



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

HUGO FALQUETO SOARES

**CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS VIAS METABÓLICAS ASSOCIADAS AO
MODELO DE JEJUM INTERMITENTE REALIZADO POR MULHERES COM
SOBREPESO E OBESIDADE: UMA ANÁLISE METABOLÔMICA “UNTARGET”**

CHAPECÓ/SC

2023

HUGO FALQUETO SOARES

**CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS VIAS METABÓLICAS ASSOCIADAS AO
MODELO DE JEJUM INTERMITENTE REALIZADO POR MULHERES COM
SOBREPESO E OBESIDADE: UMA ANÁLISE METABOLÔMICA “UNTARGET”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Henrique Manfredi.

CHAPECÓ/SC

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Soares, Hugo Falqueto

CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS VIAS METABÓLICAS
ASSOCIADAS AO MODELO DE JEJUM INTERMITENTE REALIZADO POR
MULHERES COM SOBREPESO E OBESIDADE: UMA ANÁLISE
METABOLÔMICA ?UNTARGET? / Hugo Falqueto Soares. -- 2023.
67 f.:il.

Orientador: Doutor Leandro Henrique Manfredi

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.

1. Metabolôma. 2. Jejum Intermitente. 3. Obesidade.
4. Síndrome Metabólica. I. , Leandro Henrique Manfredi,
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.
Título.

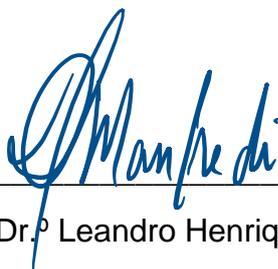
HUGO FALQUETO SOARES

**CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS VIAS METABÓLICAS ASSOCIADAS AO
MODELO DE JEJUM INTERMITENTE REALIZADO POR MULHERES COM
SOBREPESO E OBESIDADE: UMA ANÁLISE METABOLÔMICA “UNTARGET”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, apresentado em banca examinadora em 05 de Abril de 2023.

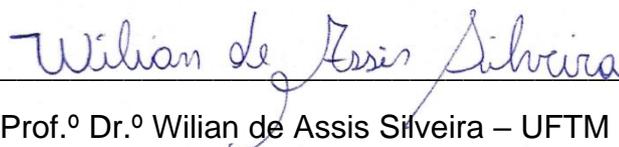
Aprovada em 05/04/2023

BANCA EXAMINADORA



Prof.º Dr.º Leandro Henrique Manfredi - UFFS

(Orientador)



Prof.º Dr.º Willian de Assis Silveira – UFTM

(Avaliador - Membro externo)



Prof.ª Dr.ª Daniela Zanini – UFFS

(Avaliador - Membro interno)

Chapecó, abril de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me apoiaram durante essa etapa, em especial minha companheira Luciana pela motivação, conversas e paciência. Agradeço a todos os docentes que foram solícitos em compartilhar seus conhecimentos comigo, em especial, meu orientador professor Leandro pelas conversas, comprometimento e inteligência ímpar.

À FAPESC pelo fomento da bolsa durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A síndrome metabólica (MetS) é um conjunto de anormalidades cardiometabólicas que ocorrem mais comumente em indivíduos com excesso de peso e/ou obesidade, apresenta uma alta prevalência e tem sido associada a uma série de consequências adversas à saúde, como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Atualmente a MetS pode ser avaliada por meio de uma escala numérica contínua de severidade o Z-MetS. A alimentação com restrição de tempo (TRF), popularmente conhecido por jejum intermitente, é uma abordagem dietética usada para perda de peso e melhora dos biomarcadores metabólicos de saúde. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito do TRF na Z-MetS em mulheres de meia-idade com sobrepeso e obesidade. Além disso, aplicar uma análise metabolômica não direcionada, visando a comparação entre o perfil metabolômico nos diferentes grupos de amostras pré e pós-intervenção de TRF. Um ensaio clínico controlado não randomizado foi realizado durante 3 meses (grupo TRF, n = 7, IMC 33.9 ± 1.8 vs. Controle n = 7, IMC 33.5 ± 1.6). O protocolo de TRF adotado foi de 16 h sem qualquer ingestão energética seguida de 8 h de ingestão alimentar *ad libitum*. Nossos resultados mostram que o TRF foi eficaz na redução de peso, IMC, circunferência da cintura desde a linha de base e em relação ao grupo controle, porém sem alterações significativas no Z-MetS. A análise metabolômica mostrou que a via do ciclo da glicose-alanina; beta oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa; e via da biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano foram significativamente enriquecidos. Essas vias podem explicar alterações no metabolismo que ocorrem sob condições de TRF e perda de peso que não podem ser determinadas pelas alterações em biomarcadores metabólicos clássicos ou pelo Z-MetS e podem impactar significativamente na melhora da saúde metabólica.

Palavras-chave: Obesidade. Síndrome Metabólica. Metaboloma. Dieta. Jejum intermitente

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MetS) is a set of cardiometabolic abnormalities that occur more commonly in overweight and/or obese individuals, has a high prevalence and has been associated with a number of adverse health consequences, such as type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Currently, the MetS can be evaluated using a continuous numerical scale of severity, the Z-MetS. Time-restricted eating (TRF) is a dietary approach used for weight loss and improvement of metabolic health biomarkers. The aim of this study was to determine the effect of TRF on Z-MetS in overweight and obese middle-aged women. In addition, apply a untargeted metabolomic analysis, aiming at comparing the metabolomic profile in the different groups of samples pre and post-TRF intervention. A non-randomized controlled clinical trial was conducted over 3 months (group TRF, $n = 7$, BMI 33.9 ± 1.8 vs. Control $n = 7$, BMI 33.5 ± 1.6). The TRF protocol adopted was 16 h without any energy intake followed by 8 h of food intake *ad libitum*. Our results show that TRF was effective in reducing weight, BMI, waist circumference from baseline and compared to the control group, but without significant changes in Z-MetS. Metabolomic analysis showed that the glucose-alanine cycle pathway; beta oxidation of very long chain fatty acids; and pathway of phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis were significantly enriched. These pathways may explain changes in metabolism that occur under TRF conditions and weight loss that cannot be determined by changes in classical metabolic biomarkers or Z-MetS and can significantly impact the improvement of metabolic health.

Keywords: Obesity. Metabolic syndrome. Metabolome. Nutrition. Time-restricted feeding

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Obesidade representada como fator central da Síndrome Metabólica.....	14
FIGURA 2 – Abordagens de análises metabolômicas.....	18
FIGURA 3 – Fluxograma resumido de trabalho envolvido na análise metabolômica.....	19
FIGURA 4 – Fluxograma do estudo.....	28
FIGURA 5 – Apresentação gráfica dos principais resultados.....	31
FIGURA 6 – Cromatograma.....	32
FIGURA 7 - Gráficos de scores da PCs.....	33
FIGURA 8 - Gráficos de scores da variável latente.....	34
FIGURA 9 - Variáveis importantes na projeção.....	35
FIGURA 10 - Gráficos de scores da variável latente.....	36
FIGURA 11 - Variáveis importantes na projeção.....	37
FIGURA 12 – Rede de associação de topologia entre features.....	43
FIGURA 13 – Vias metabólicas significativamente enriquecidas.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Linha de base para grupo TRF e Controle.....	29
TABELA 2 – Apresentação dos resultados.....	30
TABELA 3 - Features identificados nos quatro grupos.....	38
TABELA 4 - Features identificados nos dois grupos.....	39
TABELA 5 - Features identificados nos quatro grupos.....	40
TABELA 6 - Features identificados nos dois grupos.....	42

LISTA DE ABREVIÇÕES

%GC: percentual de gordura corporal

%MM: porcentual de músculo esquelético corporal

5-HT: serotonina

ACC: Acetil CoA carboxila

Aas: aminoácidos

AGs: ácidos graxos

ALT: alanina transaminase

AST: aspartato aminotransferase

BCAAs: aminoácidos de cadeia ramificada

CC: circunferência da cintura

DCV: doenças cardiovasculares

DM2: diabetes mellitus tipo 2

GGT: gama-glutamil transferase

HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade

HILIC: cromatografia de interação hidrofílica

IDO: indoleamina-2,3-dioxigenase

IMC: índice de massa corporal

IMG: índice de massa gorda

IMM: índice de massa muscular

LDL: colesterol de lipoproteína de baixa densidade

LPL: lipoproteína lipase

KYN: quinurenina

MG: massa de gordura corporal total

MM/IMC: massa muscular relacionada ao IMC

MM: massa muscular esquelética total

MS/MS: espectrometria de massa em tandem

ON: óxido nítrico

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PAS: pressão arterial sistólica

PGC-1 α : coativador 1-alfa do receptor-g ativado por proliferador de peroxissoma

PLS-DA: análise discriminante por mínimos quadrados parciais

PCA: análises de componentes principais

PCR: proteína C reativa

QCs: controles de qualidade

RI: resistência à insulina

T4: tiroxina livre

TRF: *Time-Restricted Feeding*

TRP: triptofano

TSH: hormônio estimulador da tireoide

UDP-GlcNAc: difosfato de uridina N-acetilglicosamina

VIP: variáveis importantes na projeção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 OBESIDADE: FATOR CENTRAL DA METS.....	15
1.2 METABOLOMA.....	16
1.3 DIETA E PERDA DE PESO.....	20
1.4 OBJETIVOS.....	21
1.4.1 Objetivos Gerais.....	21
1.4.2 Objetivos secundários.....	22
2 METODOLOGIA.....	22
2.1 Amostra e critérios de elegibilidade.....	22
2.2 Alimentação com restrição de tempo.....	23
2.3 Desfechos para análise.....	23
2.4 Medidas antropométricas.....	23
2.5 Aferição da pressão arterial.....	24
2.6 Coleta e análise de sangue.....	24
2.7 Padronização das amostras e das condições de corrida.....	24
2.7.1 Preparo das Amostras.....	24
2.7.2 Preparo da Fase Móvel.....	25
2.7.3 Cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada com aquisição de dados de espectrometria de massa em tandem (UPLC–MS/MS).....	25
2.7.4 Processamento e análise dos dados.....	26
2.8 Score da severidade da síndrome metabólica.....	28
2.9 Análise estatística.....	28
3 RESULTADOS.....	28
3.1 Característica da amostra.....	29
3.2 Efeitos do TRF nas análises morfológicas e bioquímicas.....	29
3.4 RESULTADOS DO METABOLOMA.....	31
3.4.1 Otimização das Condições Cromatográfica.....	31
3.4.2 Avaliação da dispersão dos dados auxiliada por estratégias multidimensionais – método fase reversa e HILIC.....	32
3.4.3 Avaliação de potenciais biomarcadores frente ao conjunto de dados completo – método HILIC.....	37

3.4.4 Avaliação de potenciais biomarcadores frente ao conjunto de dados completo – método Fase Reversa.....	40
3.4.5 Rede de associação de topologia dos metabólitos/features.....	42
3.4.6 Enriquecimento de Vias.....	43
4. DISCUSSÃO.....	44
4.1 Via da β-Oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa.....	46
4.2 Ciclo da Glicose-Alanina.....	47
4.3 Via da biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano.....	49
4.4 Relevância clínica.....	51
4.5 Limitações.....	51
5 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO.....	61

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (MetS) é uma desordem complexa com alto custo socioeconômico, considerada uma epidemia mundial, com prevalência populacional estimada de 31-34% (AGUILAR et al., 2015; ENGIN, 2017). A MetS pode ser definida por um conjunto de fatores interconectados que aumentam diretamente o risco para doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e mortalidade por todas as causas. Seus principais componentes são dislipidemia (triglicerídeos e colesterol total elevados e lipoproteínas de alta densidade (HDL) reduzidas); elevação da pressão arterial (PA); metabolismo da glicose desregulado; e aumento da adiposidade corporal, principalmente adiposidade abdominal, sendo este último o fator mais frequentemente observado da síndrome metabólica (GRUNDY et al., 2004; KASSI et al., 2011).

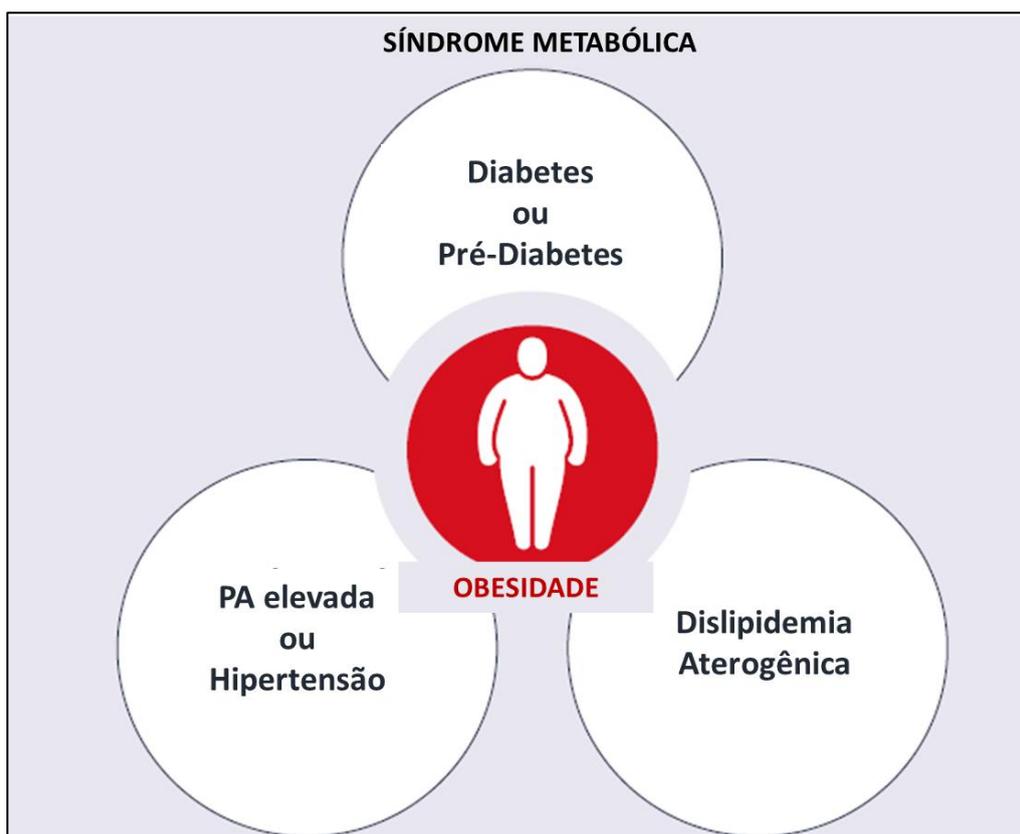
Historicamente a MetS foi classificada como algo dicotômico, por meio de uma análise descritivas das variáveis. Dessa forma, um indivíduo seria classificado como portador ou não da MetS. Recentemente foi questionada essa classificação, pois os fatores que compõem a MetS apresentam associações contínuas com os fatores de risco e desfechos clínicos negativos (GURKA et al., 2018). Nessa linha, o mais recente escore z de gravidade da síndrome metabólica (Z-MetS) combina contribuições ponderadas de todos os fatores da MetS em uma única medida contínua. O Z-MetS é obtido a partir de uma equação que fornece uma medida como variável contínua clinicamente acessível e interpretável do grau de severidade de síndrome metabólica comparada ao z-score populacional e possui potencial na identificação de pessoas com maior risco de doenças crônicas não transmissíveis e no acompanhamento de mudanças nos indivíduos ao longo do tempo e/ou a partir de uma intervenção (DEBOER; GURKA, 2017; GURKA et al., 2018).

O uso clínico de pontuações como essas oferece uma oportunidade potencial de identificar pacientes com maior risco, motivar os pacientes a mudar o estilo de vida e acompanhar o progresso do tratamento ao longo do tempo (DEBOER; GURKA, 2017). O Z-MetS já foi testado em ensaios clínicos com intervenções para o tratamento da obesidade e se mostrou uma ferramenta primorosa para avaliar os efeitos de diferentes intervenções (SANDSDAL et al., 2023).

As atuais diretrizes clínicas de manejo da MetS apontam para a obesidade como o fator central e primordial para o desenvolvimento da MetS (FIGURA 1). No estudo de coorte ATTICA, ao longo de 10 anos, 52% das pessoas com sobrepeso ou obesidade, e sem alterações em biomarcadores clássicos determinantes da MetS, desenvolveram um estado

metabólico não saudável e tiveram uma maior probabilidade de apresentar eventos de doenças cardiovasculares quando comparados aos indivíduos de peso normal saudáveis (*Hazard Ratio* (HR) = 1.43, 95% de confiança Intervalo (IC 95%) 1.02 - 2.01) (KOUVARI et al., 2019). Pelas recomendações, qualquer paciente diagnosticado com MetS deve ser visto como um paciente de alto risco clínico. Uma avaliação abrangente das condições principais e adicionais da síndrome metabólica é aconselhada, bem como a implementação de modificações no estilo de vida em paralelo ao tratamento médico adequado. Intervenção precoce, como a redução do peso corporal por meio de dietas, pode impedir o desenvolvimento e/ou retardar a progressão da MetS, principalmente em pacientes com sobrepeso ou obesidade (DOBROWOLSKI et al., 2022).

FIGURA 1 – Obesidade representada como fator central da Síndrome Metabólica



Fonte: Adaptado de Dobrowolski et al., (2022). PA pressão arterial

1.1 OBESIDADE: FATOR CENTRAL DA METS

A obesidade, o fator primordial e mais prevalente da MetS, é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo corporal e é considerada uma pandemia na atualidade (HEYMSFIELD; WADDEN, 2017; NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC), 2017). Em todo o mundo, a obesidade quase triplicou nas últimas décadas e aproximadamente 40% da população global possui sobrepeso ou obesidade. A alta prevalência pode ser parcialmente atribuída ao aumento do consumo de alimentos hipercalóricos e ao sedentarismo (GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS et al., 2017).

A obesidade é geralmente diagnosticada pelo índice de massa corporal (IMC), que representa uma relação moderada com a adiposidade corporal, permitindo que os profissionais de saúde classifiquem os indivíduos por grau de sobrepeso e/ou obesidade (GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS et al., 2017; HEYMSFIELD; WADDEN, 2017). No entanto, este índice simples e útil não avalia as alterações metabólicas frequentemente associadas à obesidade, que por sua vez estão intimamente relacionadas com a existência de resistência à insulina (RI) nos tecidos periféricos ou outros distúrbios metabólicos que podem ocorrer como consequência do estabelecimento de um processo inflamatório crônico de baixo grau (HOTAMISLIGIL, 2006; TILG; MOSCHEN, 2006; CAÑETE et al., 2007). Fenótipos distintos de distribuição da gordura corporal estão presentes na obesidade. Nesse aspecto, pessoas com maior acúmulo de gordura em região abdominal representam o fenótipo mais maligno de risco à saúde. Isso se deve ao fato da característica distinta do tecido adiposo localizado nessa região corporal. Nesses locais, a hipertrofia dos adipócitos induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio devido à disfunção do retículo endoplasmático e à ativação de cascatas de sinalização inflamatória celular (KOLB, 2022).

Recentemente algumas evidências questionam o papel de alguns biomarcadores classicamente utilizados como preditores de mortalidade e doença cardiovasculares em obesos (ex: colesterol total, glicemia, triglicerídeos), visto que há uma parcela da população obesa sem alterações notórias nesses biomarcadores, considerados, portanto, “obesos metabolicamente saudáveis”. Porém, ainda assim continuam com risco relativo de desfechos negativos elevados em relação ao indivíduo de peso normal (CALEYACHETTY et al., 2017; ZHOU et al., 2021). Portanto, é possível sugerir que alterações metabólicas

não sensíveis a análises popularmente utilizadas no contexto clínico estejam ocorrendo. Além disso, a carga de alterações metabólicas dos indivíduos parece inapropriadamente classificada em variáveis categóricas, uma vez que alterações metabólicas e riscos à saúde apresentam um *continuum* de associação; e diferentes fatores de risco, como colesterol total, circunferência de cintura e/ou glicemia podem apresentar impactos e associações distintas para os risco de desfechos cardiovasculares e mortalidade por todas as causas (DEBOER; GURKA, 2017a; GURKA et al., 2018). Dessa forma, avaliar os efeitos de uma intervenção na severidade da síndrome metabólica por meio de análise de variável contínua pode ter uma relevância que justifica uma investigação mais adequada.

Ampliando ainda mais as possibilidades de avaliações, avanços recentes na pesquisa sobre obesidade e metabolismo dependem cada vez mais de novas tecnologias para identificar mecanismos no desenvolvimento da obesidade e nos efeitos terapêuticos de intervenção. Nesse intuito, surge a metabolômica (abordada no próximo item) como nova ferramenta de análise e entendimento da obesidade e do processo de perda de peso. Nos últimos anos a metabolômica proporcionou novos conhecimento sobre a etiologia da obesidade e suas ligações com doenças crônicas (ALEKSANDROVA et al., 2020). Recentemente foi demonstrado que quase um terço de aproximadamente 1.000 metabólitos analisados foram associados ao IMC, caracterizando uma assinatura metabólica deste índice e, conseqüentemente, revelando a presença ou não de fatores de risco à obesidade. Estes diferentes metabólitos anormais estão associados a um aumento de 2-5 vezes no risco de eventos cardiovasculares ao longo do tempo, mesmo quando os indivíduos são pareados pelo IMC (CIRULLI et al., 2019). Esses dados sugerem a necessidade de uma nova forma de análise, como por meio de uma integração de biomarcadores comuns: Z-MetS; ou por meio de uma análise metabolômica mais abrangente: metaboloma.

1.2 METABOLOMA

A metabolômica é definida como uma ferramenta que visa detectar e quantificar alterações nos perfis e níveis de metabólitos de baixo peso molecular em células, tecidos, órgãos ou plasma em resposta a uma variação fisiológica e/ou patológica ou a alguma intervenção (GIBNEY et al., 2005). Dessa forma, a metabolômica tem se mostrado uma ferramenta útil para avaliar alterações em metabólitos relacionados ao sobrepeso e

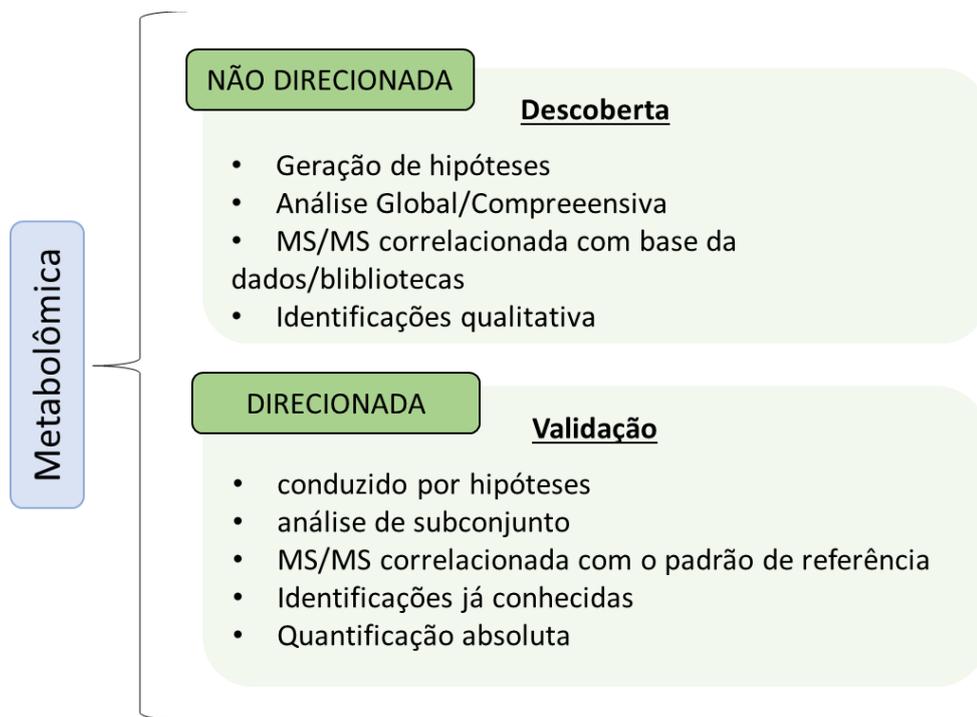
obesidade em: (i) nível celular: tecidos adiposos, músculo esquelético, fígado, coração, entre outros, e em (ii) nível de fluido corporal, como no plasma. Além disso, esta ferramenta analítica é capaz de determinar um perfil metabólico (“*metabolic fingerprint*”) que pode ser compreendida como a identidade/assinatura de uma amostra ou grupo relacionada aos indivíduos com obesidade ou sobrepeso e em relação a medidas intervencionistas de redução de peso (BADOUD et al., 2015). A comparação do metaboloma de um grupo submetido a intervenções terapêuticas, como dieta e/ou tratamento farmacológico, (grupo teste), com um controle e/ou placebo pode fornecer informações importantes no que diz respeito ao entendimento do fenótipo de um organismo, desempenhando um papel fundamental na biologia de sistemas (CANUTO et al., 2018).

A metabolômica permite realizar análises qualitativas e quantitativas de metabólitos intracelulares e intercelulares, geralmente usando duas abordagens analíticas distintas principais: (i) perfil de metabólito não direcionado ou global (do inglês, *untargeted metabolomics*), representado como uma análise abrangente sem maior conhecimento das características das classes químicas com potencial de identificação de possíveis biomarcadores a partir de uma grande variedade de metabólitos (essa foi a abordagem utilizada no presente estudo); e (ii) perfil de metabólito direcionado ou alvo (do inglês, *targeted metabolomics*), que é focado em uma medição quantitativa das variações nos metabólitos envolvidos em vias metabólicas, como, por exemplo, compostos proteicos e seus aminoácidos derivados, com base na compreensão de seus papéis biológicos em uma rota metabólica específica (PARK; SADANALA; KIM, 2015). Esses métodos diferem em vários aspectos, como a complexidade dos procedimentos de preparação da amostra, a precisão experimental, a gama de recursos detectados e o nível de quantificação (PUTRI et al., 2013; RANGEL-HUERTA; GIL, 2016).

A metabolômica não direcionada se concentra na detecção global e na análise qualitativa e/ou semi-quantitativa de pequenas moléculas em uma amostra. Importante ressaltar que esta abordagem, que identifica de modo não supervisionado uma fração de metabólitos entre uma miríade destes em uma amostra, não tem como premissa prospectar biomarcadores alternativos, mas sim indicar marcadores bioquímicos diretamente envolvidos nos fenótipos dos grupos deste presente estudo. Em contraste, a metabolômica direcionada se concentra na medição de grupos bem definidos de metabólitos com oportunidades para quantificação absoluta (FIGURA 2). Essas características levam os pesquisadores a estabelecer objetivos específicos para cada abordagem, como, gerar uma

hipótese de possíveis alterações que possam ocorrer com uma intervenção (SCHRIMPE-RUTLEDGE et al., 2016).

FIGURA 2 – Abordagens de análises metabolômicas

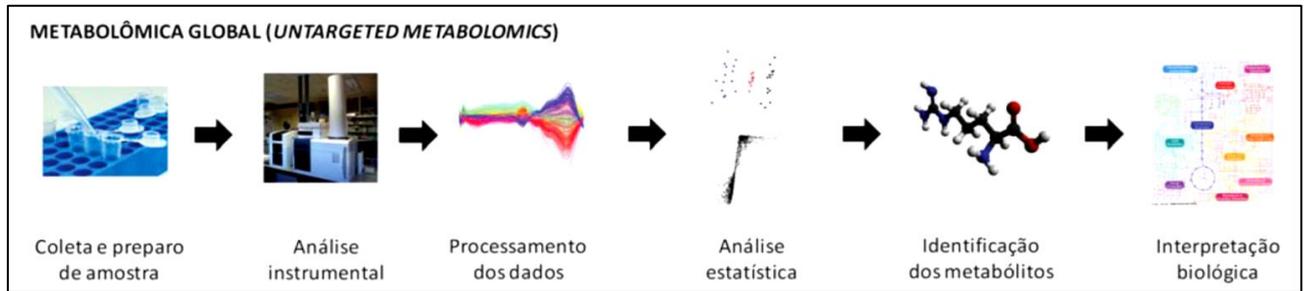


Descrição: principais diferenças de abordagens entre a metabolômica não direcionada e direcionada. MS/MS Espectrometria de massa em tandem

Fonte: Adaptado de Schrimpe-Rutledge et al. (2016).

Para a análise e estudo da metabolômica não direcionada é necessário seguir um fluxograma de etapas de processamento, análises e interpretações que são exemplificados na Figura 3 e serão detalhadas na parte da metodologia desta dissertação.

FIGURA 3 – Fluxograma resumido de trabalho envolvido na análise metabolômica



Fonte: Retirado de Canuto et al. (2018)

Nos últimos anos várias evidências abordaram as alterações metabólicas associadas à obesidade em modelos humanos e animais (RAUSCHERT et al., 2017). Muitas delas descrevem mudanças no perfil metabólico associadas à obesidade e diabetes, e, conseqüentemente, características associadas à resistência insulínica (RI), e a maioria relata os resultados das análises direcionadas (ABU BAKAR et al., 2015; ADAMS, 2011; FIEHN et al., 2010). De fato, os metabólitos identificados podem servir como biomarcadores dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da obesidade e, posteriormente, de outras doenças. Por exemplo, níveis plasmáticos elevados de aminoácidos (AAs) de cadeia ramificada (BCAAs) (leucina, isoleucina e valina) e AAs aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano e metionina), bem como alguns de seus metabólitos, foram detectados em ambos os indivíduos com obesidade e diabetes, sendo que os níveis de glutamina e glicina estão diminuídos, embora os resultados nem sempre tenham sido consistentes (ADAMS, 2011; MIHALIK et al., 2012; RAUSCHERT et al., 2017). Os níveis de outros compostos de nitrogênio não proteico, como nucleotídeos, nucleosídeos e seus metabólitos, como, uridina e ácido úrico, variam consideravelmente, dependendo do grau de RI em indivíduos obesos (FIEHN et al., 2010; PARK; SADANALA; KIM, 2015).

Em relação aos metabólitos lipídicos, os níveis de alguns ácidos graxos, por exemplo, ácidos palmítico, palmitoléico, esteárico e oleico e estearoil carnitina estão elevados em indivíduos obesos (PARK; SADANALA; KIM, 2015). Da mesma forma, os níveis de alguns lisofosfolípídeos de colina e etanolamina parecem estar alterados, embora a direção das mudanças não seja consistente e dependa de cada estudo (FIEHN et al., 2010; MOORE et al., 2014). Com relação aos carboidratos, as concentrações de glicose, frutose, manose, xilose, ácido glucônico, ácido glucurônico, glicerol e lactato no plasma são

geralmente aumentadas, enquanto as concentrações de glicerol-3-fosfato e outros metabólitos diminuem em homens obesos (FIEHN et al., 2010; PARK; SADANALA; KIM, 2015). Portanto, apesar de diversas mudanças relatadas nos metabólitos, principalmente no que diz respeito ao metabolismo energético, ainda parece inconclusivo os padrões de resposta que implicam na fisiopatologia da obesidade e como serão suas respostas em intervenções dietéticas e de redução do peso corporal.

1.3 DIETA E PERDA DE PESO

Sabe-se que uma perda de peso de 5–10% do peso corporal total, induzida principalmente por dietas hipocalóricas, melhora os resultados metabólicos, como índice glicêmico, perfil lipídico e pressão arterial (WING et al., 2011; HÖCHSMANN et al., 2021). Além disso, uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados demonstrou que as intervenções para perda de peso reduzem a mortalidade prematura por todas as causas em adultos com obesidade (MA et al., 2017). A alimentação com restrição de tempo (TRF, do inglês *Time-Restricted Feeding* e popularmente chamada no Brasil por Jejum Intermitente), definida por períodos de restrição energética severa ou completa seguido por períodos de alimentação habitual *ad libitum*, tem sido sugerida como uma estratégia potencial de perda de peso (JOHNSTONE, 2015). Revisões sistemáticas e meta-análises de estudos randomizados sugerem que as diferenças entre as dietas populares (jejum intermitente, *low fat*, *low carb*, dieta mediterrânea...) são pequenas e triviais na perda de peso e na melhora de marcadores da MetS (DINU et al., 2020; GE et al., 2020). Dessa forma, pessoas com obesidade devem receber dietas nutricionais práticas, acessíveis com grande potencial de aderência (FREIRE, 2020).

Uma recente revisão sistemática com meta-análise mostrou que a perda de peso absoluta e a porcentagem de perda de peso foram maiores para TRF do que para restrição calórica contínua no curto prazo. Porém, não há evidências que sugiram a manutenção desses resultados no longo prazo (HE et al., 2021). Um recente ensaio clínico randomizado com 139 paciente com obesidade demonstrou que, dentro de 12 meses, o TRF (janela de alimentação entre 8:00 a.m e 4:00 p.m.) promoveu resultados semelhantes a restrição calórica contínua na perda de peso e perfil de risco metabólico (LIU et al., 2022). O interesse no estudo com TRF está no fato de que muitos benefícios na saúde metabólica, como melhora da RI, pressão arterial e estresse oxidativo podem ser independentes da perda de

peso (SUTTON et al., 2018). Dessa forma, mesmo que não haja uma restrição calórica e, conseqüentemente déficit calórico e perda peso, sob protocolos de TRF, ainda podemos encontrar benefícios metabólicos, fato que provavelmente não ocorreria em uma dieta contínua sem restrição energética ou mudança do padrão/qualidade nutricional.

Alguns estudos já analisaram o efeito da perda de peso nos perfis metabólicos de indivíduos com sobrepeso e obesos (PEREZ-CORNAGO et al., 2014; KANG et al., 2018; LEAL-WITT et al., 2018; PALAU-RODRIGUEZ et al., 2020), porém a heterogeneidade metodológica, analítica e dos resultados, dificulta uma compreensão geral e sintética dos resultados. Em um estudo, conduzido por Geidenstam et al. (2017), identificou-se mudanças nos níveis plasmáticos de vários AAs após perda de peso em indivíduos obesos. Dos 21 AAs detectados, apenas a tirosina se aproximou do perfil de referência das pessoas magras após a perda de peso, e esse perfil foi mantido após a manutenção do peso. Além disso, uma subanálise revelou que níveis reduzidos de 1-metiladenosina, alanina, prolina, ácido transcinâmico, tirosina e os BCAAs foram associados a um maior sucesso da perda de peso (definido como a perda de peso $\geq 10\%$ do peso corporal). Além disso, uma concentração basal mais baixa de xilitol foi preditiva de uma diminuição no IMC e $\geq 10\%$ de perda de peso.

Com base nas evidências apresentadas anteriormente, a análise da metabolômica pode evidenciar alterações após a redução de peso e pode elucidar mecanismos que impliquem na melhora do perfil metabólico. Nossa hipótese é que o TRF proporcione a perda de peso e a melhora do Z-MetS e que diferentes metabólitos e vias metabólicas participam desse processo.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito do TRF na Z-MetS em mulheres com sobrepeso e obesidade de meia-idade. Além disso, aplicar uma análise metabolômica não direcionada, visando a comparação entre o perfil metabolômico nos diferentes grupos de amostras pré e pós-intervenção de TRF por 3 meses.

1.4.2 Objetivos secundários

Levantar discussão de prováveis vias metabólicas que participariam do processo de perda de peso e teriam potencial associação com a melhora do perfil metabólico em mulheres sobrepesas e obesas submetidas à TRF.

2 METODOLOGIA

2.1 Amostra e critérios de elegibilidade

Este estudo é um ensaio clínico controlado não randomizado sobre TRF que foi realizado durante 3 meses em mulheres com sobrepeso ou obesidade. As voluntárias (grupo controle e intervenção) eram moradoras da comunidade do município de Chapecó – Santa Catarina, Brasil e foram recrutadas por redes sociais (Facebook e Instagram) e aplicativos de mensagens instantâneas (WhatsApp). De uma amostra prévia de nosso estudo (SCHRODER et al., 2021), selecionamos intencionalmente sete (n=7) amostras do grupo TRF que obtiveram $\geq 5\%$ de perda de peso corporal e comparamos com sete (n=7) amostras aleatoriamente selecionadas do grupo controle em todas as análises realizadas nesse estudo. Sabe-se que uma redução de pelo menos 5% do peso corporal total, melhora os resultados metabólicos, como índice glicêmico, perfil lipídico e pressão arterial (WING et al., 2011; HÖCHSMANN et al., 2021).

No estudo foram incluídas mulheres com sobrepeso ou obesidade ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e foram excluídas mulheres fisicamente ativas (150 min de atividade física moderada ou menos de 75 min de atividade física intensa por semana) (BULL et al., 2020); mulheres com doenças não transmissíveis, exceto DM2 e hipertensão que foram alvos deste estudo, e àquelas que usassem outros medicamentos além da pílula anticoncepcional.

Os resultados foram avaliados no início e após 3 meses de intervenção. Os participantes do grupo TRF foram orientados a manter seus hábitos nutricionais regulares durante as horas sem jejum, enquanto o grupo controle foi orientado a manter sua alimentação habitual durante todo o período. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (protocolo número 2.819.932), e o consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes. Registro de ensaio: ensaiosclinicos.gov.br (10051).

2.2 Alimentação com restrição de tempo (TRF)

O TRF baseia-se na manipulação do tempo (jejum) e visa a redução da ingestão energética (FREIRE, 2020). O protocolo de TRF aqui adotado foi jejum (restrição de ingestão energética total) de 16h (20h às 12h) e alimentação *ad libitum* por 8h (12h às 20h). Previamente foi demonstrado que uma janela de alimentação de 8h promoveu melhoras em biomarcadores relacionados à saúde e perda de peso no período de 8 semanas (MORO et al., 2016). Além disso, esse protocolo parece particularmente interessante no contexto cultura brasileiro, pois permite incluir o almoço, popularmente considerada a refeição mais importante e com maior diversidade nutricional (BARBOSA, 2007). O protocolo foi realizado 7 dias por semana durante 3 meses. Todas as participantes recebiam diariamente um lembrete por meio de mensagens instantâneas via WhatsApp que informava o horário de parar de comer (a partir das 20h) e o horário em que a alimentação era permitida (a partir das 12h). Além disso, foram promovidos encontros periódicos (um a cada 30 dias) para que os participantes compartilhassem suas experiências e recebessem apoio dos pesquisadores envolvidos. Caso o encontro não fosse possível por motivos pessoais, os pesquisadores entravam em contato por chamada telefônica com o participante. O grupo controle foi orientado a manter os hábitos alimentares e de vida normais como previamente ao estudo.

2.3 Desfechos para análise

O desfecho primário foi os efeitos do TRF na Z-MetS e a prospecção, identificação e validação de metabólitos relacionados a melhora da saúde metabólica e perda de peso.

2.4 Medidas antropométricas

O peso corporal foi mensurado usando uma balança digital (Urano, PS 180). A estatura foi medida pelo estadiômetro de parede e a circunferência da cintura (em borda superior da crista ilíaca) com métrica fina (Sanny, fita de fibra de vidro). Os valores do índice de massa corporal (IMC) foram calculados a partir dessas medidas ($IMC = \text{peso(kg)}/\text{altura(m)}^2$). Todas as medidas antropométricas foram realizadas três vezes

consecutivas por um indivíduo com experiência em medidas antropométricas. Caso fosse detectado um erro maior que 1% entre qualquer medida realizada, uma nova medição era realizada.

2.5 Aferição da pressão arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) foram medidas usando um esfigmomanômetro de mercúrio (Kenz, 600) por um único avaliador de acordo com os critérios da lista de verificação da Sociedade Europeia de Cardiologia/Sociedade Europeia de Hipertensão (WILLIAMS et al., 2018).

2.6 Coleta e análise de sangue

Foram coletadas 20 ml de amostras de sangue da veia antecubital na linha de base e após 3 meses em BD Vacutainers Tubes (SST™ II Advance, REF 367953). As amostras foram centrifugadas (4000 RPM a 4 °C usando a centrífuga J6-MC da Beckman) e o soro resultante foi separado e armazenado a -80 °C. Colesterol total, colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c), colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos foram avaliados pelo AU480 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

2.7 Padronização das amostras e das condições de corrida

2.7.1 Preparo das Amostras

As amostras de plasma foram mantidas sob baixa temperatura (-20 °C), em outro sítio específico da pesquisa responsável pela análise de metaboloma, até a sua utilização nas análises. Alíquotas de 100µL de amostras foram transferidas para um tubo plástico de centrífuga juntamente com 400µL metanol para precipitação de proteínas. Após a precipitação, as amostras foram mantidas sob agitação em vórtex por 2 minutos e centrifugadas a 15.000rpm por 30 minutos à 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para vials de 2mL com inserts. Para as soluções de controle de qualidade (Pooled QCs), 10 µL de cada uma das amostras foram utilizadas e esta solução foi vortexada por 30 segundos.

2.7.2 Preparo da Fase Móvel

- *Fase móvel A – Tampão acetato de amônio 5mm + 0,1% ácido fórmico + 0,1% acetonitrila*

Transferiu-se 1000mL de água ultrapura para um frasco de fase móvel e adicionou-se 1mL de ácido fórmico, 1mL de acetonitrila e 0,3854g de acetato de amônia. A solução foi homogeneizada.

- *Fase móvel B – Acetonitrila (95%) + 0,1% ácido fórmico*

Transferiu-se 950mL de acetonitrila para um frasco de fase móvel e adicionou-se 1,0 mL de ácido fórmico e 50mL de água. A solução foi homogeneizada.

2.7.3 Cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada com aquisição de dados de espectrometria de massa em tandem (UPLC–MS/MS)

Em todos os experimentos de MS e MS/MS foi utilizado um Orbitrap Q-Exactive (Thermo Scientific). O instrumento foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante antes de todas as sequências. As amostras foram analisadas em um sistema ThermoUltimate 3000 UHPLC acoplado ao Q-Exactive. As amostras foram analisadas no modo de íons positivo e negativo separadamente usando uma fonte de íons de electrospray. As separações cromatográficas foram realizadas empregando os métodos de fase reversa e cromatografia de interação hidrofílica (HILIC). Para os métodos HILIC, a separação foi realizada em um Acquity UPLC CSH - C18 - 100mm x 2,1mm (1,7µm) operando a uma temperatura de coluna de 40 °C. Dois solventes foram aplicados [solvente A - 0,1% de ácido fórmico em água (vol/vol) e solvente B - 0,1% de ácido fórmico em metanol (vol/vol)] a uma taxa de fluxo de 600 µL min⁻¹. Inicialmente, o Solvente B foi fixado em 100% seguido por um aumento para 50% do solvente A ao longo de 5,0 min, que foi então mantido até 11,0 minutos. Uma mudança de etapa para 100% de solvente B foi realizada em 11,01 minutos e depois mantida em 100% de solvente B para equilibrar por 4,0 minutos.

2.7.4 Processamento e análise dos dados

Inicialmente, todos os arquivos de dados RAW foram convertidos para o formato mzXML para serem compatíveis com o ambiente R-studio usando o software de conversão MS. Posteriormente, os dados convertidos foram então processados no R-studio a partir do pacote IPO usando as amostras de controles de qualidade (QCs) visando otimizar todos os parâmetros para análise XCMS (mais informações encontradas em SI). Após a otimização de coleta de pico, detecção de recursos, alinhamento de retenção e preenchimento de pico foram realizados usando o pacote XCMS R. O algoritmo GlobalStd baseado na análise de distância de massa pareada foi empregado com o objetivo de minimizar o número de características redundantes relacionadas aos mesmos compostos e por esta razão apenas 10% do total de características detectadas foram realmente usadas para a análise de dados multivariada. Recursos com resposta de sinal/ruído inferior a 5% e área de pico RSD>30% nas injeções de amostra de CQ foram rejeitadas. Todos os picos extraídos foram anotados usando o Algoritmo de Pontuação Integrativa XMSannotator e apenas os níveis de confiança 2 e 3 eram adequados e confiáveis como compostos reais das amostras. Para a etapa de anotação foram empregados os bancos de dados HMDB, Lipid Maps, KEGG e FooDB. Além disso, o software SIRIUS 4 (<https://bio.informatik.uni-jena.de/sirius/>) foi empregado para obter uma abordagem computacional rápida para identificação de estruturas moleculares.

As análises de componentes principais (PCA) foram primeiramente utilizadas como um método não supervisionado, com o objetivo de avaliar a variação das amostras e dos controles de qualidade (Pooled QCs) agrupados. Após a verificação dos dados, foi utilizada uma abordagem PLS-DA para otimizar a separação e conseqüentemente diferenciar as classes das amostras. Para a identificação dos *features* mais importantes foi realizada a identificação dos metabólitos mais significativos dentro do conjunto de dados PLS-DA usando importância das variáveis em projeção (VIP). Todas as análises de dados foram realizadas usando o *MetaboAnalyst* 4.0. Todos os *features* importantes selecionadas foram cruzados com o conjunto de dados original (arquivos de dados.raw) para verificar se estes tratam-se de compostos reais e não apenas um aduto, no caso de picos não encontrados, estes *features* foram eliminados. A avaliação dos espectros de fragmentação foi realizada automaticamente utilizando o software SIRIUS+CSI:FingerID (Friedrich-Schiller University, Jena, Germany) e comparando manualmente os espectros obtidos com bibliotecas disponíveis na literatura.

2.8 Score da severidade da síndrome metabólica

Para avaliar o grau de severidade de Síndrome Metabólica pelo z-score (Z-MetS) nas mulheres foi utilizado o modelo equacional de Gurka et al., (2014), a partir da seguinte equação:

$$\text{Z-MetS} = -7.2591 + 0.0254 * \text{Circunferência de Cintura} - 0.0120 * \text{HDL} + 0.0075 * \text{PAS} + 0.5800 * \ln(\text{Triglicerídeos}) + 0.0203 * \text{Glicose em jejum}$$

Essa equação fornece uma medida como variável contínua clinicamente acessível e interpretável do grau de severidade de síndrome metabólica comparada ao z-score populacional e possui potencial na identificação de pessoas com maior risco de doenças crônicas não transmissíveis e no acompanhamento de mudanças nos indivíduos ao longo do tempo e/ou a partir de uma intervenção (DEBOER; GURKA, 2017a; GURKA et al., 2018).

2.9 Análise estatística

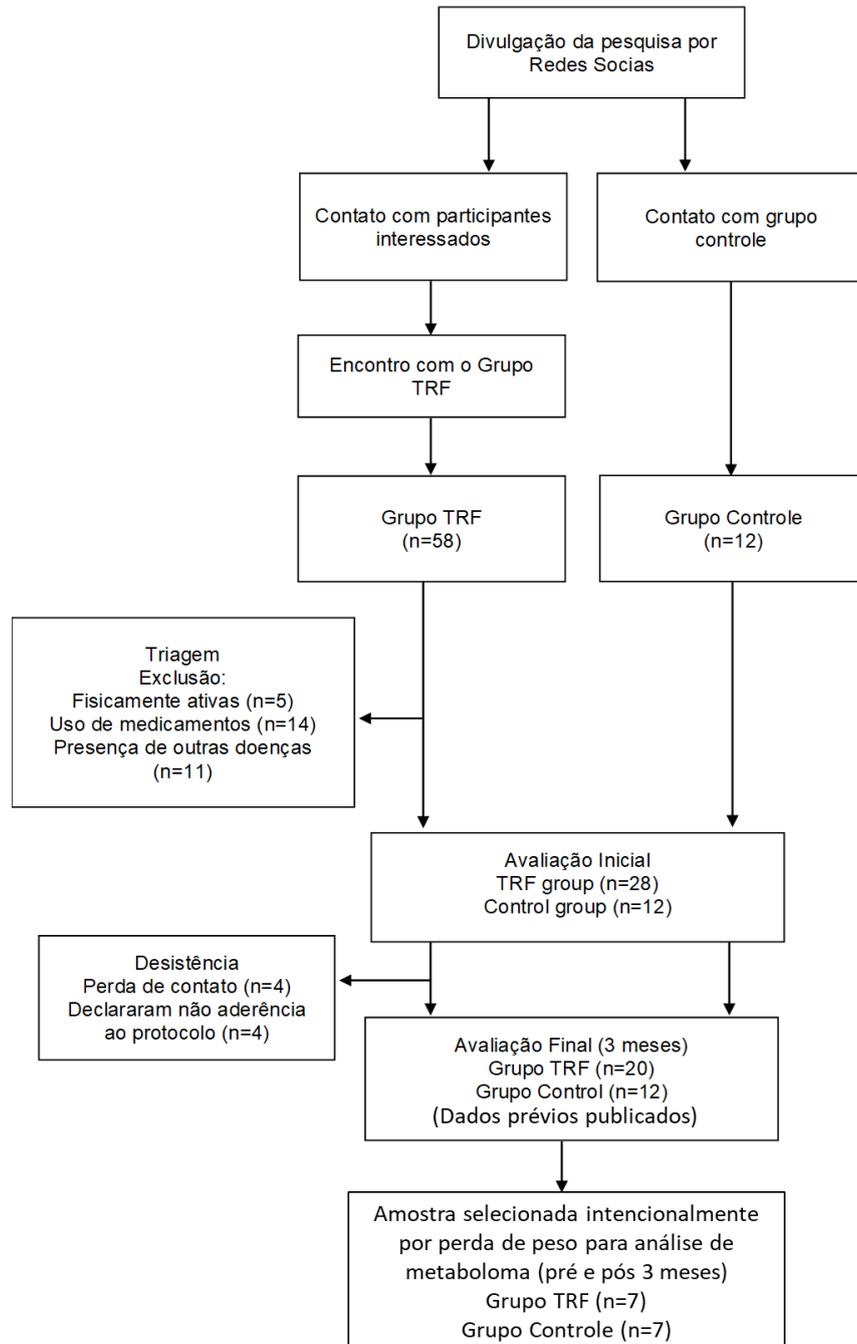
Este estudo foi realizado como um estudo piloto exploratório com o recrutamento de mulheres que estavam envolvidas na realização do protocolo. Portanto, um cálculo do tamanho da amostra não parecia possível. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. O teste W de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a normalidade. Fixamos como variável dependente o valor pós-exame clínico/medidas antropométricas para cada grupo e os valores basais dos desfechos foram adotados como covariável. Grupo TRF vs. Grupo controle foram assumidos como preditores categóricos. Um teste t de Student pareado foi realizado entre a linha de base e 3 meses para cada grupo. Realizamos uma análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças significativa entre as médias. O Teste de Tukey foi realizado para na tentativa de encontrar meios que são significativamente diferentes uns dos outros. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0.05$. As análises estatísticas foram feitas com o software estatístico Jamovi, versão 2.3.24.

3 RESULTADOS

Uma amostra composta por 7 representantes de cada grupo foi intencionalmente selecionada de um estudo base com base na variação do peso (perda de peso $\geq 5\%$ do

peso corporal total). Dessa forma, todas as análises deste estudo serão compostas por esse amostra (n=7) representativa de cada grupo.

FIGURA 4 – Fluxograma do estudo



Descrição: Fluxograma para grupo TRF e grupo controle.

3.1 Característica da amostra

As características base das amostras selecionadas para a análise neste presente são fornecidas na Tabela 1. Não houve diferença entre as características basais para os grupos.

TABELA 1 – Linha de base para grupo TRF e Controle

	Grupo TRF	Grupo Controle	P-valor
	(n=7)	(n=7)	
Idade (anos)	44.3±5.5	33.4±2.0	0.0501
Massa Corporal (kg)	87.1±7.3	87.5±4.3	0.97
IMC (kg/m ²)	33.9±1.8	33.5±1.6	0.91
Cintura (cm)	102.0±4.6	105.0±3.6	0.72
Z-MetS	-0.066±0.323	0.399±0.358	0.23
Glicemia (mg/dL)	83.9±2.1	89.4±5.6	0.08
Colesterol Total (mg/dL)	198±12.1	209±15.1	0.39
Triglicerídeos (mg/dL)	114±33.5	181±40.2	0.25
HDL-C (mg/dL)	62±3.8	59.9±7.8	0.81
LDL-C (mg/dL)	112±9.3	119±10.6	0.55
PAS (mmHg)	133±5.8	132±8.8	0.93

Resultados apresentados como Média ± SEM

IMC índice de massa corporal, PAS pressão arterial sistólica, Z-MetS severidade de síndrome metabólica pelo z-score

3.2 Efeitos do TRF nas análises morfológicas e bioquímicas

O grupo TRF apresentou mudanças significativas em relação ao baseline e em relação ao grupo controle em parâmetro de medidas antropométricas, houve redução do peso corporal total, circunferência de cintura e IMC. Apesar da mudança nesses parâmetros, não houve alterações significativas nos biomarcadores sanguíneos associados ao perfil metabólico, assim como não houve alteração no Z-MetS. Todos esses resultados

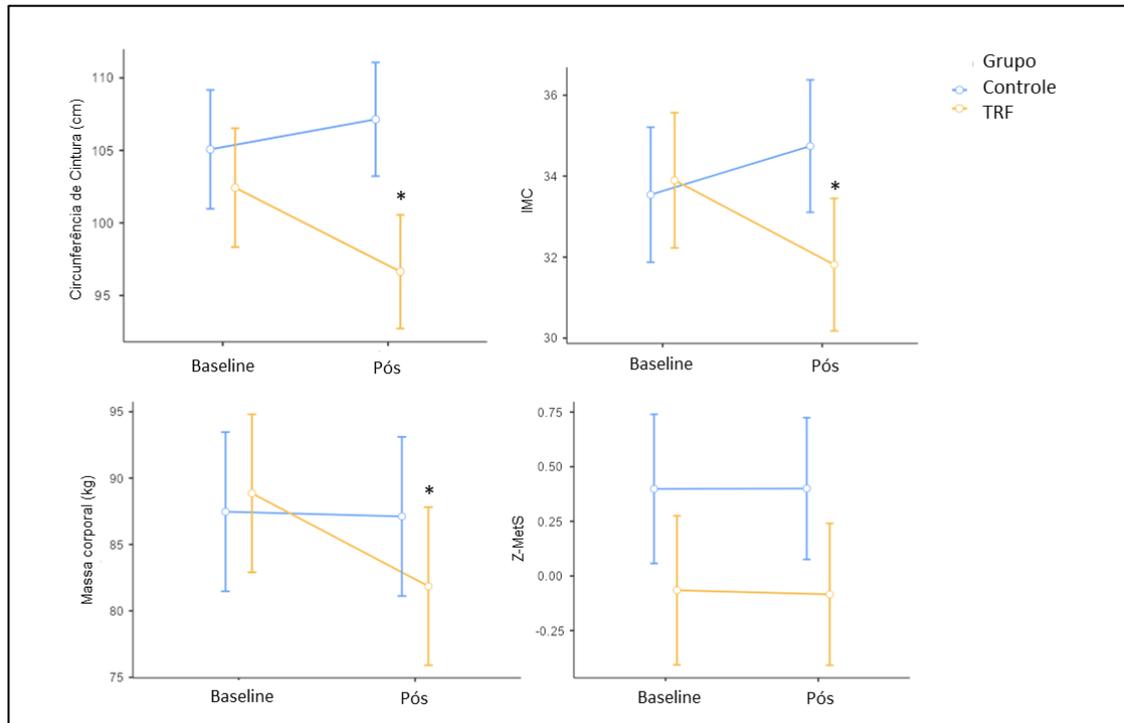
estão apresentados na Tabela 2. Na Figura 5 estão as representações gráficas para os principais desfechos do estudo.

TABELA 2 – Apresentação dos resultados

	Grupo TRF (n=7)		Grupo Controle (n=7)		Δ (TRF - Controle)	Δ P-valor
	Pré Intervenção	3 meses	Pré Intervenção	3 meses		
Massa Corporal (kg)	87.1±7.3	81.9±7.4	87.5±4.3	88.9±4.0	-5.26	<.001
IMC (kg/m ²)	33.9±1.8	31.8±1.9	33.5±1.6	34.7±1.4	-2.09	0.005
Cintura (cm)	102.0±4.6	96.6±4.7	105.0±3.6	107±2.9	-5.79	0.003
Z-MetS	-0.066±0.323	-0.084±0.341	0.399±0.358	0.400±0.301	-0.141	0.330
Glicose (mg/dL)	83.9±2.08	85.9±2.77	89.4±2.11	91.9±3.01	-0.49	0.320
PAS (mmHg)	133±5.8	129±6.5	132±8.8	130±5.8	-2.542	0.770
CT (mg/dL)	198±12.1	203±9.6	209±15.1	210±15.3	5.71	0.872
HDL-C (mg/dL)	62±3.8	55.3±4.1	59.9±7.8	59.9±6.34	6.71	0.186
LDL-C (mg/dL)	112±9.3	122±12.7	119±10.6	123±12.7	7.07	0.121
Triglicérides (mg/dL)	114±33.5	117±29.1	181±40.2	155±35.9	26.6	0.610

Resultados apresentados como média \pm SEM

CT colesterol total; IMC índice de massa corporal, PAS pressão arterial sistólica

FIGURA 5 – Apresentação gráfica dos principais resultados

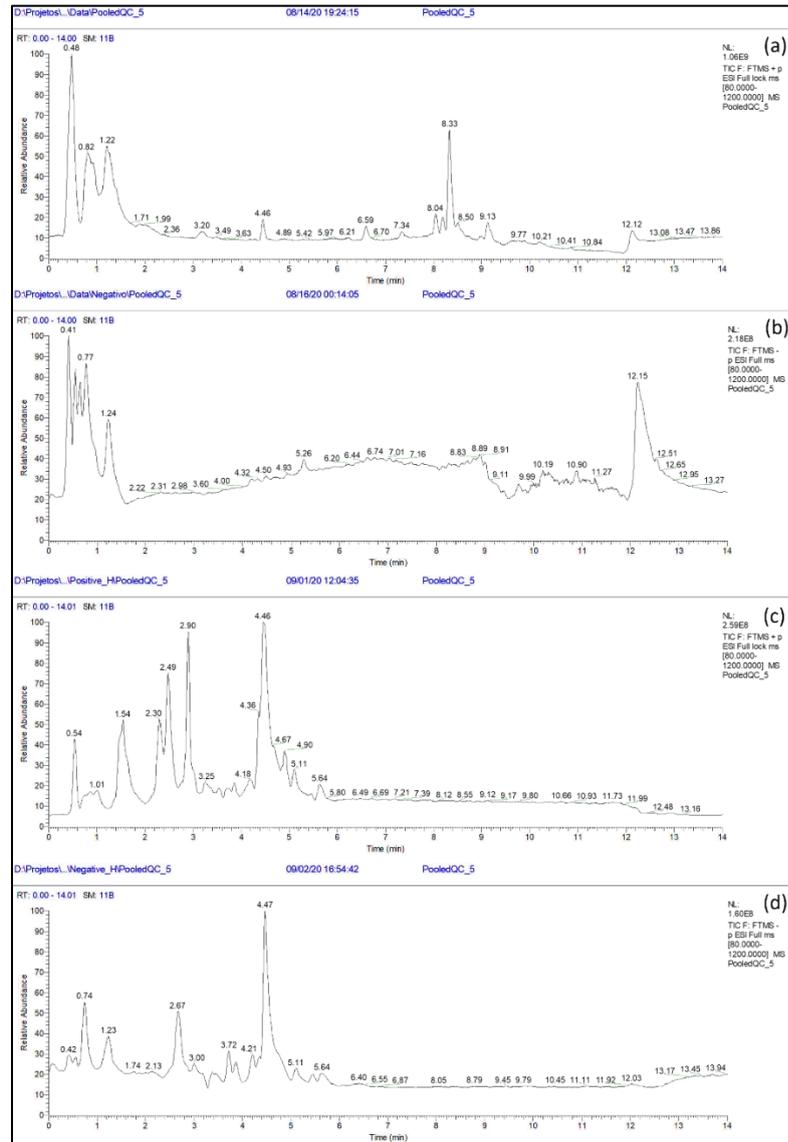
Descrição: (*) representa diferença significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle e em relação ao baseline. Valores apresentados por média \pm SEM

3.4 RESULTADOS DO METABOLOMA

3.4.1 Otimização das Condições Cromatográficas

Antes da realização das análises de todas as amostras realizou-se uma otimização do método cromatográfico de forma a promover uma melhor separação para os analitos investigados. Pela avaliação da Figura 6 é possível perceber que houve uma boa separação dos compostos e que ao utilizar o método HILIC ocorre uma melhora na separação referente aos compostos mais polares, provavelmente aminoácidos e derivados presentes nas amostras. Além disso, em ambos os métodos é possível perceber que o modo positivo foi mais informativo com relação à quantidade de compostos detectados, contudo, uma avaliação mais precisa só pode ser realizada após a verificação dos dados utilizando ferramentas de análise de dados multidimensionais.

FIGURA 6 - Cromatograma



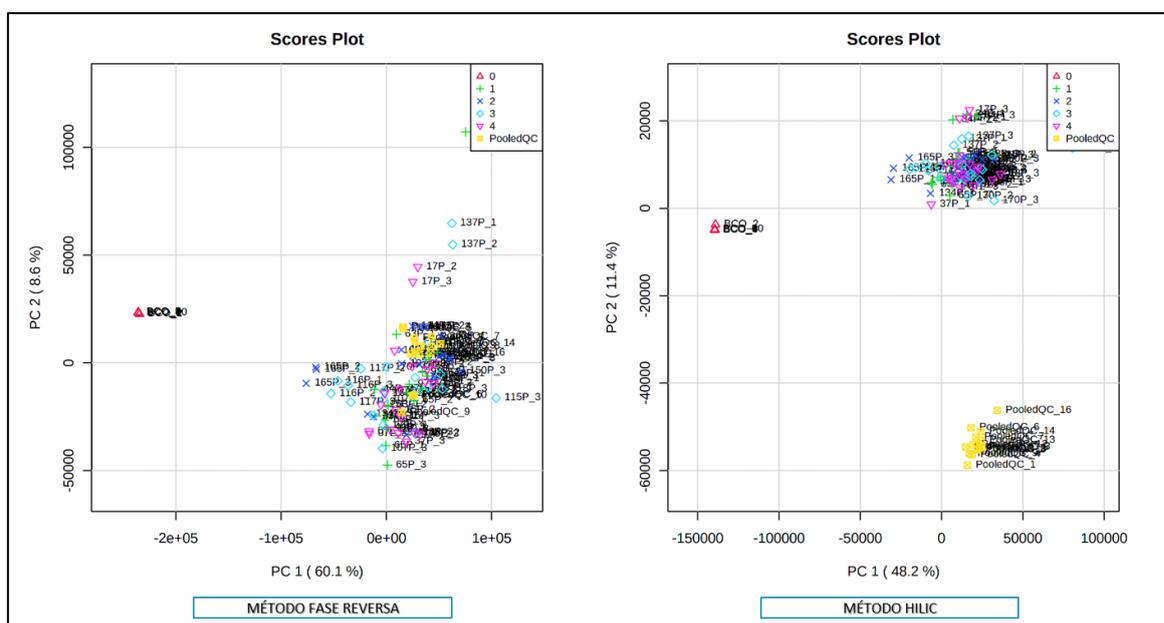
Descrição: Cromatogramas de íons totais (tic) para a amostra de pooled qc utilizando os métodos (a) fase reversa em modo positivo (esi+), (b) fase reversa em modo negativo (esi-), (c) hilic em modo positivo (esi+) e (d) hilic em modo negativo (esi-)

3.4.2 Avaliação da dispersão dos dados auxiliada por estratégias multidimensionais – método fase reversa e HILIC

A primeira estratégia consistiu na avaliação das amostras utilizando todo o conjunto de dados obtidos tanto para o método em fase reversa quanto HILIC em modo positivo. Esta etapa é de extrema importância, principalmente para avaliar a reprodutibilidade tanto do método cromatográfico quanto dos processamentos de dados. Neste caso foi possível verificar que tanto as amostras do branco quanto os QCs apresentaram uma grande

reprodutibilidade (FIGURA 7). A baixa dispersão dos dados indica a presença de amostras de perfil metabólico muito semelhantes entre si e, por isso, somente uma estratégia não supervisionada (PCA) e sem maior pré-processamentos não será uma alternativa viável. Dados apresentados pelo Grupo 1: Representa o grupo TRF pós intervenção; Grupo 2: o grupo controle pós intervenção; Grupo 3: o grupo controle pré intervenção; pelo Grupo 4: Representa o grupo TRF pré intervenção.

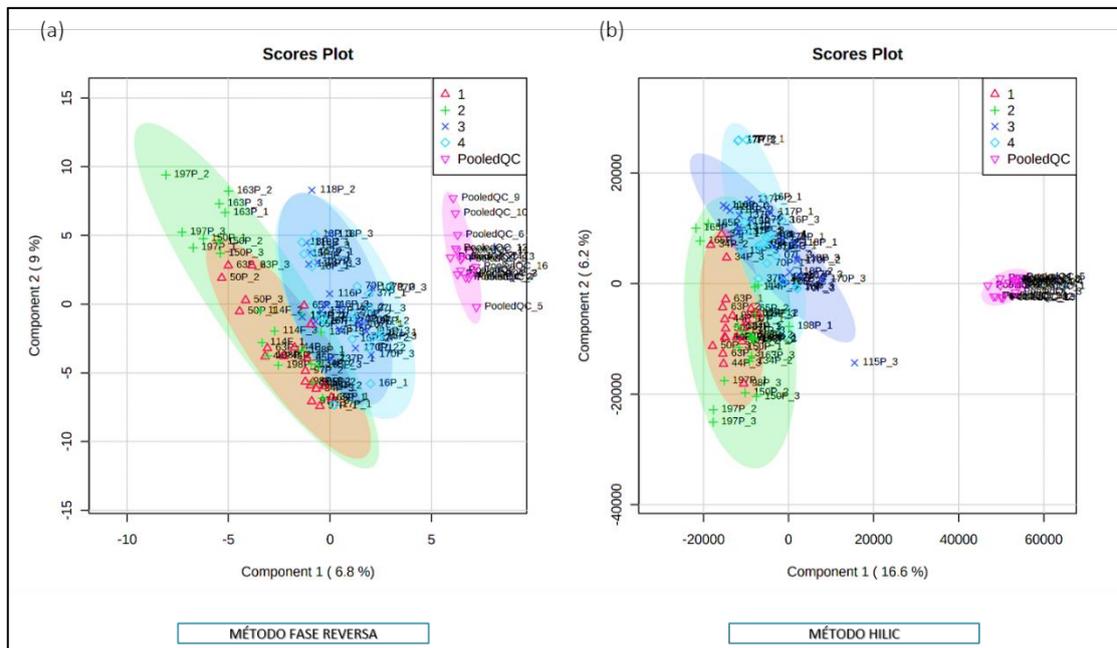
FIGURA 7 - Gráficos de scores da PCs



Descrição: gráficos de scores da PC1 versus PC2 para o conjunto de dados completos no modo positivo considerando (a) método fase reversa (b) método HILIC. No canto superior direito de ambos os gráficos se encontram as legenda para os grupos de 1-4 e análise de PooledQC.

Assim, o passo seguinte constitui na utilização de uma estratégia supervisionada, visto que se tem conhecimento da variabilidade do sistema e da reprodutibilidade do mesmo. Neste caso, utilizou-se a ferramenta de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) que, por se tratar de um método supervisionado, maximiza a separação dos grupos mediante a informação prévia de classificação (FIGURA 8). Neste caso, os 4 grupos foram utilizados como condições previamente estabelecidas e a variabilidade destas classes foi avaliada. Além disso, as amostras do branco referente ao solvente utilizado na extração foram excluídas deste modelo para verificar apenas a variação referente aos grupos.

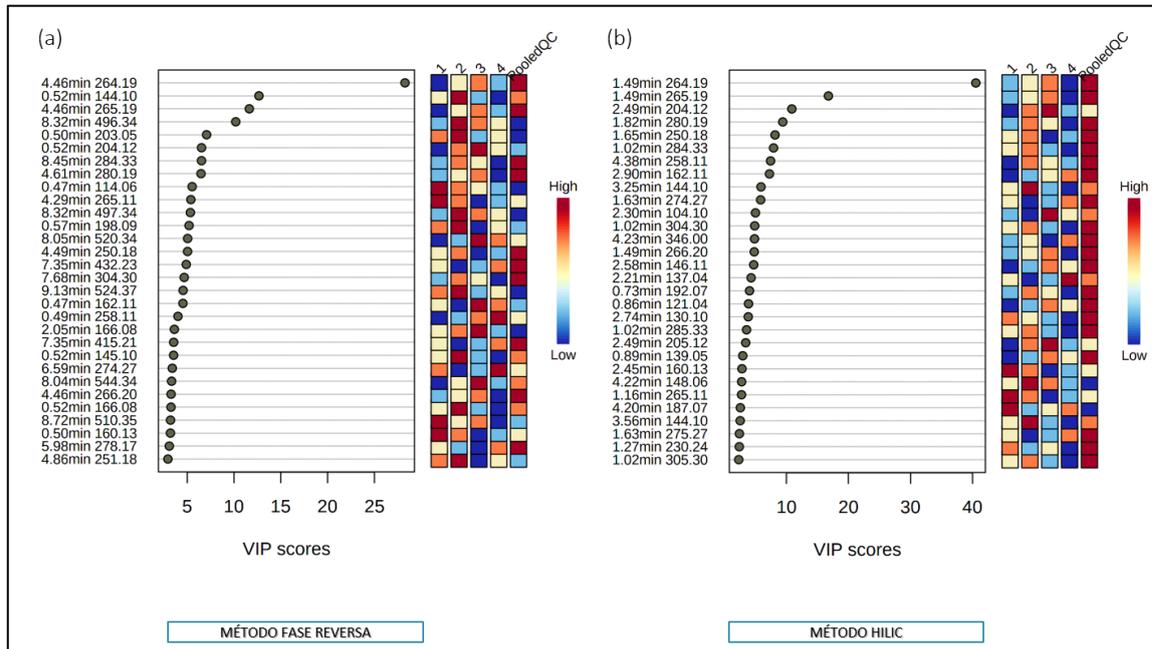
FIGURA 8 - Gráficos de scores da variável latente



Descrição: Gráficos de scores da variável latente (VL1) versus VL2 para o conjunto de dados completos utilizando a abordagem de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) considerando (a) método de fase reversa; e (b) método HILIC em modo positivo. No canto superior direito de ambos os gráficos se encontram as legenda para os grupos de 1-4 e análise de PooledQC.

Conforme verificado na Figura 8, a variável latente 1 possui uma baixa variância explicada em ambos os casos e, portanto, as variações entre as classes são pouco significativas. A partir da análise gráfica, é possível perceber que os grupos 1 e 2 acabam se confundindo, assim como o grupo 3 e 4. Por isso, também foi utilizada uma abordagem de dois grupos a partir da combinação destes. Apesar da mínima diferença entre grupos, utilizou-se a abordagem de Variáveis Importantes na Projeção (VIP) para selecionar os principais *features* responsáveis por essa diferenciação entre classes (FIGURA 9). Neste primeiro momento, selecionou-se os principais *features* referentes aos 4 grupos estudados, sendo estes apresentados nas Tabelas 3 - 7 para o método em fase reversa e HILIC. Além disso, é possível perceber que alguns destes *features* selecionados tratam-se dos mesmos compostos, corroborando a importância destes compostos na diferenciação de classes, uma vez que eles podem ser detectados em ambos os métodos.

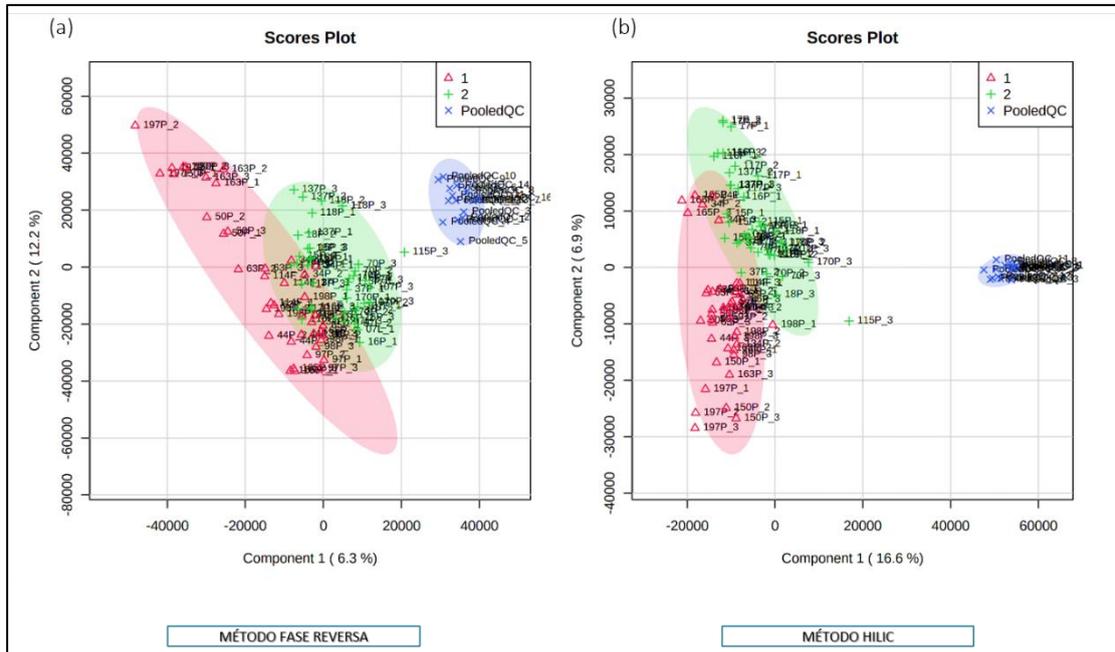
FIGURA 9 - Variáveis importantes na projeção



Descrição: Variáveis importantes na projeção (VIP) para o conjunto de dados completos utilizando a abordagem de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) considerando (a) método de fase reversa; e (b) método HILIC em modo positivo para os quatro grupos.

Além do estudo considerando os quatro grupos, a partir da correlação verificada entre os grupos 1 e 2 e também 3 e 4, estes foram agrupados e avaliados a partir da estratégia PLS-DA. A Figura 10 demonstra a separação entre os grupos para ambos os métodos avaliados. A partir dos resultados do modelo PLS-DA, é possível perceber que a separação entre os dois grupos é visivelmente verificada; contudo, não há uma distinção clara entre as classes, o que pode ser um indicativo da grande similaridade entre as amostras. Para uma melhor separação entre as classes, uma maior quantidade de amostras em cada grupo deveria ser analisada para verificar o quão pronunciável esta separação pode ser.

FIGURA 10 - Gráficos de scores da variável latente



Descrição: Gráficos de scores da variável latente (VL1) versus VL2 para o conjunto de dados completos utilizando a abordagem de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) considerando (a) método de fase reversa; e (b) método HILIC em modo positivo considerando dois grupos. No canto superior direito de ambos os gráficos se encontram as legenda para os grupos de 1-2 e análise de PooledQC.

Apesar da grande similaridade entre os grupos, o modelo PLS-DA foi utilizado para encontrar os principais *features* responsáveis pela diferenciação utilizando VIP. A Figura 11 demonstra os principais *features* selecionados considerando dois grupos (Grupo 1: TRF pós intervenção e Grupo 2: controle pós intervenção). Os principais *features* selecionados para ambas as classes são apresentados nas Tabelas 3 - 6 para o método HILIC e o método de fase reversa.

TABELA 3 - Features identificados nos quatro grupos

<i>m/z</i> <i>Exper.</i>	<i>t_R</i> (min)	Composto Proposto	Fórmula Molecular	Massa Monoisotópica	[M+H] ⁺	Aduto <i>m/z</i>	Erro de Massa (ppm)
Grupo 1 – TRF pós intervenção							
160,1333	2,45	Pregabalin	C ₈ H ₁₇ NO ₂	159,125 9	M+H	160,1332	0,5
		DL-2-Amino-octanoic acid					
		Valine betaine					
265,1183	1,16	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	264,111 0	M+H	265,1183	0,1
		Phenylacetylglutamine					
		di-Hydroxymelatonin					
		N(2)-phenylacetyl-L-glutamate					
187,0714	4,20	Pyroglutamylglycine	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₄	186,064 1	M+H	187,0713	0,3
		Alanylaspartic acid	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₅	204,074 6	M+H-H ₂ O	187,0719	2,9
		Glutamylglycine					
		Glycyl-Glutamate					
Grupo 2 – Controle pós intervenção							
144,1020	3,25	Proline betaine	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143,094 6	M+H	144,1019	0,6
		3beta,6beta-Dihydroxynortropane					
		L-2-Amino-3-methylenehexanoic acid					
148,0604	4,22	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	147,053 2	M+H	148,0604	0,3
		N-lactoyl-Glycine					
144,1019	3,56	Proline betaine	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143,094 6	M+H	144,1019	0,1
		3beta,6beta-Dihydroxynortropane					
		L-2-Amino-3-methylenehexanoic acid					
Grupo 3 - Controle pré intervenção							
204,1231	2,49	L-Acetylcarnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203,115 8	M+H	204,1230	0,5
		N-Lactoylleucine					
104,1073	2,30	Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104,107 5	M+H	104,1075	1,5
205,1264	2,49	3-Mercaptohexyl butyrate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ S	204,118 4	M+H	205,1257	3,6
Grupo 4 – TRF pré intervenção							

137,0458	2,21	Allopurinol	C ₅ H ₄ N ₄ O	136,038 5	M+H	137,0458	0,2
		Hypoxanthine					

Descrição: Features identificados como principais compostos associados aos quatro grupos utilizando conjunto de dados completos para o método HILIC e modo positivo.

TABELA 4 - Features identificados nos dois grupos

<i>m/z</i> <i>Exper,</i>	<i>t_R</i> (min)	Composto Proposto	Fórmula Molecular	Massa Monoisotópica	[M+H] ⁺	Aduto <i>m/z</i>	Erro de Massa (ppm)
Grupo 1 – TRF pós intervenção							
144,1020	3,25	Proline betaine	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143,094 6	M+H	144,1019	0,4
		3beta,6beta-Dihydroxynortropane					
		L-2-Amino-3-methylenehexanoic acid					
265,1182	1,16	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	264,111 0	M+H	265,1183	0,3
		Phenylacetylglutamine					
		di-Hydroxymelatonin					
		N(2)-phenylacetyl-L-glutamate					
148,0604	4,22	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	147,053 2	M+H	148,0604	0,3
		N-lactoyl-Glycine					
166,0863	3,52	4-Hydroxy-1-(3-pyridinyl)-1-butanone	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,079 0	M+H	166,0863	0,0
		L-Phenylalanine					
272,2583	1,49	Undecanoylcholine	C ₁₆ H ₃₄ NO ₂	272,259 0	M+H	272,2589	2,4
		N-(tetradecanoyl)ethanolamine					
Grupo 2 – Controle pós intervenção							
204,1232	2,49	L-Acetylcarnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203,115 8	M+H	204,1230	0,9
		N-Lactoylleucine					
205,1264	2,49	3-Mercaptohexyl butyrate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ S	204,118 4	M+H	205,1257	3,6
		Hexyl 3-mercaptopbutanoate					
		L-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,089 9	M+H	205,0972	0,2
133,0972	4,97	Ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	132,089 9	M+H	133,0972	0,3

Descrição: features identificados como principais compostos associados aos dois grupos utilizando conjunto de dados completos para o método HILIC e modo positivo.

* NI: Não identificado. Moléculas em negrito foram confirmadas pelo espectro de MS/MS.

3.4.4 Avaliação de potenciais biomarcadores frente ao conjunto de dados completo – método Fase Reversa

A partir das estratégias multivariadas e considerando o modelo PLS-DA a partir dos dados de VIP, os principais *features* foram selecionados e a tentativa de identificação destes com base na massa exata frente à base de dados HMDB foi realizada. Nos casos em que mais de uma possibilidade foi obtida, os possíveis compostos foram selecionados. A Tabela 5 apresenta os *features* selecionados quando utilizado a estratégia dos quatro grupos. Já na Tabela 6 foi utilizada a abordagem de apenas dois grupos, onde grande parte dos *features* selecionados já haviam sido identificados na Tabela 5.

Tabela 5 - Features identificados nos quatro grupos

<i>m/z</i> <i>Exper.</i>	<i>t_R</i> (min)	Composto Proposto	Fórmula Molecular	Massa Monoisotópica	[M+H] ⁺	Aduto <i>m/z</i>	Erro de Massa (ppm)
Grupo 1 - TRF pós intervenção							
114,0665	0,47	Creatinine	C ₄ H ₇ N ₃ O	113,0589	M+H	114,0662	2,5
265,1183	4,29	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	264,1110	M+H	265,1183	0,1
		Phenylacetylglutamine					
		di-Hydroxymelatonin					
		N(2)-phenylacetyl-L-glutamate					
510,3556	8,72	LysoPE(0:0/20:0)	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	509,3481	M+H	510,3554	0,3
160,1333	0,50	Pregabalin	C ₈ H ₁₇ NO ₂	159,1259	M+H	160,1332	0,5
		DL-2-Aminooctanoic acid					
		Valine betaine					
Grupo 2 - Controle pós intervenção							
144,1020	0,52	Proline betaine	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143,0946	M+H	144,1019	0,6
		Dihydroxynortropane					
		L-2-Amino-3-methylenehexanoic acid					
496,3399	8,32	LysoPC(0:0/16:0)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	495,3325	M+H	496,3398	0,2

204,0544	0,50	NI					
497,3431	8,32	NI					
198,0973	0,57	NI					
524,3713	9,13	Platelet-activating factor	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	523,363 8	M+H	524,3711	0,4
		LysoPC(18:0/0:0)					
145,1053	0,52	(S1)-Methoxy-3-heptanethiol	C ₈ H ₁₈ OS	162,107 8	M+H- H ₂ O	145,1051	1,6
166,0839	0,52	Proline betaine	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143,094 6	M+Na	166,0838	0,5
251,1853	4,86	NI					
Grupo 3 - Controle pré intervenção							
204,1231	0,52	L-Acetylcarnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203,115 8	M+H	204,1230	0,5
		N-Lactoylleucine					
520,3400	8,05	LysoPC(0:0/18:2(9Z,12Z))	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	519,332 5	M+H	520,3398	0,4
162,1125	0,47	L-Carnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161,105 2	M+H	162,1125	0,1
166,0863	2,05	5-(3-Pyridyl)-2-hydroxytetrahydrofuran	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,079 0	M+H	166,0863	0,3
		L-Phenylalanine					
544,3399	8,04	LysoPC(0:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	543,332 5	M+H	544,3398	0,2
Grupo 4 - TRF pré intervenção							
258,1101	0,49	Glycerophosphocholine	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	257,102 8	M+H	258,1101	0,1
		Glutamylglutamine	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O 6	275,111 7	M+H-H ₂ O	258,1090	4,2
274,2740	6,59	NI					

Descrição: features identificados como principais compostos associados aos quatro grupos utilizando conjunto de dados completos para o método em fase reversa e modo positivo.

* NI: Não identificado.

Tabela 6 - Features identificados nos dois grupos

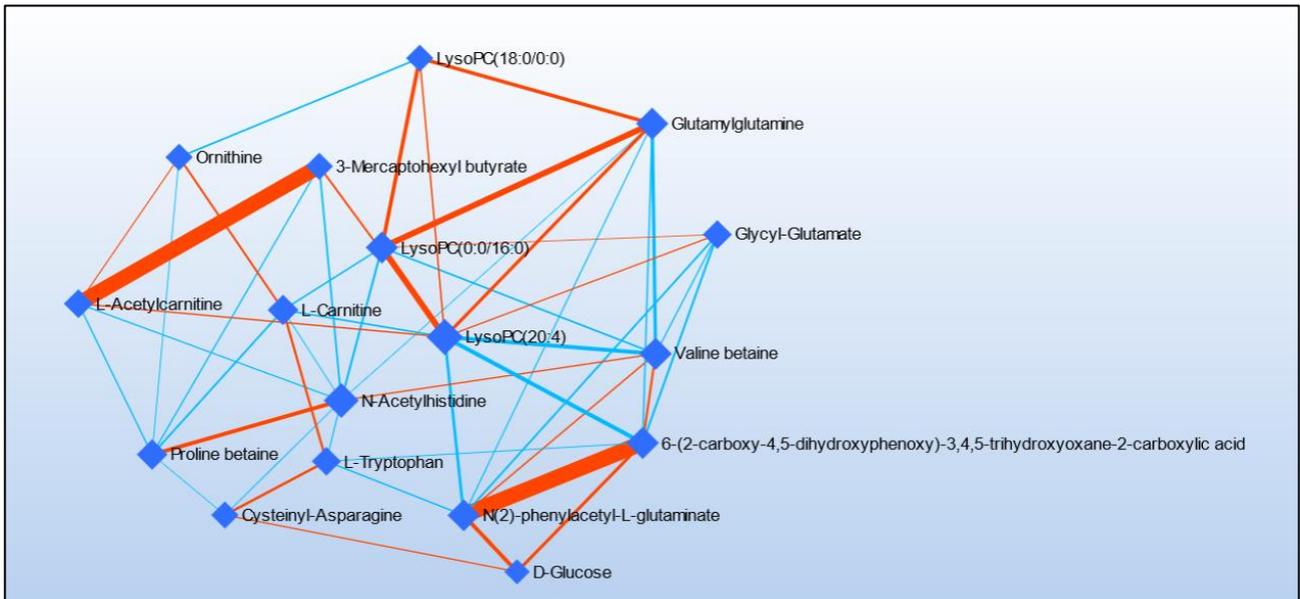
<i>m/z</i> <i>Exper.</i>	<i>t_R</i> (min)	Composto Proposto	Fórmula Molecular	Massa Monoisotópica	[M+H] ⁺	Aduto <i>m/z</i>	Erro de Massa (ppm)
Grupo 1 - TRF pós intervenção							
114,0665	0,52	Creatinine	C ₄ H ₇ N ₃ O	113,0589	M+H	114,0662	2,5
496,3399	8,32	LysoPC(0:0/16:0)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	495,3325	M+H	496,3398	0,2
203,0526	0,50	D-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634	M+Na	203,0526	0,0
524,3713	9,13	Platelet-activating factor	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	523,3638	M+H	524,3711	0,4
		LysoPC(18:0/0:0)					
265,1183	4,29	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	264,1110	M+H	265,1183	0,1
		Phenylacetylglutamine					
		di-Hydroxymelatonin					
		N(2)-phenylacetyl-L-glutamate					
198,0973	0,57	NI					
145,1053	0,52	(S1)-Methoxy-3-heptanethiol	C ₈ H ₁₆ OS	162,1078	M+H-H ₂ O	145,1051	1,6
497,3431	8,32	NI					
166,0839	0,52	Proline betaine	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143,0946	M+Na	166,0838	0,5
Grupo 2 - Controle pós intervenção							
204,1231	0,52	L-Acetylcarnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203,1158	M+H	204,1230	0,5
		N-Lactoylleucine					
205,0972	3,21	L-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,0899	M+H	205,0972	0,2

Descrição: Features identificados como principais compostos associados aos dois grupos utilizando conjunto de dados completos para o método em fase reversa e modo positivo.

*NI: não identificado. Moléculas em negrito foram confirmadas pelo espectro de MS/MS

3.4.5 Rede de associação de topologia dos metabólitos/features

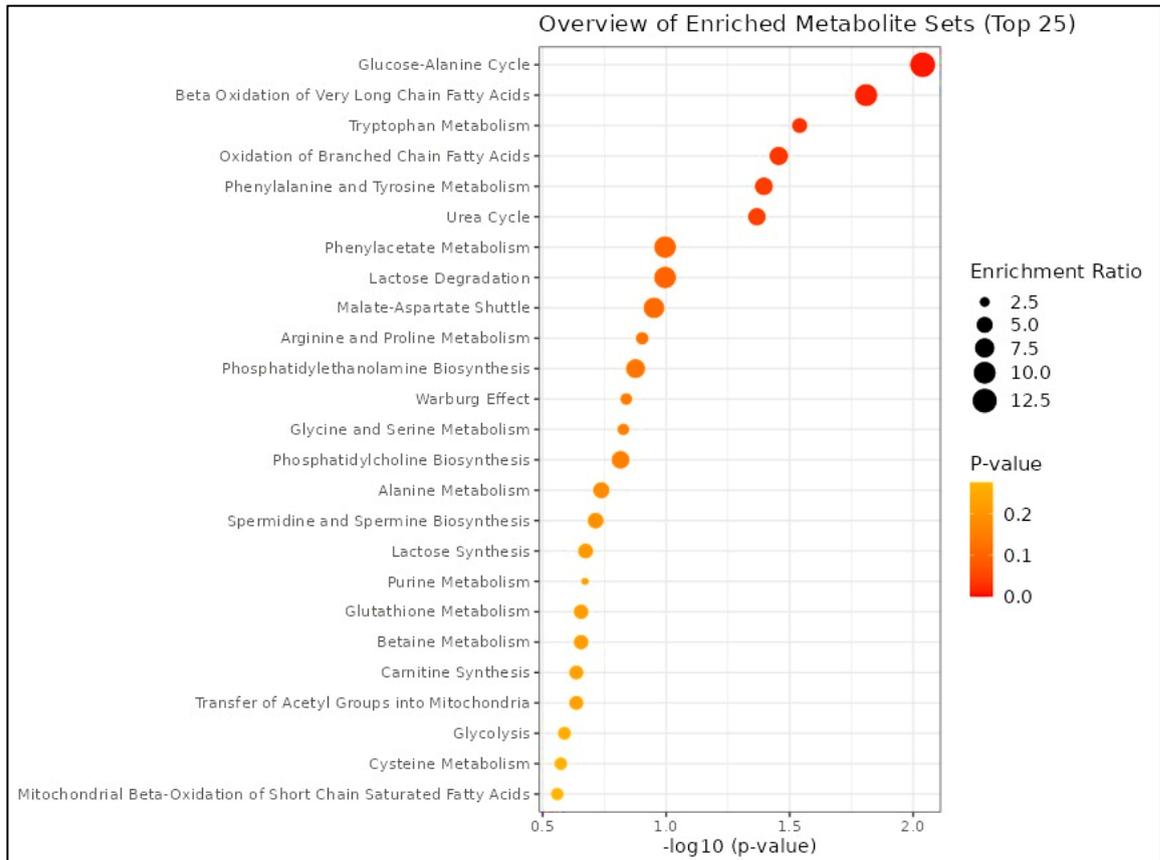
A partir dos features obtidos, apresentados nas tabelas acima, uma associação de topologia em rede foi realizada, utilizando a plataforma *Metaboanalyst 4.0*, no intuito de verificar os metabólitos de maior participação e suas respectivas interações. A Figura 12 que representa essa rede de associação.

FIGURA 12 – Rede de associação de topologia entre features

Descrição: Os features de maior participação são representados por losangos de maior área, assim como as interações mais significativas são apresentadas por linhas mais espessas.

3.4.6 Enriquecimento de Vias

Em seguida, analisamos as vias metabólicas enriquecidas para os grupos usando os conjuntos de metabólitos/features obtidos e por meio do uso do recurso de análise de via que integra análise de enriquecimento com análise de topologia de via (*Metaboanalyst 4.0*) (CHONG et al., 2018). Para isso, utilizamos todos os metabólitos/features que foram obtidos pela análise de ambos os métodos: fase reversa e HILIC. O enriquecimento de via feito pela Metabolite Set Enrichment Analysis é uma maneira de identificar padrões biologicamente que são significativamente enriquecidos em dados metabolômicos quantitativos. Em abordagens convencionais, os metabólitos são avaliados individualmente quanto à sua significância nas condições de estudo. Aqueles compostos que possuem passaram em determinado nível de significância são então combinados para ver se algum padrão significativo pode ser discernido (XIA; WISHART, 2010). Na Figura 13 destacamos o gráfico de resumo para análise de sobre-representação das vias significativamente enriquecidas. O relatório de análise total obtido pela plataforma *Metaboanalyst* encontra-se em ANEXO 1. As vias com mais significância de enriquecimento foram o ciclo de glicose-alanina; beta-oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa; e metabolismo do triptofano.

FIGURA 13 – Vias metabólicas significativamente enriquecidas

Descrição: as via de maior impacto estão representados em ordem decrescente de cima para baixo.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os efeitos de uma intervenção de três meses de TRF sobre parâmetros metabólicos, antropométricos e metabolômicos. O TRF mostrou-se uma intervenção eficaz para promover a perda de peso, reduzir o perímetro de cintura, mas não apresentou alterações significativas nos biomarcadores sanguíneos associados ao perfil metabólico e no Z-MetS, mesmo em uma análise intencional por peso perdido, contrariando a hipótese inicial do estudo. Na análise metabolômica, as vias que participam do metabolismo energético estão em grande parte presentes em mulheres que se submeteram ao programa de TRF. Nossa análise de rede de tipologia e de enriquecimento de vias parecem demonstrar que o metabolismo de lipídios e de glicose possuem participações importantes no TRF. Nossos achados demonstraram o ciclo da glicose-alanina,

popularmente conhecido por ciclo de Cori, e beta (β) oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa foram significativamente enriquecidos. Essas vias podem explicar alterações no metabolismo que ocorrem sob condições de TRF e perda de peso e que não podem ser determinadas pelas alterações em biomarcadores metabólicos clássicos ou pelo Z-MetS.

Nossos achados diferem de resultados anteriores em que o TRF promoveu alterações em biomarcadores sanguíneos e em parâmetros metabólicos (glicemia, HDL, LDL, colesterol, entre outros) (SUTTON et al., 2018; WILKINSON et al., 2020). O ensaio clínico randomizado TREAT (n=116), com duração de 12 semanas, relatou achados semelhantes, sem alterações na insulina de jejum e na glicemia em um protocolo de alimentação com restrição de tempo de 16:8 h em adultos com excesso de peso (LOWE et al., 2020). Nossos achados divergem de outros que demonstraram uma eficácia do TRF em melhorar alguns parâmetros metabólicos independente da perda de peso (SUTTON et al., 2018). Ensaio clínico prévios demonstraram que Z-MetS é uma ferramenta adequada para o monitoramento dos resultados em programas de mudanças do estilo de vida (DEBOER; FILIPP; GURKA, 2018; DIETZ DE LOOS et al., 2021). No ensaio clínico PROPEL (*Promoting Successful Weight Loss in Primary Care in Louisiana*), uma intervenção de 2 anos na mudança de estilo de vida, a partir de dietas hipocalóricas, promoveu uma redução de 0,2 pontos no Z-MetS. A divergência dos resultados pode ser devido ao tempo relativamente curto de nosso estudo ou ao reduzido número amostral.

É amplamente aceito que a obesidade está associada à mortalidade por todas as causas e ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares em adultos de meia-idade (GLOBAL BMI MORTALITY COLLABORATION et al., 2016; SUN et al., 2019). Além disso, o excesso de peso *per se*, sem a presença de biomarcadores sanguíneos alterados, é um fator independente relacionado ao aumento da mortalidade e eventos cardiovasculares (STEFAN et al., 2013; HSUEH et al., 2020). Em relação a síndrome metabólica, diretrizes e estudos destacam a obesidade como fator central e primordial, portanto, medidas dietéticas devem ser prontamente ofertadas (KASSI et al., 2011; DOBROWOLSKI et al., 2022). Nosso estudo incluiu mulheres de meia-idade, com carga de severidade de MetS (Z-MetS) relativamente baixa (TABELA 1). Dessa forma, resultados mais importantes e/ou significativos poderiam ser esperados em mulheres com maior carga de severidade da MetS. Podemos inferir que nosso estudo incluiu mulheres no estágio inicial de desenvolvimento de MetS, sendo assim, o objetivo clínico central seria a redução do peso

e da circunferência de cintura, visando a promoção da prevenção primária no contexto de saúde.

Em nossa análise metabolômica não direcionada, destacamos vias que foram significativamente enriquecidas após um período de 3 meses de TRF: via da β -Oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa; ciclo da glicose-alanina; via da biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. Essas vias podem estar envolvidas no processo de perda de peso e podem impactar significativamente na melhora da saúde metabólica.

4.1 Via da β -Oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa

Em nosso estudo a β -oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa mostrou-se uma via potencialmente enriquecida. A β -oxidação de ácidos graxos mitocondriais é a principal via de degradação de ácidos graxos e é essencial para a manutenção da homeostase energética no corpo humano. Os ácidos graxos são uma fonte de energia crucial no estado de jejum, quando o suprimento de glicose é limitado (HOUTEN et al., 2016). O mecanismo dessa via está no cerne de alterações metabólicas que ocorrem durante a perda de peso; é plausível sugerir que ácidos graxos são mobilizados dos triglicerídeos dos adipócitos e utilizados como fonte energético em um organismo sobre condições de restrição energética (HALL et al., 2015). Até 50-70% da energia, na forma de produção de ATP, vem da beta-oxidação de ácidos graxos. Durante a β -oxidação de ácidos graxos, as moléculas de acil-CoA de cadeia longa (os principais componentes dos ácidos graxos) são quebradas em moléculas de acetil-CoA. Os ácidos graxos são ativados para degradação por conjugação com a coenzima A (CoA) no citosol. O acil-CoA graxo de cadeia longa é então modificado pela carnitina palmitoiltransferase 1 em acilcarnitina e transportado através da membrana mitocondrial interna pela carnitina translocase. O carnitina palmitoiltransferase 2 então converte a acilcarnitina de cadeia longa de volta para acil-CoA de cadeia longa antes da beta-oxidação (VOCKLEY, 2020; RIBAS; VARGAS, 2022). Não é objetivo deste texto discutir todas as etapas bioquímicas da beta-oxidação, para isso sugerimos outras referências (HOUTEN et al., 2016; RUPASINGHE et al., 2016).

Em nossa análise a via da síntese de carnitina também demonstrou enriquecimento significativo (FIGURA 13), uma vez que as carnitinas estão envolvidas no transporte

mitocondrial de ácidos graxos e são de importância crítica para manter a função mitocondrial normal, é possível sugerir a as carnitinas desempenham papel essencial no emagrecimento (SHARMA; BLACK, 2009). Tomado esse papel metabólico das carnitinas, uma série de ensaios clínicos demonstraram modestas reduções de peso corporal e massa adiposa com a suplementação de L-carnitina (TALENEZHAD et al., 2020). Outras evidências advindas de ensaios clínicos demonstram que a L-carnitina pode melhorar biomarcadores associados a MetS, como glicemia, triglicerídeos e HDL-c (CHOI; PARK; LEE, 2020).

4.2 Ciclo da Glicose-Alanina

O ciclo da glicose-alanina representa uma integração entre o metabolismo de carboidratos e aminoácidos e compreende uma série de reações nas quais o piruvato, derivado principalmente da glicólise intramuscular, é transaminado com amônia, derivada do catabolismo de proteínas musculares, para formar alanina. Esta é subsequentemente transportada para o fígado, onde o grupo amino é transferido para o α -cetoglutarato pela alanina transaminase para formar glutamato e piruvato. O grupo amino, que foi transferido da alanina para o glutamato, é subsequentemente convertido em ureia (que passará a fazer parte do ciclo da ureia, outra via enriquecida em nossa análise), e o piruvato recém-gerado é convertido em glicose (FELIG, 1973; ADEVA-ANDANY et al., 2016).

O estado de jejum, como durante um protocolo de TRF, requer um *crosstalk* endócrino e metabólico complexo entre órgãos, que envolve a mudança da glicose para a oxidação de ácidos graxos, derivados da lipólise do tecido adiposo, a fim de preservar a glicose para o cérebro (SARABHAI; RODEN, 2019). Nesse intuito, o ciclo glicose-alanina é crítico para a gliconeogênese hepática e sistêmica. Durante um estado de jejum, o fígado muda do armazenamento de glicogênio para a produção de glicose pela degradação do glicogênio, bem como pela gliconeogênese a partir de precursores não-carboidratos, como o piruvato advindo do metabolismo da alanina (PAULUSMA et al., 2022; SARABHAI; RODEN, 2019). Esse estado constante de funcionamento do ciclo da alanina, e consequente gliconeogênese, pode explicar a falta de mudanças significativas nos níveis de glicemia (TABELA 2) em ambos os grupos de estudo. Estudo em modelo animal demonstra que a alanina atua como um sensor de energia hepático ativando a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), reconhecida como um importante sensor de nutrientes

que contribui para a regulação do metabolismo celular, tecidual e sistêmico (ADACHI et al., 2018). Dessa forma, a alanina pode se mostrar importantes na melhora da tolerância à glicose e, conseqüentemente, na melhora de aspectos metabólicos, mesmo sem alterações no Z-MetS.

Integrado ao metabolismo da glicose-alanina, o metabolismo de D-Glutamina e D-glutamato, parece possuir implicações importantes na melhora do perfil metabólico. A glutamina, um aminoácido não essencial, está presente em abundância em todo o corpo e envolvido em muitos processos metabólicos. É sintetizada a partir do glutamato (ácido glutâmico) e da amônia. A glutamina é considerada um dos principais transportadores de nitrogênio no corpo e é uma importante fonte de energia para muitas células (CURI et al., 2005). Além disso, parece desempenhar papel no fornecimento de intermediários para o ciclo do ácido tricarboxílico e participar do transporte de amônia, que é crítica para manter o equilíbrio geral de nitrogênio (YANG et al., 2014; YOO et al., 2020).

Petrus et al. (2020) ao analisarem metabólitos de amostras de tecido adiposo humano, descobriram que a glutamina era o fator mais acentuadamente reduzido em obesos. Desta forma, combinando estudos em culturas de células humanas e em camundongos, eles observaram que a glutamina reconfigurava o metabolismo de células do tecido adiposo e reduzia a expressão de genes inflamatórios. Os níveis reduzidos de glutamina nos adipócitos induzem um aumento dos níveis de difosfato de uridina N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) por meio da indução da glicólise e das vias biossintéticas da hexosamina. Isso promove a O-GlcNAcylation nuclear, uma modificação pós-tradução que ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios. Sendo assim, sugerem que a glutamina pode atenuar a inflamação adiposa e melhorar a função do tecido adiposo na obesidade. É possível sugerir que a atrofia dos adipócitos, comumente observada após a perda de peso, aumente a expressão de glutamina sintetase, por meio de mecanismos ainda desconhecidos, e conseqüentemente, aumenta a conversão de glutamato em glutamina, resultando em níveis aumentados de glutamina intracelular, o que confere redução da atividade transcricional de genes pró-inflamatórios e, conseqüentemente, melhorar o perfil metabólico (LECOUTRE et al., 2020; MACLEAN et al., 2015).

Cheng et al. (2012) buscando uma compreensão mais detalhada das vias bioquímicas analisaram a metabolômica em amostras de 1761 indivíduos (IMC = 28.3 ± 5 , média \pm desvio padrão) de duas coortes clínicas e encontraram associações particularmente fortes de traços de resistência à insulina com diminuição da glutamina e aumento do

glutamato. Acompanhando esses achados em modelos experimentais eles demonstraram que a administração de glutamina em camundongos resultou em aumento da tolerância à glicose e redução da pressão arterial. Tomados em conjunto, esses dados clínicos e experimentais destacam a via metabólica glutamina-glutamato como um alvo potencial para intervenções destinadas a atenuar o risco metabólico em humanos. Em nosso estudo, esta via pode explicar mudanças primordiais que ocorrem no metabolismo de pessoas com sobrepeso e/ou obesidade, mas que não foram sensíveis a mensurações por meio do Z-MetS. Apesar de não termos encontrados mudanças significativas em biomarcadores clássicos popularmente usados no ambiente clínico (colesterol total, triglicerídeos, glicose...), mudanças no metabolismo da glutamina-glutamato podem estar no cerne da melhora do perfil metabólica em mulheres obesas com a perda de peso.

O papel da glutamina durante a perda de peso é demonstrado em estudos com a suplementação do composto. Um estudo demonstrou que a suplementação com glutamina reduziu a ação da insulina e a captação de glicose no tecido adiposo, o que melhora a ação e a sinalização da insulina no fígado e músculo de ratos. Além disso, um estudo de prova de conceito mostrou que, em humanos, a suplementação de glutamina por um curto período é acompanhada por uma redução na circunferência da cintura (ABBOUD et al., 2019).

4.3 Via da biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano

Os AAs aromáticos como triptofano (TRP), tirosina e fenilalanina são importantes precursores de neurotransmissores monoaminérgicos, incluindo serotonina (5-HT), dopamina, norepinefrina e epinefrina. Essas monoaminas são conhecidas por participarem de uma ampla gama de processos fisiológicos e desempenharem papéis cruciais na regulação de funções comportamentais e emocionais (ZHANG et al., 2022). É conhecido que a obesidade está associada à diminuição da sinalização central dopaminérgica e serotoninérgica (VAN GALEN et al., 2018).

Na obesidade está presente uma inflamação crônica de baixo grau sistêmica que muitas vezes proporciona uma degradação do TRP. Este pode ser metabolizado por meio de diferentes vias, sendo uma rota principal a via da quinurenina (KYN). Foi demonstrado que adultos obesos apresentam uma maior relação KYN/TRP e níveis mais baixos de serotonina (5-HT) em relação ao não obesos (CUSSOTTO et al., 2020). O aumento da

produção de citocinas pró-inflamatórias na obesidade provavelmente está envolvido na indução da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO). A IDO é responsável pelo catabolismo do TRP ao longo da via KYN, provavelmente resultando na redução da síntese de 5-HT. A IDO está associada a obesidade em homens e mulheres e no aparecimento de sinais de aterosclerose (NIINISALO et al., 2021). Dessa forma, o enriquecimento da via de biossíntese de fenilalanina, tirosina e TRP após o protocolo de TRF em nosso estudo pode ser advindo de possíveis redução de citocinas pró-inflamatórias após a perda de peso e pode ser um potencial contribuinte para melhora da MetS e, conseqüente, redução de eventos adversos cardiovasculares.

A obesidade resulta de uma ingestão de energia que excede o gasto de energia. A este respeito, postulou-se que a inibição homeostática atenuada e/ou impulso hedônico (impulso pelo prazer ou associado aos comportamentos recompensadores) aumentado para o consumo de energia contribui para a ingestão de alimentos além das necessidades homeostáticas (CAMPOS; PORT; ACOSTA, 2022). Como a sinalização serotoninérgica desempenha um papel importante na regulação da ingestão de alimentos, a interrupção na sinalização serotoninérgica pode contribuir para a patogênese do comportamento alimentar perturbado em indivíduos com sobrepeso ou obesidade crônica. De fato, dados de vários estudos indicam que a sinalização serotoninérgica é perturbada em animais e humanos com obesidade (VAN GALEN; TER HORST; SERLIE, 2021). Em nosso estudo, o enriquecimento da via de biossíntese de fenilalanina, tirosina e TRP pode sugerir um potencial benefício na sinalização serotoninérgica advindo de um protocolo de TRF e conseqüente redução do peso corporal, isso pode implicar em melhores comportamentos de ingestão alimentar, e conseqüentemente, melhora no humor e qualidade de vida. Além disso, o TRP é um integrador fisiológico que regula os ciclos circadianos (PETRUS et al., 2022). Dessa forma, é possível sugerir que a manipulação do tempo de refeição pelo TRF no qual promoveu restrição energética completa entre 20:00h e 12:00h promova mudanças nos ciclos circadianos fisiológicos. Mais detalhes sobre essas mudanças ainda estão por ser explorados.

4.4 Relevância clínica

O sobrepeso ou obesidade, que se desenvolve sob um balanço energético positivo crônico, são caracterizados pelo acúmulo de tecido adiposo e aumento da massa corporal. Portanto, a redução desse excesso de massa adiposa é o principal objetivo da abordagem clínica da prevenção primária da MetS (GADDE et al., 2018; HEYMSFIELD; WADDEN, 2017). O TRF pode ser uma estratégia eficiente para promover a perda de peso e reduzir o perímetro de cintura naqueles indivíduos que não conseguem aderir a dietas que alteram o padrão nutricional diária do indivíduo. Além disso, pode ser uma estratégia que demanda menor tempo para implantação e explicação ao paciente no contexto clínico de atendimento em saúde. Em indivíduos com baixa carga severidade de MetS, avaliados por meio do Z-MetS, alterações a nível da análise metabólica podem ocorrer previamente às alterações em biomarcadores clínicos clássicos e podem contribuir para melhora do perfil metabólico e redução de eventos adversos futuros.

4.2 Limitações

Este estudo não foi um ensaio clínico randomizado e não inclui aspectos nutricionais detalhados da dieta dos sujeitos da amostra, pois encontramos dados conflitantes relatados pelos indivíduos, como descrição incompleta da quantidade de alimentos ingeridos, frequência das refeições e tipo de alimentos (ex.: tipo de arroz ingerido). No entanto, o autorrelato da ingestão alimentar pode diferir ou subestimar o valor real, oferecendo uma análise inconclusiva e enganosa (SCHOELLER et al., 2013; DHURANDHAR et al., 2015). A restrição energética é o principal fator que leva à perda de peso independentemente do tipo de dieta (FREIRE, 2020). Portanto, é viável supor que foi alcançada uma redução na energia total consumida, considerando que o gasto energético se manteve constante.

Em nosso estudo selecionamos intencionalmente um grupo amostral que obteve maior perda de peso com o protocolo de TRF. Esse viés de seleção amostral pode limitar nossos resultados para outras pessoas que não alcançam a mesma perda de peso. Kloecker et al., (2019), em uma meta-análise, demonstraram uma dose-resposta entre perda de peso e redução na ingestão de energia. Portanto, pode-se supor que a perda de peso foi maior naquelas mulheres que apresentaram mais déficit no balanço energético.

Uma análise metabólica não direcionada após 3 meses de um protocolo de TRF foi realizada com uma ideia inicial de analisar os efeitos crônicos dessa intervenção. Porém, como grande parte das mulheres permaneciam realizando TRF, mesmo após o fim do protocolo e na fase da segunda coleta. Não podemos distinguir se nossos achados

representam efeitos crônicos ou agudos da TRF. Por fim, nosso estudo envolveu a análise do metaboloma do plasma, resultados diferentes podem ser esperados ao realizar a análise em outros tecidos, como músculos, fígado ou tecido adiposo.

5 CONCLUSÃO

O TRF é uma estratégia dietética eficaz para promover a perda de peso e diminuir o perímetro de cintura sem alterar o Z-MetS. Na análise metabolômica, as vias que participam do metabolismo energético estão em grande parte presentes em mulheres que se submeteram ao programa de TRF e podem participar de processos fisiológicos na perda de peso e melhora do perfil metabólica. O ciclo da glicose-alanina e β -oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa foram significativamente enriquecidos e podem implicar em alterações metabólicas importantes durante a perda de peso, contribuindo para a promoção da prevenção primária no contexto do sobrepeso e obesidade.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, K. Y. et al. Oral Glutamine Supplementation Reduces Obesity, Pro-Inflammatory Markers, and Improves Insulin Sensitivity in DIO Wistar Rats and Reduces Waist Circumference in Overweight and Obese Humans. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 536, 1 mar. 2019.
- ABU BAKAR, M. H. et al. Metabolomics - the complementary field in systems biology: a review on obesity and type 2 diabetes. **Molecular bioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1742–1774, jul. 2015.
- ADACHI, Y. et al. L-Alanine activates hepatic AMP-activated protein kinase and modulates systemic glucose metabolism. **Molecular Metabolism**, v. 17, p. 61–70, nov. 2018.
- ADAMS, S. H. Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 2, n. 6, p. 445–456, nov. 2011.
- ADEVA-ANDANY, M. M. et al. Liver glucose metabolism in humans. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 6, p. e00416, dez. 2016.
- AGUILAR, M. et al. Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. **JAMA**, v. 313, n. 19, p. 1973–1974, 19 maio 2015.
- ALEKSANDROVA, K. et al. Omics Biomarkers in Obesity: Novel Etiological Insights and Targets for Precision Prevention. **Current Obesity Reports**, v. 9, n. 3, p. 219–230, set. 2020.
- BADOUD, F. et al. Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 29, n. 3, p. 748–758, mar. 2015.
- BARBOSA, L. Feijão com arroz e arroz com feijão: o Brasil no prato dos brasileiros. **Horizontes Antropológicos**, v. 13, p. 87–116, dez. 2007.
- BULL, F. C. et al. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. **British Journal of Sports Medicine**, v. 54, n. 24, p. 1451–1462, dez. 2020.
- CALEYACHETTY, R. et al. Metabolically Healthy Obese and Incident Cardiovascular Disease Events Among 3.5 Million Men and Women. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 12, p. 1429–1437, 19 set. 2017.

CAMPOS, A.; PORT, J. D.; ACOSTA, A. Integrative Hedonic and Homeostatic Food Intake Regulation by the Central Nervous System: Insights from Neuroimaging. **Brain Sciences**, v. 12, n. 4, p. 431, 24 mar. 2022.

CAÑETE, R. et al. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. **European Journal of Nutrition**, v. 46, n. 4, p. 181–187, jun. 2007.

CANUTO, G. A. B. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, v. 41, p. 75–91, jan. 2018.

CHENG, S. et al. Metabolite Profiling Identifies Pathways Associated with Metabolic Risk in Humans. **Circulation**, v. 125, n. 18, p. 2222–2231, 8 maio 2012.

CHOI, M.; PARK, S.; LEE, M. L-Carnitine's Effect on the Biomarkers of Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2795, 12 set. 2020.

CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W486–W494, 2 jul. 2018.

CIRULLI, E. T. et al. Profound Perturbation of the Metabolome in Obesity Is Associated with Health Risk. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 488- 500.e2, 5 fev. 2019.

CURI, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, n. 2, p. 392–401, ago. 2005.

CUSSOTTO, S. et al. Tryptophan Metabolic Pathways Are Altered in Obesity and Are Associated With Systemic Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

DEBOER, M. D.; FILIPP, S. L.; GURKA, M. J. Use of a Metabolic Syndrome Severity Z Score to Track Risk During Treatment of Prediabetes: An Analysis of the Diabetes Prevention Program. **Diabetes Care**, v. 41, n. 11, p. 2421–2430, nov. 2018.

DEBOER, M. D.; GURKA, M. J. Clinical utility of metabolic syndrome severity scores: considerations for practitioners. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 10, p. 65–72, 2017.

DHURANDHAR, N. V. et al. Energy Balance Measurement: When Something is Not Better than Nothing. **International journal of obesity (2005)**, v. 39, n. 7, p. 1109–1113, jul. 2015.

DIETZ DE LOOS, A. et al. Metabolic health during a randomized controlled lifestyle intervention in women with PCOS. **European Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 1, p. 53–64, 30 nov. 2021.

DINU, M. et al. Effects of Popular Diets on Anthropometric and Cardiometabolic Parameters: An Umbrella Review of Meta-Analyses of Randomized Controlled Trials. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 11, n. 4, p. 815–833, 1 jul. 2020.

DOBROWOLSKI, P. et al. Metabolic syndrome – a new definition and management guidelines. **Archives of Medical Science : AMS**, v. 18, n. 5, p. 1133–1156, 30 ago. 2022.

ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 1–17, 2017.

FELIG, P. The glucose-alanine cycle. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 22, n. 2, p. 179–207, fev. 1973.

FIEHN, O. et al. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. **PloS One**, v. 5, n. 12, p. e15234, 10 dez. 2010.

FREIRE, R. Scientific evidence of diets for weight loss: Different macronutrient composition, intermittent fasting, and popular diets. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 69, p. 110549, jan. 2020.

GADDE, K. M. et al. Obesity: Pathophysiology and Management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 1, p. 69–84, 2 jan. 2018.

GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13–27, 6 jul. 2017.

GE, L. et al. Comparison of dietary macronutrient patterns of 14 popular named dietary programmes for weight and cardiovascular risk factor reduction in adults: systematic review and network meta-analysis of randomised trials. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 369, p. m696, 1 abr. 2020.

GEIDENSTAM, N. et al. Metabolite profiling of obese individuals before and after a one year weight loss program. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 41, n. 9, p. 1369–1378, set. 2017.

GIBNEY, M. J. et al. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 3, p. 497–503, set. 2005.

GIL-CAMPOS, M.; CAÑETE, R. R.; GIL, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 23, n. 5, p. 963–974, out. 2004.

GLOBAL BMI MORTALITY COLLABORATION, NULL et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. **Lancet (London, England)**, v. 388, n. 10046, p. 776–786, 20 ago. 2016.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 433–438, 27 jan. 2004.

- GURKA, M. J. et al. An examination of sex and racial/ethnic differences in the metabolic syndrome among adults: a confirmatory factor analysis and a resulting continuous severity score. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 2, p. 218–225, fev. 2014.
- GURKA, M. J. et al. Assessing Baseline and Temporal Changes in Cardiometabolic Risk Using Metabolic Syndrome Severity and Common Risk Scores. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 16, p. e009754, 21 ago. 2018.
- HALL, K. D. et al. Calorie for Calorie, Dietary Fat Restriction Results in More Body Fat Loss than Carbohydrate Restriction in People with Obesity. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 3, p. 427–436, 1 set. 2015.
- HE, S. et al. Intermittent Versus Continuous Energy Restriction for Weight Loss and Metabolic Improvement: A Meta-Analysis and Systematic Review. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 29, n. 1, p. 108–115, jan. 2021.
- HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 254–266, 19 jan. 2017.
- HÖCHSMANN, C. et al. Effects of a 2-Year Primary Care Lifestyle Intervention on Cardiometabolic Risk Factors: A Cluster-Randomized Trial. **Circulation**, v. 143, n. 12, p. 1202–1214, 23 mar. 2021.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 14 dez. 2006.
- HOUTEN, S. M. et al. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. **Annual Review of Physiology**, v. 78, p. 23–44, 2016b.
- HSUEH, Y. et al. Association of metabolically healthy obesity and elevated risk of coronary artery calcification: a systematic review and meta-analysis. **PeerJ**, v. 8, p. e8815, 26 mar. 2020.
- JOHNSTONE, A. Fasting for weight loss: an effective strategy or latest dieting trend? **International Journal of Obesity (2005)**, v. 39, n. 5, p. 727–733, maio 2015.
- KANG, M. et al. Metabolomics identifies increases in the acylcarnitine profiles in the plasma of overweight subjects in response to mild weight loss: a randomized, controlled design study. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 237, 15 out. 2018.
- KASSI, E. et al. Metabolic syndrome: definitions and controversies. **BMC medicine**, v. 9, p. 48, 5 maio 2011.
- KIM, J. Y. et al. Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 9, p. 4368–4375, 3 set. 2010.

KLOECKER, D. E. et al. Efficacy of low- and very-low-energy diets in people with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of interventional studies.

Diabetes, Obesity & Metabolism, v. 21, n. 7, p. 1695–1705, jul. 2019.

KOLB, H. Obese visceral fat tissue inflammation: from protective to detrimental? **BMC Medicine**, v. 20, 2022.

KOUVARI, M. et al. Transition from metabolically benign to metabolically unhealthy obesity and 10-year cardiovascular disease incidence: The ATTICA cohort study. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 93, p. 18–24, abr. 2019.

LEAL-WITT, M. J. et al. Untargeted metabolomics identifies a plasma sphingolipid-related signature associated with lifestyle intervention in prepubertal children with obesity.

International Journal of Obesity (2005), v. 42, n. 1, p. 72–78, jan. 2018.

LECOUTRE, S. et al. Glutamine metabolism in adipocytes: a bona fide epigenetic modulator of inflammation. **Adipocyte**, v. 9, n. 1, p. 620–625, dez. 2020.

LIU, D. et al. Calorie Restriction with or without Time-Restricted Eating in Weight Loss.

The New England Journal of Medicine, v. 386, n. 16, p. 1495–1504, 21 abr. 2022.

LOWE, D. A. et al. Effects of Time-Restricted Eating on Weight Loss and Other Metabolic Parameters in Women and Men With Overweight and Obesity: The TREAT Randomized Clinical Trial. **JAMA internal medicine**, v. 180, n. 11, p. 1491–1499, 1 nov. 2020.

MA, C. et al. Effects of weight loss interventions for adults who are obese on mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and meta-analysis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 359, p. j4849, 14 nov. 2017.

MACLEAN, P. S. et al. The role for adipose tissue in weight regain after weight loss.

Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity, v. 16 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 45–54, fev. 2015.

MIHALIK, S. J. et al. Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: evidence for enhanced mitochondrial oxidation.

Diabetes Care, v. 35, n. 3, p. 605–611, mar. 2012.

MOORE, S. C. et al. Human metabolic correlates of body mass index. **Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society**, v. 10, n. 2, p. 259–269, 1 abr. 2014.

MORO, T. et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 290, 13 out. 2016.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. **Lancet (London, England)**, v. 390, n. 10113, p. 2627–2642, 16 dez. 2017.

- NIINISALO, P. et al. IDO activity forecasts obesity in males and premenopausal females in a 10-year follow-up study: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Atherosclerosis**, v. 336, p. 32–38, 1 nov. 2021.
- PALAU-RODRIGUEZ, M. et al. Effects of a long-term lifestyle intervention on metabolically healthy women with obesity: Metabolite profiles according to weight loss response. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 39, n. 1, p. 215–224, jan. 2020.
- PARK, S.; SADANALA, K. C.; KIM, E.-K. A Metabolomic Approach to Understanding the Metabolic Link between Obesity and Diabetes. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 7, p. 587–596, jul. 2015.
- PAULUSMA, C. C. et al. Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited. **Biochemical Pharmacology**, v. 201, p. 115074, jul. 2022.
- PEREZ-CORNAGO, A. et al. Metabolomics identifies changes in fatty acid and amino acid profiles in serum of overweight older adults following a weight loss intervention. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 593–602, jun. 2014.
- PETRUS, P. et al. Glutamine Links Obesity to Inflammation in Human White Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 375–390.e11, 4 fev. 2020.
- PETRUS, P. et al. Tryptophan metabolism is a physiological integrator regulating circadian rhythms. **Molecular Metabolism**, v. 64, p. 101556, out. 2022.
- PUTRI, S. P. et al. Current metabolomics: technological advances. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 9–16, jul. 2013.
- RANGEL-HUERTA, O. D.; GIL, A. Nutrimetabolomics: An Update on Analytical Approaches to Investigate the Role of Plant-Based Foods and Their Bioactive Compounds in Non-Communicable Chronic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. E2072, 9 dez. 2016.
- RAUSCHERT, S. et al. Early Life Factors, Obesity Risk, and the Metabolome of Young Adults. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 25, n. 9, p. 1549–1555, set. 2017.
- RIBAS, G. S.; VARGAS, C. R. Evidence that Oxidative Disbalance and Mitochondrial Dysfunction are Involved in the Pathophysiology of Fatty Acid Oxidation Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 3, p. 521–532, abr. 2022.
- RUPASINGHE, H. P. V. et al. Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 165, p. 153–163, set. 2016.
- SANDSDAL, R. M. et al. Combination of exercise and GLP-1 receptor agonist treatment reduces severity of metabolic syndrome, abdominal obesity, and inflammation: a randomized controlled trial. **Cardiovascular Diabetology**, v. 22, n. 1, p. 41, 25 fev. 2023.

SARABHAI, T.; RODEN, M. Hungry for your alanine: when liver depends on muscle proteolysis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 11, p. 4563–4566, 1 nov. 2019.

SCHOELLER, D. A. et al. Self-report–based estimates of energy intake offer an inadequate basis for scientific conclusions. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 6, p. 1413–1415, jun. 2013.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C. et al. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1897–1905, dez. 2016.

SCHRODER, J. D. et al. Effects of time-restricted feeding in weight loss, metabolic syndrome and cardiovascular risk in obese women. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 3, 6 jan. 2021.

SHARMA, S.; BLACK, S. M. CARNITINE HOMEOSTASIS, MITOCHONDRIAL FUNCTION, AND CARDIOVASCULAR DISEASE. **Drug discovery today. Disease mechanisms**, v. 6, n. 1–4, p. e31–e39, 2009.

STEFAN, N. et al. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. **The Lancet. Diabetes & Endocrinology**, v. 1, n. 2, p. 152–162, out. 2013.

SUN, Y. et al. Association of Normal-Weight Central Obesity With All-Cause and Cause-Specific Mortality Among Postmenopausal Women. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 7, p. e197337, 24 jul. 2019.

SUTTON, E. F. et al. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even Without Weight Loss in Men with Prediabetes. **Cell metabolism**, v. 27, n. 6, p. 1212- 1221.e3, 5 jun. 2018.

TALENEZHAD, N. et al. Effects of l-carnitine supplementation on weight loss and body composition: A systematic review and meta-analysis of 37 randomized controlled clinical trials with dose-response analysis. **Clinical nutrition ESPEN**, v. 37, p. 9–23, jun. 2020.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, out. 2006.

VAN GALEN, K. A. et al. The role of central dopamine and serotonin in human obesity: lessons learned from molecular neuroimaging studies. **Metabolism**, v. 85, p. 325–339, 1 ago. 2018.

VAN GALEN, K. A.; TER HORST, K. W.; SERLIE, M. J. Serotonin, food intake, and obesity. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 22, n. 7, p. e13210, jul. 2021.

VOCKLEY, J. Long-chain fatty acid oxidation disorders and current management strategies. **The American Journal of Managed Care**, v. 26, n. 7 Suppl, p. S147–S154, ago. 2020.

WILKINSON, M. J. et al. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 92- 104.e5, 7 jan. 2020.

WILLIAMS, B. et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 36, n. 10, p. 1953–2041, out. 2018.

WING, R. R. et al. Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 7, p. 1481–1486, jul. 2011.

XIA, J.; WISHART, D. S. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Web Server issue, p. W71-77, jul. 2010.

YANG, C. et al. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. **Molecular Cell**, v. 56, n. 3, p. 414–424, 6 nov. 2014.

YOO, H. C. et al. Glutamine reliance in cell metabolism. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1496–1516, set. 2020.

ZHANG, X. et al. Dietary tryptophan, tyrosine, and phenylalanine depletion induce reduced food intake and behavioral alterations in mice. **Physiology & Behavior**, v. 244, p. 113653, 1 fev. 2022.

ZHOU, Z. et al. Are people with metabolically healthy obesity really healthy? A prospective cohort study of 381,363 UK Biobank participants. **Diabetologia**, v. 64, n. 9, p. 1963–1972, set. 2021.

ANEXO 1

Metabolomic Data Analysis with MetaboAnalyst 5.0

Name: guest1199084766715613791

March 14, 2023

1 Background

MSEA or Metabolite Set Enrichment Analysis is a way to identify biologically meaningful patterns that are significantly enriched in quantitative metabolomic data. In conventional approaches, metabolites are evaluated individually for their significance under conditions of study. Those compounds that have passed certain significance level are then combined to see if any meaningful patterns can be discerned. In contrast, MSEA directly investigates if a set of functionally related metabolites without the need to preselect compounds based on some arbitrary cut-off threshold. It has the potential to identify subtle but consistent changes among a group of related compounds, which may go undetected with the conventional approaches.

Essentially, MSEA is a metabolomic version of the popular GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) software with its own collection of metabolite set libraries as well as an implementation of user-friendly web-interfaces. GSEA is widely used in genomics data analysis and has proven to be a powerful alternative to conventional approaches. For more information, please refer to the original paper by Subramanian A, and a nice review paper by Nam D, Kim SY. ^{1, 2}

2 MSEA Overview

Metabolite set enrichment analysis consists of four steps - data input, data processing, data analysis, and results download. Different analysis procedures are performed based on different input types. In addition, users can also browse and search the metabolite set libraries as well as upload their self-defined metabolite sets for enrichment analysis.

Users can also perform metabolite name mapping between a variety of compound names, synonyms, and major database identifiers.

3 Data Input

There are three enrichment analysis algorithms offered by MSEA. Accordingly, three different types of data inputs are required by these three approaches:

A list of important compound names - entered as a one column data (Over Representation Analysis (ORA));

A single measured bio fluid (urine, blood, CSF) sample- entered as tab separated two-column data with the first column for compound name, and the second for concentration values (Single Sample Profiling (SSP));

⁵Subramanian Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles., Proc Natl Acad Sci USA. 2005 102(43): 15545-50

⁶Nam D, Kim SY. Gene-set approach for expression pattern analysis, Briefings in Bioinformatics. 2008 9(3): 189-197.

A compound concentration table - entered as a comma separated (.csv) file with the each sample per row and each metabolite concentration per column. The first column is sample names and the second column for sample phenotype labels (Quantitative Enrichment Analysis (QEA))

You selected Over Representation Analysis (ORA) which requires a list of compound names as input.

4 Data Process

The first step is to standardize the compound labels. It is an essential step since the compound labels will be subsequently compared with compounds contained in the metabolite set library. MSEA has a built-in tool to convert between compound common names, synonyms, identifiers used in HMDB ID, PubChem, ChEBI, BiGG, METLIN, KEGG, or Reactome. Table 1 shows the conversion results. Note: 1 indicates exact match, 2 indicates approximate match, and 0 indicates no match. A text file containing the result can be found in the downloaded file name_map.csv

Table 1: Result from Compound Name

	Query	Match	HMI
1	Creatinine	Creatinine	HMC
2	N(2)-phenylacetyl-L-glutamate	N(2)-phenylacetyl-L-glutamate	HMC
3	LysoPE(0:0/20:0)	LysoPE(0:0/20:0)	HMC
4	N-Acetylhistidine	N-Acetylhistidine	HMC
5	6-(2-carboxy-4,5-dihydroxyphenoxy)-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	NA	NA
6	D-Glucose	D-Glucose	HMC
7	Cysteinyl-Asparagine	Cysteinyl-Asparagine	HMC
8	4-Hydroxy-1-(3-pyridinyl)-1-butanone	4-Hydroxy-1-(3-pyridinyl)-1-butanone	HMC
9	Undecanoylcholine	Undecanoylcholine	HMC
10	Valine betaine	NA	NA
11	Glycyl-Glutamate	Glycyl-Glutamate	HMC
12	Proline betaine	Proline betaine	HMC
13	LysoPC(0:0/16:0)	LysoPC(0:0/16:0)	HMC
14	LysoPC(18:0/0:0)	LysoPC(18:0)	HMC
15	(S1)-Methoxy-3-heptanethiol	(S1)-Methoxy-3-heptanethiol	HMC
16	Ornithine	Ornithine	HMC
17	L-Glutamic acid	L-Glutamic acid	HMC
18	L-Acetylcarnitine	L-Acetylcarnitine	HMC
19	LysoPC(0:0/18:2(9Z,12Z))	NA	NA
20	L-Carnitine	L-Carnitine	HMC
21	L-Phenylalanine	L-Phenylalanine	HMC
22	Choline	Choline	HMC
23	3-Mercaptohexyl butyrate	NA	NA
24	LysoPC(0:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	NA	NA

The second step is to check concentration values. For SSP analysis, the concentration must be measured in μmol for blood and CSF samples. The urinary concentrations must be first converted to $\mu\text{mol}/\text{mmol_creatinine}$ in order to compare with reported concentrations in literature. No missing or negative values are allowed in SSP analysis. The concentration data for QEA analysis is more flexible. Users can upload either the original concentration data or normalized data. Missing or negative values are allowed (coded as NA) for QEA.

5 Selection of Metabolite Set Library

Before proceeding to enrichment analysis, a metabolite set library has to be chosen. There are seven built-in libraries offered by MSEA:

Metabolic pathway associated metabolite sets (currently contains 99 entries);

Disease associated metabolite sets (reported in blood) (currently contains 344 entries);

Disease associated metabolite sets (reported in urine) (currently contains 384 entries)

Disease associated metabolite sets (reported in CSF) (currently contains 166 entries)

Metabolite sets associated with SNPs (currently contains 4598 entries)

Predicted metabolite sets based on computational enzyme knockout model (currently contains 912 entries)

Metabolite sets based on locations (currently contains 73 entries)

Drug pathway associated metabolite sets (currently contains 461 entries)

In addition, MSEA also allows user-defined metabolite sets to be uploaded to perform enrichment analysis on arbitrary groups of compounds which researchers want to test. The metabolite set library is simply a two-column comma separated text file with the first column for metabolite set names and the second column for its compound names (must use HMDB compound name) separated by "; ". Please note, the built-in libraries are mainly from human studies. The functional grouping of metabolites may not be valid. Therefore, for data from subjects other than human being, users are suggested to upload their self-defined metabolite set libraries for enrichment analysis.

6 Enrichment Analysis

Over Representation Analysis (ORA) is performed when a list of compound names is provided. The list of compound list can be obtained through conventional feature selection methods, or from a clustering algorithm, or from the compounds with abnormal concentrations detected in SSP, to investigate if some biologically meaningful patterns can be identified.

ORA was implemented using the hypergeometric test to evaluate whether a particular metabolite set is represented more than expected by chance within the given compound list. One-tailed p values are provided after adjusting for multiple testing. Figure 1 below summarizes the result.

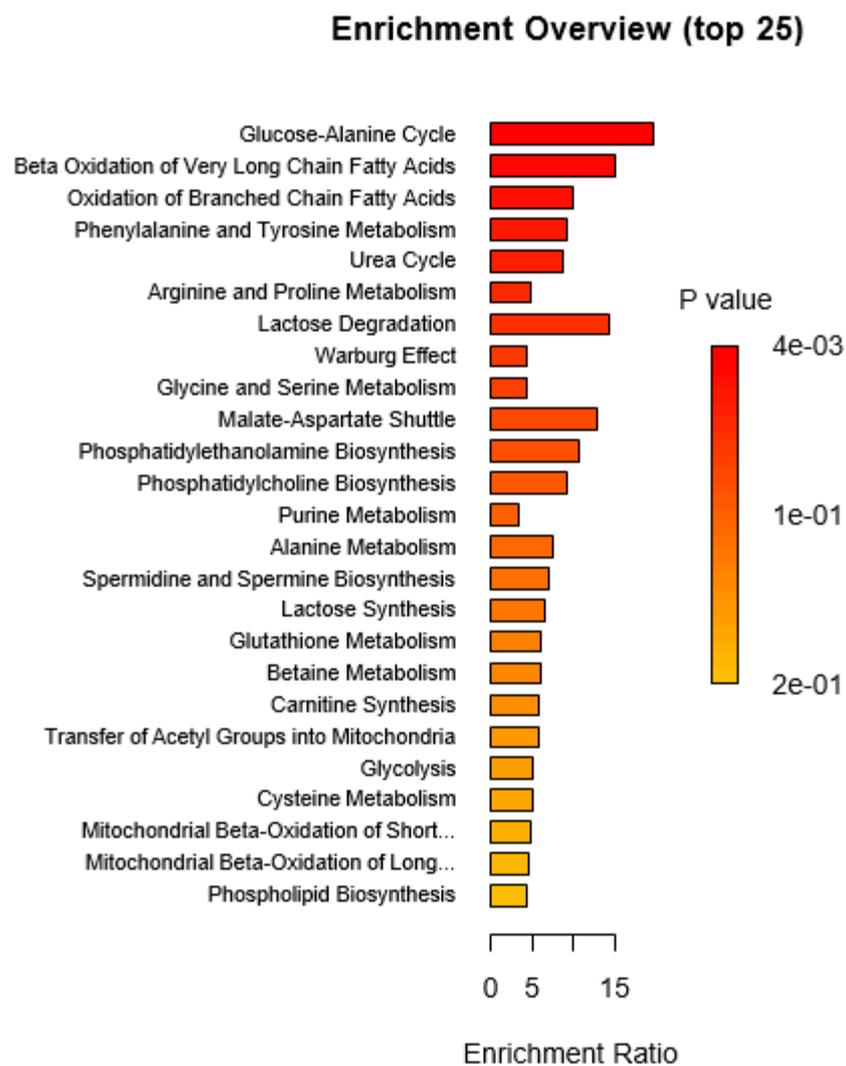


Figure 1: Summary Plot for Over Representation Analysis (ORA)

Table 2: Result from Over Representation Analysis

	total	expected	hits	Raw p	Holm p	FDR
Glucose-Alanine Cycle	13	0.10	2	3.99E-03	3.91E-01	3.36E-01
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	0.13	2	6.85E-03	6.65E-01	3.36E-01
Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	0.20	2	1.58E-02	1.00E+00	3.83E-01
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	28	0.22	2	1.82E-02	1.00E+00	3.83E-01
Urea Cycle	29	0.23	2	1.95E-02	1.00E+00	3.83E-01
Arginine and Proline Metabolism	53	0.41	2	6.02E-02	1.00E+00	7.32E-01
Lactose Degradation	9	0.07	1	6.84E-02	1.00E+00	7.32E-01
Warburg Effect	58	0.45	2	7.08E-02	1.00E+00	7.32E-01
Glycine and Serine Metabolism	59	0.46	2	7.30E-02	1.00E+00	7.32E-01
Malate-Aspartate Shuttle	10	0.08	1	7.58E-02	1.00E+00	7.32E-01
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis	12	0.09	1	9.03E-02	1.00E+00	7.32E-01
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	0.11	1	1.05E-01	1.00E+00	7.32E-01
Purine Metabolism	74	0.58	2	1.09E-01	1.00E+00	7.32E-01
Alanine Metabolism	17	0.13	1	1.26E-01	1.00E+00	7.32E-01
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	0.14	1	1.33E-01	1.00E+00	7.32E-01
Lactose Synthesis	20	0.16	1	1.46E-01	1.00E+00	7.32E-01
Glutathione Metabolism	21	0.16	1	1.53E-01	1.00E+00	7.32E-01
Betaine Metabolism	21	0.16	1	1.53E-01	1.00E+00	7.32E-01
Carnitine Synthesis	22	0.17	1	1.60E-01	1.00E+00	7.32E-01
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	0.17	1	1.60E-01	1.00E+00	7.32E-01
Glycolysis	25	0.20	1	1.80E-01	1.00E+00	7.32E-01
Cysteine Metabolism	26	0.20	1	1.87E-01	1.00E+00	7.32E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	0.21	1	1.93E-01	1.00E+00	7.32E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	0.22	1	2.00E-01	1.00E+00	7.32E-01
Phospholipid Biosynthesis	29	0.23	1	2.06E-01	1.00E+00	7.32E-01
Folate Metabolism	29	0.23	1	2.06E-01	1.00E+00	7.32E-01
Lysine Degradation	30	0.23	1	2.12E-01	1.00E+00	7.32E-01
Ammonia Recycling	32	0.25	1	2.25E-01	1.00E+00	7.32E-01
Amino Sugar Metabolism	33	0.26	1	2.31E-01	1.00E+00	7.32E-01
Beta-Alanine Metabolism	34	0.27	1	2.37E-01	1.00E+00	7.32E-01
Aspartate Metabolism	35	0.27	1	2.44E-01	1.00E+00	7.32E-01
Gluconeogenesis	35	0.27	1	2.44E-01	1.00E+00	7.32E-01
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	0.29	1	2.56E-01	1.00E+00	7.32E-01
Galactose Metabolism	38	0.30	1	2.62E-01	1.00E+00	7.32E-01
Sphingolipid Metabolism	40	0.31	1	2.74E-01	1.00E+00	7.32E-01
Propanoate Metabolism	42	0.33	1	2.86E-01	1.00E+00	7.32E-01
Methionine Metabolism	43	0.34	1	2.91E-01	1.00E+00	7.32E-01
Histidine Metabolism	43	0.34	1	2.91E-01	1.00E+00	7.32E-01
Fatty acid Metabolism	43	0.34	1	2.91E-01	1.00E+00	7.32E-01
Glutamate Metabolism	49	0.38	1	3.25E-01	1.00E+00	7.97E-01
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	0.47	1	3.84E-01	1.00E+00	8.96E-01
Tryptophan Metabolism	60	0.47	1	3.84E-01	1.00E+00	8.96E-01
Arachidonic Acid Metabolism	69	0.54	1	4.29E-01	1.00E+00	9.77E-01
Tyrosine Metabolism	72	0.56	1	4.43E-01	1.00E+00	9.87E-01

7 Appendix: R Command History

```
[1] "mSet<-InitDataObjects(\"conc\", \"msetora\", FALSE)"
[2] "cmpd.vec<-c(\"Creatinine\", \"N(2)-phenylacetyl-L-glutamate\", \"LysoPE(0:0/20:0)\", \"N-Acetyl
[3] "mSet<-Setup.MapData(mSet, cmpd.vec);"
[4] "mSet<-CrossReferencing(mSet, \"name\");"
[5] "mSet<-CreateMappingResultTable(mSet)"
[6] "mSet<-SetMetabolomeFilter(mSet, F);"
[7] "mSet<-SetCurrentMsetLib(mSet, \"smpdb_pathway\", 2);"
[8] "mSet<-CalculateHyperScore(mSet)"
[9] "mSet<-PlotORA(mSet, \"ora_0_\", \"net\", \"png\", 72, width=NA)"
[10] "mSet<-PlotEnrichDotPlot(mSet, \"ora\", \"ora_dot_0_\", \"png\", 72, width=NA)"
[11] "mSet<-CalculateHyperScore(mSet)"
[12] "mSet<-PlotORA(mSet, \"ora_1_\", \"net\", \"png\", 72, width=NA)"
[13] "mSet<-PlotEnrichDotPlot(mSet, \"ora\", \"ora_dot_1_\", \"png\", 72, width=NA)"
[14] "mSet<-CalculateHyperScore(mSet)"
[15] "mSet<-PlotORA(mSet, \"ora_2_\", \"net\", \"png\", 72, width=NA)"
[16] "mSet<-PlotEnrichDotPlot(mSet, \"ora\", \"ora_dot_2_\", \"png\", 72, width=NA)"
[17] "mSet<-CalculateHyperScore(mSet)"
[18] "mSet<-PlotORA(mSet, \"ora_3_\", \"net\", \"png\", 72, width=NA)"
[19] "mSet<-PlotEnrichDotPlot(mSet, \"ora\", \"ora_dot_3_\", \"png\", 72, width=NA)"
[20] "mSet<-SaveTransformedData(mSet)"
[21] "mSet<-PreparePDFReport (mSet, \"guest1199084766715613791\")\n"
```

The report was generated on Tue Mar 14 05:51:35 2023 with R version 4.2.2 (2022-10-31), OS system:Linux, version: -Ubuntu SMP Fri Jan 20 14:29:49 UTC 2023 .