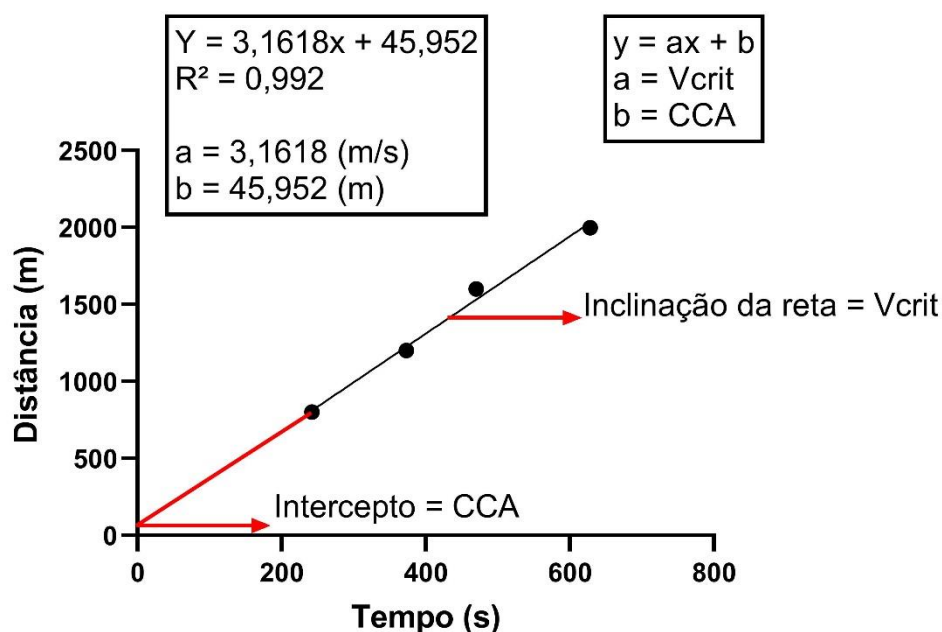


Figura 10. Exemplo do ajuste matemático utilizado para a determinação dos parâmetros referentes ao modelo de velocidade crítica para um dos atletas componentes da amostra. **VCrit** – Velocidade Crítica; **CCA** – Capacidade de Corrida Anaeróbia.

4.2 Fase de preparação das amostras

A **Figura 11** representa o fluxo de trabalho utilizado para obtenção dos metabólitos do soro dos jogadores de futebol. Os procedimentos e materiais necessários para a coleta de dados, preparação das amostras, aquisição e processamento dos dados foram descritos em detalhes nos subtópicos em seguida.

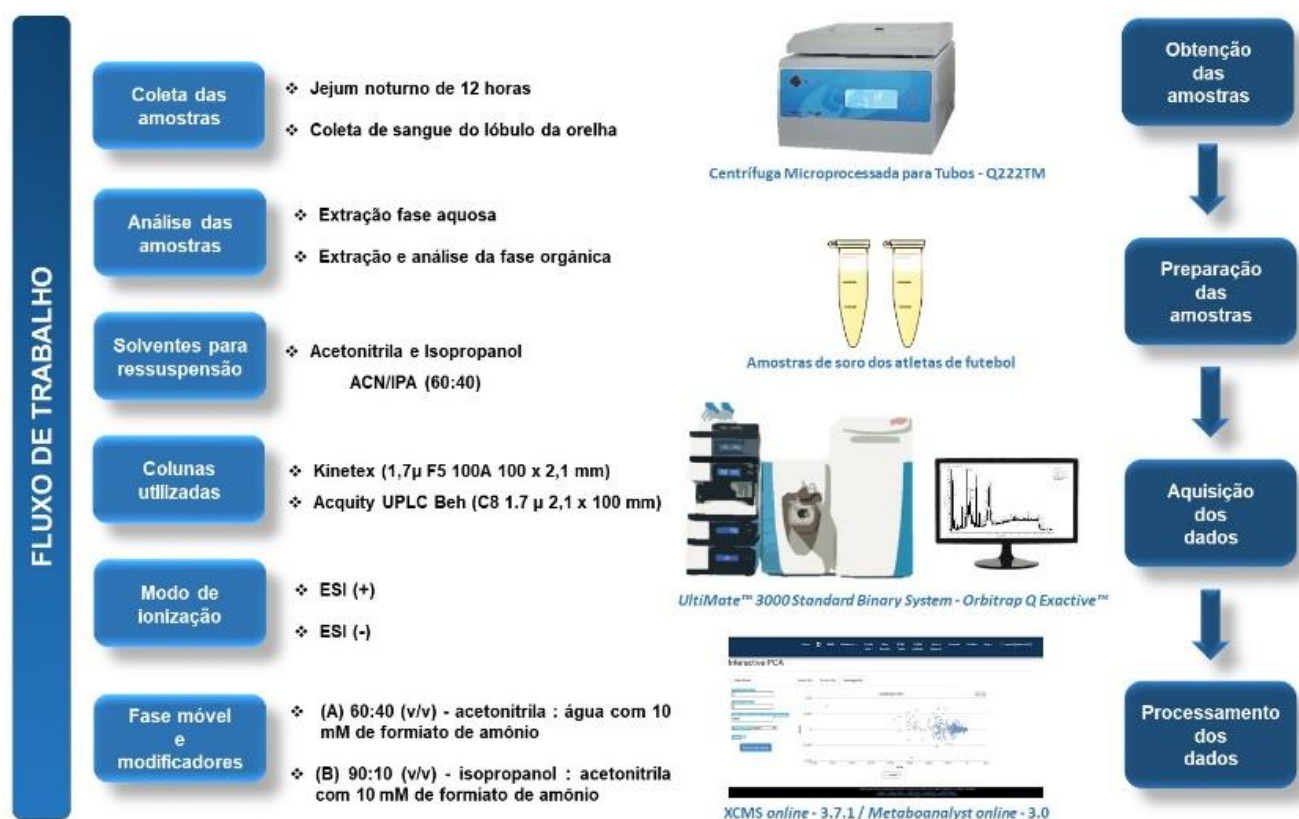


Figura 11. Fluxo de trabalho metabolômico. Etapas, materiais e procedimentos que foram necessários para a realização da análise lipidômica do soro dos jogadores avaliados.

4.2.1 Extração de metabólitos para análise por LC-MS/MS

As amostras de soro foram preparadas por meio da extração concebida por MATYASH et al. (2008) com algumas modificações. A extração consiste em um sistema de solvente bifásico de metanol frio ($\geq 99.9\%$), MTBE ($\geq 99.8\%$) e água Milli-Q.

Primeiramente, microtubos vazios (*Eppendorf* de 1,5 mL) foram identificados de acordo com o código determinado pelo pesquisador (proteínas, fase orgânica, fase aquosa, QC e branco). Em seguida, as amostras de soro criopreservadas foram retiradas do freezer -80°C para serem descongeladas em temperatura ambiente. Após o descongelamento, todos os tubos criogênicos foram agitados aleatoriamente (Labnet S0200 modelo VX-200 *Vortex*) por 10 segundos. Logo depois, 50 µL de cada amostra foram pipetados em microtubos individualizados objetivando a padronização do volume entre as amostras. Para criação do QC, 10 µL de cada amostra armazenada nos criotubos foram pipetados em um único microtubo. O microtubo QC foi agitado por 10 segundos e 50 µL foram pipetados em microtubos individualizados em quintuplicata.

Após a organização e padronização do volume das amostras, 225 μL de metanol frio foram adicionados em todas as alíquotas. Posteriormente as amostras foram agitadas em *vortex* por 20 segundos. Subsequentemente, 750 μL de MTBE frio foram adicionados em todas as amostras, seguido por agitação em *vortex* durante 20 segundos. Logo após, todas as alíquotas foram agitadas em *vortex* durante 1 minuto. A seguir, 200 μL água *Milli-Q* foram adicionados em todos os microtubos que seguidamente foram agitados em *vortex* por 20 segundos. Ao final dessa etapa, todas as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C (*Eppendorf Centrifuge 5427 R*). Como resultado da centrifugação duas fases se formaram, sendo a superior orgânica e a inferior aquosa (**Figura 12a**). Tendo como objetivo a separação das fases, primeiramente 300 μL foram retirados da porção aquosa rica em aminoácidos e 600 μL foram extraídos da fase orgânica superior rica em MTBE e lipídeos (**Figura 12b**).

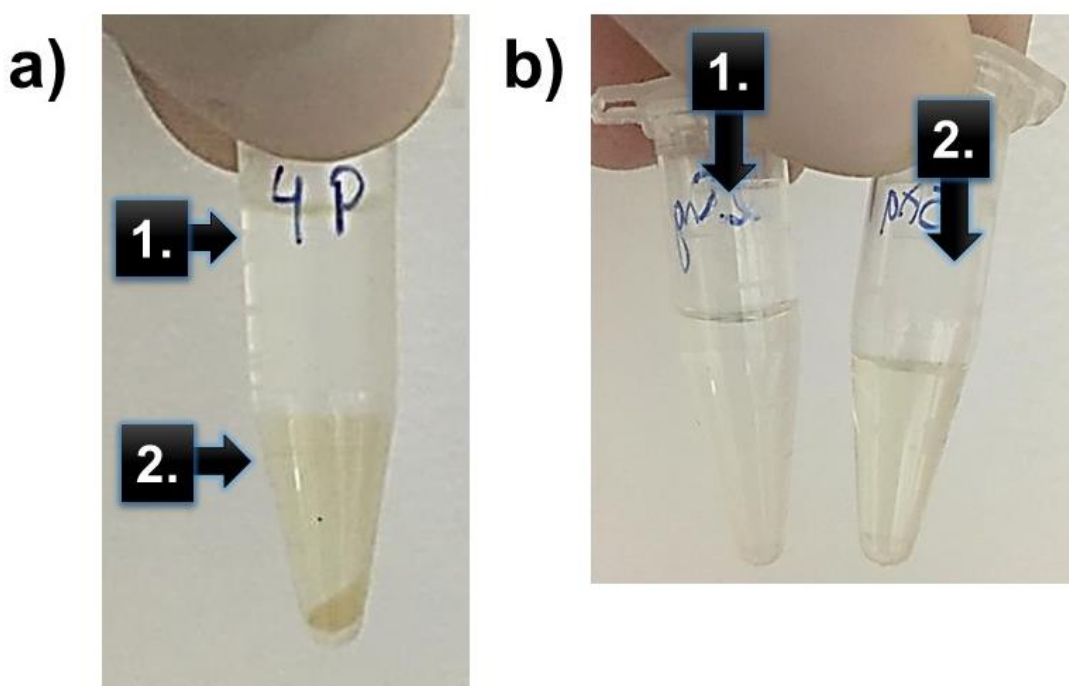


Figura 12. Preparação das amostras para análise por LC-MS/MS. **a)** Representação real da formação bifásica após centrifugação refrigerada. **b)** Extração da fase inferior e superior em microtubos individualizados. **1.)** Fase superior orgânica apolar rica em lipídeos. **2.)** Fase inferior aquosa polar.

Ao final da separação, as fases foram concentradas por meio de evaporação por secagem manual (**Figura 13**) utilizando Nitrogênio gasoso grau 6.0, pureza mínima 99,9999% (N60 AIR LIQUID) (**Figura 14**) e criopreservadas em freezer a -80°C até o momento da ressuspensão das amostras para análises por LC-MS/MS.

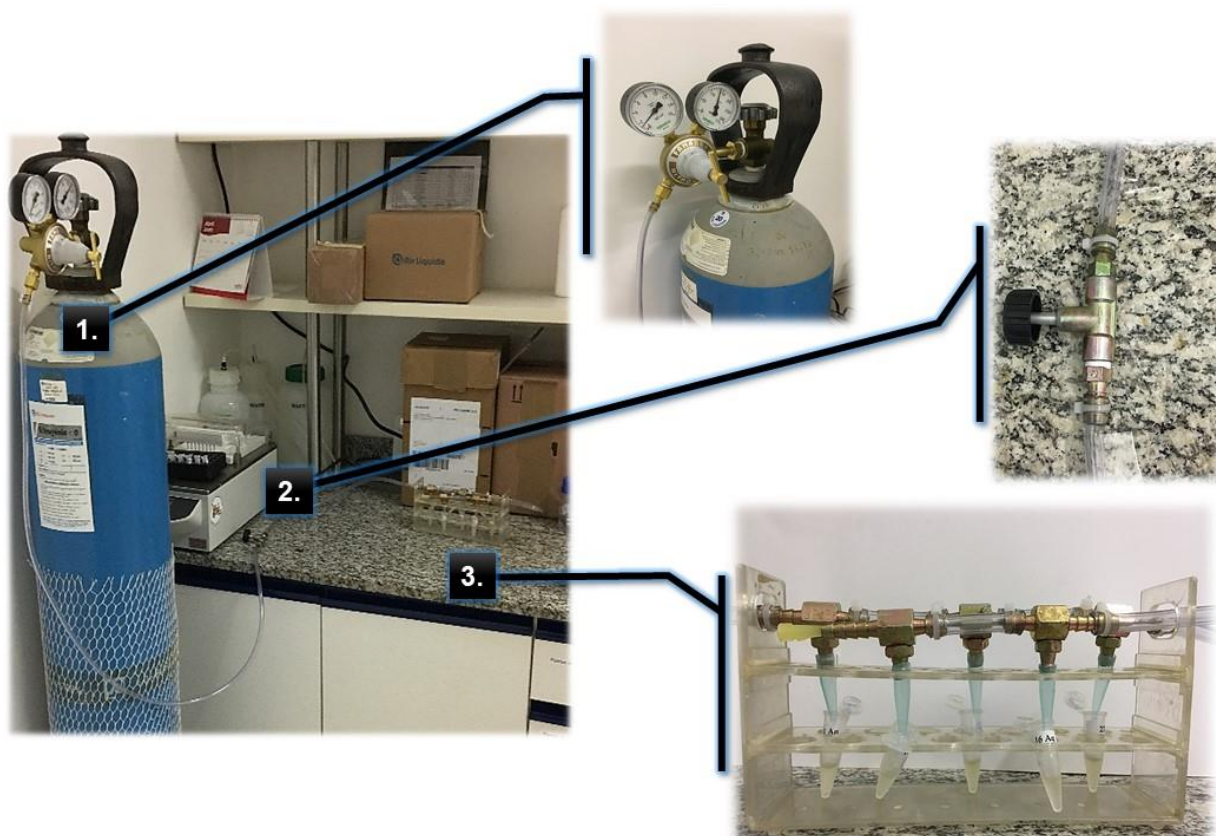


Figura 13. Sistema de secagem manual desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (LAFAE). 1.) Cilindro de Nitrogênio gasoso grau 6.0, pureza mínima 99,9999% (N60 AIR LIQUID) acoplado com regulador de pressão para cilindros de nitrogênio (FAMABRAS). 2.) Registro abre e fecha para liberação do gás para secagem. 3.) Suporte com cinco saídas de gás nitrogênio utilizado para concentração das amostras.

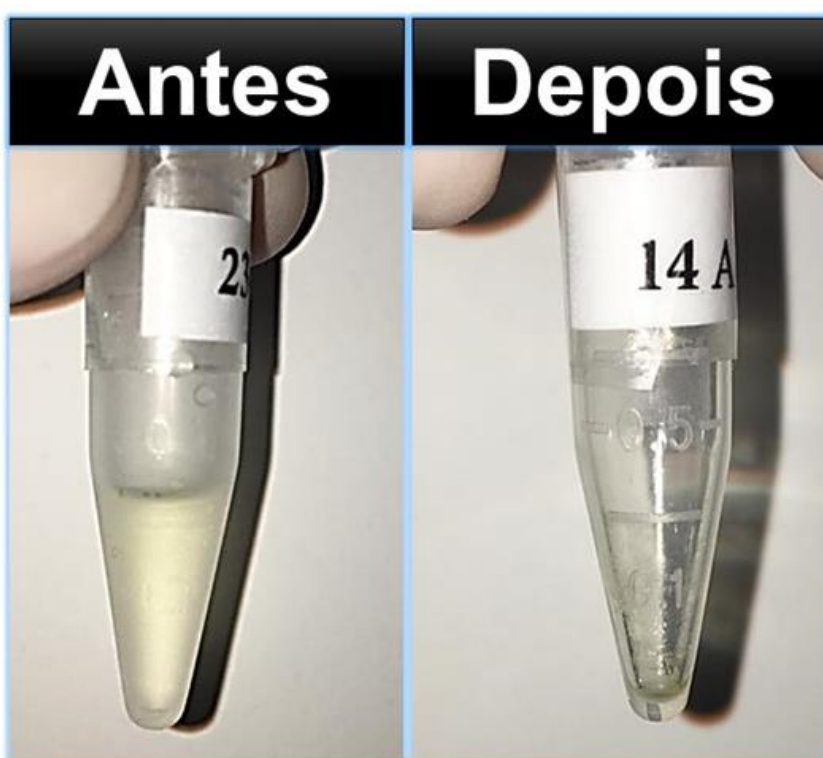


Figura 14. Antes e depois de uma amostra submetida ao sistema de secagem manual.

4.2.2 Ressuspensão das amostras para análise LC-MS/MS

Momentos antes das análises por LC-MS/MS, os extratos orgânicos secos ricos em lipídeos foram ressuspensos usando 100 μ L de uma mistura com proporção de 60% Acetonitrila ($\geq 99.9\%$) e 40% Isopropanol ($\geq 99.9\%$) (ACN/IPA - 60:40). Em seguida os microtubos foram agitados por 30 segundos em *vortex*. Posteriormente o volume de 100 μ L do extrato ressuspenso foi adicionado no *insert* com mola presente dentro do *vial* e encaminhado para análise LC-MS/MS (**Figura 15**).

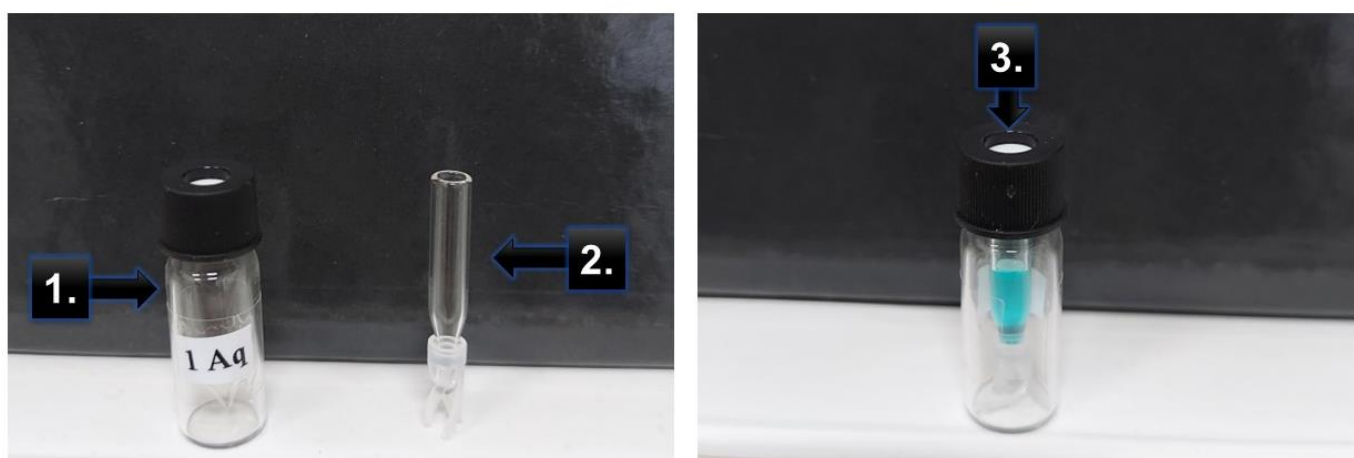


Figura 15. Volume de 100 μ L do extrato ressuspenso foi adicionado no insert com mola presente dentro do vial e encaminhado para análise LC-MS/MS. **1.)** Vial. **2.)** Insert com mola. **3.)** Exemplo de amostra ressuspensa pronta para análise LC-MS/MS.

4.3 Fase analítica

Nessa seção, foram apresentados os métodos analíticos, o pré-processamento e normalização dos dados brutos lipdômicos e identificação dos metabólitos utilizados na presente tese de doutorado.

4.3.1 Análise lipidômica por LC-MS/MS

As análises tiveram como base a metodologia e os parâmetros utilizados por CAJKA e FIEHN, (2016). Os metabólitos foram analisados usando um sistema HPLC *UltiMate™ 3000 Standard Binary System* (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) acoplado com um espectrômetro de massas Orbitrap Q Exactive™ Focus (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) equipado com

uma fonte *eletrospray* (ESI) (**Figura 16**). Com o volume ajustado para 2 μ L utilizando um autoamostrador, os extratos foram injetados no LC-MS/MS. A temperatura das amostras foi mantida a 6°C. Os extratos do soro foram analisados tanto no modo ESI (+) quanto no modo ESI (-). Os metabólitos do soro foram separados utilizando uma coluna Kinetex (1,7 μ F5 100A 100 x 2,1 mm) quando a fonte ESI estava em modo positivo. No momento em que a fonte ESI foi configurada para o modo negativo, a coluna utilizada para separação dos compostos foi a Acquity UPLC® Beh (C8 1.7 μ 2,1 x 100 mm). Ambas as colunas foram mantidas a 65°C, com taxa de fluxo de 0,6 mL/min. As fases móveis consistiam em (A) 60:40 (v/v) acetonitrila: água com 10 mM de formiato de amônio e (B) 90:10 (v/v) isopropanol: acetonitrila com 10 mM de formiato de amônio. A separação foi conduzida sob o seguinte gradiente: 0 min 5% (B); 0–15 min 95% (B); 15–22 min 95% (B); 22–22,1 min 5% (B); 22,1–27 min 5% (B). A detecção dos metabólitos do soro por espectrometria de massa foi realizada em um sistema *Orbitrap Q Exactive™ Focus* (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Para ambas as polaridades da ESI os parâmetros adotados foram: fluxo do gás de dessolvatação, 55; fluxo do gás de auxiliar, 15; fluxo do sweep gas, 3; voltagem do *spray*, 3,50 kV; temperatura do capilar, 275°C; RF Lentes S, 50; temperatura do gás auxiliar, 450° C. O modo de aquisição do espectrômetro foi configurado para Full-MS. A faixa de massas foi ajustada a 100 – 1500 Da, com resolução MS em 70.000; AGC *target*, 3e6 e *Maximum IT*, 200 ms. Quando o espectrômetro foi configurado no modo MS/MS os parâmetros adotados para ambas as polaridades foram: resolução, 17.500; AGC *Target*, 1e5; *Maximum IT*, 50 ms; *Top N*, 5; *Isolation window*, 3,0 *m/z*; NCE, 20, 30 e 40 (**ANEXO 3**).

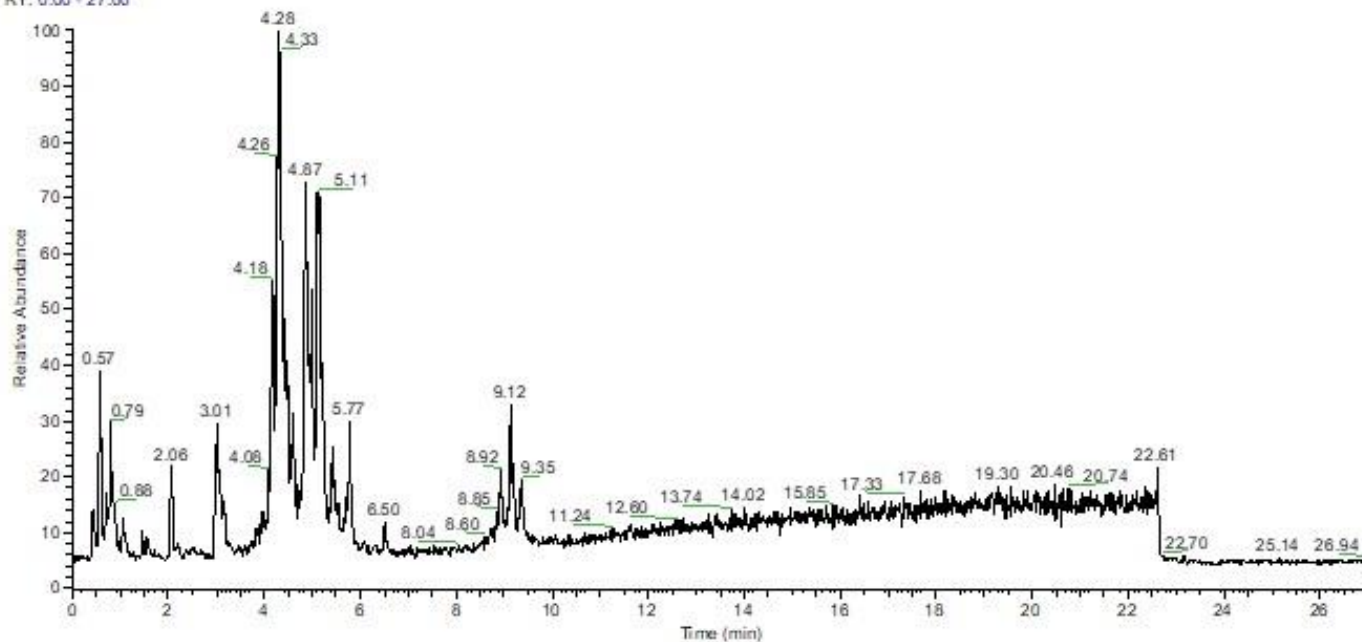


Figura 16. Foto do sistema HPLC *UltiMate™ 3000 Standard Binary System* (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) acoplado com um espectrômetro de massas *Orbitrap Q Exactive™ Focus* (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) equipado com uma fonte *eletrospray* (ESI) utilizado na presente tese de doutorado.

O *software TraceFinder* (Thermo Scientific) e o *software Xcalibur™* (Thermo Scientific) do sistema HPLC *UltiMate™ 3000 Standard Binary System* acoplado com um espectrômetro de massas *Orbitrap Q Exactive™ Focus* forneceu duas informações principais para cada amostra analisada, o cromatograma advindo do HPLC e o espectro de massas fornecido pelo espectrômetro de massas. A **Figura 17** e **Figura 18** exemplificam o cromatograma e o espectro de massas brutos obtidos após a injeção de uma amostra de soro durante 27 minutos pela técnica de LC-MS/MS no modo ESI (+) e ESI (-).

A.

RT: 0.00 - 27.00



NL:
1.11E10
TIC F: FTMS + p
ESI Full lock ms
[100.0000-
1500.0000] MS
Amostra_4

B.

Amostra 4 41-12589 RT: 0.02-26.99 AV: 2094 NL: 646E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [100.0000-1500.0000]

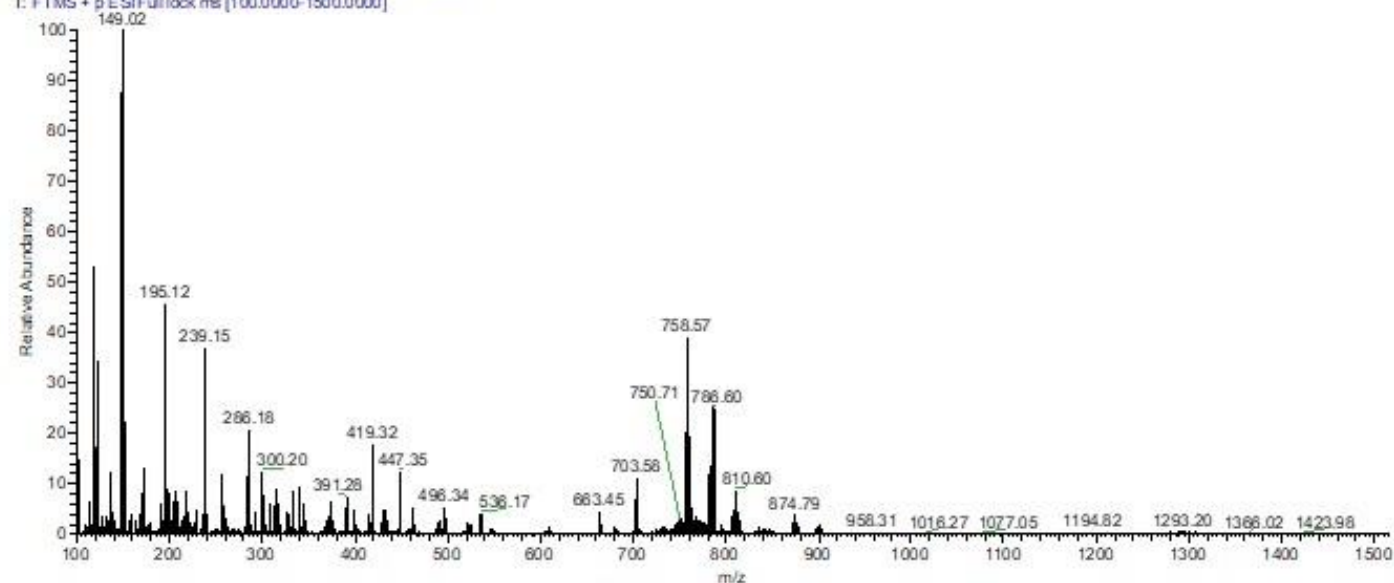


Figura 17. Cromatograma (A) e espectro de massas (B) brutos de íons extraídos de uma amostra de soro pela técnica de LC-MS/MS no modo ESI (+).

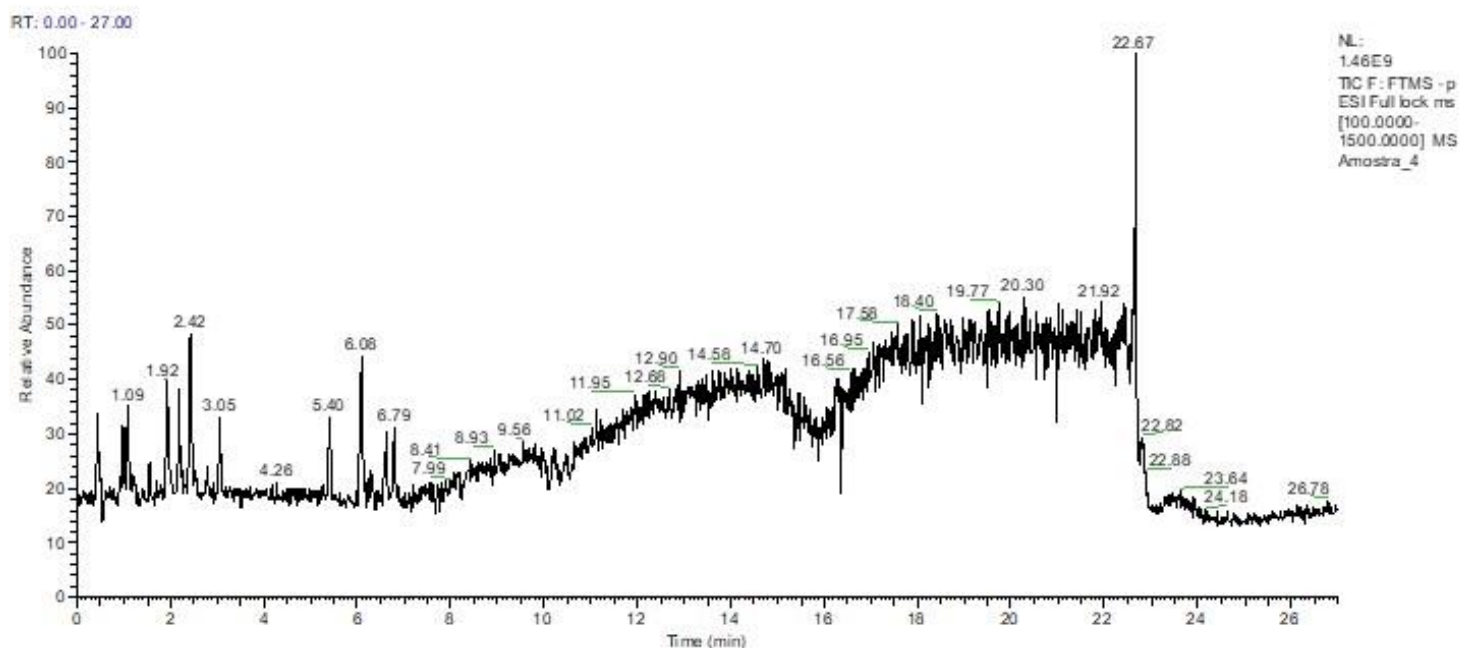
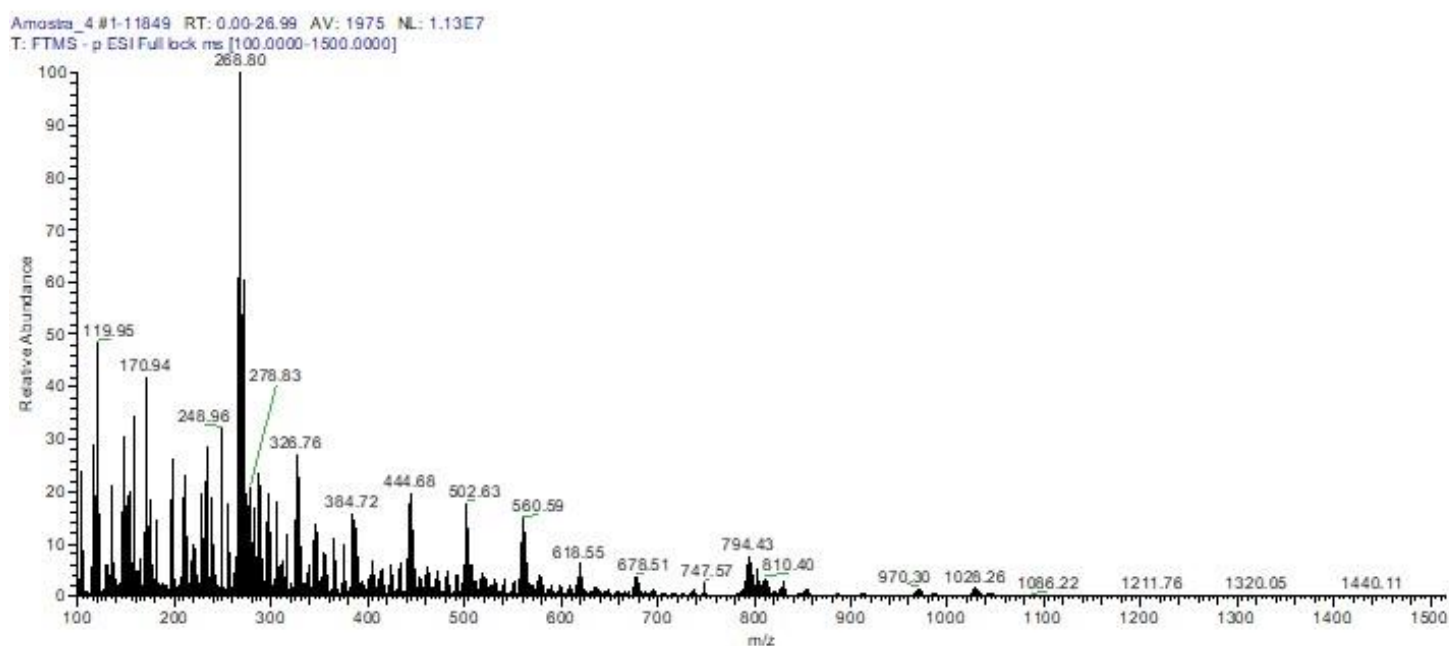
A.**B.**

Figura 18. Cromatograma (A) e espectro de massas (B) brutos de íons extraídos de uma amostra de soro pela técnica de LC-MS/MS no modo ESI (-).

4.3.2 Pré-processamento no software XCMS versão online

Os dados brutos foram convertidos para o formato mzData e carregados na plataforma do *software* XCMS (SMITH et al., 2006). Os arquivos foram processados para correção dos tempos de retenção, alinhamento dos picos, extração dos íons. O modo positivo foi baseado no parâmetro #171 UPLC Orbitrap e o XCMS foi ajustado para trabalhar com as seguintes informações. Na sessão detecção de recursos (método = centWave; ppm = 5; largura mínima de pico = 5; largura máxima de pico = 20; mzdif = 0.01; limite de sinal/ruído = 10; método de integração = 1; picos pré-filtro = 3; intensidade do pré-filtro = 5000; filtro de ruído = 1000), correção do tempo de retenção (método = obiwarp; profStep = 1), alinhamento (bw = 5; minfrac = 0.5; mzwid = 0.015; minamp = 1; max = 100). O modo negativo foi baseado no parâmetro #84139 e o XCMS foi ajustado para trabalhar com as mesmas informações do modo positivo.

O XCMS dispõe de vários algoritmos com a função de extrair os *features* das análises. A correção do tempo de retenção foi calculada pela média do tempo de retenção para cada amostra agrupada (**Figura 19**).

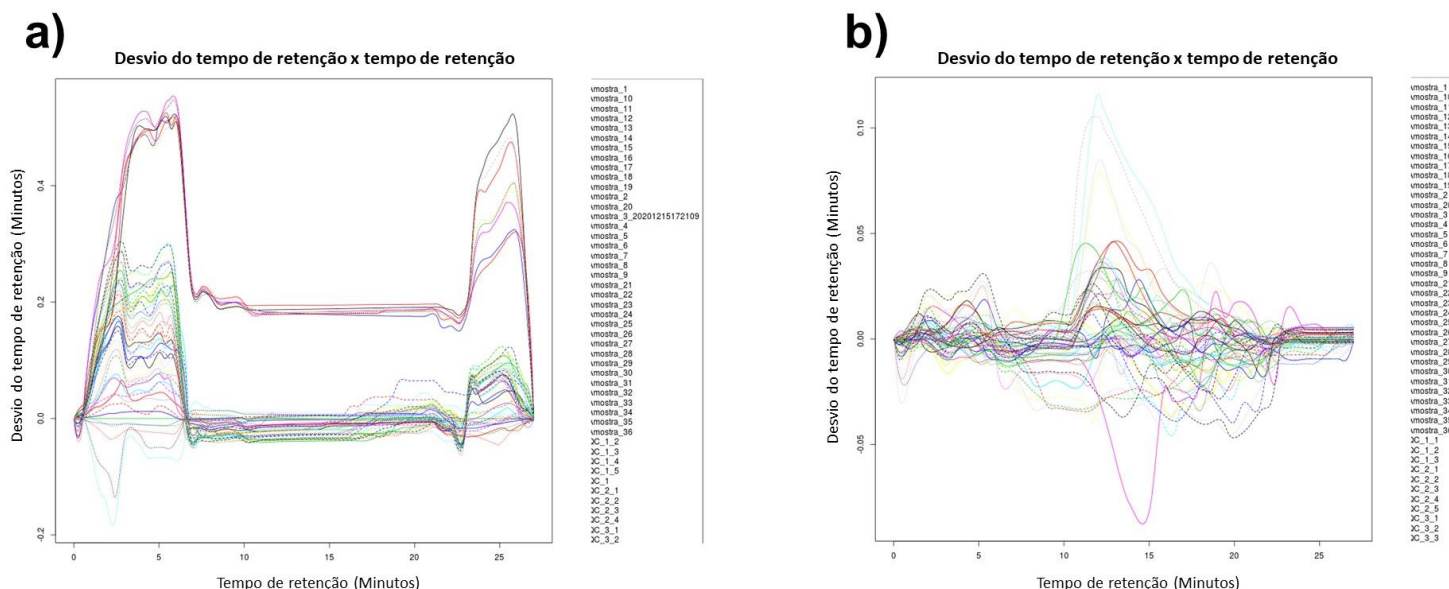


Figura 19. Gráfico do desvio de tempo de retenção em função dos tempos de retenção em minutos obtidos depois de um alinhamento dos dados no XCMS. **a)** Para o modo de ionização positivo ESI(+). **b)** Para o modo de ionização negativo ESI(-).

Os picos de cada *feature* foram agrupados em um número crescente de valores de m/z e após o agrupamento, o XCMS realizou a correção no tempo de retenção. Em seguida, os picos foram novamente juntados, porém com maior eficiência, devido ao alinhamento dos dados (**Figura 20**). Ao final do processamento dos dados, foram extraídos 5022 *features* para o modo positivo e 5208 *features* para o modo negativo.

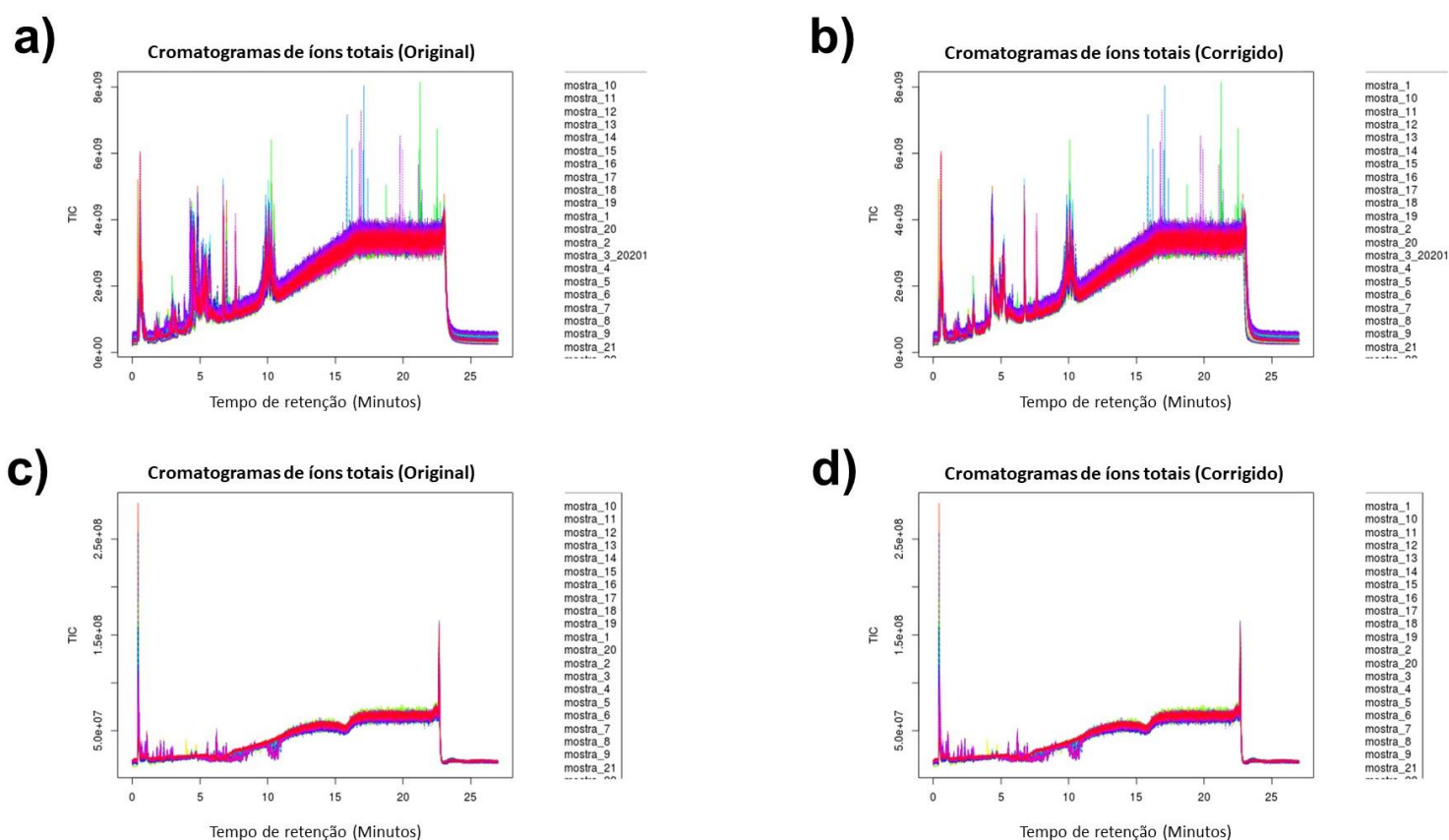


Figura 20. Sobreposição dos cromatogramas LC-MS/MS das amostras de controle de qualidade e do soro dos jogadores de futebol de ambas as equipes. **a)** Sobreposição dos cromatogramas sem correção do tempo de retenção para ESI(+). **b)** Sobreposição dos cromatogramas após correção do tempo de retenção para ESI(+). **c)** Sobreposição dos cromatogramas sem correção do tempo de retenção para ESI(-). **d)** Sobreposição dos cromatogramas após correção do tempo de retenção para ESI(-). **TIC** - Cromatogramas de íons totais.

4.3.3 Normalização dos dados

Os dados com correção da razão m/z , tempo de retenção e intensidade dos *features* no XCMS foram convertidos para o formato .csv e foram submetidos a um processamento inicial no Metaboanalyst 5.0 versão online (XIA et al., 2015; XIA et al., 2016; PANG et al., 2021). Os dados foram filtrados utilizando pelo desvio padrão relativo. Em seguida, as amostras foram

normalizadas pela soma. A escala adotada foi a Pareto, a qual consiste em uma centralização pela média e divisão pela raiz quadrada do desvio-padrão de cada variável. A **figura 21** mostra a alteração nas amostras após normalização.

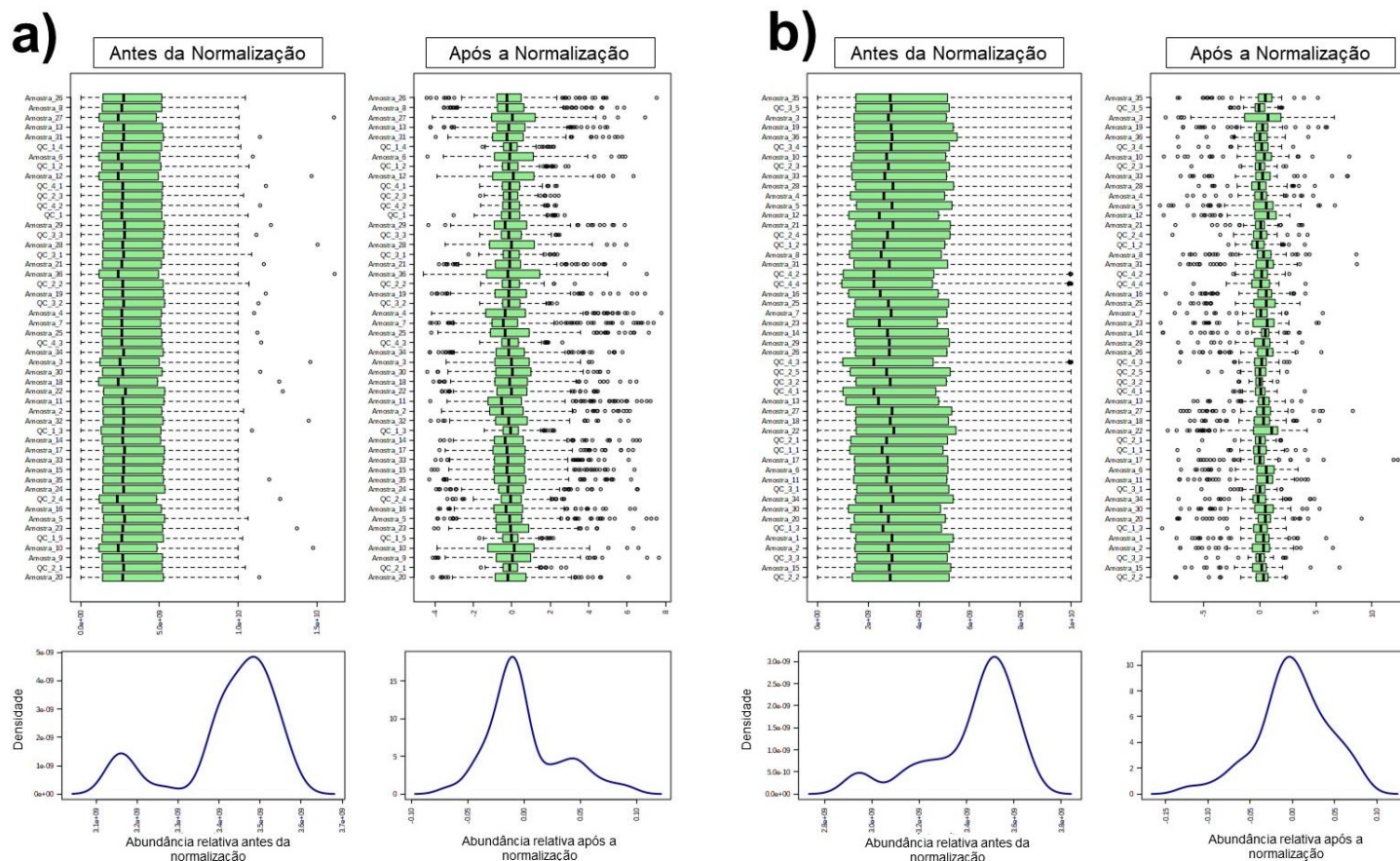


Figura 21. Comportamento e boxplot dos dados após o processo de normalização. **a)** Normalização para o modo ESI(+). **b)** Normalização para o modo ESI(-).

Garantir a qualidade dos dados da análise e a corrigir variações analíticas é essencial para o sucesso da lipidômica. A maneira aceita e utilizada no presente estudo para definir a eficácia analítica e sucesso de uma etapa de normalização se dá por meio do agrupamento das amostras de QC na análise PCA. Demonstrando assim sua similaridade analítica, assim como seu posicionamento central na análise por PCA, considerando-se o fato de que tais amostras representam uma média (*pool*) de todas as amostras analisadas (**Figura 22**).

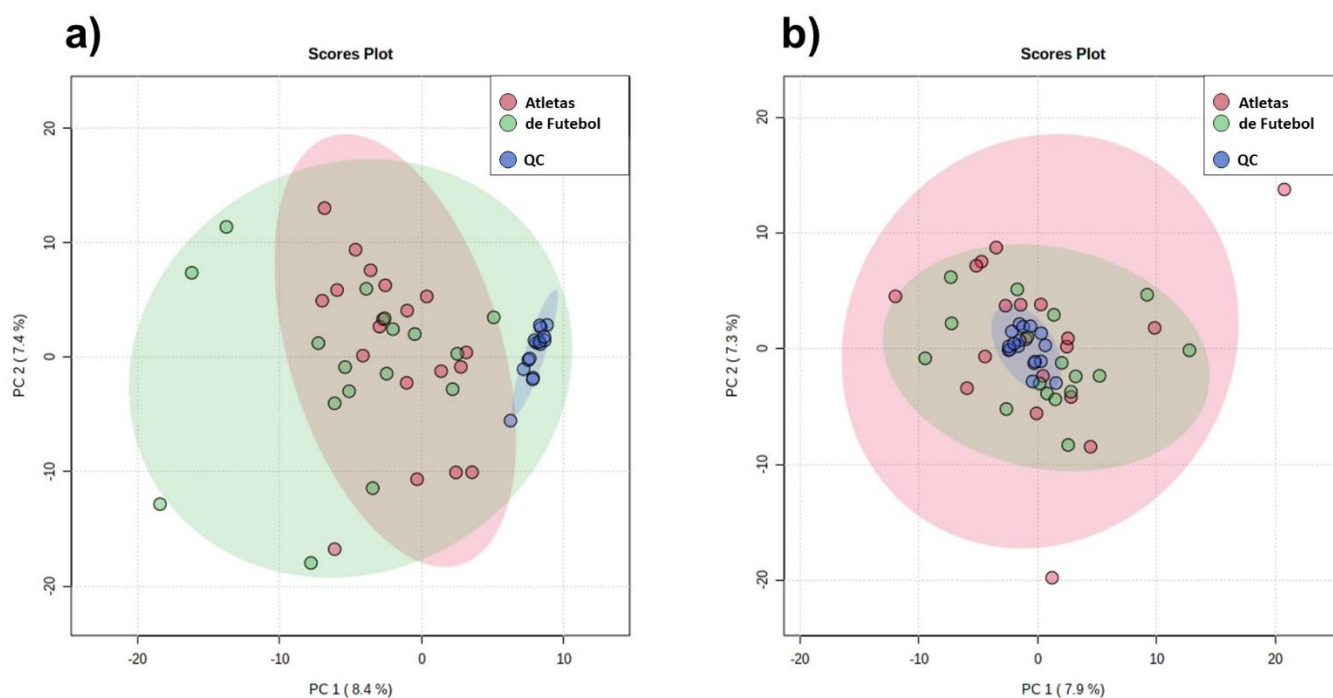


Figura 22. Distribuição final dos controles de qualidade (QC) após normalização. **a)** Para o modo ESI(+). **b)** Para o modo ESI(-).

A análise por LC-MS/MS no modo positivo e negativo apresentou um melhor agrupamento das amostras de QC após a normalização. No entanto, ainda foi possível observar uma separação entre os QCs, conforme apresentado na **Figura 22**. De maneira geral, os QCs indicaram estabilidade do equipamento ao longo das injeções das amostras e sucesso na normalização dos dados.

4.3.4 Identificação dos metabólitos

Conforme discutido pelo grupo Compound Identification da Metabolomics Society na reunião anual de 2017 da Metabolomics Society (Brisbane, Austrália), existem 5 níveis de confiança para anotação dos metabólitos. No nível 1, o *feature* deve ter uma estrutura 2D confiável. Pelo menos duas técnicas ortogonais que definem a estrutura 2D com confiança devem ser utilizadas, como a fragmentação dos íons (MS/MS) e tempo de retenção (BLAŽENOVIC et al., 2018). Inicialmente nós pretendíamos realizar a identificação nível 1 para os metabólitos mais discriminantes entre os grupos em questão (**ANEXO 3**). Em nossos experimentos de fragmentação das amostras (MS/MS), o método definido no espectrômetro de massas foi o Top 5. Ou seja, o Orbitrap fragmentou apenas os 5 íons mais abundantes presentes nos espectros para cada segundo do cromatograma. No momento

da realização da análise estatística do estudo 1 e 2, os íons destacados pelos modelos matemáticos não foram os top 5 metabólitos fragmentados por nossos experimentos de MS/MS. Geralmente os metabólitos que são diferenciados pelos modelos matemáticos apresentam baixa abundância relativa nas amostras.

Para sanar essa limitação analítica, novos experimentos de fragmentação direcionada aos íons diferenciados pela análise estatística deveriam ser realizados, mas por questões de financeiras, tempo e logística não conseguimos realizá-los. Dessa maneira, a anotação dos metabólitos em questão foi feita de forma putativa, baseando-se exclusivamente nos valores de massa exata e tempo de retenção obtidos para o modo positivo e negativo. Portanto, o nível 2 de evidência foi considerado para identificação dos metabólitos diferenciados nos resultados redigidos (BLAŽENović et al., 2018). De maneira geral, recorreu-se ao uso de bases de dados online com o objetivo de encontrar possíveis correspondências para os *features* destacados. A plataforma CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>) (GIL-DE-LA-FUENTE et al., 2018) apresenta vínculo com bancos de dados de espectros de massa como Metlin, Human Metabolome Database (HMDB), Keeg, LipidMaps e MINE. Adicionalmente, essa plataforma apresenta um cálculo de um score de acordo com a probabilidade de determinado composto formar ou não o aduto em questão. Desse modo, para cada *feature* destacado pelos modelos matemáticos utilizados, o principal nome de metabólito foi determinado considerando os menores valores de erro de massa (10 ppm) e diferentes adutos formados. Nos resultados da presente tese de doutorado, os nomes anotados de cada metabólitos foi mostrado de forma resumida, apresentando também as classes a que pertencem e os códigos de identificação de acordo com cada base de dados correspondente, já que cada base de dados apresenta identificadores únicos e permitem direcionar com precisão o metabólito anotado.

5. ESTUDO 1: METABÓLITOS DO SORO EM JEJUM ASSOCIADOS À CAPACIDADE AERÓBIA DE JOGADORES SUB-22 DE FUTEBOL: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA

5.1 Introdução

O futebol tem caráter intermitente e requer das vias energéticas aeróbia e anaeróbia ao longo de uma partida (STØLEN et al., 2005; BANGSBO et al., 2007). Embora o metabolismo anaeróbio seja essencial para a execução de contra-ataques, habilidades específicas e ações defensivas durante uma partida de futebol (STØLEN et al., 2005; BANGSBO et al., 2007), a via aeróbia fornece maior contribuição para a produção de energia (STØLEN et al., 2005; BANGSBO et al., 2007), atuando principalmente em esforços realizados nos domínios moderado e pesado (GAESSER e POOLE, 1996). Além disso, a via aeróbia contribui significativamente durante momentos de recuperação após exercício em intensidade severa (GAESSER e POOLE, 1996; TOMLIN e WENGER, 2001). Portanto, a capacidade aeróbia desempenha um papel fundamental no desempenho dos jogadores de futebol (STØLEN et al., 2005; BANGSBO et al., 2007). Estudos têm mostrado repetidamente que o nível de capacidade aeróbia (por exemplo, LAn e VCrit) está positivamente associado ao desempenho no futebol, como o número de sprints e a DTP (CHAMARI et al., 2005; HOFF, 2005; MCMILLAN et al., 2005; CASTAGNA et al., 2006), bem como a classificação da equipe ao final do campeonato (WISLOEFF et al., 1998), ou se o atleta é titular ou reserva (GRAVINA et al., 2008). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do nível de capacidade aeróbia de atletas de futebol ainda precisam ser totalmente compreendidos.

Diante disso, a metabolômica e lipidômica *untargeted* são ferramentas úteis para caracterizar os mecanismos moleculares que ocorrem em diferentes organismos (KLASSEN et al., 2017). LC-MS, NMR, GC-MS e CE-MS (KLASSEN et al., 2017) são plataformas analíticas poderosas que podem ser usadas para identificar metabólitos em uma amostra biológica (urina, saliva, suor e sangue) (ZHANG et al., 2012). Atualmente, essas abordagens tem respondido questões relacionadas ao futebol. Desde então, estudos recentes examinaram modificações nos perfis metabolômicos e lipidômicos após sessões de exercícios, partidas de futebol, pré-temporada e ao final de uma temporada completa. CÍCERO et al. (2016) mostraram que a aplicação

aguda de uma sessão de jogo reduzida afetou os níveis de metabólitos salivares de jogadores de futebol. Entre os metabólitos alterados, a taurina foi correlacionada com a DTP pelos atletas durante o treinamento. ZAFERIDIS et al. (2016) observaram que o exercício agudo (exercício contínuo e intervalado) induziu de maneira semelhante o estresse metabólico global, com regulação positiva do metabolismo de carboidratos-lipídios e ativação do ciclo do ácido cítrico devido ao aumento de lactato, piruvato, glicerol, citrato e succinato. Além disso, a metabolômica revelou alterações impactantes no catabolismo do músculo esquelético, glicose, lipídios, aminoácidos e metabolismo energético após partidas de futebol (RA et al., 2014; PRADO et al., 2017; PITTI et al., 2019; ZHAO et al., 2020; MARINHO et al., 2022). Além disso, PINTUS et al. (2020) observaram variações significativas para o N-óxido de trimetilamina, dimetilamina, ácido hipúrico, hipoxantina, ácido guanidoacético, ácido 3-hidroxi-butírico, ácido cítrico e creatina, associados à dieta, treinamento e microbiota na pré-temporada. Ao decorrer de uma temporada, QUINTAS et al. (2020) detectaram pequenas alterações na biossíntese de hormônios esteróides e no metabolismo de triptofano e tirosina relacionadas à carga externa de treinamento, revelando potenciais biomarcadores de estresse e lesão a longo prazo.

No geral, esses estudos revelaram que a metabolômica e a lipidômica são ferramentas com alto potencial para avaliar o impacto do exercício agudo e crônico no metaboloma de jogadores de futebol. No entanto, a lipidômica ainda não foi utilizada para diferenciar o perfil metabólico de jogadores de futebol sub-22 com maior e menor capacidade aeróbia. Os estudos realizaram apenas comparações e associações entre o perfil metabólico de indivíduos ativos e sedentários com o $VO_2\text{max}$ (LUSTGARTEN et al., 2013; MORRIS et al., 2013; MORRIS et al., 2015; CASTRO et al., 2021). Dessa forma, avaliar se o nível de capacidade aeróbia determinado pelo protocolo de VCrit (WAKAYOSHI et al., 1992) reflete alterações no perfil metabólico sérico em jejum de atletas de futebol é de extrema relevância para melhorar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo aeróbio. Além disso, correlacionar metabólitos séricos com capacidade aeróbia pode ter implicações para a descoberta de futuros possíveis biomarcadores que possam vir a contribuir com informações sobre o nível de capacidade aeróbia do indivíduo sem avaliações exaustivas. Portanto, o objetivo deste estudo foi usar lipidômica *untargeted* para investigar diferenças

metabólicas entre jogadores de futebol masculinos sub-22 com maior e menor capacidade aeróbia. Além disso, procuramos identificar associações entre o perfil metabólico sérico em jejum com a VCrit.

5.2 Metodologia específica

5.2.1 Grupos experimentais

Para esse estudo, foram avaliados trinta e seis jogadores de futebol sub-22. Os grupos de baixa e alta aptidão aeróbia foram determinados com base nos quartis superior e inferior dos níveis de VCrit (MORRIS et al., 2013). A VCrit média por quartil foi a seguinte: Quartil 1 = $9,5 \pm 0,43$ km/h, Quartil 2 = $10,2 \pm 0,2$ km/h, Quartil 3 = $11,0 \pm 0,2$ km/h, Quartil 4 = $12,5 \pm 1,4$ km/h. O grupo de baixa aptidão aeróbia apresentou um total de 21 atletas (idade= 19 ± 1 anos, mesomorfo= 86%, ectomorfo= 14%) e o grupo de alta aptidão aeróbia 15 atletas (idade= 19 ± 2 anos, mesomorfo = 80%, ectomorfo = 20%).

5.2.2 Análise estatística

A média e o desvio padrão (DP) foram calculados para todas as variáveis estudadas. Os testes de Levene e Shapiro-Wilk confirmaram a homogeneidade e normalidade dos dados antropométricos, porcentagem de hematócrito e VCrit. Esses dados foram comparados por testes t para amostras independentes ($p < 0,05$). A correlação produto-momento de Pearson foi usada para verificar associações entre as características dos jogadores de futebol e a VCrit ($p < 0,05$). Os intervalos de confiança foram calculados para desvio padrão com $\alpha = 0,05$ ($\sigma/\sqrt{n}$). O *effect size* (ES) foi calculado de acordo com as categorias de Cohen: pequeno se $0 \leq |d| \leq 0,5$; médio se $0,5 < |d| \leq 0,8$; e grande se $|d| > 0,8$ (COHEN, 1994). As análises dos dados lipidômicos foram realizadas usando o MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) (PANG et al., 2021). Os dados foram filtrados pelo desvio padrão relativo, normalizado pela soma, e adotado escala de Pareto. Primeiro, as análises de mapa de calor (*heatmap*) foram realizadas para fornecer uma visualização intuitiva da diferenciação dos lipídios no perfil metabólico sérico em jejum entre grupos de baixa e alta aptidão aeróbia. Em seguida, foram propostos três níveis de evidência estatística visando associar o perfil metabólico sérico

em jejum com a capacidade aeróbia (VCrit). O primeiro nível de evidência estatística consistiu na aplicação do *volcano plot* com limiar *fold change* de 2 e limiar do teste t de 0,01 para identificar os *features* com diferentes abundâncias relativas entre grupos de baixa e alta aptidão aeróbia. Posteriormente, os *features* selecionados pelo primeiro nível de evidência (diferenças entre os grupos) foram correlacionadas com a VCrit (capacidade aeróbia) por meio do teste de correlação de Pearson (r). Todos os *features* com $r \geq |0.2|$ foram retidos. O valor do coeficiente de correlação foi escolhido por refletir um efeito potencialmente importante esperado para preditores moleculares do metabolismo aeróbio (CASTRO et al., 2021). Com base nos resultados anteriores, realizamos o enriquecimento *over representation analysis* (ORA) para os metabólitos anotados e retidos pelos dois primeiros níveis de evidência estatística. Nesse sentido, os limites de $p < 0,05$ e *false discovery rate* (FDR) $< 0,1$ foram usados para considerar se os conjuntos de lipídios da classe superquímica foram impactantes (AMIN et al., 2019).

5.3 Resultados

5.3.1 Características dos atletas de futebol

A **Tabela 1** mostra as características físicas gerais de ambos os grupos. Não foram encontradas diferenças estatísticas e correlações entre os grupos de baixa aptidão aeróbia e alta aptidão aeróbia para altura, índice de massa corporal, massa magra, gordura corporal e hematócrito. Além disso, as variáveis exibiram pequenos ES. No entanto, houve diferença significativa com grande ES entre os grupos para a variável VCrit (capacidade aeróbia). O coeficiente de regressão do ajuste linear, distância versus tempo (R^2) foi de $0,98 \pm 0,1$ para os grupos de baixa e alta aptidão aeróbia, indicando sucesso na determinação da capacidade aeróbia.

Tabela 1. Características antropométricas e capacidade aeróbia dos jogadores de futebol.

	Baixa aptidão aeróbia (n=21) Média ± DP (IC)	Alta aptidão aeróbia (n=15) Média ± DP (IC)	Análise estatística		
			r (P valor)	Comparação	ES
Altura (cm)	175,7±7,1 (5,4–10,2)	174,8±6,4 (4,6–10,1)	-0,01 (0,918)	t=0,37 p=0,709	0,13
IMC (kg/m²)	21,9±2,6 (1,9–3,7)	22,1±2,0 (1,5–3,1)	-0,11 (0,502)	t=-0,20 p=0,835	0,09
Massa Corporal (kg)	67,8±10,2 (7,8–17,7)	67,5±8,2 (6,0–12,9)	-0,10 (0,541)	t=0,06 p=0,945	0,03
Massa magra (kg)	60,1±8,0 (6,1–11,5)	60,0±6,7 (4,9–10,6)	-0,09 (0,580)	t=0,03 p=0,972	0,01
Massa gorda (kg)	7,6±2,5 (1,9–3,6)	7,5±2,3 (1,7–3,6)	-0,11 (0,510)	t=0,15 p=0,875	0,04
% Gordura (%)	11,1±2,0 (1,5–2,8)	11,0±2,4 (1,8–3,8)	-0,08 (0,607)	t=0,14 p=0,889	0,05
Hematócrito (%)	51,1±3,9 (2,9–5,6)	49,7±4,1 (3,0–6,5)	0,09 (0,569)	t=1,06 p=0,295	0,35
VCrit (km/h)	9,9±0,5 (0,3–0,7)	11,8±1,3 (0,9–2,0)	– (–)	t=-6,00 p=0,001	2,11

IMC – índice de massa corporal; **VCrit** – capacidade aeróbia (velocidade crítica); **DP** – desvio padrão; os valores entre parênteses representam os limites de confiança (IC) superior e inferior dos DP; **r (P valor)** – coeficientes de correlação de Pearson para a associação entre as características dos jogadores de futebol e a capacidade aeróbia ($P < 0,05$); **Comparação** ($P < 0,05$) – teste t para amostras independentes; **ES** – *effect size*.

5.3.2 Análise de LC-MS e perfil de metabólitos séricos em jejum

Os mapas de calor podem fornecer diretamente uma visualização intuitiva da diferenciação dos *features*. No presente estudo, o grupo de baixa e alta aptidão aeróbia apresentaram diferentes perfis metabólicos baseados no mapa de calor. Os *features* com maior abundância relativa para o grupo de baixa aptidão aeróbia apresentam a menor abundância relativa para o grupo de alta aptidão aeróbia. Além disso, os *features* com maior abundância relativa para o grupo de alta aptidão aeróbia tiveram a menor abundância relativa para o grupo de baixa aptidão aeróbia (**Figura 1**).

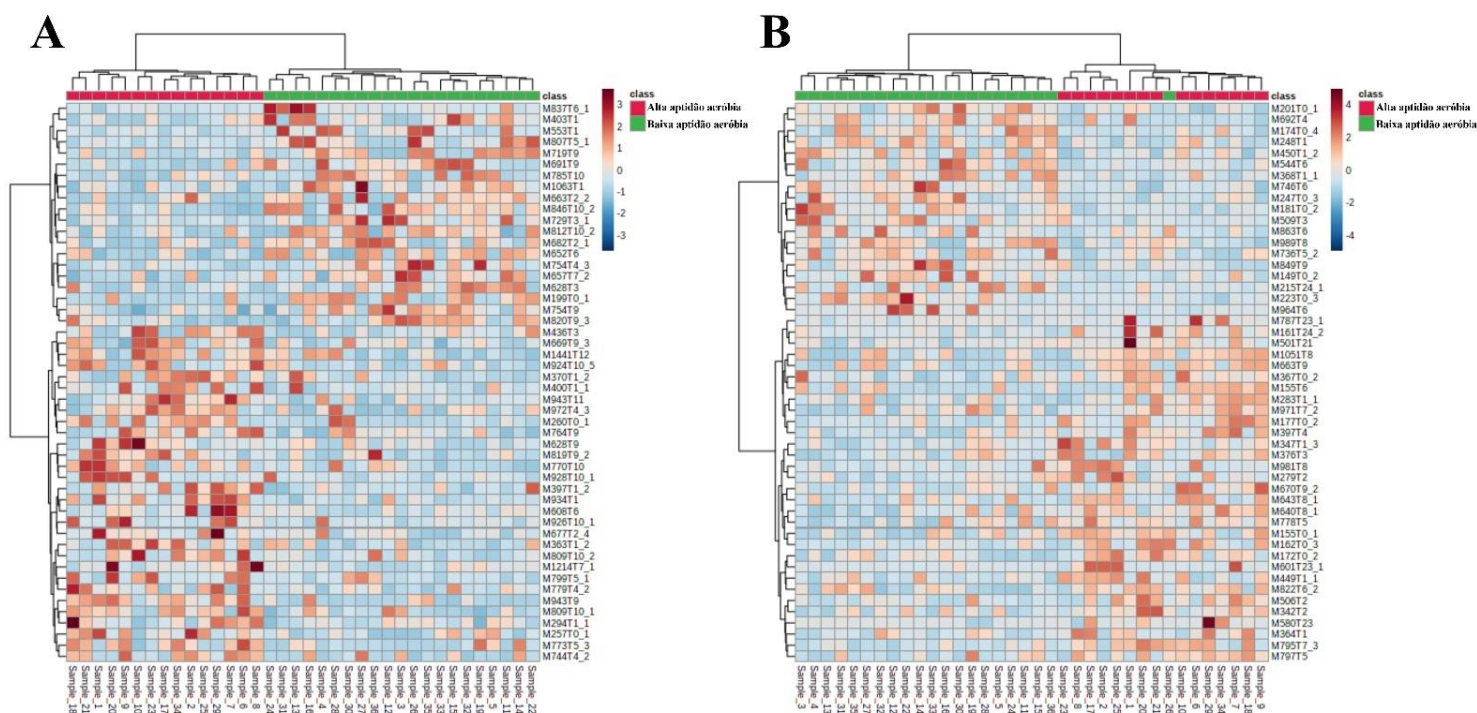


Figura 1. Os resultados de LC-MS derivados do soro coletado após jejum noturno de 12 horas são mostrados como mapas de calor para o modo ESI (+) (Painel A) e ESI (-) (Painel B). As caixas coloridas indicam a abundância relativa dos *features* correspondentes. A cor vermelha indica alta abundância relativa e a cor azul indica baixa abundância relativa.

5.3.3 Diferenças entre jogadores de futebol com baixa e alta capacidade aeróbia

Conforme mostrado na imagem do mapa de calor (**Figura 1**), a análise do *volcano plot* também confirmou as diferenças no perfil metabólico sérico em jejum entre os grupos de baixa e alta aptidão aeróbia (**Figura 2**).

Essa análise revelou que 16 *features* apresentaram abundância relativa diferentes entre os grupos de aptidão aeróbia para o modo ESI (+). Para o grupo com baixa aptidão aeróbia, 6 *features* foram maiores e 10 *features* foram maiores para o grupo com alta aptidão aeróbia. Por outro lado, 7 *features* foram diferentes para o modo ESI (-), com 3 *features* tendo maior abundância relativa para o grupo com baixa aptidão aeróbia e 4 *features* para o grupo com alta aptidão aeróbia (**Tabela 2**).

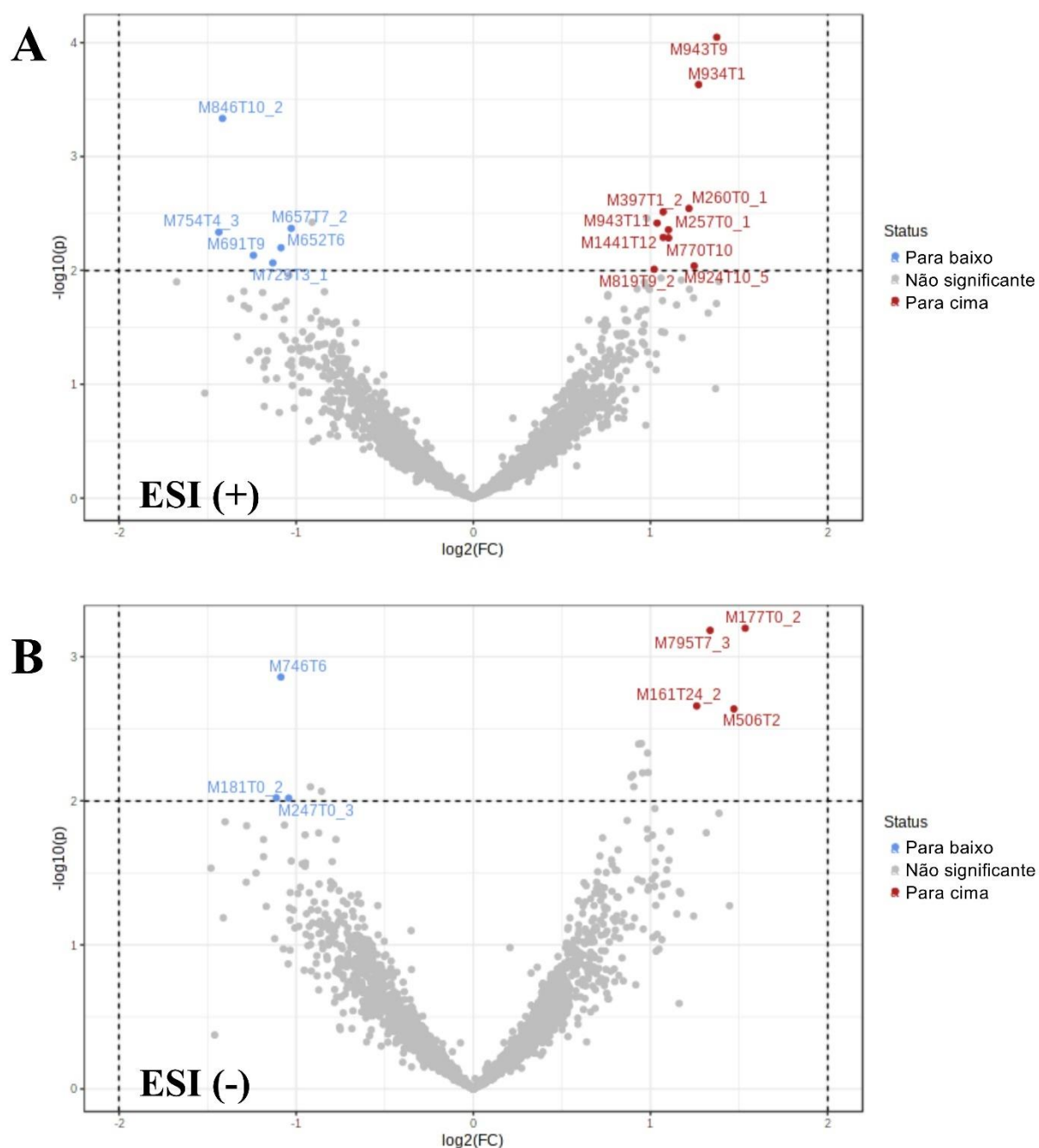


Figura 2. *Features* importantes selecionadas pelo *volcano plot* para o modo ESI (+) (Painel A) e ESI (-) (Painel B). Os *features* diferentes (vermelho e azul) e os *features* não diferentes (cinza) foram determinados sob as condições de *fold change* ≥ 2 e P valor $\leq 0,01$ do teste t. Os valores de P são transformados por $-\log_{10}$ para que os *features* mais significativamente diferentes (com valores de P menores) sejam maiores no eixo y. O *fold change* é transformado em log, de modo que valores negativos representam uma diminuição nos níveis dos *features* e valores positivos representam um aumento nos níveis dos *features*. Quanto mais distante de (0,0) estiver sua posição, mais significativo será o *feature*. Para cima (vermelho) e para baixo (azul) indicam *features* significantes para grupos de alta e baixa aptidão aeróbia.

Tabela 2. *Features* importantes identificados pelo *volcano plot* para o modo ESI (+) e ESI (-).

ESI (+)	Picos (mz/rt)	FC	log2(FC)	raw.pval	-log10(p)
1	M943T9	2.5923	1.3742	8.9669e-05	4.0474
2	M934T1	2.4142	1.2716	0.00023328	3.6321
3	M846T10_2	0.37476	-1.416	0.00046297	3.3344
4	M260T0_1	2.3251	1.2173	0.0028558	2.5443
5	M397T1_2	2.102	1.0717	0.0030629	2.5139
6	M943T11	2.0526	1.0375	0.0038469	2.4149
7	M657T7_2	0.49038	-1.028	0.0042761	2.369
8	M257T0_1	2.1462	1.1018	0.0044044	2.3561
9	M754T4_3	0.36939	-1.4368	0.0046197	2.3354
10	M1441T12	2.1019	1.0717	0.0051323	2.2897
11	M770T10	2.1469	1.1022	0.0051883	2.285
12	M652T6	0.4712	-1.0856	0.0063233	2.1991
13	M691T9	0.4229	-1.2416	0.0073747	2.1323
14	M729T3_1	0.45631	-1.1319	0.0085939	2.0658
15	M924T10_5	2.3731	1.2468	0.0091379	2.0392
16	M819T9_2	2.0294	1.021	0.0097715	2.01
ESI (-)					
1	M177T0_2	2.8974	1.5348	0.00063407	3.1979
2	M795T7_3	2.5256	1.3366	0.00065648	3.1828
3	M746T6	0.47093	-1.0864	0.0013835	2.859
4	M161T24_2	2.3968	1.2611	0.0021964	2.6583
5	M506T2	2.7724	1.4711	0.0023031	2.6377
6	M181T0_2	0.4626	-1.1122	0.00954	2.0205
7	M247T0_3	0.48554	-1.0423	0.0095902	2.0182

ESI – Fonte de eletrospray; **Features** – Os números após M e T representam a relação massa-carga (*m/z*) e o tempo de retenção (*rt*) do metabólito, respectivamente.

5.3.4 Associação entre capacidade aeróbia e *features* suportadas pelo 1º nível de evidência

Posteriormente, os *features* selecionados pelo primeiro nível de evidência (diferenças entre os grupos) foram correlacionadas com a VCrit. Como resultado, 13 e 6 *features* tiveram a abundância relativa correlacionada com VCrit em $r \geq |0,2|$ para o modo ESI (+) e ESI (-), respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3. Coeficientes de correlação parcial de Pearson (r) acima de |0,2| e valores de P para a associação entre velocidade crítica e abundância relativa dos *features* séricos em jejum.

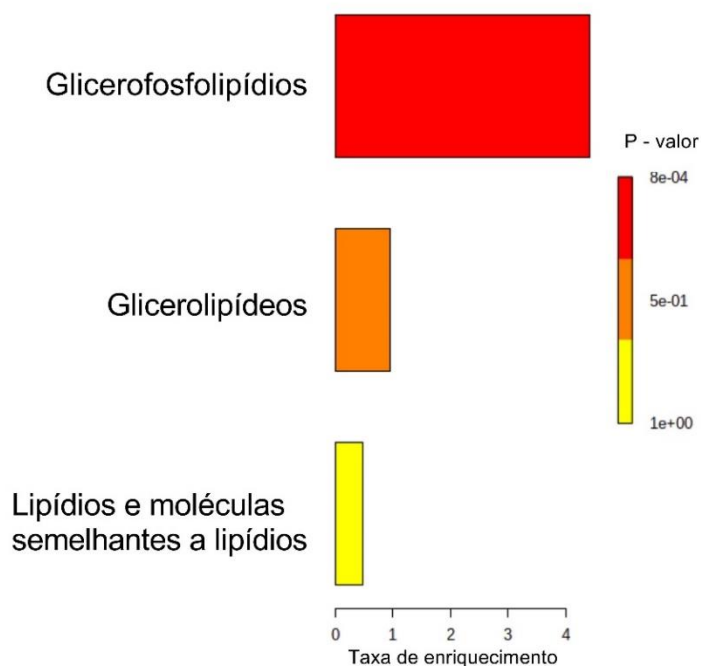
ESI (+)			ESI (-)		
<i>Features</i>	r	P valor	<i>Features</i>	r	P valor
M943T9	0,95	0,003	M161T24_2	0,81	0,050
M943T11	0,81	0,052	M795T7_3	0,79	0,063
M846T10_2	-0,77	0,077	M177T0_2	-0,52	0,293
M770T10	0,72	0,103	M181T0_2	-0,50	0,314
M819T9_2	-0,69	0,126	M247T0_3	-0,46	0,353
M754T4_3	-0,64	0,166	M506T2	-0,26	0,621
M924T10_5	0,55	0,253			
M691T9	-0,39	0,438			
M657T7_2	-0,35	0,493			
M729T3_1	-0,34	0,508			
M397T1_2	0,33	0,516			
M652T6	-0,31	0,539			
M1441T12	0,28	0,584			

ESI – Fonte de eletrospray; **Features** – Os números após M e T representam a relação massa-carga (m/z) e o tempo de retenção (RT) do metabólito, respectivamente.

5.3.5 Enriquecimento ORA de metabólitos retidos pelo 1º e 2º nível de evidência

Os *features* retidas pelo 1º e 2º níveis de evidência foram anotadas pesquisando os bancos de dados de espectros Metlin, HMDB, Keeg, LipidMaps e MINE. Posteriormente, foi realizada a análise ORA para a lista de metabólitos anotados. A **Figura 3** mostra o gráfico de barras do enriquecimento ORA. Além disso, detalha o valor P e o FDR para os metabólitos anotados contra a biblioteca de conjuntos de lipídios da classe super química. A análise ORA dos metabólitos séricos em jejum contra a biblioteca de conjuntos de lipídios da classe super química mostrou que a classe de glicerofosfolipídios teve a maior taxa de enriquecimento, o menor valor de P ($p < 0,001$) e $FDR < 0,1$ (**Figura 3**).

Visão geral do enriquecimento do conjunto de metabólitos



Conjunto de Metabólitos	Metabólitos Implicados ^a	Total ^b	Hits ^c	P valor ^d	Holm P ^e	FDR ^f
Glicerofosfolípidios	PC(32:3); PE(18:1(9Z)/16:1(9Z)); PE(22:2(13Z,16Z)/18:2(9Z,12Z)); PS(48:0); PG(38:7); 1-(2-Metoxi-nonadecanil)-sn-glicero-3-fosfoserina	27000	6	0,001	0,021	0,021
Glicerolipídeos	TG(16:0/16:0/16:0); TG(16:1(9Z)/16:1(9Z)/16:1(9Z))	41500	2	0,651	1	1
Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios	TG(15:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/22:0); DG(20:0/0:0/17:0)	83000	2	0,963	1	1

Figura 3. Visão geral gráfica e tabela da análise *enrichment over representation* (ORA). Gráfico de barras da ORA para os metabólitos séricos suportados pelo 1º e 2º nível de evidência contra a biblioteca de lipídios da classe super química no soro. ^a – Metabólitos classificados por conjuntos lipídicos de classe superquímica ou conjuntos lipídicos; ^b – Número total de metabólitos no conjunto de metabólitos; ^c – Número de acertos de metabólitos suportados pelo 1º e 2º nível de evidência envolvidos no conjunto de metabólitos; ^d – P Valor original calculado a partir da ORA; ^e – Holm p, P Valor original ajustado pelo método de Holm-Bonferroni; ^f – FDR, taxa de falsa descoberta (*false discovery rate*). Os limites de $p < 0,05$ e $FDR < 0,1$ foram usados para considerar se os conjuntos de lipídios da classe superquímica foram impactantes. Valores em negrito representam lipídios impactantes.

Conforme mostrado na **Tabela 4**, os metabólitos ligados à capacidade aeróbia foram aqueles apoiados por três níveis de evidência: (1) diferença significativa entre atletas com baixa e alta aptidão aeróbia, (2) correlação com VCrit e (3) contribuição dos metabólitos para um conjunto significativo de lipídios pertencentes a classe super química associados a VCrit.

Tabela 4. Informações sobre os glicerofosfolipídios suportados pelos três níveis de evidência estatística.

Features	Metabólitos	Base de dados	Volcano plot			
			FC	P valor	AR	r
Glicerofosfoserinas						
M943T9	PS(48:0)	HMDB0112908	2,60	0,001	↑Alta	0,95
M652T6	1-(2-metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoserina	LMGP03060027	0,47	0,006	↑Baixa	-0,31
Glicerofosfoetanolaminas						
M795T7_3	PE(22:2(13Z,16Z)/18:2(9Z,12Z))	HMDB0009555	2,53	0,001	↑Alta	0,79
M754T4_3	PE(18:1(9Z)/16:1(9Z))	HMDB0009056	0,37	0,004	↑Baixa	-0,64
Glicerofosfocolinas						
M729T3_1	PC(32:3)	HMDB0008196	0,47	0,008	↑Baixa	-0,34
Glicerofosfogliceróis						
M397T1_2	PG(38:7)	HMDB0116631	2,10	0,003	↑Alta	0,33

HMDB – Código do metabólito no *Human Metabolome Database*; **LMGP** – Código do metabólito no *Lipid maps*; **FC** – *fold change* do *volcano plot*; **P valor** – Limiar dos testes T do *volcano plot*; **AR** – refere-se à abundância relativa de metabólitos. ↑_{Alta} – Maior abundância relativa para o grupo de alta aptidão aeróbia; ↑_{Baixa} – Maior abundância relativa para o grupo de baixa aptidão aeróbia; **r** – Coeficientes de correlação de Pearson para a associação entre velocidade crítica e abundância relativa de metabólitos séricos em jejum.

5.4 Discussão

Embora estudos tenham realizado comparações e associações entre o perfil metabólico de indivíduos ativos e sedentários com VO₂max (LUSTGARTEN et al., 2013; MORRIS et al., 2013; MORRIS et al., 2015; CASTRO et al., 2021), nosso estudo foi o primeiro a aplicar a lipidômica *untargeted* por meio da análise LC-MS em jogadores de futebol sub-22 para diferenciar o perfil metabólico sérico em jejum de acordo com o nível de capacidade aeróbia, também revelando possíveis novos biomarcadores aeróbios. A análise lipidômica identificou diferenças no perfil metabólico sérico em jejum de acordo com os níveis de capacidade aeróbia. Além disso, nossos resultados identificaram uma relação entre glicerofosfolipídios séricos e a capacidade aeróbia dos atletas de futebol. Do nosso trabalho, propomos cautelosamente que níveis mais altos de PC(32:3), PE(18:1(9z)/16:1(9z)) e 1-(2-metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoserina no grupo com baixa aptidão aeróbia e níveis mais altos de PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)), PS(48:0) e PG(38:7) para o grupo com alta aptidão aeróbia, podem ser considerados possíveis biomarcadores de aptidão aeróbia.

Estudos tem demonstrado que o sexo, idade, índice de massa corporal (KOCHHAR et al., 2006; SLUPSKY et al., 2007; PSIHOGIOS et al., 2008) e o nível de aptidão aeróbia (MORRIS et al., 2013; MORRIS et al., 2015; CASTRO et al., 2021) influenciam os perfis metabólicos em amostras de plasma. É importante observar que, no presente estudo, as características gerais da composição corporal, incluindo altura, índice de massa corporal, massa corporal, massa magra, gordura corporal e hematócrito não mostraram diferenças e não apresentaram correlações significativas entre os grupos de baixa e alta aptidão aeróbia (**Tabela 1**). Assim, essas variáveis não afetaram a diferenciação do perfil metabólico sérico em jejum dos grupos. Por outro lado, a capacidade aeróbia foi a única variável que mostrou diferença estatística, confirmando diferentes níveis de capacidade aeróbia entre os grupos de baixa e alta aptidão aeróbia.

Os glicerofosfolipídios séricos eleitos candidatos como possíveis biomarcadores de capacidade aeróbia foram apoiados por três níveis de evidência estatística. Primeiro, esses metabólitos mostraram abundância relativa diferente entre grupos com baixa e alta aptidão aeróbia. Segundo, os lipídeos foram correlacionados com o VCrit. Terceiro, os glicerofosfolipídios exibiram uma contribuição significativa para as vias associadas à superclasse química dos lipídios. Os lipídeos PC(32:3), PE(18:1(9z)/16:1(9z)), 1-(2-metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoserina, PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)), PS(48:0) e PG(38:7) foram apoiados estatisticamente. Em particular, 1-(2-metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoserina e OS(48:0) são subclassificados como glicerofosfoserinas, também chamados fosfatidilserinas (PS). As PSs geralmente ocorrem em baixas concentrações na natureza, cerca de 0,2% no plasma sanguíneo humano (JÄGER et al., 2007) e desempenham um papel fundamental na integridade celular (JÄGER et al., 2007). Foi demonstrado que os PSs eram considerados possíveis biomarcadores responsáveis por distinguir o carcinoma hepatocelular da cirrose hepática e hepatite B crônica (PASSOS-CASTILHO et al., 2015). Em relação ao exercício, maiores concentrações de PSs prolongavam o tempo de exercício na corrida e no ciclismo, sugerindo um possível efeito ergogênico desses lipídios (KINGSLEY et al., 2006). Antes do presente estudo, ainda não haviam sido relatadas evidências relacionadas ao papel do PSs ao nível de capacidade aeróbia. Nossos resultados mostraram que níveis mais altos de PS(48:0) e níveis mais baixos de 1-(2-

metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoserina podem ser indicativos de um nível mais alto de capacidade aeróbia em jogadores de futebol.

Em relação ao PE(18:1(9z)/16:1(9z)) e PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)), esses metabólitos são subclassificados como glicerofosfolaminas, também nomeados como fosfatidiletanolaminas (PE). As PEs desempenham uma função mitocondrial indispensável, também contribuindo para o processo de autofagia (STEENBERGEN et al., 2005; HAILEY et al., 2010; VANCE et al., 2013). Associado ao fator neurotrófico derivado do cérebro, o PEs com concentração reduzida pelo exercício físico moderado pode ter um papel neuroprotetor em adultos de meia idade contra o desenvolvimento da doença de Alzheimer (GAITÁN et al., 2021). Há evidências de que os PEs mitocondriais podem potencializar as enzimas respiratórias, sendo capazes de ampliar a capacidade aeróbia do músculo esquelético (HEDEN et al., 2019). Além disso, foram relatados que indivíduos com alto VO_{2max} apresentam maiores concentrações séricas de PEs em comparação com indivíduos com baixo VO_{2max} (MORRIS et al., 2015). Corroborando a literatura, PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)) mostrou uma associação linear positiva com a VCrit e maior abundância relativa no grupo com alta aptidão aeróbia, sugerindo que PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)) pode ser indicativo de um nível mais alto de capacidade aeróbia. Em contraste, a maior abundância relativa no grupo com baixa aptidão aeróbia e a associação linear negativa entre PE(18:1(9z)/16:1(9z)) e VCrit sugerem que a depleção de PE(18:1(9z)/16:1(9z)) ocorre em níveis mais altos de capacidade aeróbia.

O lipídeo PC(32:3) é subclassificado como glicerofosfolinas, também conhecido como fosfatidilcolinas (PC). A composição das PCs no músculo esquelético tem sido associada à sensibilidade à insulina (LEE et al., 2018), sendo também caracterizada como lipídios induzidos pelo treinamento físico crônico (GOTO-INOUE et al., 2013). Além disso, atletas treinados apresentaram níveis mais altos de PCs musculares em comparação com adultos obesos sedentários e indivíduos com diabetes tipo 2 (NEWSOM et al., 2016). Estudos anteriores mostraram a ligação entre PCs e VO_{2max} , onde o grupo com o VO_{2max} mais alto exibiu maior concentração sérica de PCs em comparação com o grupo com o menor VO_{2max} (BYE et al., 2012; MORRIS et al., 2015). Ao contrário da literatura, o presente estudo revelou uma associação negativa de PC(32:3) com a VCrit. Ou seja, os jogadores de

futebol com um nível mais alto de capacidade aeróbia exibiram abundância relativa menor de PC(32:3). Com relação ao PG(38:7), esse lipídeo é subclassificado como glicerofosfogliceróis, também reconhecido como fosfatidilgliceróis (PG). Os PGs são encontrados em surfactantes pulmonares (KING et al., 1981) e no plasma sanguíneo humano (SCHWARZ et al., 1970), geralmente em baixa abundância, mas essencial para a vida (FURSE, 2017). Concentrações elevadas de PGs demonstraram várias propriedades essenciais para a saúde e função pulmonar (FURSE, 2017). Até onde sabemos, as relações diretas entre PGs e exercício físico ainda não foram relatados. No entanto, sabemos que os PGs são precursores da biossíntese da cardiolipina (CL) (NIE et al., 2010). As CLs estão presentes na membrana mitocondrial interna, sendo essencial para a manutenção da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, importante para o desempenho do metabolismo aeróbio (HOUTCOOPER et al., 2008). Devido à relação entre CLs e PGs, especulamos que pode haver uma relação entre metabolismo aeróbio e PGs. Nossos resultados estão alinhados com essa idéia, uma vez que os jogadores de futebol com maior capacidade aeróbia tiveram uma abundância relativa maior de PG(38:7).

5.5 Conclusão

Em resumo, diferenças foram relatadas pela primeira vez no perfil metabólico sérico em jejum de acordo com os níveis de capacidade aeróbia de jogadores de futebol sub-22. No geral, esse estudo acrescenta peso ao papel potencial da capacidade aeróbia no perfil metabólico sérico em jejum. Além disso, esse estudo mostrou que os níveis de VCrit estavam associados a lipídios séricos, com as vias metabólicas mais relevantes relacionadas ao metabolismo dos glicerofosfolipídios (glicerofosfoserinas, glicerofosfoetanolaminas, glicerofosfocolinas e glicerofosfogliceróis) de jogadores de futebol. Níveis mais baixos de PC(32:3), PE(18:1(9z)/16:1(9z)), 1-(2-metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoserina e níveis mais altos de PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)), PS(48:0) e PG(38:7) podem ser indicativos de um nível mais alto de capacidade aeróbia em jogadores de futebol. Antes da validação em uma coorte maior com intervenções em resposta ao treinamento aeróbio, esses resultados são promissores como potenciais biomarcadores representativos da capacidade aeróbia.

6. ESTUDO 2: UMA ABORDAGEM LIPIDÔMICA E AVALIAÇÕES FÍSICAS TRADICIONAIS PARA COMPARAR JOGADORES DE FUTEBOL SUB-22 DE ACORDO COM SEU NÍVEL COMPETITIVO

O presente estudo foi publicado na *Biology* (ISSN 2079-7737) em 18 de julho de 2022 no *Special Issue* nomeado “New Frontiers of Sport, Exercise and Physical Activity for Health and Human Performance” (**ANEXO 4**).

6.1 Introdução

A capacidade física, características morfológicas e habilidades táticas e técnicas diferenciam os jogadores de futebol por nível competitivo (SLIMANI et al., 2017). Capacidades aeróbia e anaeróbia aumentadas, VO_{2max} , força e potência muscular, velocidade de corrida, agilidade e menor porcentagem de gordura corporal foram identificadas como características essenciais em jogadores de elite em comparação com outros níveis competitivos (ou seja, sub-elite, amador, recreativo) (SLIMANI et al., 2017). Considerando esses importantes aspectos, distintas avaliações físicas tradicionais, como medidas antropométricas e composição corporal (REILLY et al., 2000; REILLY et al., 2000), TLM (SILVA et al., 2007), MFEL (LOURES et al., 2015), MAOD (ANDRADE et al., 2015) e VCrit (KARSTEN et al., 2016; WAKAYOSHI et al., 1992) foram aplicados em jogadores de futebol para avaliação de talentos, discriminação do nível competitivo e prescrição e controle da carga de treinamento (SLIMANI et al., 2017).

Além de estudos envolvendo protocolos com avaliações físicas clássicas, a bioquímica tradicional tem sido usada para determinar marcadores biológicos específicos em jogadores de futebol (DJAOUI et al., 2017). Parâmetros e marcadores hematológicos como hemograma completo, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, CK, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol, ferritina, proteína C reativa e hormônio estimulador da tireoide passaram a fazer parte dos exames laboratoriais de rotina aplicados à elite atletas de futebol (MEYER et al., 2011). Embora a bioquímica tradicional tenha permitido a diferenciação entre atletas de alto nível com outros níveis competitivos, essa análise tradicional é limitada quando o objetivo é buscar uma resposta global e integrada dos metabólitos. Nesse sentido, a metabolômica (lipidômica) *untargeted* pode ser uma estratégia

interessante para investigar o perfil fisiológico dos atletas, uma vez que essa abordagem visa fornecer uma perspectiva ampla e integrada das vias metabólicas de um organismo (HOANG et al., 2019). A lipidômica pode ser conduzida utilizando LC-MS, NMR, GC-MS e CE-MS ou em combinação com outras análises (KLASSEN et al., 2017) para determinar o perfil metabólico dos atletas usando fluidos biológicos (urina, saliva, suor e sangue) (ZHANG et al., 2012).

Essa abordagem envolve o estudo de perfis de metabólitos em situações comparativas de grupos submetidos a diferentes intervenções, como terapias, níveis de estresse, modulação alimentar, doenças e exercício físico (HEANEY et al., 2019; HOANG et al., 2019). No futebol, AL-KHELAIFI et al. (2018) estudaram o perfil dos metabólitos alimentares presentes no soro de atletas de elite de vários esportes, incluindo futebol. Além disso, as mudanças no perfil metabólico foram investigadas após as partidas de futebol (RA et al., 2014; PRADO et al., 2017; PITTI et al., 2019; ZHAO et al., 2020; MARINHO et al., 2022), no treinamento físico agudo e crônico (CÍCERO et al., 2016; CAO et al., 2020; PINTUS et al., 2020; QUINTAS et al., 2020) e na aplicação de protocolos de avaliação física (SANTONE et al., 2014). No entanto, estudos metabolômicos ainda não foram usados para diferenciar o perfil metabólico dos jogadores de futebol em diferentes níveis competitivos.

Nesse contexto, a combinação entre as avaliações físicas tradicionais e a abordagem lipidômica para caracterizar e diferenciar os atletas de futebol pode contribuir muito para a área do exercício físico e da fisiologia do esporte. Portanto, esse estudo teve como objetivo usar avaliações físicas tradicionais, juntamente com uma abordagem metabolômica (lipidômica) para comparar o perfil antropométrico, o nível de aptidão física e o perfil metabólico sérico de jejum entre os jogadores de futebol de sub-22 inseridos em diferentes níveis de competição. Foi levantada a hipótese de que os jogadores de futebol de sub-22 em níveis mais altos de competição apresentariam melhores parâmetros para o perfil antropométrico, nível de aptidão física e perfil metabólico diferente dos jogadores não-elite de futebol sub-22.

6.2 Metodologia específica

6.2.1 Participantes

Trinta e seis jogadores de futebol de duas equipes de sub-22 jogando em diferentes níveis de competição foram avaliados, ou seja, um grupo não-elite ($n = 20$ atletas, idade = 20 ± 2 anos) competindo na divisão regional de São Paulo e um grupo elite ($n = 16$ atletas, idade = 18 ± 1 ano) participando da primeira divisão do campeonato de futebol de São Paulo.

6.2.2 Análise estatística

A média e o DP foram calculados para todas as variáveis estudadas. A normalidade e homogeneidade de dados antropométricos, porcentagem de hematócrito, VCrit e CCA foram confirmados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Esses dados foram comparados usando o teste t não pareado ($p < 0,05$). O ES foi calculado de acordo com as categorias de Cohen: pequeno se $0 \leq |d| \leq 0,5$; médio se $0,5 < |d| \leq 0,8$; e grande se $|d| > 0,8$ (COHEN, 1994). Os intervalos de confiança foram calculados para desvio padrão com $\alpha = 0,05$ ($\sigma/\sqrt{n}$).

O metaboanalyst 5.0 foi usado para realizar o tratamento estatístico lipidômico (PANG et al., 2021). Os dados foram filtrados pelo desvio padrão relativo, normalizado pela soma e dimensionados usando a escala Pareto. A primeira etapa da análise consistiu em aplicar a análise de *fold change* (FC) (*fold change* limite de 2) para identificar *features* com diferente abundância relativa entre os times de futebol. Em seguida, os metabólitos que mostraram diferenças foram submetidos à análise de PCA, com o objetivo de fornecer uma rápida visualização de semelhanças ou diferenças no conjunto de dados de metabólitos. Posteriormente, foi utilizada a análise PLS-DA, permitindo a distinção entre *clusters* das equipes de elite e não-elite com base em dados metabolômicos. Para validar a robustez e qualidade dessa análise, foi utilizado validação cruzada para o número ideal de componentes para classificação. Os componentes máximos foram encontrados em cinco. A classificação foi feita com base no método *10-fold*. Os índices de acurácia, Q^2 (previsibilidade do modelo) e R^2 (variação explicada) foram usados como uma medida de desempenho do PLS-DA. Além disso, testes de permutação (100

permutações) foi utilizado. A discriminação entre os perfis fisiológicos de ambas as equipes foi realizada usando a *variable importance for projection* (VIP) maior que 1,0, estimada a partir da análise PLS-DA.

6.3 Resultados

6.3.1 Características antropométricas, composição corporal, aeróbia e anaeróbia

As características gerais antropométricas e de composição corporal de todos os indivíduos separados por equipes, incluindo altura, índice de massa corporal, massa corporal, massa corporal magra, gordura corporal e hematócrito, são mostrados na **Tabela 1**. Não houve diferenças significativas entre os grupos não-elite e elite. Além disso, as variáveis exibiram pequeno ES (**Tabela 1**). Adicionalmente, o grupo não-elite mostrou uma prevalência de 80% do mesomorfo e 20% do ectomorfo, enquanto no grupo de elite as porcentagens foram de 87% e 13%, respectivamente. Não foram encontrados endomorfos em nossa amostra.

Tabela 1. Caracterização de ambas as equipes considerando variáveis antropométricas e composição corporal.

	Time_A (Menor nível competitivo) (n=16) Média ± DP (IC)	Time_B (Maior nível competitivo) (n=20) Média ± DP (IC)	Análise estatística	
			Comparação	ES
Altura (cm)	174,4±7,0 (5,1–10,8)	176,5±7,0 (5,3–10,2)	t=-0,95 p=0,348	0,30
IMC (kg/m²)	22,1±2,4 (1,7–3,7)	21,9±2,3 (1,7–3,3)	t=0,16 p=0,870	0,09
Massa Corporal (kg)	67,1±8,8 (6,5–13,6)	68,5±10,1 (7,6–14,7)	t=-0,45 p=0,654	0,15
Massa magra (kg)	59,3±7,1 (5,2–10,9)	61,1±7,9 (6,0–11,5)	t=-0,74 p=0,462	0,24
Massa gorda (kg)	7,8±2,4 (1,7–3,7)	7,3±2,4 (1,8–3,5)	t=0,53 p=0,597	0,21
% Gordura (%)	11,4±2,4 (1,7–3,7)	10,5±1,7 (1,2–2,4)	t=1,28 p=0,207	0,44
Hematócrito (%)	50,2±4,0 (2,9–6,1)	51,0±4,0 (3,0–5,8)	t=-0,58 p=0,563	0,20

IMC – índice de massa corporal; **DP** – desvio padrão; os valores entre parênteses representam os limites de confiança (IC) superior e inferior dos DP; **Comparação** (P < 0,05) – teste t para amostras independentes; **ES** – *effect size*.

Os dados da aplicação do protocolo de VCrit são apresentados na **Tabela 2**. Em relação ao tlim das cargas preditivas, VCrit, CCA e r^2 , não houve diferença estatística entre as equipes não-elite e elite, e as variáveis exibiram pequeno ES.

Tabela 2. Cargas preditivas, capacidade aeróbia e anaeróbia de ambas as equipes a partir da aplicação do protocolo de velocidade crítica.

			Análise estatística	
	Time _A (Menor nível competitivo) (n=16) Média ± DP (IC)	Time _B (Maior nível competitivo) (n=20) Média ± DP (IC)	Comparação	ES
1º carga preditiva (s)	232,0±15,0 (11,1–23,2)	232,0±16,0 (12,1–23,3)	t=0,08 p=0,933	0,01
2º carga preditiva (s)	371,0±26,0 (19,2–40,2)	366,0±26,0 (19,7–37,9)	t=0,50 p=0,616	0,19
3º carga preditiva (s)	495,0±33,0 (24,3–51,1)	497,0±20,0 (15,2–29,2)	t=-0,20 p=0,841	0,08
4º carga preditiva (s)	627,0±56,0 (41,3–86,6)	656,0±43,0 (32,7–62,8)	t=-1,69 p=0,099	0,59
VCrit (m/s)	3,1±0,4 (0,3–0,6)	3,0±0,2 (0,1–0,3)	t=1,98 p=0,06	0,33
CCA (m)	129,6±55,7 (41,1–86,21)	161,5±61,0 (46,3–89,1)	t=-1,63 p=0,110	0,55
R²	0,98±0,02 (0,01–0,03)	0,99±0,01 (0,01–0,02)	t=-0,57 p=0,569	0,67

1º carga preditiva – distância total realizada (800m); **2º carga preditiva** – distância total percorrida (1200m); **3º carga preditiva** – distância total percorrida (1600m); **4º carga preditiva** – distância total percorrida (2000m); **DP** – desvio padrão; os valores entre parênteses representam os limites de confiança (IC) superior e inferior dos DP; **Comparação (P < 0,05)** – teste t para amostras independentes; **ES** – *effect size*.

6.3.2 Metabólitos com diferenças entre os times de futebol

Após o processamento dos dados brutos no XCMS, foram extraídos 10.230 *features*, dos quais 5.022 foram extraídos no modo ESI (+) e 5.208 no modo ESI (-). Os dados do processamento no Metaboanalyst indicaram os principais *features* da análise LC-MS em ambos os modos de ionização. Primeiro, os *features* dos grupos não-elite e elite foram comparados (**Figura 1**). A análise FC revelou que 76 *features* apresentaram diferenças na abundância relativa entre as equipes para o modo ESI (+). Para os jogadores não-elite, houve prevalência de 49 *features*, enquanto o time de elite apresentou 27 *features*. Por outro lado, 64 *features* foram diferentes para o modo ESI (-), das quais 39 *features* apresentaram maior abundância relativa para o grupo não-elite e 25 *features* para o grupo elite (**Tabelas 3 e 4**).

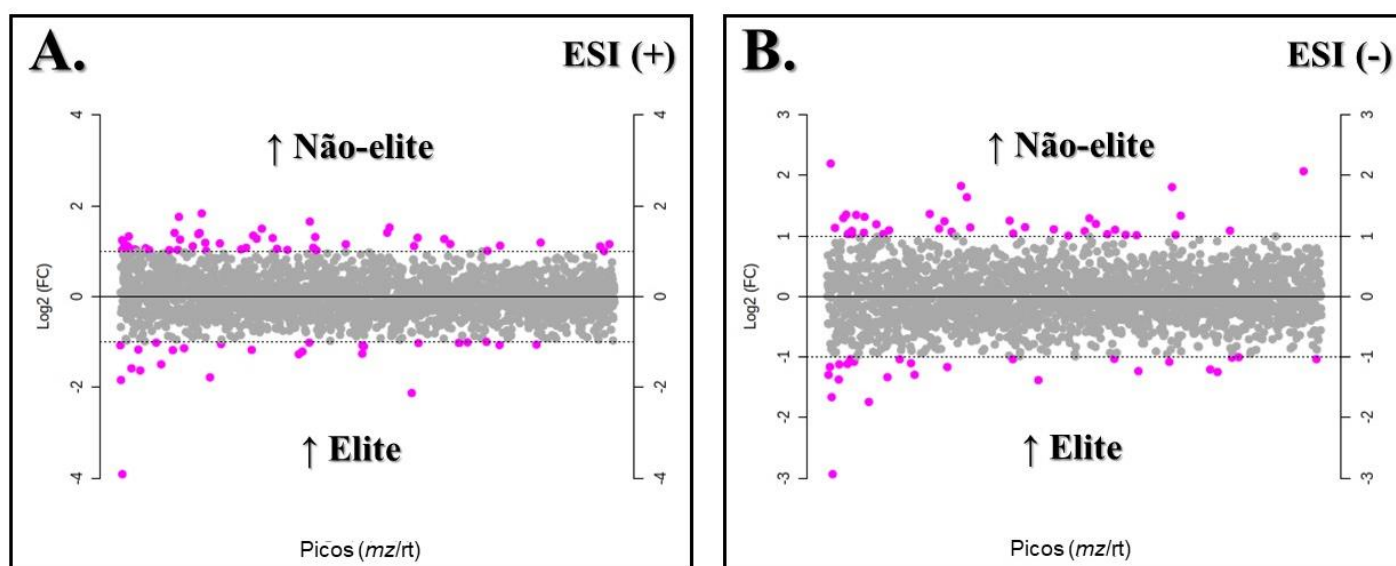


Figura 1. Comparação dos perfis fisiológicos dos jogadores de futebol das equipes elite e não-elite para os modos ESI (+) (**A**) e ESI (-) (**B**) por análise com limiar 2. Os círculos rosas representam *features* diferentes entre as equipes. Os círculos rosas superiores representam *features* acima do limiar da *fold change* mostrando maior abundância relativa para a equipe não-elite, enquanto os círculos rosas inferiores representam *features* acima do limiar da *fold change* mostrando maior abundância relativa para a equipe elite.

Tabela 3. *Features* diferenciados dos perfis fisiológicos de jogadores de futebol de times de elite e não elite para o modo ESI (+) por análise fold-change com limiar 2.

ESI(+)		
<i>Features</i>	Fold Change	log2(FC)
M404T1_3	0.066231	-3.9164
M755T3	0.22876	-2.1281
M740T4	0.27924	-1.8404
M1272T8	3.5576	1.8309
M514T8	0.29087	-1.7816
M974T5_2	3.3745	1.7547
M660T2	3.1414	1.6514
M443T2_2	0.32328	-1.6292
M747T4_1	0.33368	-1.5834
M243T2	2.8692	1.5206
M721T2	0.35467	-1.4955
M605T5	2.8189	1.4951
M901T7_1	2.6509	1.4065
M316T0_1	2.6448	1.4032
M463T1_1	2.6396	1.4003
M715T4_2	2.5922	1.3742
M676T2_2	2.5366	1.3429
M774T5_2	2.5064	1.3256
M554T7_1	2.4824	1.3118
M291T1_1	2.4544	1.2954
M532T1_1	2.4439	1.2892
M638T2	2.4179	1.2738
M932T2_2	0.4143	-1.2713
M829T5	2.407	1.2672
M909T2	0.41725	-1.261
M340T0_2	2.3884	1.256
M370T0	2.3641	1.2413
M726T1	0.431	-1.2142
M784T5_3	2.3152	1.2112
M359T1_1	2.2792	1.1885
M761T5_1	2.2739	1.1852
M286T3	0.44056	-1.1826
M209T2_2	0.44244	-1.1764
M763T5_1	0.44428	-1.1704
M820T4	2.25	1.1699
M583T10	2.2305	1.1574
M406T1_2	2.2258	1.1543
M204T2	2.2248	1.1537
M787T9	0.45391	-1.1395
M238T0_4	2.1746	1.1208
M765T4_2	2.1721	1.1191
M238T0_3	2.161	1.1117
M313T1_2	2.1585	1.11
M145T0_2	2.1557	1.1082
M369T1_2	2.1525	1.106
M1087T1_1	0.46624	-1.1008
M172T20_2	2.1078	1.0757
M334T1_1	2.1074	1.0754
M375T1_2	0.47463	-1.0751
M628T7	0.47489	-1.0743
M161T15_2	0.47661	-1.0691
M889T10_3	2.0904	1.0638
M591T8	0.4794	-1.0607
M773T5_3	2.0767	1.0543
M635T2_2	2.0741	1.0525
M293T1	0.48406	-1.0467
M1214T7_1	2.0541	1.0385
M909T10_1	2.0535	1.0381
M918T10_3	2.0514	1.0366
M701T7	2.0406	1.029
M414T1_4	2.0387	1.0277
M998T10	0.49106	-1.026
M650T8_1	2.0329	1.0236
M677T2_2	2.0316	1.0226
M356T0	2.0297	1.0213
M887T9_1	2.0292	1.0209
M591T1	0.49313	-1.0199
M812T5_3	0.4932	-1.0198
M527T1_2	0.49432	-1.0165
M906T10_1	0.49455	-1.0158
M917T9_1	2.0216	1.0155
M417T2_1	0.49624	-1.0109
M705T12	2.0117	1.0084
M103T19_2	2.008	1.0058
M698T5	2.0005	1.0004
M856T7_1	0.49993	-1.0002

ESI – Fonte de eletrospray; **Features** – Os números após M e T representam a relação massa-carga (m/z) e o tempo de retenção (RT) do metabólito, respectivamente.

Tabela 4. *Features* diferenciados dos perfis fisiológicos de jogadores de futebol de times de elite e não elite para o modo ESI (-) por análise fold-change com limiar 2.

ESI(-)		
<i>Features</i>	Fold Change	log2(FC)
M798T6	0.13076	-2.935
M348T1_2	4.5819	2.196
M583T23_1	4.1967	2.0693
M924T23	3.546	1.8262
M187T27	3.4989	1.8069
M608T1_3	0.29925	-1.7406
M495T1	0.31587	-1.6626
M682T3	3.1162	1.6398
M571T21	0.38401	-1.3808
M465T3_2	0.38648	-1.3715
M671T3	2.5728	1.3633
M263T1_1	2.5546	1.3531
M887T7_3	2.5442	1.3472
M777T7_2	2.524	1.3357
M993T9	0.39713	-1.3323
M961T23	2.4898	1.316
M789T6_2	2.4542	1.2952
M773T6	0.40775	-1.2942
M580T1_3	0.40804	-1.2932
M698T3	2.4483	1.2918
M300T1_2	2.3832	1.2529
M966T7	0.42145	-1.2466
M1005T23_2	2.3676	1.2434
M449T0	0.42553	-1.2327
M949T7_1	0.43393	-1.2045
M620T2	2.2954	1.1987
M267T1_1	2.286	1.1928
M447T1_1	0.44629	-1.1639
M803T7_1	0.44682	-1.1622
M349T1_2	2.2118	1.1452
M954T8	2.2051	1.1408
M857T6	2.1953	1.1344
M889T7	0.45985	-1.1207
M846T23	2.1735	1.12
M338T1_4	0.46173	-1.1149
M397T3_2	2.1594	1.1107
M734T23	2.1467	1.1021
M455T1_2	0.46588	-1.102
M483T23_1	2.1342	1.0937
M797T7_2	2.1257	1.0879
M724T7	2.1188	1.0833
M682T8	0.47306	-1.0799
M439T1_1	2.1135	1.0796
M373T25_1	0.47326	-1.0793
M1137T6	2.1006	1.0708
M539T2	2.078	1.0552
M530T23	2.0583	1.0414
M499T1	2.057	1.0406
M335T0	0.48729	-1.0372
M752T7_2	0.4874	-1.0368
M827T6_2	2.0507	1.0361
M369T1_4	0.48771	-1.0359
M247T0_1	2.0499	1.0355
M833T23	0.48808	-1.0348
M791T6_2	2.0452	1.0322
M409T3	2.0434	1.031
M424T2	2.0419	1.0299
M558T1_1	0.48986	-1.0295
M545T23_2	2.0269	1.0193
M383T0_1	2.0266	1.0191
M1217T23	2.0172	1.0123
M223T0_2	0.49677	-1.0094
M884T8	2.0053	1.0038
M829T6_1	0.49881	-1.0034

ESI – Fonte de eletrospray; *Features* – Os números após M e T representam a relação massa-carga (m/z) e o tempo de retenção (RT) do metabólito, respectivamente.

A **Figura 2** mostra a análise multivariada não supervisionada (PCA). Neste gráfico de pontuação, os eixos x e y foram denominados PC 1 e 2, respectivamente, e cada ponto representa 1 jogador de futebol. Embora os gráficos de pontuação do PCA revelem baixa variância explicada cumulativa, eles fornecem uma tendência de separação clara para os modos ESI (+) (**Figura 2a**) e ESI (-) (**Figura 2b**), o que foi confirmado no modelo PLS-DA. Inclusive, a PCA revelou a ausência de amostras discrepantes.

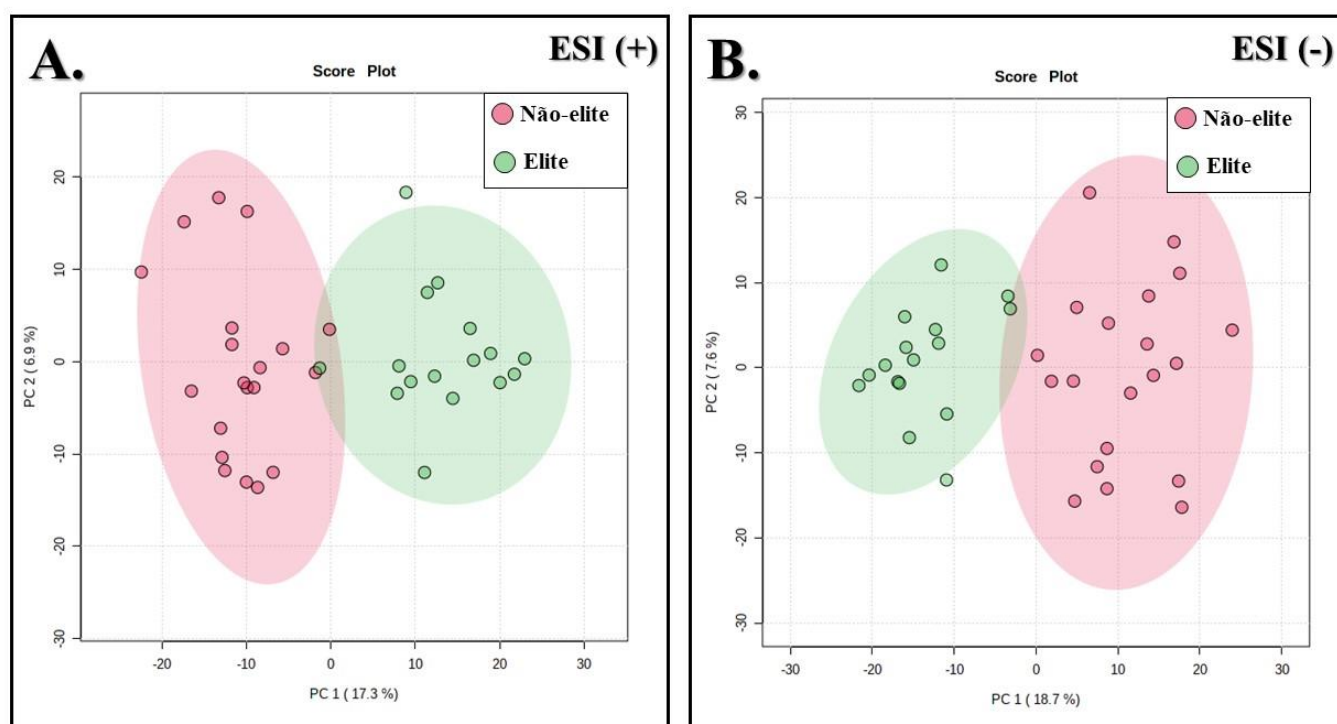


Figura 2. Gráficos de pontuação PCA de todas as amostras de soro de ambos os times de futebol para os modos ESI (+) (**A**) e ESI (-) (**B**). As cores representam diferentes times de futebol (vermelho: atletas não-elite; verde: atletas de elite).

A análise multivariada supervisionada do PLS-DA foi aplicada para revelar a classificação das equipes de elite e não-elite (**Figura 3**). Esse modelo matemático apresentou acurácia = 0,98, $R^2 = 0,88$, $Q^2 = 0,81$ e teste de cem permutações com $p = < 0,01$ para o modo ESI (+) e acurácia = 0,99, $R^2 = 0,86$, $Q^2 = 0,79$ e teste de cem permutações com $p = < 0,01$ para o modo ESI (-), indicando robustez na previsibilidade do modelo. No gráfico de pontuação PLS-DA para os modos ESI (+) (**Figura 3a**) e ESI (-) (**Figura 3c**), uma clara separação das amostras pode ser observada nos dois *clusters*. O gráfico VIP mostra os 15 *features* mais contribuíram para a diferenciação dos grupos não-elite e elite, com uma pontuação fixada acima de 1 para o modo ESI (+) (**Figura 3b**) e ESI (-) (**Figura 3d**).

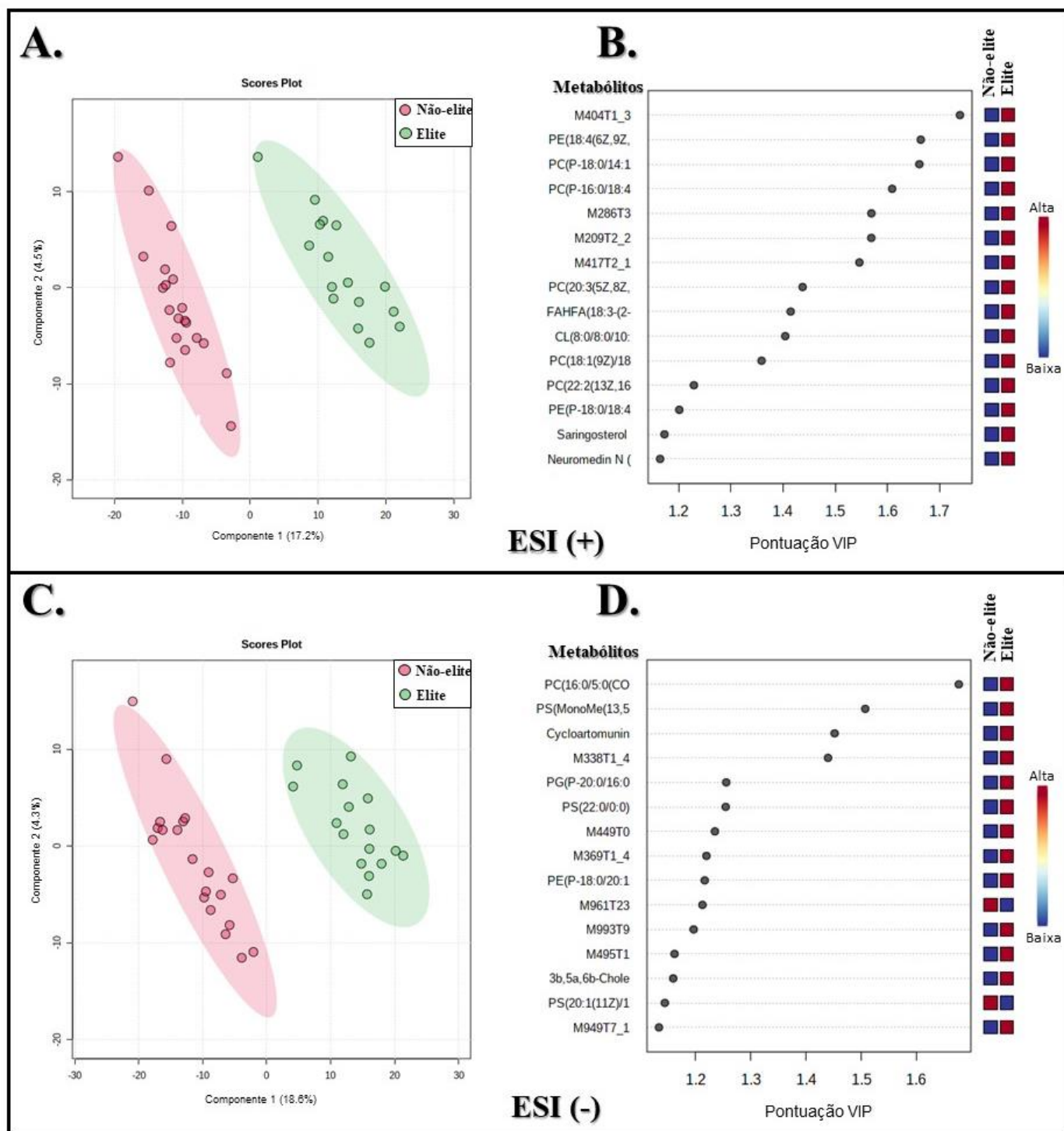


Figura 3. (A,C): Gráficos de pontuação 2D da Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) comparando os dois grupos nos modos ESI (+) e ESI (-), respectivamente. **(B,D):** Gráficos de pontuação PLS-DA mostrando os principais features que discriminaram os grupos amostrais de acordo com a pontuação VIP para os modos ESI (+) e ESI (-), respectivamente. As cores representam diferentes times de futebol (vermelho: atletas não-elite; verde: atletas de elite). As caixas de espectro de cores azul e vermelho à direita indicam os valores da abundância relativa dos metabólitos correspondentes em cada equipe. Os recursos M404T1_3, M286T3, M209T2_2, M417T2_1 no modo ESI (+) e M338T1_4, M449T0, M369T1_4, M961T23, M993T9, M495T1, M949T7_1 no modo ESI (-) não foram identificados.

6.3.3 Anotação dos Metabólitos

A anotação dos *features* é a atribuição de potenciais candidatos a metabólitos ao sinal com base na correspondência entre sua massa e os parâmetros de entrada dos bancos de dados ou bibliotecas de espectros. Os *features* identificados foram anotados e nomeados como metabólitos putativos. Os metabólitos mais essenciais do gráfico de pontuação VIP são mostrados na **Tabela 5**. Dezenove metabólitos foram anotados dos 30 *features* discriminatórios entre as equipes. A abundância relativa dos metabólitos é mostrada no gráfico de pontuação VIP (**Figura 3b,d**). As caixas de espectro de cores azul e vermelho à direita indicam os valores de abundância relativa dos possíveis metabólitos correspondentes em cada equipe. Dos metabólitos anotados, todos apresentaram maior abundância relativa para a equipe elite, com exceção do PS(20:1(11Z)/16:0), que foi relativamente mais abundante na equipe não-elite (**Figuras 4 e 5**).

Tabela 5. *Features* anotados e selecionados pela análise de pontuação VIP como os mais capazes de diferenciar as duas equipes.

<i>Features</i>	<i>m/z</i>	RT (min)	Matabólitos	Modo	Fórmula química	Erro ppm	VIP
Glicerofosfolipídios							
<i>Fosfatidilserinas</i>							
M889T7	888,53	6,75	PS(MonoMe(13,5)/DiMe(9,5))	-	C ₄₉ H ₈₂ NO ₁₂ P	5	1,50
M580T1_3	580,36	1,42	PS(22:0/0:0)	-	C ₂₈ H ₅₆ NO ₉ P	2	1,25
M789T6_2	788,54	5,83	PS(20:1(11Z)/16:0)	-	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P	2	1,14
<i>Glicerofosfogliceróis</i>							
M798T6	797,55	6,10	PG(P-20:0/16:0)	-	C ₄₂ H ₈₃ O ₉ P	7	1,25
<i>Fosfatidiletanolaminas</i>							
M740T4	739,54	3,76	PE(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/P-18:1(11Z))	+	C ₄₁ H ₇₂ NO ₇ P	10	1,66
M803T7_1	802,59	6,98	PE(P-18:0/20:1(11Z))	-	C ₄₃ H ₈₄ NO ₇ P	6	1,21
M747T4_1	746,51	3,62	PE(P-18:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	+	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	2	1,20
<i>Fosfatidilcolinas</i>							
M608T1_3	608,35	0,91	PC(16:0/5:0(COOH))	-	C ₂₉ H ₅₆ NO ₁₀ P	3	1,67
M755T3	754,52	2,81	PC(P-18:0/14:1(9Z))	+	C ₄₀ H ₇₈ NO ₇ P	10	1,66
M721T2	720,53	2,34	PC(P-16:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	+	C ₄₂ H ₇₆ NO ₇ P	1	1,61
M856T7_1	855,66	6,55	PC(20:3(5Z,8Z,11Z)/20:1(11Z))	+	C ₄₈ H ₈₈ NO ₈ P	2	1,43
M787T9	786,60	9,04	PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))	+	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	9	1,35
M909T2	908,61	2,33	PC(22:2(13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	+	C ₅₂ H ₈₈ NO ₈ P	2	1,22
<i>Cardiolipinas</i>							
M1087T1_1	1086,65	0,63	CL(8:0/8:0/10:0/18:2(9Z,11Z))	+	C ₅₃ H ₉₈ O ₁₇ P ₂	5	1,40
Glicerolipídeos							
M591T1	591,42	0,86	Saringosterol 3-glicosídeo	+	C ₃₅ H ₅₈ O ₇	6	1,17
Flavonóides							
M447T1_1	447,14	0,79	Cicloartomunina	-	C ₂₆ H ₂₄ O ₇	6	1,45
Lipídios esteróis							
M465T3_2	465,35	3,45	3b,5a,6b-Colestanetriol	-	C ₂₇ H ₄₈ O ₃	8	1,15
Acils Graxos							
M527T1_2	527,28	0,52	Neuromedina N (1-4)	+	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₆	6	1,16
Outros metabólitos							
M628T7	627,56	6,86	FAHFA(18:3-(2-O-24:0))	+	C ₄₂ H ₇₆ O ₄	6	1,41

m/z – m representa a massa e z representa a carga do *feature*; *RT* – Tempo de retenção; *VIP* – pontuação do gráfico VIP. A classe do metabólito é representada em negrito e a subclasse é representada em negrito e itálico na coluna dos metabólitos.

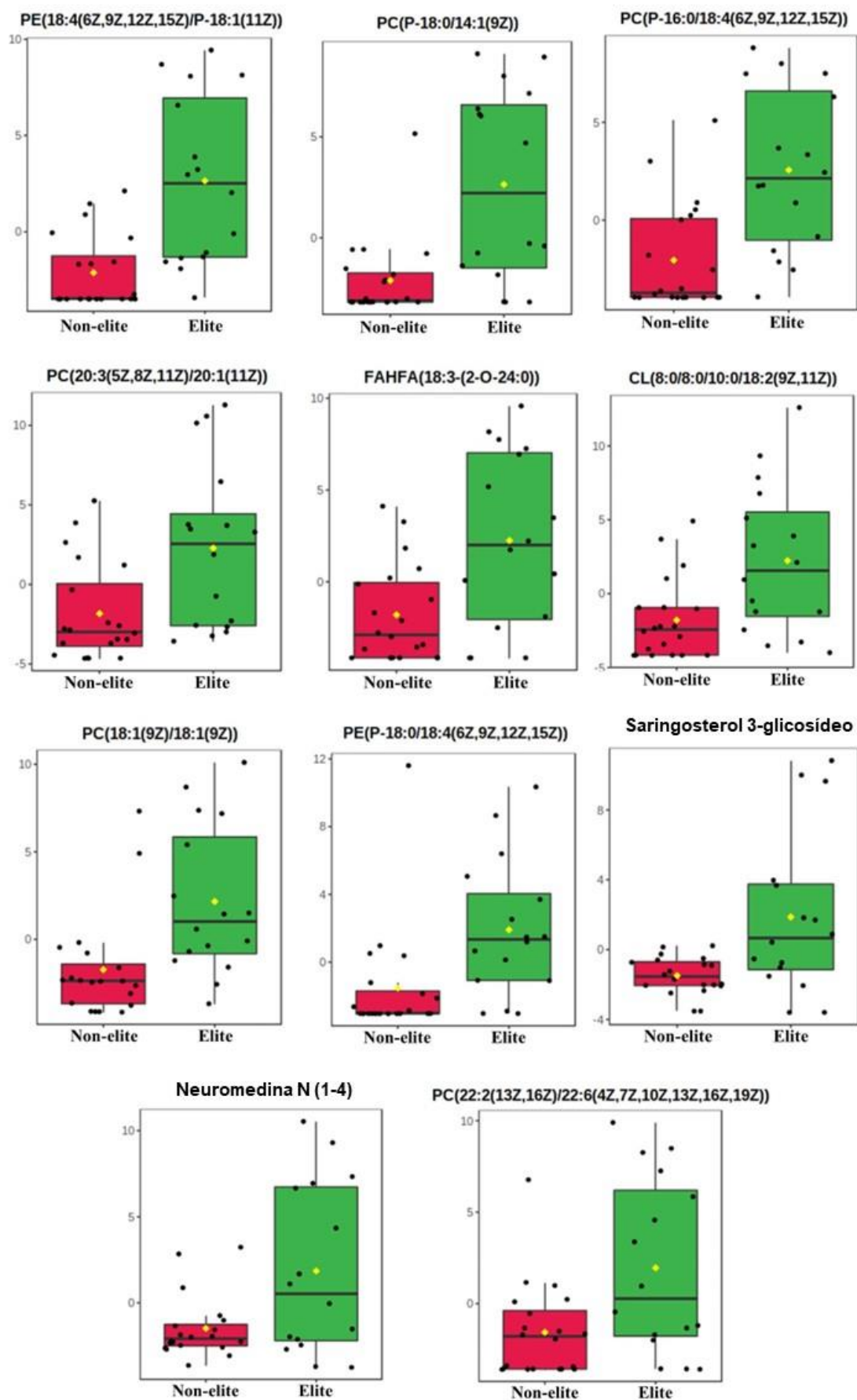


Figura 4. Abundâncias relativas em média e desvio padrão dos metabólitos putativos correspondentes em cada equipe para o modo ESI (+). Todos os metabólitos são estatisticamente diferentes pela análise *fold change* com limite de 2.

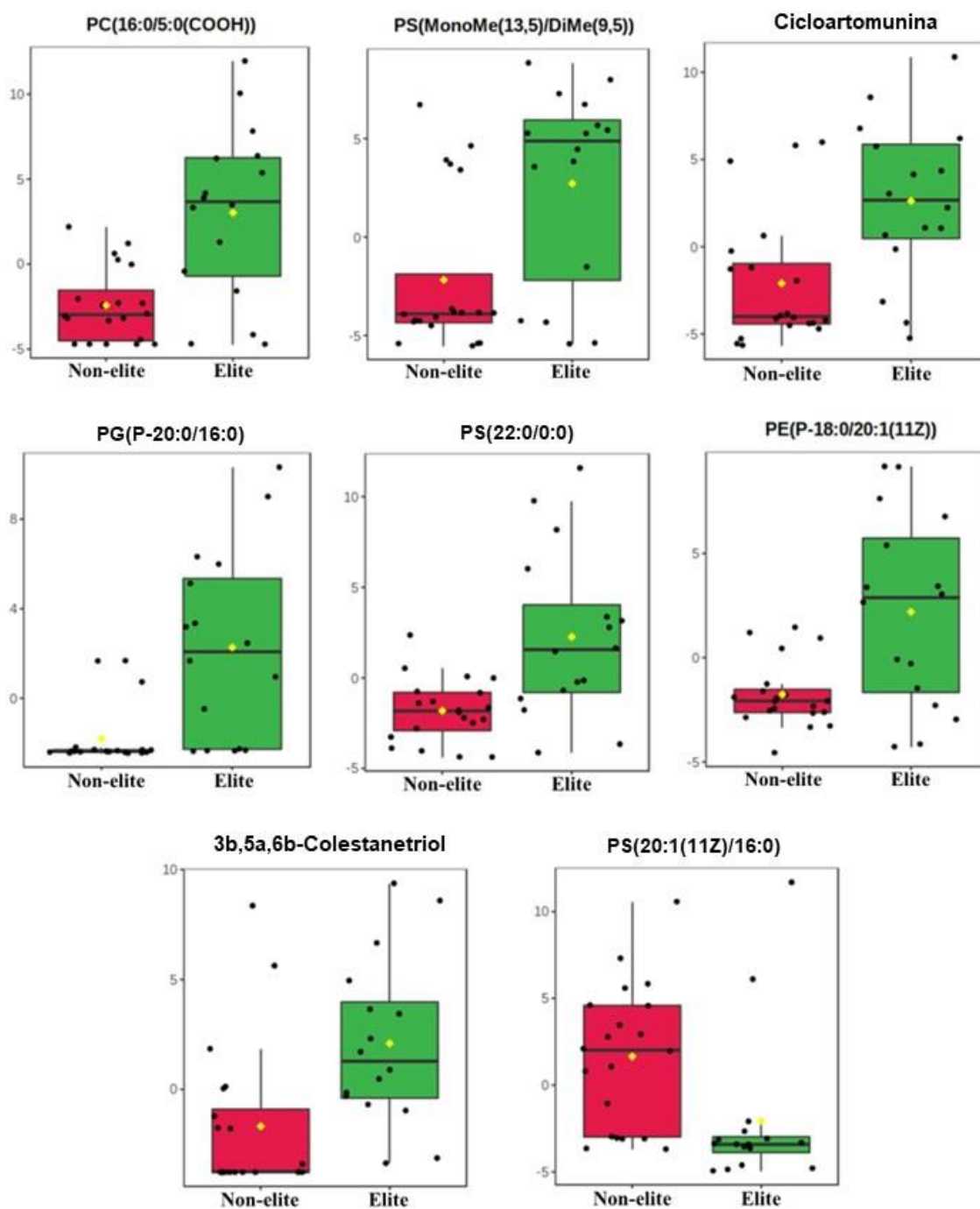


Figura 5. Abundâncias relativas em média e desvio padrão dos metabólitos putativos correspondentes em cada equipe para o modo ESI (-). Todos os metabólitos são estatisticamente diferentes pela análise *fold change* com limite de 2.

6.4 Discussão

Ao contrário das nossas hipóteses, variáveis antropométricas, composição corporal, hematócrito, tlim das cargas preditivas e as capacidades aeróbia e anaeróbia não foram significativamente diferentes entre as equipes de elite e não-elite. No entanto, a análise lipidômica foi capaz de distinguir o perfil metabólico de jejum das equipes avaliadas. Além disso, essa metodologia possibilitou identificar as principais classes de metabólitos responsáveis por diferenciar as equipes de futebol não-elite e elite sub-22. Embora pesquisadores venham caracterizando alterações metabólicas após a aplicação de testes físicos, no final das partidas e durante a preparação física na pré e temporada completa de futebol (RA et al., 2014; PRADO et al., 2017; PINTUS et al., 2020; QUINTAS et al., 2020), nosso estudo foi o primeiro a combinar protocolos tradicionais de avaliação física e lipidômica para detalhar e comparar o perfil fisiológico de duas equipes de futebol inseridas em diferentes níveis competitivos.

Historicamente, as avaliações físicas tradicionais fornecem parâmetros que contribuem para o conhecimento das características essenciais necessárias para um atleta jogar partidas de futebol em um nível altamente competitivo (STØLEN et al., 2005). As avaliações antropométricas são aplicadas para determinar a condição física e a adaptação ao treinamento, além de discriminar o nível competitivo dos atletas. No futebol, o HEATH et al. (1967) tem sido utilizado para determinar os somatotipos (mesomorfo, endomorfo e ectomorfo). Estudos têm demonstrado a prevalência de mesomorfismo em jogadores de futebol de elite, não-elite, adultos e jovens (RIENZI et al., 2000; RIBEIRO et al., 2007; PERRONI et al., 2015). Corroborando com a literatura, nossos resultados mostraram que houve prevalência de 80% e 87% de atletas mesomorfos nas equipes não-elite e elite, respectivamente. Além disso, a composição corporal desempenha um papel fundamental na constituição física de jogadores profissionais de futebol (SLIMANI et al., 2017). No presente estudo, as características gerais da composição corporal, incluindo estatura, índice de massa corporal, massa corporal, massa magra e gordura corporal, não apresentaram diferenças estatísticas entre as equipes. Da mesma forma, OSTOJIC (2003) verificou que a altura, o peso e a soma de sete dobras cutâneas não foram diferentes entre os grupos elite e não-elite. Em contraste, ARNASON et al. (2004) observaram

que equipes de elite apresentaram diferenças estatisticamente maiores do que equipes participantes de ligas inferiores. Além disso, o percentual de gordura corporal mostrou-se maior em jogadores de futebol de sub-elite do que em jogadores de elite (REILLY et al., 2000).

O hematócrito refere-se à porcentagem de hemácias no volume total de sangue, sendo importante para identificar e diagnosticar anemia, desnutrição, desidratação ou hidratação excessiva (FERREIRA et al., 2010). Em jogadores de futebol, o hematócrito apresentou alterações significativas no final da temporada em relação ao início (MEYER et al., 2011). Essa tendência foi mantida após 6 semanas de treinamento de futebol (SILVA et al., 2008). Nesse estudo, as equipes não apresentaram diferença estatística no percentual de hematócrito, corroborando o estudo realizado por OSTOJIC (2004), que não indicou diferenças no percentual de hematócrito entre jogadores inseridos em diferentes níveis competitivos.

Durante uma partida de 90 minutos, os jogadores de futebol deslocam-se aproximadamente 10 km com intensidade média próxima ao LAn, parâmetro relacionado à capacidade aeróbia (STØLEN et al., 2005). Existem várias avaliações físicas tradicionais responsáveis por determinar a capacidade aeróbia de jogadores de futebol (SILVA et al., 2007; LOURES et al., 2015). A V_{Crit} foi capaz de detectar adaptações em jogadores de futebol de ambos os sexos em diferentes níveis competitivos após períodos de treinamento (FAIRMAN et al., 2001; KNAB et al., 2013; KARSTEN et al., 2016). No entanto, nossos dados de capacidade aeróbia e anaeróbia do teste V_{Crit} não discriminaram os jogadores de elite e não-elite. Em geral, não foi observada diferença ao comparar as variáveis derivadas das avaliações físicas tradicionais de ambas as equipes. Esses achados podem ser explicados pelo momento da temporada, categoria avaliada e nível competitivo futebolístico do país. Vale ressaltar que nossos atletas estavam na segunda semana da pré-temporada, enquanto em outros estudos estavam no meio e no final da temporada (REILLY et al., 2000; ARNASON et al., 2004). Aqui, a categoria avaliada foi sub-22, diferentemente de alguns estudos da literatura (que investigaram, por exemplo, sub-16 e equipes profissionais) (REILLY et al., 2000; ARNASON et al., 2004). Além disso, o Brasil tem um nível altamente competitivo, independente da divisão. Sendo importante ressaltar que em São Paulo, os programas de treinamento nessa fase (pré-temporada) para a categoria estudada parecem ser semelhantes aos de

equipes de diferentes níveis competitivos, o que pode explicar a não diferença nos parâmetros antropométricos e de desempenho avaliados. Apesar disso, a análise lipidômica foi capaz de distinguir o perfil fisiológico em repouso das equipes avaliadas.

Para direcionar a inferência biológica, foram utilizadas análises de FC, PCA e PLS-DA para identificar quais metabólitos apresentaram diferenças na abundância relativa entre as equipes. Em outros estudos, esses modelos matemáticos mostraram excelente desempenho na detecção de alterações metabólicas após diferentes situações e intervenções no futebol (PINTUS et al., 2020; QUINTAS et al., 2020; MARINHO et al., 2022). No presente estudo, as análises PCA e PLS-DA permitiram a construção de gráficos de pontuação revelando uma clara separação entre jogadores de futebol, evidenciando que o perfil metabólico das equipes não-elite e elite eram significativamente diferentes. Em particular, a análise PLS-DA auxiliou a anotação de alguns metabólitos lipídicos como saringosterol 3-glicosídeo (glicerolipídios), 3b,5a,6b-colestanetriol (lipídios de estero), neuromedina N (1-4) (ácidos graxos), PG(P-20:0/16:0) (glicerofosfolipídios) e FAHFA(18:3-(2-O-24:0)). Além disso, esse modelo matemático demonstrou que outros metabólitos pertencentes às classes de flavonóides e glicerofosfolipídios são mais abundantes no soro de atletas de elite em comparação com os atletas não-elite.

Os flavonóides (cicloartomuninas) são uma classe de metabólitos encontrados em frutas, sendo assim comumente consumidos na dieta humana (KNAB et al., 2013). NIEMAN et al. (2010) mostraram que indivíduos com concentrações aumentadas de flavonóides são mais eficazes no combate à inflamação induzida pelo exercício e ao estresse oxidativo. Por outro lado, os glicerofosfolipídios são elementos fundamentais para as membranas celulares que contribuem para uma variedade de processos metabólicos e sinalização intracelular (CASTRO-GÓMEZ et al., 2015). Os mais importantes são PS, PC, PE e CL. Os PSs são responsáveis por 10% de todos os glicerofosfolipídios de membrana. Em um estudo, homens fisicamente ativos apresentaram melhora na capacidade de exercício devido à maior concentração de PSs no corpo (KINGSLEY et al., 2006). Além disso, STARKS et al. (2008) demonstraram que o aumento de PSs é eficaz no combate ao estresse induzido pelo exercício e na prevenção da deterioração fisiológica. Em geral, os PSs atuam na recuperação e desempenho humano,

melhorando também o humor, imunidade, tomada de decisão e a precisão (CARTER et al., 2015). Outros metabólitos como PCs e PEs são os glicerofosfolipídios mais abundantes na membrana celular. A literatura mostra que indivíduos com alta potência aeróbia (VO_{2max}) apresentaram maiores concentrações séricas de PCs e PEs em comparação com indivíduos com baixo VO_{2max} (BYE et al., 2012; MORRIS et al., 2015), tornando esses metabólitos possíveis biomarcadores do nível de VO_{2max} . Além disso, os PEs desempenham um papel importante na função e morfologia mitocondrial, contribuindo também para o processo de autofagia (STEENBERGEN et al., 2005; HAILEY et al., 2010; VANCE et al., 2013). Assim como os PEs, os CLs estão presentes em células com grande número de mitocôndrias, sendo essenciais para o metabolismo energético mitocondrial e para a manutenção da cadeia transportadora de elétrons (HOUTKOOPE et al., 2008).

Por fim, equipes de elite e não-elite que aparentemente apresentavam igualdade no condicionamento físico, na realidade apresentavam diferenças relevantes do ponto de vista metabólico. A lipidômica ampliou a compreensão do perfil metabólico desses jogadores. A equipe de elite apresentou mais metabólitos diferenciados do que a equipe não-elite, sendo alguns deles possíveis biomarcadores de aumento do VO_{2max} (BYE et al., 2012; MORRIS et al., 2015). Neste estudo, algumas PCs e PEs possivelmente indicam maior potência aeróbia de jogadores de elite, uma vez que o VO_{2max} foi considerado um dos mais poderosos discriminadores entre jogadores de futebol masculino em diferentes níveis competitivos (SLIMANI et al., 2017). Além disso, outros metabólitos discriminados podem trazer alguns benefícios, como potencialização do processo de recuperação, aumento do humor, imunidade, tomada de decisão e precisão, e melhora da capacidade de exercício com preservação mitocondrial e manutenção da cadeia transportadora de elétrons (STEENBERGEN et al., 2005; HOUTKOOPE et al., 2008; STARKS et al., 2008; HAILEY et al., 2010; VANCE et al., 2013; CARTER et al., 2015). Assim, a abordagem lipidômica pode contribuir oferecendo dados adicionais sobre a caracterização individual dos atletas, melhorando os programas de treinamento e, conseqüentemente, aumentando o desempenho dos jogadores durante as competições.

6.5 Conclusão

No presente estudo, as avaliações físicas tradicionais não foram capazes de diferenciar jogadores de futebol em diferentes níveis competitivos. No entanto, a abordagem lipidômica distinguiu com sucesso o perfil metabólico em jejum de equipes de elite e não-elite, mostrando que os jogadores de futebol de elite apresentaram um número aumentado de metabólitos lipídicos séricos pertencentes às classes glicerolípídeo, esterol lipídico, acil graxo, flavonóide e glicerofosfolípídeo. Portanto, esse estudo sugere que a aplicação da lipidômica aliada a protocolos tradicionais de avaliação física podem melhorar a caracterização dos atletas, fortalecendo a diferenciação do perfil fisiológico dos times de futebol. Além disso, essa abordagem pode contribuir para o surgimento de novas linhas de pesquisa para cientistas do futebol visando desvendar a complexidade dessa modalidade sob diferentes perspectivas, como a identificação de novos biomarcadores para monitoramento da fadiga ao longo da temporada, adaptação física ao treinamento e descoberta de novos talentos. Por fim, poderia fornecer informações promissoras sobre o desempenho de jogadores de futebol de elite.

7. PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES

Pontos fortes e limitações devem ser levados em consideração para ambos os estudos presentes na tese de doutorado. Considerando que essas investigações são estudos observacionais (transversais) baseadas em uma coorte específica de participantes (jogadores de futebol da sub-22), as relações causais e a extrapolação de nossos achados para outras populações devem ser realizadas com cautela, como sugerido por CASTRO et al. (2021). Além disso, os participantes dos estudos tiveram acesso livre as refeições fornecidas pelos clubes (embora a quantidade de alimentos individuais não fosse controlada) e as sessões de treinamento não foram padronizadas. Para sanar essas limitações, em estudos futuros forneceremos um recordatório alimentar, padronizaremos a dieta e as sessões de treinamento dos atletas durante o período experimental.

Por outro lado, ressaltamos que nossos achados foram caracterizados por exames fisiológicos padronizados aplicados em ambiente específico para a modalidade. Por exemplo, o protocolo VCrit (WAKAYOSHI et al., 1992) teve grande sucesso na determinação da capacidade aeróbia e anaeróbia dos atletas de futebol ($R^2 = 0,99 \pm 0,01$). Outro aspecto interessante a ser considerado é a coleta de sangue do lóbulo da orelha, tornando-a mais acessível e menos indolor aos participantes (CATALA et al., 2018). Além disso, nossa análise lipidômica foi baseada em uma técnica padronizada e robusta (LC-MS) para a identificação de um grande número de metabólitos (WANG et al., 2011), aumentando a possibilidade de sinalizar novos possíveis metabólitos para identificar diferenças entre jogadores de futebol de elite e não-elite. Além de aumentar a possibilidade de sinalizar novos possíveis biomarcadores associados à capacidade aeróbia de jogadores de futebol. Em oportunidades futuras, seria importante investigar a responsividade dos metabólitos apontados por nossos estudos frente ao treinamento físico e outras intervenções (HOFFMAN, 2017).

8. CONCLUSÃO GERAL

Com base nos achados e limitações da presente tese de doutorado, pode-se concluir que:

- O nível de capacidade aeróbia influenciou o perfil metabólico sérico de jejum dos atletas de futebol.
- Alguns metabólitos identificados e diferenciados foram relacionados com nível de capacidade aeróbia dos jogadores de futebol (glicerofosfoerinas, glicerofosfoetanolaminas, glicerofosfocolinas e glicerofosfogliceróis).
- Níveis mais baixos de PC(32:3), PE(18:1(9z)/16:1(9z)), 1-(2-metoxi-19Z-hexacosenil)-sn-glicero-3-fosfoerina e níveis mais altos de PE(22:2(13z,16z)/18:2(9z,12z)), PS(48:0) e PG(38:7) podem ser indicativos de um nível mais alto de capacidade aeróbia em jogadores de futebol.
- Jogadores futebol inseridos em diferentes níveis competitivos não apresentaram valores diferentes nos parâmetros advindos da aplicação das avaliações físicas tradicionais.
- Jogadores futebol inseridos em diferentes níveis competitivos apresentaram diferenças no perfil metabólico sérico de jejum.
- A lipidômica distinguiu com sucesso o perfil metabólico em jejum de equipes de elite e não-elite, mostrando que os jogadores de futebol de elite apresentaram um número aumentado de metabólitos lipídicos séricos pertencentes às classes glicerolípido, esterol lipídico, acil graxo, flavonóide e glicerofosfolípido.

9. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1651-1656, 1991. ISSN 0036-8075.

AHMETOV, I. I.; EGOROVA, E. S.; GABDRAKHMANOVA, L. J.; FEDOTOVSKAYA, O. N. Genes and athletic performance: an update. *In: **Genetics and Sports***: Karger Publishers, 2016. v. 61, p. 41-54.

AHMETOV, I. I.; FEDOTOVSKAYA, O. N. Current progress in sports genomics. *In: (Ed.). **Advances in clinical chemistry***: Elsevier, v.70, 2015. p.247-314. ISBN 0065-2423.

ÄIJÖ, T.; BUTTY, V.; CHEN, Z.; SALO, V. *et al.* Methods for time series analysis of RNA-seq data with application to human Th17 cell differentiation. **Bioinformatics**, 30, n. 12, p. i113-i120, 2014.

AKOH, C. C. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. CRC press, 2017. 1498744877.

AL'HAZZAA, H.; ALMUZAINI, K.; AL-REFAE, S.; SULAIMAN, M. Aerobic and anaerobic power characteristics of Saudi elite soccer players. **Journal of Sports Medicine Physical Fitness**, 41, n. 1, p. 54, 2001.

AL-KHELAIFI, F.; DIBOUN, I.; DONATI, F.; BOTRÈ, F.; ALSAYRAFI, M.; GEORGAKOPOULOS, C.; YOUSRI, N. A.; SUHRE, K.; ELRAYESS, M. A. Metabolomics profiling of xenobiotics in elite athletes: relevance to supplement consumption. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 48, 2018. ISSN 1550-2783.

AL-MURAIKHY, S.; SELLAMI, M.; DOMLING, A. S.; RIZWANA, N. *et al.* Metabolic Signature of Leukocyte Telomere Length in Elite Male Soccer Players. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 8, p. 727144, 2021.

ALZHARANI, M. A.; ALSHUWAIER, G. O.; ALJALOU, K. S.; AL-TANNAK, N. F. *et al.* Metabolomics profiling of plasma, urine and saliva after short term training in young professional football players in Saudi Arabia. **Scientific reports**, 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

AMIN, A. M.; MOSTAFA, H.; ARIF, N. H.; KADER, M. A. S. A. *et al.* Metabolomics profiling and pathway analysis of human plasma and urine reveal further insights into the multifactorial nature of coronary artery disease. **Clinica Chimica Acta**, 493, p. 112-122, 2019.

ANDERSON, N. L.; MATHESON, A. D.; STEINER, S. Proteomics: applications in basic and applied biology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 408-412, 2000. ISSN 0958-1669.

ANDRADE, V.; ZAGATTO, A.; KALVA-FILHO, C.; MENDES, O.; GOBATO, C.; CAMPOS, E.; PAPOTI, M. Running-based anaerobic sprint test as a procedure to evaluate anaerobic power. **International journal of sports medicine**, v. 36, n. 14, p. 1156-1162, 2015. ISSN 0172-4622.

ARCHER, S. N.; LAING, E. E.; MÖLLER-LEVET, C. S.; VAN DER VEEN, D. R.; BUCCA, G.; LAZAR, A. S.; SANTHI, N.; SLAK, A.; KABILJO, R.; VON SCHANTZ, M. Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome. **J Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. E682-E691, 2014. ISSN 0027-8424.

ARİ, E.; DELICEOĞLU, G. The prediction of repeated sprint and speed endurance performance by parameters of critical velocity models in soccer. **Pedagogy of Physical Culture Sports**, 25, n. 2, p. 132-143, 2021.

ARMITAGE, E. G.; SOUTHAM, A. D. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. **Metabolomics**, v. 12, n. 9, p. 146, 2016. ISSN 1573-3882.

ARNASON, A.; SIGURDSSON, S. B.; GUDMUNDSSON, A.; HOLME, I. *et al.* Physical fitness, injuries, and team performance in soccer. **Medicine Science in Sports Exercise**, 36, n. 2, p. 278-285, 2004.

ARTATI, A.; TOKARZ, J. Metabolomics applied to cultured human and animal cells. In: (Ed.). **Metabolomics for Biomedical Research**: Elsevier, 2020. p.137-157.

ASANO, R.; SALES, M.; MORAES, J.; COELHO, J. *et al.* Comparação da potência e capacidade anaeróbia em jogadores de diferentes categorias de futebol. **Motricidade**, 9, n. 1, p. 5-12, 2013.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHID, M. *et al.* Proteomics: technologies and their applications. **Journal of chromatographic science**, 55, n. 2, p. 182-196, 2017.

AU, A. Metabolomics and lipidomics of ischemic stroke. **Advances in clinical chemistry**, v. 85, p. 31-69, 2018.

BAGINSKY, S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 1, p. 93-120, 2009. ISSN 0277-7037.

BAGINSKY, S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, 28, n. 1, p. 93-120, 2009.

BANGSBO, J. Energy demands in competitive soccer. **Journal of sports sciences**, 12, n. sup1, p. S5-S12, 1994.

BANGSBO, J.; IAIA, F. M.; KRUSTRUP, P. Metabolic response and fatigue in soccer. **International journal of sports physiology and performance**, v. 2, n. 2, p. 111-127, 2007. ISSN 1555-0265.

BANGSBO, J.; NØRREGAARD, L.; THORSOE, F. Activity profile of competition soccer. **J Canadian journal of sport sciences= Journal canadien des sciences du sport**, v. 16, n. 2, p. 110, 1991. ISSN 0833-1235.

BANKS, R. E.; DUNN, M. J.; HOCHSTRASSER, D. F.; SANCHEZ, J.-C.; BLACKSTOCK, W.; PAPPIN, D. J.; SELBY, P. J. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **The Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1749-1756, 2000. ISSN 0140-6736.

BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. **Viruses**, 6, n. 1, p. 106-136, 2014.

BAR-OR, O. The Wingate anaerobic test an update on methodology, reliability and validity. **Sports medicine**, 4, n. 6, p. 381-394, 1987.

BARROS, R. M.; MISUTA, M. S.; MENEZES, R. P.; FIGUEROA, P. J.; MOURA, F. A.; CUNHA, S. A.; ANIDO, R.; LEITE, N. J. Analysis of the distances covered by first division Brazilian soccer players obtained with an automatic tracking method. **Journal of sports science medicine**, v. 6, n. 2, p. 233, 2007.

BASSINI, A.; CAMERON, L. Sportomics: building a new concept in metabolic studies and exercise science. **Biochemical biophysical research communications** v. 445, n. 4, p. 708-716, 2014. ISSN 0006-291X.

BEATO, M.; JAMIL, M. Intra-system reliability of SICS: Video-tracking system (Digital Stadium®) for performance analysis in soccer. **J. Sports Med. Phys. Fitness**, 58, p. 831-836, 2018.

BEGER, R. D. A review of applications of metabolomics in cancer. **Metabolites**, v. 3, n. 3, p. 552-574, 2013.

BELHAJ, M. R.; LAWLER, N. G.; HOFFMAN, N. J. Metabolomics and lipidomics: Expanding the molecular landscape of exercise biology. **Metabolites**, v. 11, n. 3, p. 151, 2021.

BELL, M.; BLAIS, J. M. “-Omics” workflow for paleolimnological and geological archives: A review. **Science of The Total Environment**, 672, p. 438-455, 2019.

BERGER, U.; LANGLOIS, I.; OEHME, M.; KALLENBORN, R. Comparison of three types of mass spectrometer for high-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of perfluoroalkylated substances and fluorotelomer alcohols. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 10, n. 5, p. 579-588, 2004.

BERTON, R.; CONCEIÇÃO, M. S.; LIBARDI, C. A.; CANEVAROLO, R. R. *et al.* Metabolic time-course response after resistance exercise: A metabolomics approach. **Journal of sports sciences**, 35, n. 12, p. 1211-1218, 2017.

BESSA, A.; NISSENBAUM, M.; MONTEIRO, A.; GANDRA, P. G.; NUNES, L.; BASSINI-CAMERON, A.; WERNECK-DE-CASTRO, J. P. S.; DE MACEDO, D. V.; CAMERON, L.-C. High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. **British journal of sports medicine**, v. 42, n. 11, p. 889-893, 2008. ISSN 0306-3674.

BI, H.; GUO, Z.; JIA, X.; LIU, H.; MA, L.; XUE, L. The key points in the pre-analytical procedures of blood and urine samples in metabolomics studies. **Metabolomics**, v. 16, p. 1-15, 2020.

BILLAT, V. L.; SIRVENT, P.; PY, G.; KORALSZTEIN, J.-P. *et al.* The concept of maximal lactate steady state. **Sports medicine**, 33, n. 6, p. 407-426, 2003.

BISHOP, D.; GJENKINS, D.; HOWARD, A. The critical Power Function is Dependent on the Duration. **Int. J. Sports Med**, v. 19, p. 125-129, 1998.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **The lancet**, 327, n. 8476, p. 307-310, 1986.

BLAŽENOVIC, I.; KIND, T.; JI, J.; FIEHN, O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. **Metabolites**, 8, n. 2, p. 31, 2018.

BLIGH, E. G.; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BLOOMFIELD, J.; POLMAN, R.; O'DONOGHUE, P. Physical demands of different positions in FA Premier League soccer. **Journal of sports science medicine**, 6, n. 1, p. 63, 2007.

BONGIOVANNI, T.; PINTUS, R.; DESSÌ, A.; NOTO, A. *et al.* Sportomics: metabolomics applied to sports. The new revolution? **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 23, p. 11011-11019, 2019.

BOOBIS, L.; WILLIAMS, C.; CHEETHAM, M.; WOOTTON, S. Metabolic aspects of fatigue during sprinting. **Exercise benefits, limits and adaptations**, p. 116-143, 1987.

BROADHURST, D.; GOODACRE, R.; REINKE, S. N.; KULIGOWSKI, J.; WILSON, I. D.; LEWIS, M. R.; DUNN, W. B. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. **Metabolomics**, v. 14, n. 6, p. 1-17, 2018.

BUCHHEIT, M.; MENDEZ-VILLANUEVA, A.; SIMPSON, B.; BOURDON, P. Repeated-sprint sequences during youth soccer matches. **J International journal of sports medicine**, v. 31, n. 10, p. 709-716, 2010. ISSN 0172-4622.

BUDOVSKY, A.; CRAIG, T.; WANG, J.; TACUTU, R.; CSORDAS, A.; LOURENÇO, J.; FRAIFELD, V. E.; DE MAGALHÃES, J. P. LongevityMap: a database of human genetic variants associated with longevity. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 559-560, 2013. ISSN 0168-9525.

BULBULIAN, R.; WILCOX, A. R.; DARABOS, B. L. Anaerobic contribution to distance running performance of trained cross-country athletes. **Medicine science in sports exercise**, 18, n. 1, p. 107-113, 1986.

BURNISTON, J. G.; HOFFMAN, E. Proteomic responses of skeletal and cardiac muscle to exercise. **Expert review of proteomics**, v. 8, n. 3, p. 361-377, 2011. ISSN 1478-9450.

BYE, A.; VETTUKATTIL, R.; ASPENES, S. T.; GISKEØDEGÅRD, G. F. *et al.* Serum levels of choline-containing compounds are associated with aerobic fitness level: the HUNT-study. **PloS one**, 2012.

BYRON, S. A.; VAN KEUREN-JENSEN, K. R.; ENGELTHALER, D. M.; CARPTEN, J. D. *et al.* Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. **Nature Reviews Genetics**, 17, n. 5, p. 257-271, 2016.

CAJKA, T.; FIEHN, O. Increasing lipidomic coverage by selecting optimal mobile-phase modifiers in LC-MS of blood plasma. **Metabolomics**, v. 12, n. 2, p. 34, 2016

CAMARGO, B. F.; DE ARAUJO, G. G.; GOBATO, C. A.; VIEIRA, N. A.; MESSIAS, L.; MANCHADO-GOBATO, F. D. B. Adaptation of invasive and non-invasive protocols to aerobic and anaerobic specific evaluation in female basketball players. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2013. ISSN 1517-8692.

CAMUS, G.; THYS, H. An evaluation of the maximal anaerobic capacity in man. **International journal of sports medicine**, 12, n. 04, p. 349-355, 1991.

CANUTO, G. A.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L.; DE SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018. ISSN 0100-4042.

CAO, B.; LIU, S.; YANG, L.; CHI, A. Changes of differential urinary metabolites after high-intensive training in teenage football players. **BioMed Research International**, 2020, 2020.

CARLING, C.; LACOME, M.; MCCALL, A.; DUPONT, G.; LE GALL, F.; SIMPSON, B.; BUCHHEIT, M. Monitoring of post-match fatigue in professional soccer: welcome to the real world. **Sports Medicine**, v. 48, n. 12, p. 2695-2702, 2018.

CARMINATTI, L. J.; BATISTA, B. N.; DA SILVA, J. F.; TRAMONTIN, A. F. *et al.* Predicting Maximal Lactate Steady State from Carminatti's Shuttle Run Test in Soccer Players. **International Journal of Sports Medicine**, 42, n. 02, p. 153-160, 2021.

CARTER, J.; GREENWOOD, M. Phosphatidylserine for the Athlete. **Strength Conditioning Journal**, 37, n. 1, p. 61-68, 2015.

CASAMASSIMI, A.; FEDERICO, A.; RIENZO, M.; ESPOSITO, S. *et al.* Transcriptome profiling in human diseases: new advances and perspectives. **International journal of molecular sciences**, 18, n. 8, p. 1652, 2017.

CASIMIRO-LOPES, G.; COLONNA, M.; BOAVENTURA, G.; FIDALGO, T. K. Plasma metabolomic response to acute short-term high-intensity exercise in young soccer players. **Research, Society and Development** 10, n. 12, 2021.

CASTAGNA, C.; IMPELLIZZERI, F. M.; CHAMARI, K.; CARLOMAGNO, D. *et al.* Aerobic fitness and yo-yo continuous and intermittent tests performances in soccer players: a correlation study. **The Journal of Strength Conditioning Research**, 20, n. 2, p. 320-325, 2006.

CASTELLANO, J.; CASAMICHANA, D. What are the differences between first and second divisions of Spanish football teams? **International Journal of Performance Analysis in Sport**, 15, n. 1, p. 135-146, 2015.

- CASTRO, A.; DUFT, R. G.; SILVA, L. M.; FERREIRA, M. L. *et al.* Understanding the relationship between intrinsic cardiorespiratory fitness and serum and skeletal muscle metabolomics profile. **Journal of Proteome Research**, 20, n. 5, p. 2397-2409, 2021.
- CASTRO-GÓMEZ, P.; GARCIA-SERRANO, A.; VISIOLI, F.; FONTECHA, J. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. **Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids**, 101, p. 41-51, 2015.
- CATALA, A.; CULP-HILL, R.; NEMKOV, T.; D'ALESSANDRO, A. Quantitative metabolomics comparison of traditional blood draws and TAP capillary blood collection. **Metabolomics**, 14, n. 7, p. 1-9, 2018
- CHAMARI, K.; HACHANA, Y.; KAOUECH, F.; JEDDI, R. *et al.* Endurance training and testing with the ball in young elite soccer players. **British journal of sports medicine**, 39, n. 1, p. 24-28, 2005.
- CHEN, C.; HOU, J.; TANNER, J. J.; CHENG, J. Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 8, p. 2873, 2020.
- CHO, H.; HYEON, S. J.; SHIN, J. Y.; ALVAREZ, V. E.; STEIN, T. D.; LEE, J.; KOWALL, N. W.; MCKEE, A. C.; RYU, H.; SEO, J. S. Alterations of transcriptome signatures in head trauma-related neurodegenerative disorders. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.
- CHU, Y.; COREY, D. R. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. **Nucleic acid therapeutics**, 22, n. 4, p. 271-274, 2012.
- CICERO, D. O.; DI MARINO, S.; DINALLO, V.; PIERI, M.; SUMMA, V.; DESIDERI, A.; BERNARDINI, A.; PERONDI, F.; D'OTTAVIO, S. A small sided game session affects salivary metabolite levels in young soccer players. **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v. 5, n. 1, p. 55-70, 2016.
- CLARK, I. E.; WEST, B. M.; REYNOLDS, S. K.; MURRAY, S. R. *et al.* Applying the critical velocity model for an off-season interval training program. **The Journal of Strength Conditioning Research**, 27, n. 12, p. 3335-3341, 2013.
- CLARKE, A. C.; PRESLAND, J.; RATTRAY, B.; PYNE, D. B. Critical velocity as a measure of aerobic fitness in women's rugby sevens. **Journal of Science Medicine in Sport**, 17, n. 1, p. 144-148, 2014.
- CLOONAN, N.; FORREST, A. R.; KOLLE, G.; GARDINER, B. B. *et al.* Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature methods**, 5, n. 7, p. 613-619, 2008.
- COBLE, D. J.; FLEMING, D.; PERSIA, M. E.; ASHWELL, C. M. *et al.* RNA-seq analysis of broiler liver transcriptome reveals novel responses to high ambient temperature. **BMC genomics**, 15, n. 1, p. 1084, 2014.
- COELHO, W. S.; VIVEIROS DE CASTRO, L.; DEANE, E.; MAGNO-FRANÇA, A. *et al.* Investigating the Cellular and Metabolic Responses of World-Class Canoeists Training: A Sportomics Approach. **Nutrients**, 8, n. 11, p. 719, 2016.
- COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports medicine**, 37, n. 9, p. 737-763, 2007.
- COHEN, J. The earth is round ($p < .05$). **American psychologist**, 49, n. 12, p. 997, 1994.
- COMETTI, G.; MAFFIULETTI, N.; POUSSON, M.; CHATARD, J.-C. *et al.* Isokinetic strength and anaerobic power of elite, subelite and amateur French soccer players. **International journal of sports medicine**, 22, n. 01, p. 45-51, 2001.
- CONSORTIUM*, C. E. S. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 1998. ISSN 0036-8075.
- CONTREPOIS, K.; WU, S.; MONEGHETTI, K. J.; HORNBERG, D.; AHADI, S.; TSAI,

- M. S.; SNYDER, M. P. Molecular choreography of acute exercise. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1112-1130. e16, 2020.
- CORLUKA, M.; BJELICA, D.; GARDASEVIC, J.; VASILJEVIC, I. Anthropometric characteristics of elite soccer players from Bosnia and Herzegovina and Montenegro. **Journal of Anthropology of Sport Physical Education**, 3, n. 3, p. 11-15, 2019.
- CUEVAS-CÓRDOBA, B.; SANTIAGO-GARCIA, J. Saliva: a fluid of study for OMICS. **Omics: a journal of integrative biology**, 18, n. 2, p. 87-97, 2014.
- ČUPERLOVIĆ-CULF, M.; BARNETT, D. A.; CULF, A. S.; CHUTE, I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. **Drug discovery today**, v. 15, n. 15-16, p. 610-621, 2010. ISSN 1359-6446.
- DA CRUZ, J. P.; DOS SANTOS, F. N.; RASTEIRO, F. M.; MAROSTEGAN, A. B. *et al.* A Metabolomic Approach and Traditional Physical Assessments to Compare U22 Soccer Players According to Their Competitive Level. **Biology**, 11, n. 8, p. 1103, 2022.
- DA CRUZ, J. P.; MESSIAS, L. H. D.; CETEIN, R. L.; RASTEIRO, F. M.; GOBATTO, C. A.; MANCHADO-GOBATTO, F. B. Anaerobic and Agility Parameters of Salonists in Laboratory and Field Tests. **International journal of sports medicine**, v. 41, n. 07, p. 450-460, 2020.
- DATSON, N.; HULTON, A.; ANDERSSON, H.; LEWIS, T.; WESTON, M.; DRUST, B.; GREGSON, W. Applied physiology of female soccer: an update. **Sports Medicine**, v. 44, n. 9, p. 1225-1240, 2014. ISSN 0112-1642.
- DAVIS, J.; BREWER, J.; ATKIN, D. Pre-season physiological characteristics of English first and second division soccer players. **Journal of sports sciences**, v. 10, n. 6, p. 541-547, 1992. ISSN 0264-0414.
- DE FEO, P.; DI LORETO, C.; LUCIDI, P.; MURDOLO, G.; PARLANTI, N.; DE CICCIO, A.; SANTEUSANIO, F. P. F. Metabolic response to exercise. **Journal of endocrinological investigation**, v. 26, n. 9, p. 851-854, 2003. ISSN 0391-4097.
- DE LIMA, T. B.; DE ANDRADE, V. C.; MESSIAS, L. H. D.; DE BARROS MANCHADO-GOBATTO, F. *et al.* Running anaerobic sprint test, lactate minimum and critical velocity protocol in shuttle futsal testing. **Central European Journal of Sport Sciences Medicine**, 12, p. 5-15, 2015.
- DEDA, O.; GIKA, H.; PANAGOULIS, T.; TAITZOGLU, I. *et al.* Impact of exercise on fecal and cecal metabolome over aging: a longitudinal study in rats. **Bioanalysis**, 9, n. 1, p. 21-36, 2017.
- DEELEN, J.; BEEKMAN, M.; UH, H.-W.; BROER, L.; AYERS, K. L.; TAN, Q.; KAMATANI, Y.; BENNET, A. M.; TAMM, R.; TROMPET, S. Genome-wide association meta-analysis of human longevity identifies a novel locus conferring survival beyond 90 years of age. **Human molecular genetics**, v. 23, n. 16, p. 4420-4432, 2014. ISSN 1460-2083.
- DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass spectrometry reviews**, 26, n. 1, p. 51-78, 2007.
- DEVRIES, H. A.; MORITANI, T.; NAGATA, A.; MAGNUSSEN, K. The relation between critical power and neuromuscular fatigue as estimated from electromyographic data. **Ergonomics**, 25, n. 9, p. 783-791, 1982.
- DI PRAMPERO, P. E.; OSGNACH, C. Metabolic power in team sports-part 1: an update. **International journal of sports medicine**, 39, n. 08, p. 581-587, 2018.
- DI SALVO, V.; BARON, R.; TSCHAN, H.; MONTERO, F. C.; BACHL, N.; PIGOZZI, F. Performance characteristics according to playing position in elite soccer. **International journal of sports medicine**, v. 28, n. 03, p. 222-227, 2007. ISSN 0172-4622.

DIAS-AUDIBERT, F. L.; NAVARRO, L. C.; DE OLIVEIRA, D. N.; DELAFIORI, J. *et al.* Combining Machine Learning and Metabolomics to Identify Weight Gain Biomarkers. **Frontiers in Bioengineering Biotechnology**, 8, p. 6, 2020.

DIXON, R. A.; GANG, D. R.; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER, H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, J. B.; RIDLEY, W. P. Applications of metabolomics in agriculture. **Journal of Agricultural Food Chemistry** v. 54, n. 24, p. 8984-8994, 2006. ISSN 0021-8561.

DJAOUI, L.; HADDAD, M.; CHAMARI, K.; DELLAL, A. Monitoring training load and fatigue in soccer players with physiological markers. **Physiology behavior**, 181, p. 86-94, 2017.

DJUKOVIC, D.; RAFTERY, D.; GOWDA, N. Mass spectrometry and NMR spectroscopy based quantitative metabolomics. In: (Ed.). **Proteomic and metabolomic approaches to biomarker discovery**: Elsevier, 2020. p.289-311.

DUFT, R. G.; CASTRO, A.; CHACON-MIKAHIL, M. P. T.; CAVAGLIERI, C. R. Metabolomics and Exercise: possibilities and perspectives. **Motriz: Revista de Educação Física**, 23, n. 2, 2017.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical society reviews**, v. 40, n. 1, p. 387-426, 2011.

DUNN, W. B.; WILSON, I. D.; NICHOLLS, A. W.; BROADHURST, D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. **Bioanalysis**, v. 4, n. 18, p. 2249-2264, 2012.

EDWARDS, D.; BATLEY, J. Plant genome sequencing: applications for crop improvement. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 1, p. 2-9, 2010. ISSN 1467-7644.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009.

EYNON, N.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; SAGIV, M.; YAMIN, C.; MECKEL, Y.; GOLDHAMMER, E. ACTN3 R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. **International journal of sports medicine**, v. 30, n. 09, p. 695-698, 2009. ISSN 0172-4622.

FAIRMAN, C. M.; KENDALL, K. L.; HYDE, P. N.; YARBROUGH, M. B. *et al.*, 2015, **Estimating and Tracking Changes in VO₂max From a Field-Based Critical Velocity Test in Collegiate Soccer Players**. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS TWO COMMERCE SQ, 2001 MARKET ST, PHILADELPHIA 964-964.

FARROKHI YEKTA, R.; REZAEI TAVIRANI, M.; AREFI OSKOUIE, A.; MOHAJERI-TEHRANI, M.; SOROUSH, A. The metabolomics and lipidomics window into thyroid cancer research. **Biomarkers**, v. 22, n. 7, p. 595-603, 2017. ISSN 1354-750X.

FAULKNER, John A. Physiology of swimming. **Research Quarterly. American Association for Health, Physical Education and Recreation**, v. 37, n. 1, p. 41-54, 1966.

FENG, Z.; DING, C.; LI, W.; WANG, D.; CUI, D. Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125914, 2020. ISSN 0308-8146.

FERREIRA, F. G.; ALVES, K.; COSTA, N. M. B.; SANTANA, Â. M. C.; MARINS, J. C. B. Efeito do nível de condicionamento físico e da hidratação oral sobre a homeostase hídrica em exercício aeróbico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 3, p. 166-170, 2010. ISSN 1517-8692.

FIANDACA, M. S.; MAPSTONE, M.; MAHMOODI, A.; GROSS, T. *et al.* Plasma metabolomic biomarkers accurately classify acute mild traumatic brain injury from controls. **PloS one**, 13, n. 4, p. e0195318, 2018.

FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. In: (Ed.). **Functional genomics**: Springer, 2002. p.155-171.

FISCHER, D.; LAIHO, A.; GYENESEI, A.; SIRONEN, A. Identification of reproduction-related gene polymorphisms using whole transcriptome sequencing in the Large White pig population. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 7, p. 1351-1360, 2015. ISSN 2160-1836.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J.-F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496-512, 1995. ISSN 0036-8075.

FOLCH, J.; LEES, M. Sloane Stanley GH. **A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues**. **Biol Chem**, p. p. 497-509, 1956.

FRANÇA, C.; IHLE, A.; MARQUES, A.; SARMENTO, H. *et al.* Physical Development Differences between Professional Soccer Players from Different Competitive Levels. **Applied Sciences**, 12, n. 14, p. 7343, 2022.

FRANCHINI, E. Teste anaeróbio de Wingate: conceitos e aplicação. **Revista Mackenzie de educação física e esporte**, 1, n. 1, 2002.

FURSE, S. Is phosphatidylglycerol essential for terrestrial life? **Journal of chemical biology**, 10, n. 1, p. 1-9, 2017.

GAESSER, G. A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 24, n. 1, p. 35-70, 1996.

GAITÁN, J. M.; MOON, H. Y.; STREMLAU, M.; DUBAL, D. B. *et al.* Effects of Aerobic exercise training on systemic biomarkers and cognition in late middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. **Frontiers in endocrinology**, 12, p. 562, 2021.

GAMA, M. C. T.; DOS REIS, I. G. M.; SOUSA, F. A. D. B.; GOBATTO, C. A. The 3-min all-out test is valid for determining critical power but not anaerobic work capacity in tethered running. **PloS one**, v. 13, n. 2, p. e0192552, 2018. ISSN 1932-6203.

GARCIA-TABAR, I.; RAMPININI, E.; GOROSTIAGA, E. M. Lactate equivalent for maximal lactate steady state determination in soccer. **Research Quarterly for Exercise and Sport**, 90, n. 4, p. 678-689, 2019.

GARGANTA, J.; MAIA, J.; SILVA, R.; NATAL, A. **A comparative study of explosive leg strength in elite and non-elite young soccer players**. London: Routledge, 1993.

GIL, S.; GIL, J.; RUIZ, F.; IRAZUSTA, A. *et al.* Anthropometrical characteristics and somatotype of young soccer players and their comparison with the general population. **Biology of Sport**, 27, n. 1, 2010.

GIL-DE-LA-FUENTE, A.; GODZIEN, J.; SAUGAR, S.; GARCIA-CARMONA, R. *et al.* CEU mass mediator 3.0: a metabolite annotation tool. **Journal of proteome research**, 18, n. 2, p. 797-802, 2018.

GLINSKY, G. “Stemness” genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 17, p. 2846-2853, 2008. ISSN 0732-183X.

GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAN, T.-H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, v. 296, n. 5565, p. 92-100, 2002. ISSN 0036-8075.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996. ISSN 0036-8075.

GOMEZ-PIQUERAS, P.; GONZALEZ-VILLORA, S.; CASTELLANO, J.; TEOLDO, I. *et al.* Relation between the physical demands and success in professional soccer players. **Journal of Human Sport**, 14, n. 1, 2019.

GONÇALVES, L. C.; BESSA, A.; FREITAS-DIAS, R.; LUZES, R. *et al.* A sportomics strategy to analyze the ability of arginine to modulate both ammonia and lymphocyte levels in blood after high-intensity exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, 9, n. 1, p. 30, 2012.

GONGORA-CASTILLO, E.; CHILDS, K. L.; FEDEWA, G.; HAMILTON, J. P. *et al.* Development of transcriptomic resources for interrogating the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids in medicinal plant species. **PloS one**, 7, n. 12, p. e52506, 2012.

GORROCHATEGUI, E.; JAUMOT, J.; LACORTE, S.; TAULER, R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425-442, 2016. ISSN 0165-9936.

GOTO-INOUE, N.; YAMADA, K.; INAGAKI, A.; FURUICHI, Y.; OGINO, S.; MANABE, Y.; SETOU, M.; FUJII, N. L. Lipidomics analysis revealed the phospholipid compositional changes in muscle by chronic exercise and high-fat diet. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

GRAHAM, D. R.; ELLIOTT, S. T.; VAN EYK, J. E. Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening. **The Journal of physiology**, v. 563, n. 1, p. 1-9, 2005. ISSN 0022-3751.

GRAVINA, L.; GIL, S. M.; RUIZ, F.; ZUBERO, J. *et al.* Anthropometric and physiological differences between first team and reserve soccer players aged 10-14 years at the beginning and end of the season. **The Journal of Strength Conditioning Research**, 22, n. 4, p. 1308-1314, 2008.

GREEN, S. A definition and systems view of anaerobic capacity. **European journal of applied physiology occupational physiology**, 69, n. 2, p. 168-173, 1994.

GRIFFITHS, J. A brief history of mass spectrometry. **Anal. Chem**, 80, n. 15, p. 5678-5683, 2008.

GRIFFITHS, W.; YUTUC, E.; DAVIES, D.; DICKSON, A. *et al.* Lipidomics Basics. **Lipidomics: Current and Emerging Techniques**, 2020.

GÜNTHER, O. P.; SHIN, H.; NG, R. T.; MCMASTER, W. R.; MCMANUS, B. M.; KEOWN, P. A.; TEBBUTT, S. J.; LE CAO, K.-A. Novel multivariate methods for integration of genomics and proteomics data: applications in a kidney transplant rejection study. **OMICS: A journal of integrative biology**, v. 18, n. 11, p. 682-695, 2014. ISSN 1536-2310.

HAILEY, D. W.; RAMBOLD, A. S.; SATPUTE-KRISHNAN, P.; MITRA, K. *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, 141, n. 4, p. 656-667, 2010.

HAMMAMI, M. A.; BEN ABDERRAHMANE, A.; NEBIGH, A.; LE MOAL, E. *et al.* Effects of a soccer season on anthropometric characteristics and physical fitness in elite young soccer players. **Journal of sports sciences**, 31, n. 6, p. 589-596, 2013.

HAN, X. Lipidomics for studying metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 11, p. 668, 2016.

HANSEY, C. N.; VAILLANCOURT, B.; SEKHON, R. S.; DE LEON, N.; KAEPLER, S. M.; BUELL, C. R. Maize (*Zea mays* L.) genome diversity as revealed by RNA-sequencing. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33071, 2012. ISSN 1932-6203.

HASANPOUR, M.; IRANSHAHY, M.; IRANSHAHI, M. The application of metabolomics in investigating anti-diabetic activity of medicinal plants. **Biomedicine Pharmacotherapy**, 128, p. 110263, 2020.

HAUGEN, T. A.; TØNNESSEN, E.; SEILER, S. Anaerobic performance testing of professional soccer players 1995–2010. **International journal of sports physiology performance**, 8, n. 2, p. 148-156, 2013.

HAZIR, T.; KOSE, M. G.; KIN-ISLER, A. The validity of Running Anaerobic Sprint Test to assess anaerobic power in young soccer players. **Isokinetics Exercise Science**, 26, n. 3, p. 201-209, 2018.

HEANEY, L. M.; DEIGHTON, K.; SUZUKI, T. Non-targeted metabolomics in sport and exercise science. **Journal of sports sciences**, 37, n. 9, p. 959-967, 2019.

HEATH, B. H.; CARTER, J. L. A modified somatotype method. **American journal of physical anthropology**, v. 27, n. 1, p. 57-74, 1967. ISSN 0002-9483.

HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S. *et al.* Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. **International journal of sports medicine**, 6, n. 03, p. 117-130, 1985.

HEDEN, T. D.; JOHNSON, J. M.; FERRARA, P. J.; ESHIMA, H. *et al.* Mitochondrial PE potentiates respiratory enzymes to amplify skeletal muscle aerobic capacity. **Science advances**, 5, n. 9, p. eaax8352, 2019.

HERRERO, P.; RODRÍGUEZ, M. Á.; RAS, M. R.; DEL PINO, A. *et al.* Metabolomics Analyses to Investigate the Role of Diet and Physical Training. *In: High-Throughput Metabolomics*: Springer, 2019. p. 403-430.

HICKS, S. D.; JACOB, P.; PEREZ, O.; BAFFUTO, M.; GAGNON, Z.; MIDDLETON, F. A. The Transcriptional Signature of a Runner's High. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 51, n. 5, p. 970-978, 2019. ISSN 0195-9131.

HILL, D. W.; POOLE, D. C.; SMITH, J. C. The relationship between power and the time to achieve VO₂max. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 34, n. 4, p. 709-714, 2002.

HOANG, G.; UDUPA, S.; LE, A. Application of metabolomics technologies toward cancer prognosis and therapy. *In: (Ed.)*. **International review of cell and molecular biology**: Elsevier, v.347, 2019. p.191-223. ISBN 1937-6448.

HOFF, J.; WISLØFF, U.; ENGEN, L.; KEMI, O.; HELGERUD, J. Soccer specific aerobic endurance training. **British journal of sports medicine**, v. 36, n. 3, p. 218-221, 2002. ISSN 0306-3674.

HOFFMAN, N. J. Omics and exercise: global approaches for mapping exercise biological networks. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 10, p. a029884, 2017. ISSN 2157-1422.

HORN, P. J.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics in situ: insights into plant lipid metabolism from high resolution spatial maps of metabolites. **Progress in Lipid Research**, v. 54, p. 32-52, 2014. ISSN 0163-7827.

HOUSH, D. J.; HOUSH, T. J.; BAUGE, S. M. A methodological consideration for the determination of critical power and anaerobic work capacity. **Research Quarterly for Exercise Sport**, 61, n. 4, p. 406-409, 1990.

HOUSH, D. J.; HOUSH, T. J.; BAUGE, S. M. The accuracy of the critical power test for predicting time to exhaustion during cycle ergometry. **Ergonomics**, 32, n. 8, p. 997-1004, 1989.

HOUSH, T.; JOHNSON, G.; MCDOWELL, S.; HOUSH, D. *et al.* 334 Physiological responses at the fatigue threshold. **Medicine Science in Sports Exercise**, 22, n. 2, p. S56, 1990.

HOUTKOOPER, R.; VAZ, F. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. **Cellular Molecular Life Sciences**, 65, n. 16, p. 2493-2506, 2008.

HUAN, T.; FORSBERG, E. M.; RINEHART, D.; JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; BENTON, H. P.; FANG, M.; AISPORN, A.; HILMERS, B.; POOLE, F. L.; THORGERSEN, M. P.; ADAMS, M. W. W.; KRANTZ, G.; FIELDS, M. W.; ROBBINS, P. D.; NIEDERNHOFER, L. J.; IDEKER, T.; MAJUMDER, E. L.; WALL, J. D.; RATTRAY, N. J. W.; GOODACRE, R.; LAIRSON, L. L.; SIUZDAK, G. Systems biology guided by XCMS Online metabolomics. **Nature methods**, v. 14, n. 5, p. 461-462, 2017.

HUGHSON, R.; OROK, C.; STAUDT, L. A high velocity treadmill running test to assess endurance running potential. **International journal of sports medicine**, 5, n. 01, p. 23-25, 1984.

INTERNATIONAL, R. G. S. P. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 793, 2005. ISSN 1476-4687.

JÄGER, R.; PURPURA, M.; KINGSLEY, M. Phospholipids and sports performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, 4, n. 1, p. 1-8, 2007.

JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature reviews Molecular cell biology** v. 17, n. 7, p. 451-459, 2016. ISSN 1471-0080.

JONES, A. M.; VANHATALO, A.; BURNLEY, M.; MORTON, R. H.; POOLE, D. C. Critical power: implications for determination of VO₂max and exercise tolerance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 10, p. 1876-1890, 2010.

JONES, N. L.; MCCARTNEY, N.; GRAHAM, T.; SPRIET, L.; KOWALCHUK, J.; HEIGENHAUSER, G.; SUTTON, J. Muscle performance and metabolism in maximal isokinetic cycling at slow and fast speeds. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 1, p. 132-136, 1985. ISSN 8750-7587.

JONES, O. A.; MAGUIRE, M. L.; GRIFFIN, J. L.; DIAS, D. A.; SPURGEON, D. J.; SVENDSEN, C. Metabolomics and its use in ecology. **Austral Ecology**, v. 38, n. 6, p. 713-720, 2013.

JUFFER, P.; FURRER, R.; GONZÁLEZ-FREIRE, M.; SANTIAGO, C.; VERDE, Z.; SERRATOSA, L.; MORATE, F. J.; RUBIO, J. C.; MARTIN, M. A.; RUIZ, J. R.; ARENAS, J.; GÓMEZ-GALLEGO, F.; LUCIA, A. Genotype distributions in top-level soccer players: a role for ACE?. **International journal of sports medicine**, v. 30, n. 05, p. 387-392, 2009.

KADOCH, C.; CRABTREE, G. R. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics. **Science advances**, v. 1, n. 5, p. e1500447, 2015. ISSN 2375-2548.

KAFATOS, F. C.; JONES, C. W.; EFSTRATIADIS, A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. 7, n. 6, p. 1541-1552, 1979.

KAMBOURIS, M.; DEL BUONO, A.; MAFFULLI, N. Genomics DNA profiling in elite professional soccer players: a pilot study. **Translational Medicine@ Unisa**, v. 9, p. 18, 2014.

KARSTEN, B.; LARUMBE-ZABALA, E.; KANDEMIR, G.; HAZIR, T.; KLOSE, A.; NACLERIO, F. The effects of a 6-week strength training on critical velocity, anaerobic running distance, 30-M sprint and Yo-Yo intermittent running test performances in male soccer players. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151448, 2016. ISSN 1932-6203.

KATOH, M.; IGARASHI, M.; FUKUDA, H.; NAKAGAMA, H.; KATOH, M. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. **Cancer letters**, v. 328, n. 2, p. 198-206, 2013. ISSN 0304-3835.

KAUL, S.; KOO, H. L.; JENKINS, J.; RIZZO, M.; ROONEY, T.; TALLON, L. J.; FELDBLYUM, T.; NIERMAN, W.; BENITO, M. I.; LIN, X. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796-815, 2000. ISSN 0028-0836.

KERKSICK, C. M.; TSATSAKIS, A. M.; HAYES, A. W.; KAFANTARIS, I. *et al.* How can bioinformatics and toxicogenomics assist the next generation of research on physical exercise and athletic performance. **The Journal of Strength Conditioning Research**, 29, n. 1, p. 270-278, 2015.

KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **European journal of applied physiology occupational physiology**, 42, n. 1, p. 25-34, 1979.

KING, R. J.; MACBETH, M. C. Interaction of the lipid and protein components of pulmonary surfactant Role of phosphatidylglycerol and calcium. **Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes**, 647, n. 2, p. 159-168, 1981.

KINGSLEY, M. I.; MILLER, M.; KILDUFF, L. P.; MCENENY, J. *et al.* Effects of phosphatidylserine on exercise capacity during cycling in active males. **Medicine science in sports exercise**, 38, n. 1, p. 64, 2006.

KLASSEN, A.; FACCIO, A. T.; CANUTO, G. A. B.; DA CRUZ, P. L. R.; RIBEIRO, H. C.; TAVARES, M. F. M.; SUSSULINI, A. Metabolomics: Definitions and significance in systems biology. In: (Ed.). **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**: Springer, 2017. p.3-17.

KNAB, A. M.; NIEMAN, D. C.; GILLITT, N. D.; SHANELY, R. A. *et al.* Effects of a flavonoid-rich juice on inflammation, oxidative stress, and immunity in elite swimmers: a metabolomics-based approach. **International journal of sport nutrition exercise metabolism**, 23, n. 2, p. 150-160, 2013.

KOAY, Y. C.; STANTON, K.; KIENZLE, V.; LI, M.; YANG, J.; CELERMAJER, D. S.; O'SULLIVAN, J. F. Effect of chronic exercise in healthy young male adults: a metabolomic analysis. **Cardiovascular research**, v. 117, n. 2, p. 613-622, 2021.

KOCHHAR, S.; JACOBS, D. M.; RAMADAN, Z.; BERRUJEX, F. *et al.* Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabolomics. **Analytical biochemistry**, 352, n. 2, p. 274-281, 2006.

KOELMEL, J. P.; NAPOLITANO, M. P.; ULMER, C. Z.; VASILIOU, V.; GARRETT, T. J.; YOST, R. A.; PRASAD, M. N. V.; POLLITT, K. J. G.; BOWDEN, J. A. Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. **Metabolomics**, v. 16, n. 5, p. 1-22, 2020.

KUEHNBAUM, N. L.; GILLEN, J. B.; KORMENDI, A.; LAM, K. P.; DIBATTISTA, A.; GIBALA, M. J.; BRITZ-MCKIBBIN, P. *et al.* Multiplexed separations for biomarker discovery in metabolomics: Elucidating adaptive responses to exercise training. **Electrophoresis**, v. 36, n. 18, p. 2226-2236, 2015.

KUMAR, P. R.; DINESH, S. R.; RINI, R. LCMS—a review and a recent update. **J Pharm Pharm Sci**, v. 5, p. 377-391, 2016.

LALAND, K. N.; ODLING-SMEE, J.; MYLES, S. How culture shaped the human genome: bringing genetics and the human sciences together. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 2, p. 137-148, 2010. ISSN 1471-0064.

LARANCE, M.; LAMOND, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 5, p. 269-280, 2015. ISSN 1471-0080.

LAUSECKER, B.; HOPFGARTNER, G.; HESSE, M. Capillary electrophoresis–mass spectrometry coupling versus micro-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry coupling: a case study. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences Applications**, 718, n. 1, p. 1-13, 1998.

LAY JR, J. O.; LIYANAGE, R.; BORGMANN, S.; WILKINS, C. L. Problems with the “omics”. **Trends in Analytical Chemistry**, 25, n. 11, p. 1046-1056, 2006.

LAZARIM, F. L.; ANTUNES-NETO, J. M.; DA SILVA, F. O.; NUNES, L. A.; BASSINI-CAMERON, A.; CAMERON, L. C.; ALVES A. A.; BRENIKOFEER, R.; DE MACEDO,

D. V. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 12, n. 1, p. 85-90, 2009.

LEE, J.; ZHANG, X.; SPORTS. Physiological determinants of VO₂max and the methods to evaluate it: A critical review. **Science**, 36, n. 4, p. 259-271, 2021.

LEE, S.; NORHEIM, F.; GULSETH, H. L.; LANGLEITE, T. M. *et al.* Skeletal muscle phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine respond to exercise and influence insulin sensitivity in men. **Scientific reports**, 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

LEWIS, G. D.; ASNANI, A.; GERSZTEN, R. E. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 117-123, 2008. ISSN 0735-1097.

LI, M.; YANG, L.; BAI, Y.; LIU, H. Analytical methods in lipidomics and their applications. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 1, p. 161-175, 2014. ISSN 0003-2700.

LI, S.; LI, B.; CHENG, C.; XIONG, Z.; LIU, Q.; LAI, J.; CAREY, H. V.; ZHANG, Q.; ZHENG, H.; WEI, S. Genomic signatures of near-extinction and rebirth of the crested ibis and other endangered bird species. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 557, 2014. ISSN 1474-760X.

LI, Y.; JOHN, M. A. S.; ZHOU, X.; KIM, Y.; SINHA, U.; JORDAN, R. C.; EISELE, D.; ABEMAYOR, E.; ELASHOFF, D.; PARK, N.-H. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 24, p. 8442-8450, 2004. ISSN 1078-0432.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.

LIMERO, T.; NAZAROV, E.; MENLYADIEV, M.; EICEMAN, G. Characterization of ion processes in a GC/DMS air quality monitor by integration of the instrument to a mass spectrometer. **Analyst**, 140, n. 3, p. 922-930, 2015.

LIN, M.; PEDROSA, E.; SHAH, A.; HRABOVSKY, A.; MAQBOOL, S.; ZHENG, D.; LACHMAN, H. M. RNA-Seq of human neurons derived from iPS cells reveals candidate long non-coding RNAs involved in neurogenesis and neuropsychiatric disorders. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e23356, 2011. ISSN 1932-6203.

LINDHOLM, M. E.; HUSS, M.; SOLNESTAM, B. W.; KJELLQVIST, S.; LUNDEBERG, J.; SUNDBERG, C. J. The human skeletal muscle transcriptome: sex differences, alternative splicing, and tissue homogeneity assessed with RNA sequencing. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 10, p. 4571-4581, 2014. ISSN 0892-6638.

LINDHOLM, M. E.; MARABITA, F.; GOMEZ-CABRERO, D.; RUNDQVIST, H. *et al.* An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. **Epigenetics**, 9, n. 12, p. 1557-1569, 2014.

LIU, D.; SARTOR, M. A.; NADER, G. A.; GUTMANN, L. *et al.* Skeletal muscle gene expression in response to resistance exercise: sex specific regulation. **BMC genomics**, 11, n. 1, p. 659, 2010.

LIU, S.; LI, W.; WU, Y.; CHEN, C.; LEI, J. De novo transcriptome assembly in chili pepper (*Capsicum frutescens*) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e48156, 2013. ISSN 1932-6203.

LLODIO, I.; GARCIA-TABAR, I.; SÁNCHEZ-MEDINA, L.; IBÁÑEZ, J. *et al.* Estimation of the maximal lactate steady state in junior soccer players. **International Journal of Sports Medicine**, 36, n. 14, p. 1142-1148, 2015.

LLOYD, B. B. The energetics of running: an analysis of world records. **Advancement of Science**, 22, n. 103, p. 515, 1966.

LOURES, J. P.; CHAMARI, K.; FERREIRA, E. C.; CAMPOS, E. Z.; ZAGATTO, A. M.; MILIONI, F.; DA SILVA, A. S.; PAPOTI, M. Specific determination of maximal lactate

steady state in soccer players. **The Journal of Strength Conditioning Research** v. 29, n. 1, p. 101-106, 2015. ISSN 1064-8011.

LOURES, J. P.; KALVA FILHO, C. A.; FRANCO, V. H.; KAMINAGAKURA, E. I. *et al.* Correlation between the Curvature Constant Parameter (W') from the Velocity-Exhaustion Time Relationship, Maximal Accumulated Oxygen Deficit and Performance in Professional Soccer Players. **Journal of Exercise Physiology Online**, 15, n. 5, 2012.

LOVINS, R.; ELLIS, S.; TOLBERT, G.; MCKINNEY, C. Liquid chromatography-mass spectrometry. Coupling of a liquid chromatograph to a mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, 45, n. 8, p. 1553-1556, 1973.

LU, T.; LU, G.; FAN, D.; ZHU, C.; LI, W.; ZHAO, Q.; FENG, Q.; ZHAO, Y.; GUO, Y.; LI, W. Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. **Genome research**, v. 20, n. 9, p. 1238-1249, 2010. ISSN 1088-9051.

LUSTGARTEN, M. S.; PRICE, L. L.; LOGVINENKO, T.; HATZIS, C.; PADUKONE, N.; REO, N. V.; PHILLIPS, E. M.; KIRN, D.; MILLS, J.; FIELDING, R. A. Identification of serum analytes and metabolites associated with aerobic capacity. **European journal of applied physiology**, v. 113, n. 5, p. 1311-1320, 2013.

MACKLIN, A.; KHAN, S.; KISLINGER, T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. **Clinical Proteomics**, v. 17, p. 1-25, 2020. ISSN 1542-6416.

MACRAE, T.; SARGEANT, T.; LEMIEUX, S.; HÉBERT, J.; DENEALT, É.; SAUVAGEAU, G. RNA-Seq reveals spliceosome and proteasome genes as most consistent transcripts in human cancer cells. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72884, 2013. ISSN 1932-6203.

MALLICK, P.; KUSTER, B. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 695, 2010. ISSN 1546-1696.

MARINHO, A. H.; SOUSA, F. A. d. B.; VILELA, R. d. A. M. P.; BALIKIAN, P. *et al.* The rating of perceived exertion is able to differentiate the post-matches metabolomic profile of elite U-20 soccer players. **European journal of applied physiology**, 122, n. 2, p. 371-382, 2022.

MARIONI, J. C.; MASON, C. E.; MANE, S. M.; STEPHENS, M. *et al.* RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome research**, 18, n. 9, p. 1509-1517, 2008.

MARTÍN-SÁNCHEZ, F. J.; VILLALÓN, J. M.; ZAMORANO-LEÓN, J. J.; ROSAS, L. F.; PROIETTI, R.; MATEOS-CACERES, P. J.; GONZÁLEZ-ARMENGOL, J. J.; VILLARROEL, P.; MACAYA, C.; LÓPEZ-FARRÉ, A. J. Functional status and inflammation after preseason training program in professional and recreational soccer players: a proteomic approach. **Journal of sports science medicine** v. 10, n. 1, p. 45, 2011.

MATYASH, V.; LIEBISCH, G.; KURZCHALIA, T. V.; SHEVCHENKO, A.; SCHWUDKE, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 5, p. 1137-1146, 2008.

MAYHEW, S.; WENGER, H. Time-motion analysis of professional soccer. **Journal of Human Movement Studies**, 11, n. 1, p. 49-52, 1985.

MCBRIDE, E. M.; LAWRENCE, R. J.; MCGEE, K.; MACH, P. M. *et al.* Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry method for targeted quantitation of human performance metabolites in saliva. **Journal of Chromatography A**, 1601, p. 205-213, 2019.

MCGLORY, C.; VAN VLIET, S.; STOKES, T.; MITTENDORFER, B. *et al.* The impact of exercise and nutrition on the regulation of skeletal muscle mass. **The Journal of Physiology**, 597, n. 5, p. 1251-1258, 2019.

- MCMILLAN, K.; HELGERUD, J.; MACDONALD, R.; HOFF, J. Physiological adaptations to soccer specific endurance training in professional youth soccer players. **British journal of sports medicine**, 39, n. 5, p. 273-277, 2005.
- MEDBO, J. I.; MOHN, A.-C.; TABATA, I.; BAHR, R.; VAAGE, O.; SEJERSTED, O. M. Anaerobic capacity determined by maximal accumulated O₂ deficit. **Journal of Applied Physiology**, v. 64, n. 1, p. 50-60, 1988. ISSN 8750-7587.
- MESSIAS, L. H. D.; DE ANDRADE, V. C.; DE LIMA, T. B.; ROSANTE, K.; SANTA CRUZ, R. A. R.; DE OLIVEIRA, R. M.; DE BARROS MANCHADO-GOBATTO, F. Running anaerobic sprint test, lactate minimum and critical velocity protocol in shuttle futsal testing. **Central European Journal of Sport Sciences Medicine** v. 12, p. 5-15, 2015. ISSN 2300-9705.
- MESSIAS, L. H.; FERRARI, H. G.; REIS, I. G.; SCARIOT, P. P.; MANCHADO-GOBATTO, F. B. Critical velocity and anaerobic paddling capacity determined by different mathematical models and number of predictive trials in canoe slalom. **Journal of sports science medicine** v. 14, n. 1, p. 188, 2015.
- MEYER, J. G.; SCHILLING, B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. **Expert review of proteomics**, v. 14, n. 5, p. 419-429, 2017. ISSN 1478-9450.
- MEYER, T.; MEISTER, S. Routine blood parameters in elite soccer players. **International journal of sports medicine**, v. 32, n. 11, p. 875-881, 2011.
- MICHAILIDIS, Y. Physical condition differences between semi-professional and amateur soccer players. **International Journal of Sport Culture Science**, 6, n. 2, p. 191-202, 2018.
- MILLER, W.; DRAUTZ, D. I.; RATAN, A.; PUSEY, B.; QI, J.; LESK, A. M.; TOMSHO, L. P.; PACKARD, M. D.; ZHAO, F.; SHER, A. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 387-390, 2008. ISSN 1476-4687.
- MIRANDA, R. E. E. P. C.; ANTUNES, H. K. M.; PAULI, J. R.; PUGGINA, E. F. *et al.* Effects of 10-week soccer training program on anthropometric, psychological, technical skills and specific performance parameters in youth soccer players. **Science**, 28, n. 2, p. 81-87, 2013.
- MITTELMAIER, S.; PISCHETSRIEDER, M. Multistep ultrahigh performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis for untargeted quantification of glycation activity and identification of most relevant glycation products. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 24, p. 9660-9668, 2011. ISSN 0003-2700.
- MIYAGI, W. E.; DE POLI, R. D. A. B.; PAPOTI, M.; BERTUZZI, R. *et al.* Anaerobic capacity estimated in a single supramaximal test in cycling: validity and reliability analysis. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- MO, M. L.; PALSSON, B. Ø.; HERRGÅRD, M. J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. **BMC systems biology**, v. 3, n. 1, p. 37, 2009. ISSN 1752-0509.
- MOCO, S.; VERVOORT, J.; BINO, R. J.; DE VOS, R. C.; BINO, R. Metabolomics technologies and metabolite identification. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 855-866, 2007. ISSN 0165-9936.
- MOHR, M.; KRUSTRUP, P.; BANGSBO, J. Match performance of high-standard soccer players with special reference to development of fatigue. **Journal of sports sciences**, 21, n. 7, p. 519-528, 2003.
- MONOD, H.; SCHERRER, J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics**, v. 8, n. 3, p. 329-338, 1965. ISSN 0014-0139.
- MORITANI, T.; NAGATA, A.; DEVRIES, H. A.; MURO, M. Critical power as a measure of physical work capacity and anaerobic threshold. **Ergonomics**, 24, n. 5, p. 339-350, 1981.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255-264, 2008. ISSN 0888-7543.

MORRIS, C.; GRADA, C. O.; RYAN, M.; ROCHE, H. M.; DE VITO, G.; GIBNEY, M. J.; GIBNEY, E. R.; BRENNAN, L. The relationship between aerobic fitness level and metabolic profiles in healthy adults. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 7, p. 1246-1254, 2013.

MORRIS, C.; O'GRADA, C. M.; RYAN, M. F.; GIBNEY, M. J.; ROCHE, H. M.; GIBNEY, E. R.; BRENNAN, L. Modulation of the lipidomic profile due to a lipid challenge and fitness level: a postprandial study. **Lipids in health disease** v. 14, n. 1, p. 65, 2015. ISSN 1476-511X.

MUKHERJEE, K.; EDGETT, B. A.; BURROWS, H. W.; CASTRO, C.; GRIFFIN, J. L.; SCHWERTANI, A. G.; GURD, B. J.; FUNK, C. D. Whole blood transcriptomics and urinary metabolomics to define adaptive biochemical pathways of high-intensity exercise in 50-60 year old masters athletes. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92031, 2014.

NAIR, K. S.; JALEEL, A.; ASMANN, Y. W.; SHORT, K. R.; RAGHAVAKAIMAL, S. Proteomic research: potential opportunities for clinical and physiological investigators. **American Journal of Physiology-Endocrinology**, v. 286, n. 6, p. E863-E874, 2004. ISSN 0193-1849.

NAZ, S.; VALLEJO, M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 99-105, 2014.

NEBELSICK-GULLETT, L. J.; HOUSH, T. J.; JOHNSON, G. O.; BAUGE, S. M. A comparison between methods of measuring anaerobic work capacity. **Ergonomics**, 31, n. 10, p. 1413-1419, 1988.

NÉDÉLEC, M.; HALSON, S.; ABAIDIA, A.-E.; AHMAIDI, S.; DUPONT, G. Stress, sleep and recovery in elite soccer: a critical review of the literature. **Sports Medicine**, v. 45, n. 10, p. 1387-1400, 2015. ISSN 0112-1642.

NÉDÉLEC, M.; MCCALL, A.; CARLING, C.; LEGALL, F.; BERTHOIN, S.; DUPONT, G. Recovery in soccer. **Sports medicine**, v. 42, n. 12, p. 997-1015, 2012.

NEUBAUER, O.; SABAPATHY, S.; ASHTON, K. J.; DESBROW, B.; PEAKE, J. M.; LAZARUS, R.; WESSNER, B.; CAMERON-SMITH, D.; WAGNER, K.H.; HASELER, L. J.; BULMER, A. C. Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 3, p. 274-287, 2014.

NEWSOM, S. A.; BROZINICK, J. T.; KISELJAK-VASSILIADES, K.; STRAUSS, A. N. *et al.* Skeletal muscle phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are related to insulin sensitivity and respond to acute exercise in humans. **Journal of applied physiology**, 120, n. 11, p. 1355-1363, 2016.

NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; LINDON, J. C. Metabonomics and metabolomics techniques and their application in mammalian systems. **The handbook of metabonomics metabolomics**, p. 1-34, 2007.

NIE, J.; HAO, X.; CHEN, D.; HAN, X. *et al.* A novel function of the human CLS1 in phosphatidylglycerol synthesis and remodeling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Biology of Lipids**, 1801, n. 4, p. 438-445, 2010.

NIELSEN, J.; LEE, S.Y. Systems biology: The 'new biotechnology'. **Current opinion in biotechnology**, v. 4, n. 23, p. 583-584, 2012.

NIEMAN, D.; STEAR, S.; CASTELL, L.; BURKE, L. A-Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance: part 15. **British journal of sports medicine**, 44, n. 16, p. 1202-1205, 2010.

NIEMI, A.-K.; MAJAMAA, K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, n. 8, p. 965-969, 2005. ISSN 1476-5438.

NIKOLAÏDIS, P. Anaerobic power across adolescence in soccer players. **Human Movement**, 12, n. 4, p. 342-347, 2011.

NORTH, K. N.; BEGGS, A. H. Deficiency of a skeletal muscle isoform of α -actinin (α -actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 6, n. 4, p. 229-235, 1996. ISSN 0960-8966.

NOWAKOWSKA, A.; KOSTRZEWA-NOWAK, D.; BURYTA, R.; NOWAK, R. Blood Biomarkers of Recovery Efficiency in Soccer Players. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 18, p. 3279, 2019.

O'BEIRNE, S. L.; SHENOY, S. A.; SALIT, J.; STRULOVICI-BAREL, Y. *et al.* Ambient pollution-related reprogramming of the human small airway epithelial transcriptome. **American journal of respiratory critical care medicine**, 198, n. 11, p. 1413-1422, 2018.

O'REILLY, J.; WONG, S. H. The development of aerobic and skill assessment in soccer. **Sports Medicine**, v. 42, n. 12, p. 1029-1040, 2012. ISSN 0112-1642.

OLIVA-LOZANO, J. M.; MARTÍNEZ-PUERTAS, H.; FORTES, V.; LÓPEZ-DEL CAMPO, R. *et al.* Is there any relationship between match running, technical-tactical performance, and team success in professional soccer? A longitudinal study in the first and second divisions of LaLiga. **Biology of Sport**, 40, n. 2, 2022.

OLIVEIRA, S. R.; MENEGÁRIO, A. A.; ARRUDA, M. A. Evaluation of Fe uptake and translocation in transgenic and non-transgenic soybean plants using enriched stable ⁵⁷Fe as a tracer. **Metallomics**, 6, n. 10, p. 1832-1840, 2014.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998. ISSN 0167-7799.

OSGNACH, C.; DI PRAMPERO, P. E. metabolic power in team sports-part 2: aerobic and anaerobic energy yields. **International journal of sports medicine**, 39, n. 08, p. 588-595, 2018.

OSTOJIC, S. M. Elite and nonelite soccer players: preseasonal physical and physiological characteristics. **Research in Sports Medicine**, 12, n. 2, p. 143-150, 2004.

OSTOJIC, S. M.; MEDICINE. Characteristics of elite and non-elite Yugoslav soccer players: correlates of success. **Journal of sports science**, 2, n. 1, p. 34-35, 2003.

OTA, T.; SUZUKI, Y.; NISHIKAWA, T.; OTSUKI, T.; SUGIYAMA, T.; IRIE, R.; WAKAMATSU, A.; HAYASHI, K.; SATO, H.; NAGAI, K. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. **Nature genetics**, v. 36, n. 1, p. 40-45, 2004. ISSN 1546-1718.

PACHECO, C.; DA SILVA FELIPE, S. M.; DE CARVALHO SOARES, M. M. D.; ALVES, J. O. *et al.* A compendium of physical exercise-related human genes: an omic scale analysis. **Biology of sport**, 35, n. 1, p. 3, 2018.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000. ISSN 1476-4687.

PANG, Z.; CHONG, J.; ZHOU, G.; DE LIMA MORAIS, D. A. *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic acids research**, 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.

PAPAEVANGELOU, E.; METAXAS, T.; RIGANAS, C.; MANDROUKAS, A. *et al.* Evaluation of soccer performance in professional, semi-professional and amateur players of the same club. **Journal of Physical Education Sport**, 12, n. 3, p. 362, 2012.

PASSOS-CASTILHO, A. M.; CARVALHO, V. M.; CARDOZO, K. H. M.; KIKUCHI, L. *et al.* Serum lipidomic profiling as a useful tool for screening potential biomarkers of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma by ultraperformance liquid chromatography–mass spectrometry. **BMC cancer**, 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

PATE, R.; GOODYEAR, L.; DOVER, V.; DOROCIAC, J. *et al.* 2: 15 pm: MAXIMAL OXYGEN DEFICIT: A TEST OF ANAEROBIC CAPACITY. **Medicine and science in sports and exercise**, 15, n. 2, p. 121, 1983.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012. ISSN 1471-0080.

PEPPER, M.; HOUSH, T.; JOHNSON, G. The accuracy of the critical velocity test for predicting time to exhaustion during treadmill running. **International journal of sports medicine**, 13, n. 02, p. 121-124, 1992.

PEREIRA, V. H.; GAMA, M. C. T.; SOUSA, F. A. B.; LEWIS, T. G.; GOBATTO, C. A.; MANCHADO-GOBATTO, F. B. Complex network models reveal correlations among network metrics, exercise intensity and role of body changes in the fatigue process. **Scientific reports**, v. 5, p. 10489, 2015. ISSN 2045-2322.

PÉREZ-SCHINDLER, J.; KANHERE, A.; EDWARDS, L.; ALLWOOD, J. W. *et al.* Exercise and high-fat feeding remodel transcript-metabolite interactive networks in mouse skeletal muscle. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

PERRONI, F.; VETRANO, M.; CAMOLESE, G.; GUIDETTI, L.; BALDARI, C. PERRONI, Fabrizio *et al.* Anthropometric and somatotype characteristics of young soccer players: Differences among categories, subcategories, and playing position. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 29, n. 8, p. 2097-2104, 2015.

PERROTTI, F.; ROSA, C.; CICALINI, I.; SACCHETTA, P. *et al.* Advances in lipidomics for cancer biomarkers discovery. **International journal of molecular sciences**, 17, n. 12, p. 1992, 2016.

PETRIZ, B. A.; GOMES, C. P.; ALMEIDA, J. A.; DE OLIVEIRA JR, G. P.; RIBEIRO, F. M.; PEREIRA, R. W.; FRANCO, O. L. The effects of acute and chronic exercise on skeletal muscle proteome. **Journal of cellular physiology**, v. 232, n. 2, p. 257-269, 2017.

PICKERING, C.; SURACI, B.; SEMENOVA, E. A.; BOULYGINA, E. A. *et al.* A genome-wide association study of sprint performance in elite youth football players. **The Journal of Strength Conditioning Research**, 33, n. 9, p. 2344-2351, 2019.

PINTUS, R.; BONGIOVANNI, T.; CORBU, S.; FRANCAVILLA, V. C.; DESSÍ, A.; NOTO, A.; CORSELLO, G.; FINCO, G.; FANOS, V.; MARINCOLA, F. C. Sportomics in professional soccer players: metabolomics results during preseason. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, 2020.

PIOMELLI, D.; ASTARITA, G.; RAPAKA, R. A neuroscientist's guide to lipidomics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 743-754, 2007. ISSN 1471-0048.

PITSILADIS, Y. P.; TANAKA, M.; EYNON, N.; BOUCHARD, C. *et al.* Athlome Project Consortium: a concerted effort to discover genomic and other “omic” markers of athletic performance. **Physiological genomics**, 48, n. 3, p. 183-190, 2016.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19, 2009.

PITTI, E.; PETRELLA, G.; DI MARINO, S.; SUMMA, V.; PERRONE, M.; D'OTTAVIO, S.; BERNARDINI, A.; CICERO, D. O. Salivary metabolome and soccer match: Challenges for understanding exercise induced changes. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 141, 2019.

POOLE, D. C.; ROSSITER, H. B.; BROOKS, G. A.; GLADDEN, L. B. The anaerobic threshold: 50+ years of controversy. **The journal of physiology**, 599, n. 3, p. 737-767, 2021.

PRADO, E.; SOUZA, G. H.; PEGURIER, M.; VIEIRA, C.; LIMA-NETO, A. B. M.; ASSIS, M.; GUEDES, M. I. F.; KOBLITZ, M. G. B.; FERREIRA, M. S. L.; MACEDO, A. F. Non-targeted sportomics analyses by mass spectrometry to understand exercise-induced metabolic stress in soccer players. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 1-5, 2017. ISSN 1387-3806.

PRIMROSE, S.; DRAPER, J.; ELSOM, R.; KIRKPATRICK, V. *et al.* Metabolomics and human nutrition. **British Journal of Nutrition**, 105, n. 8, p. 1277-1283, 2011.

PROKOPOW, P. The effects of muscle strengthening on neuro-musculo--skeletal dynamics in a squat jump: a simulation study. **Human Movement**, 12, n. 4, p. 307-314, 2011.

PRUNA, R.; ARTELLS, R.; LUNDBLAD, M.; MAFFULLI, N. Genetic biomarkers in non-contact muscle injuries in elite soccer players. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 25, n. 10, p. 3311-3318, 2017.

PSIHOGIOS, N. G.; GAZI, I. F.; ELISAF, M. S.; SEFERIADIS, K. I. *et al.* Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics. **NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development Application of Magnetic Resonance In vivo**, 21, n. 3, p. 195-207, 2008.

QUINTAS, G.; RECHE, X.; SANJUAN-HERRÁEZ, J. D.; MARTÍNEZ, H.; HERRERO, M.; VALLE, X.; MASA, M.; RODAS, G. Urine metabolomic analysis for monitoring internal load in professional football players. **Metabolomics**, v. 16, p. 1-11, 2020. ISSN 1573-3882.

RA, S.-G.; MAEDA, S.; HIGASHINO, R.; IMAI, T.; MIYAKAWA, S. Metabolomics of salivary fatigue markers in soccer players after consecutive games. **Applied Physiology, Nutrition, Metabolism** v. 39, n. 10, p. 1120-1126, 2014. ISSN 1715-5312.

RAHIM, M.; EL KHOURY, L. Y.; RALEIGH, S. M.; RIBBANS, W. J. *et al.* Human genetic variation, sport and exercise medicine, and achilles tendinopathy: role for angiogenesis-associated genes. **Omics: a journal of integrative biology**, 20, n. 9, p. 520-527, 2016.

RAI, V.; MUKHERJEE, R.; GHOSH, A. K.; ROUTRAY, A.; CHAKRABORTY, C. "Omics" in oral cancer: New approaches for biomarker discovery. **Archives of oral biology**, v. 87, p. 15-34, 2018. ISSN 0003-9969.

RAMPININI, E.; COUTTS, A. J.; CASTAGNA, C.; SASSI, R. *et al.* Variation in top level soccer match performance. **International journal of sports medicine**, 28, n. 12, p. 1018-1024, 2007.

RAMPININI, E.; IMPELLIZZERI, F. M.; CASTAGNA, C.; COUTTS, A. J. *et al.* Technical performance during soccer matches of the Italian Serie A league: Effect of fatigue and competitive level. **Journal of science medicine in sport**, 12, n. 1, p. 227-233, 2009.

REBELO, A.; BRITO, J.; MAIA, J.; COELHO-E-SILVA, M. *et al.* Anthropometric characteristics, physical fitness and technical performance of under-19 soccer players by competitive level and field position. **International journal of sports medicine**, 34, n. 04, p. 312-317, 2013.

REICHEL, C. OMICS-strategies and methods in the fight against doping. **Forensic science international**, 213, n. 1-3, p. 20-34, 2011.

REILLY, T. A motion analysis of work-rate in different positional roles in professional football match-play. v. 2, p. 87-97, 1976.

REILLY, T.; BANGSBO, J.; FRANKS, A. Anthropometric and physiological predispositions for elite soccer. **Journal of sports sciences**, 18, n. 9, p. 669-683, 2000.

REILLY, T.; WILLIAMS, A. M.; NEVILL, A.; FRANKS, A. A multidisciplinary approach to talent identification in soccer. **Journal of sports sciences**, 18, n. 9, p. 695-702, 2000.

RESENDE, N. M.; DE MAGALHAES NETO, A. M.; BACHINI, F.; DE CASTRO, L. E. V.; BASSINI, A.; CAMERON, L. Metabolic changes during a field experiment in a world-class windsurfing athlete: a trial with multivariate analyses. **OMICS: A journal of integrative biology**, v. 15, n. 10, p. 695-704, 2011. ISSN 1536-2310.

REY, E.; PADRÓN-CABO, A.; BARCALA-FURELOS, R.; CASAMICHANA, D.; ROMO-PÉREZ, V. Practical active and passive recovery strategies for soccer players. **Strength & Conditioning Journal**, v. 40, n. 3, p. 45-57, 2018.

RIBEIRO, R.; DIAS, D.; CLAUDINO, J.; GONÇALVES, R. Analysis of the somatotype and physical conditioning between soccer player under-20. **Motriz: Rer Educ Fis**, 13, p. 280-287, 2007.

RIEKEBERG, E.; POWERS, R. New frontiers in metabolomics: from measurement to insight. **F1000Research**, v. 6, 2017.

RIENZI, E.; DRUST, B.; REILLY, T.; CARTER, J. E. X. L.; MARTIN, A. RIENZI, E. et al. Investigation of anthropometric and work-rate profiles of elite South American international soccer players. **Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 40, n. 2, p. 162, 2000.

RIETVELD, A. G.; KOORENGEVEL, M. C.; DE KRUIJFF, B. Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of Escherichia coli. **J The EMBO Journal**, v. 14, n. 22, p. 5506-5513, 1995. ISSN 0261-4189.

RIGHETTI, L.; RUBERT, J.; GALAVERNA, G.; HURKOVA, K.; DALL'ASTA, C.; HAJŠLOVA, J.; STRANSKA-ZACHARIASOVA, M. A novel approach based on untargeted lipidomics reveals differences in the lipid pattern among durum and common wheat. **Food chemistry**, v. 240, p. 775-783, 2018.

ROBERTS, L. D.; SOUZA, A. L.; GERSZTEN, R. E.; CLISH, C. B. Targeted metabolomics. **Current protocols in molecular biology**, v. 98, n. 1, p. 30.32. 31-30.32. 24, 2012. ISSN 1934-3639.

ROSTOKS, N.; BOREVITZ, J. O.; HEDLEY, P. E.; RUSSELL, J.; MUDIE, S.; MORRIS, J.; CARDLE, L.; MARSHALL, D. F.; WAUGH, R. Single-feature polymorphism discovery in the barley transcriptome. **Genome Biology**, v. 6, n. 6, p. R54, 2005. ISSN 1474-760X.

ROUSOPOULOS, E.; COOKE, C.; PARADISIS, G.; ZACHAROGIANNIS, E. et al. The Physiological Profile of Male Professional Soccer Players: The Effect of Playing Division. **Journal ISSN**, 2766, p. 2276, 2021.

ROUX, A.; LISON, D.; JUNOT, C.; HEILIER, J.-F. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. **Clinical biochemistry**, 44, n. 1, p. 119-135, 2011.

ROWLANDS, D. S.; NELSON, A. R.; RAYMOND, F.; METAIRON, S.; MANSOURIAN, R.; CLARKE, J.; STELLINGWERFF, T.; PHILLIPS, S. M. Protein-leucine ingestion activates a regenerative inflammo-myogenic transcriptome in skeletal muscle following intense endurance exercise. **Physiological genomics**, v. 48, n. 1, p. 21-32, 2016.

ROWLANDS, D. S.; PAGE, R. A.; SUKALA, W. R.; GIRI, M.; GHIMBOVSCHI, S. D.; HAYAT, I.; CHEEMA, B. S.; LYS, I.; LEIKIS, M.; SHEARD, P. Multi-omic integrated networks connect DNA methylation and miRNA with skeletal muscle plasticity to

chronic exercise in Type 2 diabetic obesity. **Physiological genomics**, v. 46, n. 20, p. 747-765, 2014. ISSN 1094-8341.

ROWLANDS, D. S.; THOMSON, J. S.; TIMMONS, B. W.; RAYMOND, F.; FUERHOLZ, A.; MANSOURIAN, R.; ZWAHLEN, M.C.; MÉTAIRON, S.; GLOVER, E.; STELLINGWERFF, T.; KUSSMANN, M.; TARNOPOLSKY, M. A. Transcriptome and translational signaling following endurance exercise in trained skeletal muscle: impact of dietary protein. **Physiological genomics**, 2011.

SAKAGUCHI, C. A.; NIEMAN, D. C.; SIGNINI, E. F.; ABREU, R. M.; CATAI, A. M. Metabolomics-based studies assessing exercise-induced alterations of the human metabolome: A systematic review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, p. 164, 2019.

SAMEEK, R.; CHINNAIYAN, A. M. Translating genomics for precision cancer medicine. **Annual review of genomics human genetics** v. 15, p. 395-415, 2014. ISSN 1527-8204.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

SANFORD, J. A.; NOGIEC, C. D.; LINDHOLM, M. E.; ADKINS, J. N. *et al.* Molecular Transducers of Physical Activity Consortium (MoTrPAC): Mapping the Dynamic Responses to Exercise. **Cell Reports**, p. 107863, 2020.

SANGER, F.; COULSON, A.; FRIEDMANN, T.; AIR, G.; BARRELL, B.; BROWN, N.; FIDDES, J.; HUTCHISONIII, C.; SLOCOMBE, P.; SMITH, M. Nucleotide sequence of λ X 174 DNA. v. 265, p. 687-695, 1977.

SANTONE, C.; DINALLO, V.; PACI, M.; D'OTTAVIO, S.; BARBATO, G.; BERNARDINI, S. Saliva metabolomics by NMR for the evaluation of sport performance. **Journal of pharmaceutical biomedical analysis** v. 88, p. 441-446, 2014. ISSN 0731-7085.

SARZYNSKI, M. A.; GHOSH, S.; BOUCHARD, C. Genomic and transcriptomic predictors of response levels to endurance exercise training. **The Journal of Physiology**, 595, n. 9, p. 2931-2939, 2017.

SCHEIMAN, J.; LUBER, J. M.; CHAVKIN, T. A.; MACDONALD, T. *et al.* Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. **Nature medicine**, 25, n. 7, p. 1104-1109, 2019.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270, n. 5235, p. 467-470, 1995.

SCHWARZ, H. P.; DREISBACH, L. Isolation and chemical characterization of phosphatidylglycerol from blood plasma of humans. **Biochimica et Biophysica Acta Lipids**, 210, n. 3, p. 436-441, 1970.

SEGRS, K.; ZHANG, W.; AOURZ, N.; BONGAERTS, J.; DECLERCK, S.; MANGELINGS, D.; HANKEMEIER, T.; DE BUNDEL, D.; VANDER HEYDEN, Y.; SMOLDERS, I. CE-MS metabolic profiling of volume-restricted plasma samples from an acute mouse model for epileptic seizures to discover potentially involved metabolomic features. **Talanta**, p. 121107, 2020. ISSN 0039-9140.

SELLERS, T. A.; YATES, J. R. Review of proteomics with applications to genetic epidemiology. **Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society**, v. 24, n. 2, p. 83-98, 2003. ISSN 0741-0395.

SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; ORESIC, M. How to study lipidomes. **Journal of molecular endocrinology**, v. 42, n. 3, p. 185, 2009. ISSN 1479-6813.

SIEMELINK, M. A.; ZELLER, T. Biomarkers of coronary artery disease: the promise of the transcriptome. **Current cardiology reports**, v. 16, n. 8, p. 513, 2014. ISSN 1523-3782.

SILVA, A. S. R.; SANTHIAGO, V.; PAPOTI, M.; GOBATTO, C. A. Hematological parameters and anaerobic threshold in Brazilian soccer players throughout a training program. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 30, n. 2, p. 158-166, 2008.

SILVA, A. S. R.; SANTHIAGO, V.; PAPOTI, M.; GOBATTO, C. A. Psychological, biochemical and physiological responses of Brazilian soccer players during a training program. **Science & Sports**, v. 23, n. 2, p. 66-72, 2008.

SILVA, A.; BONETTE, A.; SANTHIAGO, V.; GOBATTO, C. Effect of soccer training on the running speed and the blood lactate concentration at the lactate minimum test. **Biology of Sport**, p. 105-114, 2007. ISSN 0860-021X.

SILVA, A.; SANTHIAGO, V.; PAPOTI, M.; GOBATTO, C. Hematological parameters and anaerobic threshold in Brazilian soccer players throughout a training program. **International Journal of Laboratory Hematology**, 30, n. 2, p. 158-166, 2008.

SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. D. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A. D.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. C.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, n. 6792, p. 151-157, 2000. ISSN 1476-4687.

SINCLAIR, K.; DUDLEY, E. Metabolomics and biomarker discovery. **Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research**, p. 613-633, 2019.

SLAGBOOM, P.; BEEKMAN, M.; PASSTOORS, W.; DEELEN, J.; VAARHORST, A.; BOER, J.; VAN DEN AKKER, E.; VAN HEEMST, D.; DE CRAEN, A.; MAIER, A. Genomics of human longevity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1561, p. 35-42, 2011. ISSN 0962-8436.

SLIMANI, M.; ZNAZEN, H.; MIARKA, B.; BRAGAZZI, N. L. Maximum oxygen uptake of male soccer players according to their competitive level, playing position and age group: implication from a network meta-analysis. **Journal of human kinetics**, 66, n. 1, p. 233-245, 2019.

SLUPSKY, C. M.; RANKIN, K. N.; WAGNER, J.; FU, H. *et al.* Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. **Analytical chemistry**, 79, n. 18, p. 6995-7004, 2007.

SMITH, C. A.; WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. **Analytical chemistry**, v. 78, n. 3, p. 779-787, 2006.

SOBSEY, C. A.; IBRAHIM, S.; RICHARD, V. R.; GASPAR, V.; MITSA, G.; LACASSE, V.; ZAHEDI, R. P.; BATIST, G.; BORCHERS, C. H. Targeted and Untargeted Proteomics Approaches in Biomarker Development. **Proteomics**, v. 20, n. 9, p. 1900029, 2020. ISSN 1615-9853.

SONG, L.; FANG, F.; LIU, P.; ZENG, G.; LIU, H.; ZHAO, Y.; XIE, X.; TSENG, G.; RANDHAWA, P.; XIAO, K. Quantitative Proteomics for Monitoring Renal Transplant Injury. **PROTEOMICS-Clinical Applications**, p. 1900036, 2020. ISSN 1862-8346.

SPRATLIN, J. L.; SERKOVA, N. J.; ECKHARDT, S. G. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 2, p. 431-440, 2009. ISSN 1078-0432.

SPRIET, L. Anaerobic metabolism during high-intensity exercise. Exercise Metabolism. **Haargreaves M**, 1995.

STARKS, M. A.; STARKS, S. L.; KINGSLEY, M.; PURPURA, M. *et al.* The effects of phosphatidylserine on endocrine response to moderate intensity exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, 5, n. 1, p. 1-6, 2008.

STARNES, J. W.; PARRY, T. L.; O'NEAL, S. K.; BAIN, J. R.; MUEHLBAUER, M. J.; HONCOOP, A.; ILAIWY, A.; CHRISTOPHER, P. M.; PATTERSON, C.; WILLIS, M. S.

- Exercise-induced alterations in skeletal muscle, heart, liver, and serum metabolome identified by non-targeted metabolomics analysis. **Metabolites**, v. 7, n. 3, p. 40, 2017.
- STATHIS, C.; FEBBRAIO, M.; CAREY, M.; SNOW, R. Influence of sprint training on human skeletal muscle purine nucleotide metabolism. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 4, p. 1802-1809, 1994. ISSN 8750-7587.
- STEENBERGEN, R.; NANOWSKI, T. S.; BEIGNEUX, A.; KULINSKI, A. *et al.* Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. **Journal of Biological Chemistry**, 280, n. 48, p. 40032-40040, 2005.
- STEWART, A.; MARFELL-JONES, M.; OLDS, T. ISAK. **International Standards for Anthropometric Assessment. ISAK Manual. New Zealand: Lower Hutt**, 2011.
- STØLEN, T.; CHAMARI, K.; CASTAGNA, C.; WISLØFF, U. Physiology of soccer. **Sports Medicine**, v. 35, n. 6, p. 501-536, 2005. ISSN 0112-1642.
- SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; SOGA, T.; TOMITA, M. Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 96-108, 2012. ISSN 1574-8936.
- SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Canadian journal of applied physiology**, 28, n. 2, p. 299-323, 2003.
- TAYLOR, J.; KING, R. D.; ALTMANN, T.; FIEHN, O. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning. **Bioinformatics**, v. 18, n. suppl_2, p. S241-S248, 2002. ISSN 1460-2059.
- TEGTBUR, U.; BUSSE, M. W.; BRAUMANN, K. M. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Medicine Science in Sports Exercise** v. 25, n. 5, p. 620-627, 1993. ISSN 0195-9131.
- TESCH, P. A.; LUNDBERG, T. R.; FERNANDEZ-GONZALO, R. Unilateral lower limb suspension: From subject selection to “omic” responses. **Journal of Applied Physiology**, 120, n. 10, p. 1207-1214, 2016.
- THOMAS, S.; READING, J.; SHEPHARD, R. J. Revision of the physical activity readiness questionnaire (PAR-Q). **Canadian journal of sport sciences**, 1992.
- THONGBOONKERD, V.; MALASIT, P. Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1033-1042, 2005. ISSN 1615-9853.
- TIMMONS, J. A.; KNUDSEN, S.; RANKINEN, T.; KOCH, L. G. *et al.* Using molecular classification to predict gains in maximal aerobic capacity following endurance exercise training in humans. **Journal of applied physiology**, 108, n. 6, p. 1487-1496, 2010.
- TOMLIN, D. L.; WENGER, H. A. The relationship between aerobic fitness and recovery from high intensity intermittent exercise. **Sports Medicine**, 31, n. 1, p. 1-11, 2001.
- TØNNESSEN, E.; HEM, E.; LEIRSTEIN, S.; HAUGEN, T.; SEILER, S. Maximal aerobic power characteristics of male professional soccer players, 1989–2012. **International journal of sports physiology performance** v. 8, n. 3, p. 323-329, 2013. ISSN 1555-0273.
- TOUCHSTONE, J. C. History of chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 16, n. 8, p. 1647-1665, 1993.
- TRICK, M.; LONG, Y.; MENG, J.; BANCROFT, I. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the polyploid Brassica napus using Solexa transcriptome sequencing. **Plant biotechnology journal**, v. 7, n. 4, p. 334-346, 2009. ISSN 1467-7644.
- TUMILTY, D. Physiological characteristics of elite soccer players. **Sports medicine**, 16, n. 2, p. 80-96, 1993.

- UBAIDA-MOHIEN, C.; GONZALEZ-FREIRE, M.; LYASHKOV, A.; MOADDEL, R.; CHIA, C. W.; SIMONSICK, E. M.; SEN R.; FERRUCCI, L. Physical activity associated proteomics of skeletal muscle: being physically active in daily life may protect skeletal muscle from aging. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 312, 2019.
- URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Diagnosis of overtraining. **Sports medicine**, v. 32, n. 2, p. 95-102, 2002.
- VAEYENS, R.; MALINA, R. M.; JANSSENS, M.; VAN RENTERGHEM, B. *et al.* A multidisciplinary selection model for youth soccer: the Ghent Youth Soccer Project. **British journal of sports medicine**, 40, n. 11, p. 928-934, 2006.
- VALIENTE-PALLEJÀ, A.; TORRELL, H.; ALONSO, Y.; VILELLA, E. *et al.* Increased blood lactate levels during exercise and mitochondrial DNA alterations converge on mitochondrial dysfunction in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, 2020.
- VAN MEER, G. Cellular lipidomics. **The EMBO journal**, 24, n. 18, p. 3159-3165, 2005.
- VANCE, J. E.; TASSEVA, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Biology of Lipids**, 1831, n. 3, p. 543-554, 2013.
- VARLEY, M. C.; GABBETT, T.; AUGHEY, R. J. Activity profiles of professional soccer, rugby league and Australian football match play. **Journal of sports sciences**, v. 32, n. 20, p. 1858-1866, 2014. ISSN 0264-0414.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.
- VIANT, M. R.; SOMMER, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review. **Metabolomics**, 9, n. 1, p. 144-158, 2013.
- VIHINEN, M. Bioinformatics in proteomics. **Biomolecular Engineering**, 18, n. 5, p. 241-248, 2001.
- WAKAYOSHI, K.; IKUTA, K.; YOSHIDA, T.; UDO, M.; MORITANI, T.; MUTOH, Y.; MIYASHITA, M. Determination and validity of critical velocity as an index of swimming performance in the competitive swimmer. **European journal of applied physiology occupational physiology** v. 64, n. 2, p. 153-157, 1992. ISSN 0301-5548.
- WALLACE, E. D.; TODD, D. A.; HARNLY, J. M.; CECH, N. B.; KELLOGG, J. J. Identification of adulteration in botanical samples with untargeted metabolomics. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, p. 1-14, 2020. ISSN 1618-2642.
- WANG, F.; HAN, J.; HE, Q.; GENG, Z. *et al.* Applying ¹H NMR spectroscopy to detect changes in the urinary metabolite levels of Chinese half-pipe snowboarders after different exercises. **Journal of analytical methods in chemistry**, 2015, 2015.
- WANG, G.; KARANIKOLOU, A.; VERDOUKA, I.; FRIEDMANN, T. *et al.* Next generation “omics” approaches in the “fight” against blood doping. *In: Acute Topics in Anti-Doping*: Karger Publishers, 2017. v. 62, p. 119-128.
- WANG, J.; WANG, C.; LIU, H.; QI, H. *et al.* Metabolomics assisted metabolic network modeling and network wide analysis of metabolites in microbiology. **Critical Reviews in Biotechnology**, 38, n. 7, p. 1106-1120, 2018.
- WANG, L.; FENG, Z.; WANG, X.; WANG, X. *et al.* DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. **Bioinformatics**, 26, n. 1, p. 136-138, 2010.
- WANG, X.; SUN, H.; ZHANG, A.; WANG, P. *et al.* Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies. **Journal of separation science**, 34, n. 24, p. 3451-3459, 2011.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009. ISSN 1471-0064.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 1090-1094, 1995. ISSN 0173-0835.

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **The American journal of cardiology**, v. 14, n. 6, p. 844-852, 1964. ISSN 0002-9149.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. J. N. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953. ISSN 1476-4687.

WEBBORN, N.; DIJKSTRA, H. P. Twenty-first century genomics for sports medicine: what does it all mean? : BMJ Publishing Group Ltd and British Association of Sport and Exercise Medicine 2015.

WEI, W.; SHIN, Y. S.; MA, C.; WANG, J.; ELITAS, M.; FAN, R.; HEATH, J. R. Microchip platforms for multiplex single-cell functional proteomics with applications to immunology and cancer research. **Genome medicine**, v. 5, n. 8, p. 75, 2013. ISSN 1756-994X.

WELTI, R.; SHAH, J.; LI, W.; LI, M.; CHEN, J.; BURKE, J.; FAUCONNIER, M.-L.; CHAPMAN, K.; CHYE, M.; WANG, X. Plant lipidomics: discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry. **J Frontiers in bioscience: a journal**, v. 12, 2007. ISSN 1093-9946.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. **Proteome research: new frontiers in functional genomics**. Springer Science & Business Media, 2013. 366203493X.

WISHART, D. S. Applications of metabolomics in drug discovery and development. **Drugs in R & D**, 9, n. 5, p. 307-322, 2008.

WISHART, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. **Nature reviews Drug discovery**, v. 15, n. 7, p. 473, 2016. ISSN 1474-1784.

WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in food science technology**, 19, n. 9, p. 482-493, 2008.

WISLOEFF, U.; HELGERUD, J.; HOFF, J. Strength and endurance of elite soccer players. **Medicine science in sports exercise**, 30, n. 3, p. 462-467, 1998.

WORST, T. S.; VON HARDENBERG, J.; GROSS, J. C.; ERBEN, P. *et al.* Database-augmented mass spectrometry analysis of exosomes identifies claudin 3 as a putative prostate cancer biomarker. **Molecular Cellular Proteomics** 16, n. 6, p. 998-1008, 2017.

WRAGG, C.; MAXWELL, N.; DOUST, J. Evaluation of the reliability and validity of a soccer-specific field test of repeated sprint ability. **European journal of applied physiology**, v. 83, n. 1, p. 77-83, 2000. ISSN 1439-6319.

XIA, J.; SINELNIKOV, I. V.; HAN, B.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W251-W257, 2015.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current protocols in bioinformatics**, v. 55, n. 1, p. 14.10. 1-14.10. 91, 2016.

XIN, Y.; KIM, J.; OKAMOTO, H.; NI, M.; WEI, Y.; ADLER, C.; MURPHY, A. J.; YANCOPOULOS, G. D.; LIN, C.; GROMADA, J. RNA sequencing of single human

islet cells reveals type 2 diabetes genes. **Cell metabolism**, v. 24, n. 4, p. 608-615, 2016. ISSN 1550-4131.

YAN, S.-K.; LIU, R.-H.; JIN, H.-Z.; LIU, X.-R.; YE, J.; SHAN, L.; ZHANG, W.-D. 'Omics' in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. **Chinese journal of natural medicines**, v. 13, n. 1, p. 3-21, 2015.

YANG, N.; MACARTHUR, D. G.; GULBIN, J. P.; HAHN, A. G.; BEGGS, A. H.; EASTEAL, S.; NORTH, K. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. **The American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 3, p. 627-631, 2003. ISSN 0002-9297.

YASUDA, M.; TANAKA, Y.; RYU, M.; TSUDA, S.; NAKAZAWA, T. RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e93258, 2014. ISSN 1932-6203.

YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.-S.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, v. 296, n. 5565, p. 79-92, 2002. ISSN 0036-8075.

ZAFEIRIDIS, A.; CHATZIOANNOU, A. C.; SARIVASILIOU, H.; KYPAROS, A.; NIKOLAIDIS, M. G.; VRABAS, I. S.; PECHLIVANIS, A.; ZOUMPOULAKIS, P.; BASKAKIS, C.; DIPLA, K. Global metabolic stress of isoeffort continuous and high intensity interval aerobic exercise: a comparative ¹H NMR metabolomic study. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 12, p. 4452-4463, 2016. ISSN 1535-3893.

ZAGATTO, A. M.; BECK, W. R.; GOBETTO, C. A. Validity of the running anaerobic sprint test for assessing anaerobic power and predicting short-distance performances. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 23, n. 6, p. 1820-1827, 2009.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y. *et al.* Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. **Journal of proteomics**, 75, n. 4, p. 1079-1088, 2012.

ZHANG, A.; SUN, H.; XU, H.; QIU, S.; WANG, X. Cell metabolomics. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 17, n. 10, p. 495-501, 2013.

ZHAO, J.; WANG, Y.; ZHAO, D.; ZHANG, L.; CHEN, P.; XU, X. Integration of metabolomics and proteomics to reveal the metabolic characteristics of high-intensity interval training. **Analyst**, v. 145, n. 20, p. 6500-6510, 2020.

ZHOU, B.; XIAO, J. F.; TULI, L.; RESSOM, H. W. LC-MS-based metabolomics. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 2, p. 470-481, 2012.

ZHOU, C.; LORENZO, A.; GÓMEZ, M.-Á.; PALAO, J. M. Players' match demands according to age and playing position in professional male soccer players. **International Journal of Performance Analysis in Sport**, v. 20, n. 3, p. 389-405, 2020. ISSN 2474-8668.

ZHU, L.; JIA, R.; ZHANG, J.; LI, X.; QIN, C.; ZHAO, Q. Quantitative Proteomics Analysis Revealed the Potential Role of lncRNA Ftx in Promoting Gastric Cancer Progression. **PROTEOMICS—Clinical Applications**, v. 14, n. 1, p. 1900053, 2020. ISSN 1862-8346.

ZHU, Z.; JIANG, T.; XIONG, X.; ZOU, W. A microwave plasma torch quadrupole mass spectrometer for monitoring trace levels of lead and cadmium in water. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 30, p. 44-50, 2016.

ZOU, X.; ZHANG, P.; XU, Y.; LU, L.; ZOU, H. J. Quantitative Proteomics and Weighted Correlation Network Analysis of Tear Samples in Type 2 Diabetes Patients Complicated with Dry Eye. **PROTEOMICS—Clinical Applications**, p. 1900083, 2020. ISSN 1862-8346.

ANEXOS

ANEXO 1.

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL DO PROJETO DE PESQUISA

Número do CAAE: 15540619.6.0000.5404

Número do Parecer: 4.050.125



**UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS**



Ativar Winc
Acesse Configurar

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ANÁLISES METABOLÔMICA E PROTEÔMICA EM JOGADORES DE FUTEBOL: RELAÇÕES COM AS CAPACIDADES AERÓBIA E ANAERÓBIA

Pesquisador: JOAO PEDRO DA CRUZ

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 15540619.6.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.050.125

Apresentação do Projeto:

Solicitação de emenda ao projeto anterior. Segundo o documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1461328_E1.pdf 12/12/2019: Justificativa da Emenda: Ilm.ª Sr.ª Prof.ª Dr.ª Renata Maria dos Santos Celeghini DD Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP Prezada Coordenadora, Após a aprovação ética (parecer de número 3.522.987) emitido por este Comitê de Ética em Pesquisa, viemos por meio desta solicitar algumas alterações dentro do projeto de pesquisa com seres humanos intitulado "ANÁLISES METABOLÔMICA E PROTEÔMICA EM JOGADORES DE FUTEBOL: RELAÇÕES COM AS CAPACIDADES AERÓBIA E ANAERÓBIA", sob número de CAAE: 15540619.6.0000.5404. Esperamos que esta carta possa vir a facilitar a conferência das alterações realizadas dentro do projeto de pesquisa. As modificações estão relacionadas ao método de extração de sangue dos participantes da pesquisa. Anteriormente optamos apenas pela retirada de sangue pelo lóbulo da orelha, porém após nos aprofundarmos nas técnicas de preparação e análises das amostras para determinação das proteínas (proteômica), observamos que durante o processo de preparação o volume do plasma é reduzido sendo insuficiente para a análise. Sendo assim, se torna essencial coletar maior volume de sangue de cada participante da pesquisa. Para resolução dessa problemática, viemos por meio desta solicitar a adição do método de extração sanguíneo intravenoso a vácuo. Todas as modificações necessárias foram realizadas na plataforma e nos arquivos "Projeto_joao_pedro.pdf", "TALE.pdf", "TCLE_responsáveis.pdf", "TCLE.pdf" grifadas em amarelo. O cronograma e o

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Figura A1. Comprovante de aprovação Plataforma Brasil do projeto de pesquisa.



CEPUNICAMP
CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA

**UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS**



**Plataforma
Brasil**

Ativar o Winc
Acesse Configurar

Continuação do Parecer: 4.050.125

orçamento também foram adequados para a nova proposta. Sem mais para o momento, reiteramos votos de consideração e respeito. Limeira, 12/12/2019 Data

Objetivo da Pesquisa:
Inalterado .

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos:
Os possíveis riscos dos testes são aqueles inerentes a qualquer coleta sanguínea e a prática de exercício físico extenuante. Apesar de raro, há possibilidade de alterações orgânicas durante a realização de qualquer tipo de teste de esforço, incluindo-se nessas respostas atípicas de pressão arterial, arritmias, desmaios, tonturas e em raríssimas e extremas situações, morte súbita pós-esforço. Os riscos relacionadas as coletas de sangue intravenosa podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Segundo a justificativa da emenda a única alteração será no método de coleta do material biológico, proposto ser no lóbulo da orelha inicialmente e agora alterado para punção venosa, pra maior volume. Apresenta documentos pertinentes com destaque nas alterações .
No projeto completo apresenta em destaque: * Análise proteômica e Análise metabolômica: Todas as etapas pré-analíticas acontecerão em condição de campo. Para tanto, contaremos com equipamentos e materiais adequados bem como com uma equipe de enfermeiros e pesquisadores experientes em coleta de sangue, centrifugação, alíquotagem e armazenamento das amostras de sangue. Todas as coletas de sangue serão realizadas por enfermeiros utilizando luvas descartáveis durante a coleta e ao manusear as amostras. Isso inclui durante a remoção da tampa de borracha dos tubos de sangue, centrifugação, pipetagem, descarte de tubos contaminados e limpeza de derramamentos. Os Tubos, agulhas e pipetas serão descartados adequadamente em recipientes de risco biológico, de acordo com os requisitos institucionais. Durante a determinação do baseline serão obtidos 5 mL de sangue intravenoso em tubo com heparina. Inicialmente as amostras de 5 mL de sangue serão centrifugadas a 3000 × g durante 10 min e o plasma será removido e armazenado em 4 alíquotas de 100l em tubos criogênicos de 1,2 mL, com armazenamento inicial em nitrogênio líquido e subsequente em biorrepositório a 80 ° C. * Desenho experimental: destaque a aplicação de 4 questionários coleta de material biológico. * Armazenamento, análise e descarte do material biológico: Em campo, serão coletadas amostras de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Figura A2. Comprovante de aprovação Plataforma Brasil do projeto de pesquisa.

Ativar o Wind
 Acesse Configuraç



CEPUNICAMP
comitê de ética em pesquisa

**UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 4.050.125

sangue intravenosa e do lóbulo da orelha. Para as amostras de sangue intravenosa serão utilizados tubos, adaptadores e agulhas descartáveis e lacrados. Já para as coletas sanguíneas do lóbulo da orelha serão usadas lancetas estéreis descartáveis e tubos capilares serão utilizados para todas as coletas de sangue. Para ambas as coletas as amostras serão centrifugadas a 3000 × g durante 10 min e o plasma será removido e armazenado em criogênicos de 1,2 mL, com armazenamento inicial em nitrogênio líquido e subsequente em biorrepositório a 80° C (ANEXO 7.) antes de preparação de amostras adicionais ou análises. A * PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO.

Cronograma: Período da realização das coletas de dados em campo e capturas de imagens 01/07/2020 01/06/2021.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Carta_CEP.pdf 12/05/2020 : responde as pendências.
- Cronograma.pdf 12/05/2020 : início em 2020 e término em 2022.
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1461328_E1.pdf 12/05/2020: Período da realização das coletas de dados em campo e capturas de imagens 01/07/2020 01/06/2021. Não apresenta riscos da coleta de sangue no lóbulo da orelha.
- projeto_joao_pedro.pdf 12/05/2020 : com destaque nas alterações. Riscos.
- TCLEs: com destaque nas alterações. Basicamente em riscos e inclusão da coleta de sangue.
- * TCLE.pdf 12/05/2020 :
- * TCLE_responsaveis.pdf 12/05/2020
- * TALE.pdf 12/05/2020 .

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração ao parecer anterior:

- refere encaminhar relatório parcial do estudo.
- declara que há o documento para cessão de imagem. Já aprovado na versão original.
- adequa riscos das punções de material biológico no projeto completo , mas não na PB.
- nada refere sobre a adequação do benefício.
- adequa alguns detalhes da linguagem do TCLE e TALE mas não apresenta destaque.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Figura A3. Comprovante de aprovação Plataforma Brasil do projeto de pesquisa.



Continuação do Parecer: 4.050.125

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.
- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais semestrais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".
- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_146132_8_E1.pdf	12/05/2020 10:47:29		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		
Bairro: Barão Geraldo		CEP: 13.083-887
UF: SP	Município: CAMPINAS	
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Página 04 de 05

Figura A4. Comprovante de aprovação Plataforma Brasil do projeto de pesquisa.



CEPUNICAMP
comitê de ética em pesquisa

**UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS**



**Plataforma
Brasil**

Ativar o Winc
Acesse Configuraç

Continuação do Parecer: 4.050.125

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	12/05/2020 10:46:39	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsaveis.pdf	12/05/2020 10:46:28	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/05/2020 10:46:15	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_joao_pedro.pdf	12/05/2020 10:46:00	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	12/05/2020 10:45:38	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	12/05/2020 10:44:41	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3971124_E1.pdf	12/05/2020 10:43:48	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Outros	Carta_Ementa.pdf	12/12/2019 14:13:12	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	12/12/2019 14:09:35	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Outros	Uso_de_imagem.pdf	15/08/2019 11:17:34	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Outros	biorepositorio.pdf	15/08/2019 11:16:37	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_aos_clubes.pdf	02/08/2019 10:26:46	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	12/06/2019 00:15:03	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Outros	Autorizacao_Coleta_de_Dados.pdf	10/06/2019 10:54:38	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisadores.pdf	10/06/2019 10:41:35	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinfraestrutura.pdf	10/06/2019 10:41:10	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito
Folha de Rosto	Plataforma_Brasil.pdf	10/06/2019 10:38:08	JOAO PEDRO DA CRUZ	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Figura A5. Comprovante de aprovação Plataforma Brasil do projeto de pesquisa.


CEPUNICAMP
 curso@ce.unicamp.br

UNICAMP - CAMPUS
 CAMPINAS


**Plataforma
Brasil**

Ativar o Win
 Acesse Configura

Continuação do Parecer: 4.050.125

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

CAMPINAS, 26 de Maio de 2020

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Figura A6. Comprovante de aprovação Plataforma Brasil do projeto de pesquisa.

ANEXO 2.

Anexo 2. Dieta oferecida para jogadores de futebol durante o período em que o delineamento experimental foi realizado.

Café da manhã					
Dias da semana	Pão	Frios	Doces	Bebidas	*
Segunda-feira	Pão Francês	Presunto, Mussarela e Margarina	Bolo Chocolate	Leite/ Café/ Achocolatado	*
Terça-feira	Pão Francês	Presunto, Mussarela e Margarina	Rosquinha	Leite/ Café/ Achocolatado	*
Quarta-feira	Pão Francês	Presunto, Mussarela e Margarina	Pão de Leite em Pó	Leite/ Café/ Achocolatado	*
Quinta-feira	Pão Francês	Presunto, Mussarela e Margarina	Rosca Doce	Leite/ Café/ Achocolatado	*
Sexta-feira	Pão Francês	Presunto, Mussarela e Margarina	Bolo Coco	Leite/ Café/ Achocolatado	*
Sábado	Pão Francês	Presunto, Mussarela e Margarina	Lua de Mel	Leite/ Café/ Achocolatado	*
Domingo	Pão Francês	Presunto, Mussarela e Margarina	Bolacha de Nata	Leite/ Café/ Achocolatado	*
Almoço					
Dias da semana	Saladas	Prato Principal	Guarnição	Sobremesa	Suco
Segunda-feira	Alface/ Pepino	Bife com Mussarela e Molho/ Iscas Suína com Cebola	Sufle de Chuchu	Gelatina Cremosa	Tangerina
Terça-feira	Mix/ Cenoura Cozida	Isclas de Frango Chapeada/ Coxão Duro Peça ao Molho Roty	Berinjela Frita	Arroz Doce	Laranja
Quarta-feira	Chuchu c/ Ovo/ Alface	Bife Role/ Filé de Frango Grelhado	Repolho Refogado	Pudim	Caju
Quinta-feira	Vinagrete/ Alface	Bife Pizzaiolo/ Coxinha da Asa Assada	Batata na Manteiga	Gelatina de Laranja	Limão
Sexta-feira	Lasanha de Alface	File de Frango Empanado/ Cubos de Carne com Batata	Crema de Milho	Crema Belga	Morango
Sábado	Alface c/ Tomate	Lagarto/ Cubos de Frango c/ Tomate	Espaguete Alho e Óleo	Pudim Leite Condensado	Maracujá
Domingo	Almeirão/ Beterraba Cozida	Croquete/ Filé de Frango ao Molho Sugo	Pure de Batata Doce	Bolo	Uva
Jantar					
Dias da semana	Saladas	Prato Principal	Guarnição	Sobremesa	Suco
Segunda-feira	Alface/ Beterraba e Cenoura Coz	Escondidinho de Cane Moida/ Filé de Frango Grelhado	Farofa Colorida	Gelatina 2 Cores	Uva
Terça-feira	Pepino e Tomate/ Alface	Peixe Assado com Batata/ Isclas de Carne com Cebola	Abobrinha e Cenoura	Sagu	Caju
Quarta-feira	Mix/ Cenoura Cozida	Cubos de Carne com Cebola e Tomate/ Isclas de Frango Cebola	Batata Gratinada	Gelatina 2 Cores	Abacaxi
Quinta-feira	Alface/Batata Doce	Cubos Suino/ Cupim Fatiado com Vinagrete	Couve Refogada	Sagu	Laranja
Sexta-feira	Batata, Vagem e Cenoura	Carne Louca c/ Tomate e Cebola/ Sobrecoxa Assada	Pure de Batata	Gelatina Cremosa	Uva
Sábado	Alface/ Beterraba Cozida	Isclas de Carne c/ Tomate e Cebola / Omelete	Abobrinha Refogada	Doce de Banana	Pessegueiro
Domingo	Mix/ Chuchu	Bolinho de Carne Moida Vulcão/ Bisteca	Parafuso ao Sugo	Canjica	Guaraná

ANEXO 3.

Identificação dos *features* fragmentados por LC-MS/MS

Inicialmente nós pretendíamos realizar a identificação nível 1 para os metabólitos mais discriminantes entre os grupos em questão. Para exemplificar o nível de identificação pretendida, nós selecionamos um íon aleatório com grande abundância relativa e que foi fragmentado pelo Orbitrap no modo ESI (+) em nossos experimentos. O íon selecionado apresentou razão massa carga (m/z) igual a 400.3416 e tempo de retenção (RT) de 1.54 minutos (**Figura A**).

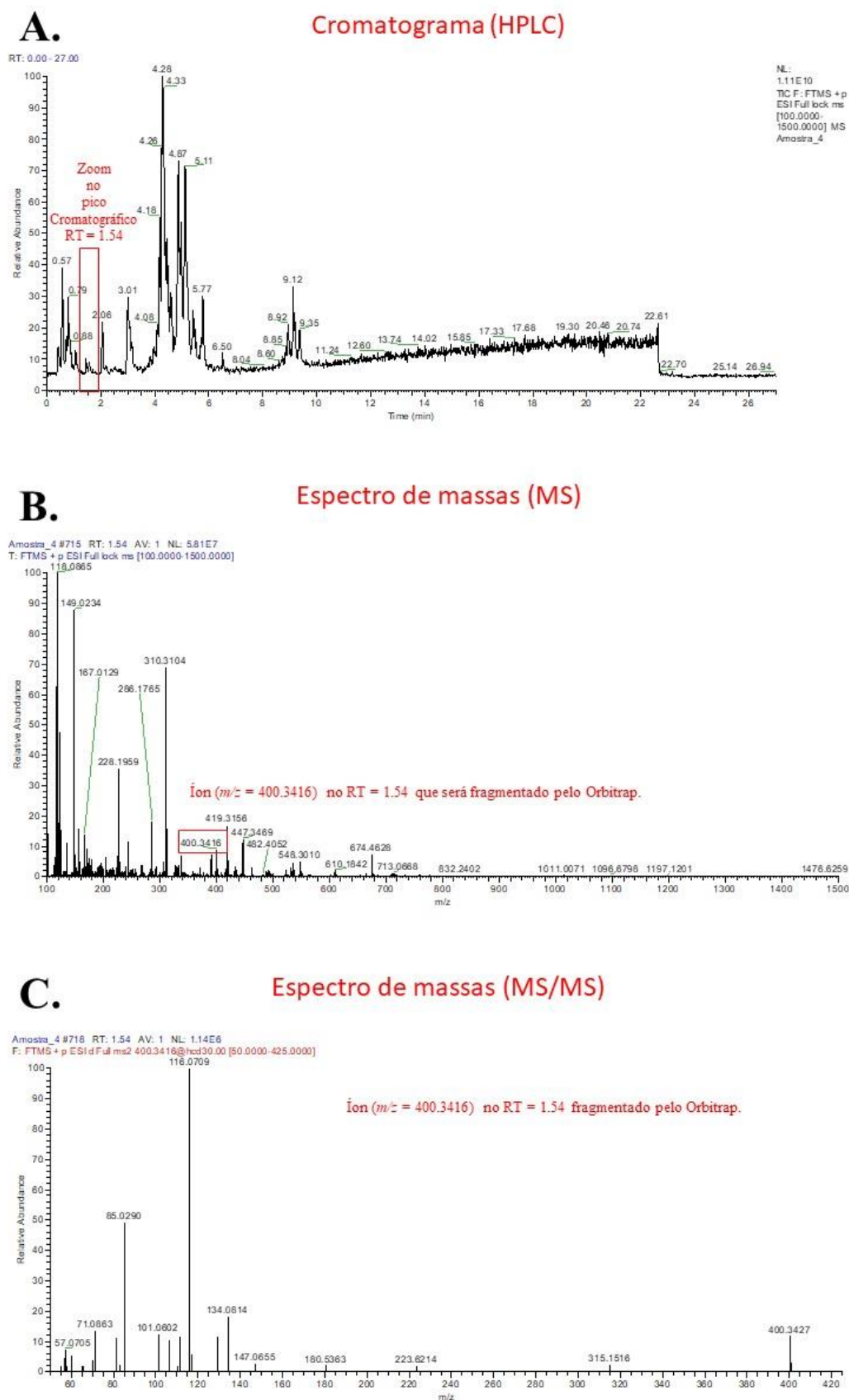


Figura A. Cromatograma (A), espectro de massas (B) de íons e espectro de massas (C) da fragmentação do íon com massa carga (m/z) igual a 400.3416 e tempo de retenção (RT) de 1.54 minutos extraído da amostra 4 pela técnica de LC-MS/MS no modo ESI (+).

Logo após, o íon fragmentado foi convertido para o formato txt (**Figura B**) e as colunas *m/z* e *relative* foram utilizadas para pesquisa do metabólito nas bases de dados.

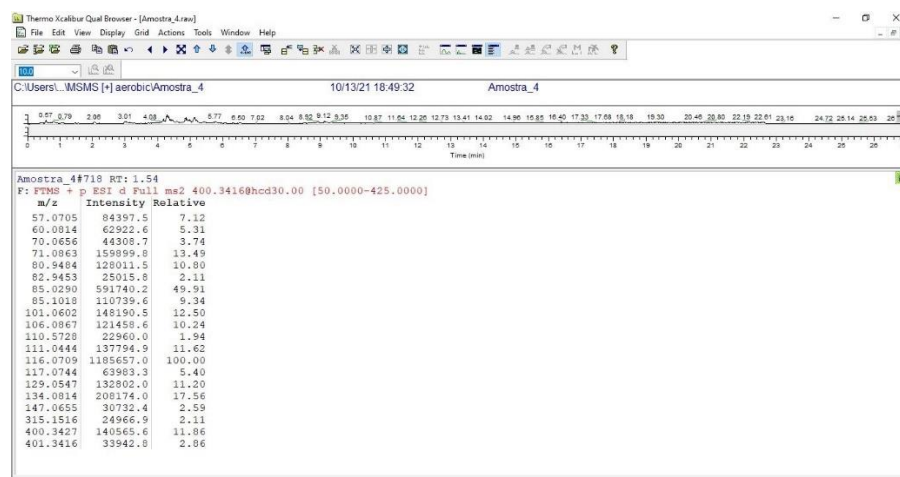


Figura B. Espectro de massas fragmentado em txt do íon com massa carga (*m/z*) igual a 400.3416 e tempo de retenção (RT) de 1.54 minutos extraído da amostra 4 pela técnica de LC-MS/MS no modo ESI (+).

Objetivando a identificação do íon 400.3416, o software CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>) (GIL-DE-LA-FUENTE et al., 2018) foi utilizado para realizar pesquisa nos bancos de dados de espectros Metlin, HMDB, Keeg, LipidMaps e MINE. Os parâmetros de entrada para a pesquisa nos bancos de dados foram a massa do íon precursor (*m/z*): 400.3416, lista de picos de MS/MS: (**Figura B**), tolerância do íon precursor (ppm): 10, tolerância *m/z* (ppm): 10, modo de ionização: positivo, voltagem da fonte: todos, e tipo de espectro: experimental. Como resultado da busca, a **Figura C** mostra a comparação do espectro de massas experimental fragmentado (*m/z* = 400.3416) com um já existente no HMDB. Com essa comparação, chegamos à conclusão que o íon 400.3416 e RT de 1.54 minutos tem o espectro de massas semelhante ao metabólito Nevskin (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0030162>). Esse metabólito pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como cumarinas e derivados. Esses são compostos aromáticos policíclicos contendo uma porção 1-benzopirano com um grupo cetona no átomo de carbono C2 (1-benzopirano-2-ona). Nevskin foi detectado em vegetais verdes e ervas e especiarias. Isso poderia tornar o Nevskin um potencial biomarcador para o consumo desses alimentos.

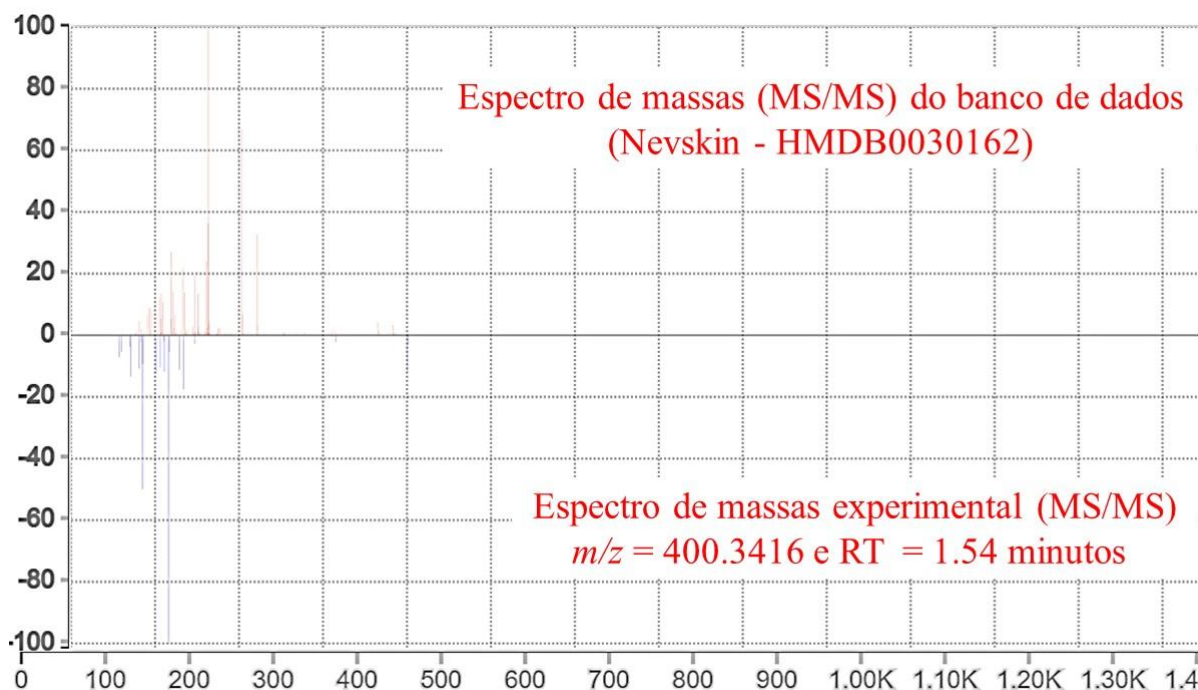


Figura C. Resultado da busca nos bancos de dados utilizando o software CEU Mass Mediator 3.0.

Por questões metodológicas, logísticas e financeiras não conseguimos seguir o método de identificação nível 1 para os metabólitos mais discriminantes entre os grupos em questão no presente projeto. No experimento de fragmentação das amostras, o método definido no espectrômetro de massas foi o Top 5. Ou seja, o Orbitrap fragmentou apenas os 5 íons mais abundantes presentes nos espectros para cada segundo do cromatograma. No momento da realização da análise estatística dos artigos, os íons destacados pelos modelos matemáticos não foram os top 5 metabólitos fragmentados por nossos experimentos de MS/MS. Geralmente os metabólitos que são diferenciados pelos modelos matemáticos apresentam baixa abundância relativa nas amostras. Nós detectamos esse problema somente após as análises. Para sanar essa limitação analítica, novos experimentos de fragmentação direcionada aos íons diferenciados pela análise estatística deveriam ser realizados, mas por questões de tempo e logística não conseguimos realizá-los.

ANEXO 4.



biology

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

Certificate of acceptance for the manuscript (**biology-1792531**) titled:
A Metabolomics Approach And Classical Physical Assessments To Compare U22 Soccer
Players According To Their Competitive Level

Authored by:

João Pedro Da Cruz; Fábio Neves Dos Santos; Felipe Marroni Rasteiro; Anita Brum
Marostegan; Fúlvia Barros Manchado-Gobatto; Claudio Alexandre Gobatto

has been accepted in *Biology* (ISSN 2079-7737) on 18 July 2022



Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, July 2022