
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO –
INTERUNIDADES**

THAÍS AMANDA REIA

**A RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GDF15 E ESTRESSE OXIDATIVO NO
ENVELHECIMENTO: O EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO**

Bauru - SP

2024

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO -
INTERUNIDADES**

THAÍS AMANDA REIA

**A RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GDF15 E ESTRESSE OXIDATIVO NO
ENVELHECIMENTO: O EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO**

Tese apresentada a Faculdade de Ciências do
Câmpus de Bauru, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências do
Movimento.

Orientador: Anderson Saranz Zago

Bauru
2024

R347r Reia, Thaís Amanda
A relação entre a expressão de GDF15 e estresse oxidativo no
envelhecimento: o efeito do treinamento aeróbio / Thaís Amanda
Reia. -- , 2024
94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências, Bauru,
Orientador: Anderson Saranz Zago

1. Envelhecimento. 2. Estresse oxidativo. 3. Disfunção
mitocondrial. 4. GDF15. 5. Exercício físico. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa tem o potencial de provocar impactos significativos em várias áreas relacionadas à saúde e ao envelhecimento. Primeiramente, ao elucidar a interação entre o exercício físico, o estresse oxidativo e o fator de crescimento e diferenciação 15 (GDF15), a pesquisa poderá aprofundar a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes ao envelhecimento. Isso inclui esclarecer como o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial contribuem tanto para o envelhecimento saudável quanto para condições patológicas associadas à idade.

Em segundo lugar, os achados da pesquisa poderão fomentar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Compreender a função do GDF15 e sua resposta ao exercício pode possibilitar a criação de intervenções personalizadas e mais eficazes para gerenciar ou atenuar condições associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Se GDF15 for identificado como um biomarcador ou alvo terapêutico relevante, isso poderá transformar abordagens clínicas e de saúde preventiva.

Além disso, a pesquisa pode informar o desenvolvimento de programas de exercício físico mais eficientes e adaptados às necessidades específicas de diferentes populações, especialmente idosos. Isso pode potencializar os benefícios do exercício para a função mitocondrial e para a redução do estresse oxidativo, promovendo uma abordagem mais precisa e personalizada para a manutenção da saúde ao longo da vida.

Por fim, os resultados obtidos poderão oferecer evidências valiosas para a formulação de políticas de saúde pública. Incentivar a prática regular de exercício físico, embasado por evidências científicas sobre seus benefícios para o controle do estresse oxidativo e a regulação de GDF15. Poderá ainda apoiar a implementação de estratégias de saúde pública que promovam uma vida ativa e saudável na terceira idade. Dessa forma, a pesquisa não apenas contribuirá para o avanço do conhecimento científico, mas também poderá ter um impacto prático significativo na melhoria da saúde e da qualidade de vida da população idosa.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research has the potential to impact various areas related to health and aging. Firstly, by elucidating the interaction between exercise, oxidative stress, and growth differentiation factor 15 (GDF15), the study may deepen our understanding of the biological mechanisms underlying aging. This includes clarifying how oxidative stress and mitochondrial dysfunction contribute to both healthy aging and age-related pathological conditions.

Secondly, the findings from this research could foster the development of new therapeutic strategies. Understanding the role of GDF15 and its response to exercise may enable the creation of more effective and personalized interventions for managing or mitigating age-associated conditions such as cardiovascular diseases, diabetes, and cancer. If GDF15 is identified as a relevant biomarker or therapeutic target, this could revolutionize clinical and preventive health approaches.

Moreover, this research could inform the development of more efficient exercise programs tailored to the specific needs of different populations, particularly the elderly. This could enhance the benefits of exercise on mitochondrial health and the reduction of oxidative stress, promoting a more precise and personalized approach to health maintenance across the lifespan.

Finally, the results obtained could provide valuable evidence for the formulation of public health policies. Encouraging regular exercise, supported by scientific evidence on its benefits for oxidative stress management and GDF15 regulation, could underpin the implementation of public health strategies that promote an active and healthy lifestyle in older adults. In this way, the research will not only contribute to the advancement of scientific knowledge but could also have a significant practical impact on improving the health and quality of life of the aging population.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE THAÍS AMANDA REIA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 04 dias do mês de outubro do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós Graduação da Faculdade de Ciências, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de THAÍS AMANDA REIA, intitulada **A RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GDF15 E ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO: O EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM (Participação Virtual) do(a) Departamento de Fisioterapia / UNESP - Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP, Prof. Dr. DANILO SALES BOCALINI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Desportos / Universidade Federal do Espírito Santo, Profa. Dra. GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia do Câmpus de Presidente Prudente - UNESP, Prof. Dr. THIAGO JOSÉ DIONÍSIO (Participação Presencial) do(a) Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo - USP, Prof. Dr. LEONARDO DOS REIS SILVEIRA (Participação virtual) do(a) Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM
Data: 04/10/2024 18:29:46-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Valdelice e Cláudio, meu alicerce. Por nunca pouparem esforços para que meus sonhos se tornassem realidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre abençoar meu caminho e minhas escolhas.

À minha mãe, Valdelice, e ao meu pai, Cláudio, por terem moldado quem eu sou, com valores que me guiaram até aqui. Pela forma como me ensinaram a ter responsabilidade e dedicação em tudo que me proponho a fazer. Por estarem presentes em todas as etapas, sempre acreditando no meu potencial e me dando todo o suporte necessário. Ao meu irmão, Júnior, por sempre me apoiar e torcer pelo meu sucesso. Ao meu noivo, Lucas, por todo amor, paciência, compreensão e companheirismo. Por ser minha fonte constante de apoio e incentivo, e por acreditar em mim em cada passo desta jornada. Eu amo muito vocês!

Às minhas amigas e amigos que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson S. Zago, por todos os ensinamentos, por sempre confiar no meu potencial e me dar oportunidades de ministrar aulas, palestras, orientar alunos, coordenar projetos de extensão e participar de bancas examinadoras, contribuindo significativamente para o meu crescimento acadêmico.

Ao Centro de Estudos de Doenças Crônicas Não Transmissíveis, Envelhecimento e Exercício Físico/UNESP, onde aprendi, amadureci e vivi minhas maiores experiências desde 2017. Grata a todos os membros e ex-membros por estarem sempre dispostos a contribuir, pela parceria e amizade. Um agradecimento especial ao aluno Rafael, pela colaboração no treinamento dos animais, e ao Aislan, por sua prontidão e ajuda sempre que necessário.

Ao Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades /UNICAMP, por todo auxílio e suporte durante os sete meses em que realizei o estudo em cultura de células. Agradeço a todos os alunos e funcionários pelo acolhimento, apoio, incentivo e amizade. Em especial, minha eterna gratidão ao Prof. Dr. Leonardo R. Silveira, quem me orientou durante esse período, por todo ensinamento, conselhos e direcionamento na composição deste trabalho. Gratidão aos seus alunos Laís, Ninon, Bianca, André, por todo o auxílio nas análises, e, em especial, ao Marcos, que esteve comigo todos os dias, me ensinando e auxiliando em todas as coletas e análises.

Ao Laboratório de Fisiologia do Exercício/UNIFESP, grata à Prof. Dra. Kátia de Angeles pela parceria, e ao seu aluno Antônio, pelo auxílio nas análises de estresse oxidativo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento-UNESP/Bauru, por sempre me auxiliar quando precisei, e a CAPES pelo apoio financeiro.

Imensa gratidão a todos que, de alguma forma, acreditaram no meu potencial e contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A única maneira de fazer um grande trabalho é
amar o que você faz.”*

(STEVE JOBS).

RESUMO

O envelhecimento é caracterizado por mudanças degenerativas causadas pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à disfunção mitocondrial, o que pode desencadear respostas compensatórias, como a regulação positiva do fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF15). O GDF15 é elevado em situações de estresse celular, tal como durante o exercício físico agudo e o envelhecimento, sendo hipotetizado que ele modula o ambiente oxidativo e mitiga os impactos do envelhecimento. Diante disso, este trabalho foi dividido em três estudos: o primeiro estudo teve como objetivo revisar sistematicamente os efeitos do exercício agudo e crônico sobre a expressão do GDF15 em humanos. A revisão sistemática foi conduzida seguindo as diretrizes PRISMA, com buscas realizadas nas bases de dados MEDLINE/PubMed, Cochrane Central Register of Controlled Trials e Embase. Os resultados mostraram que o exercício físico agudo pode aumentar as concentrações de GDF15 em várias populações. No entanto, estudos sobre programas de treinamento regular apresentaram resultados discrepantes, apontando a necessidade de mais investigações; o segundo estudo teve como objetivo analisar o impacto do envelhecimento na expressão de GDF15 e no estresse oxidativo e, investigar os efeitos do treinamento regular na atenuação desses marcadores em ratos idosos. Ratos Wistar foram alocados em três grupos (n=7): jovem controle (JC), idoso controle (IC) e idoso treinado (IT). O grupo IT realizou 8 semanas de treinamento aeróbio. Foram analisados peso corporal, capacidade física, concentração plasmática e muscular de GDF15 e marcadores de estresse oxidativo plasmático. O grupo IT apresentou maior capacidade física, menor peso corporal, redução na concentração de GDF15 e melhora no perfil oxidativo. Além disso, altos níveis de GDF15 foram associados a menor capacidade física e maior estresse oxidativo. O treinamento aeróbio regular parece reduzir os níveis basais de GDF15 em ratos idosos, possivelmente devido à sua eficácia em atenuar os efeitos do envelhecimento, melhorando o equilíbrio oxidativo e a capacidade física; e por fim, o terceiro estudo visou analisar o efeito protetor do GDF15 após a indução do fenótipo oxidativo mitocondrial em células musculares C2C12. As células foram submetidas à indução de estresse oxidativo, com a geração de EROs e a taxa de morte celular avaliadas na presença e ausência de GDF15. A expressão de GDF15 foi associada à menor geração de EROs e taxa de morte celular. Esses resultados sugerem um papel protetor do GDF15 contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo em células musculares. Em suma, os estudos indicam que o GDF15 desempenha um papel importante na resposta ao estresse oxidativo e no envelhecimento. O treinamento aeróbio regular pode reduzir os níveis de GDF15 em idosos, possivelmente devido à sua eficácia em atenuar o impacto do envelhecimento. Além disso, o GDF15 parece exercer uma função protetora contra o estresse oxidativo, auxiliando na preservação da função mitocondrial. No entanto, são necessários mais estudos para determinar se o GDF15 de fato pode ser considerado um marcador de estresse ou um mediador das adaptações biológicas induzidas pelo exercício físico.

Palavras-chave: Envelhecimento. Estresse oxidativo. Disfunção mitocondrial. GDF15. Exercício físico.

ABSTRACT

Aging is characterized by degenerative changes caused by increased production of reactive oxygen species (ROS) due to mitochondrial dysfunction, which can trigger compensatory responses such as the upregulation of growth differentiation factor-15 (GDF15). GDF15 is elevated during cellular stress, including acute exercise and aging, and is hypothesized to modulate the oxidative environment and mitigate the impacts of aging. This study was divided into three parts: the first study aimed to systematically review the effects of acute and chronic exercise on GDF15 expression in humans. The systematic review followed PRISMA guidelines, with searches conducted in the MEDLINE/PubMed, Cochrane Central Register of Controlled Trials, and Embase databases. The results showed that acute exercise can increase GDF15 concentrations in various populations. However, studies on regular training programs presented inconsistent findings, highlighting the need for further research; the second study aimed to analyze the impact of aging on GDF15 expression and oxidative stress and investigate the effects of regular training on the attenuation of these markers in aged rats. Wistar rats were allocated into three groups (n=7): young control (YC), aged control (AC), and aged trained (AT). The AT group underwent 8 weeks of aerobic training. Body weight, physical capacity, GDF15 concentration, and oxidative stress markers were assessed. The AT group showed higher physical capacity, lower body weight, reduced GDF15 concentration, and improved oxidative profile. Additionally, higher GDF15 levels were associated with lower physical capacity and greater oxidative stress. Regular aerobic training appears to reduce baseline GDF15 levels in aged rats, likely due to its effectiveness in mitigating the effects of aging, improving oxidative balance, and enhancing physical capacity; finally, the third study aimed to assess the protective effect of GDF15 after inducing the mitochondrial oxidative phenotype in C2C12 muscle cells. C2C12 were subjected to oxidative stress induction, with ROS generation and cell death rates evaluated in the presence or absence of GDF15. GDF15 expression was associated with lower ROS production and reduced cell death rates. These findings suggest a protective role of GDF15 against the detrimental effects of oxidative stress in muscle cells. In summary, the studies indicate that GDF15 plays a crucial role in the response to oxidative stress and aging. Regular aerobic training may lower basal GDF15 levels in older adults, likely due to its ability to mitigate the impact of aging. Additionally, GDF15 seems to act as a protective factor against oxidative stress, contributing to mitochondrial function preservation. However, further studies are needed to determine whether GDF15 should be considered a marker of a stress or a mediator of exercise-induced biological adaptations.

Keywords: Aging. Oxidative stress. Mitochondrial dysfunction. GDF15. Exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do papel do GDF15 no envelhecimento.	24
Figura 2 - Fluxograma para a seleção dos estudos	34
Figura 3 - Resumo do risco de viés dos estudos clínicos incluídos.....	43
Figura 4 - Caracterização dos animais.....	53
Figura 5 - Protocolo Experimental	54
Figura 6 - Comparação do impacto do envelhecimento sobre o conteúdo proteico no músculo sóleo entre ratos jovens e idosos	61
Figura 7 - Efeito do treinamento aeróbio sobre a capacidade física e peso corporal em ratos idosos.....	61
Figura 8 - Efeito do treinamento aeróbio sobre GDF15, estresse oxidativo plasmático em ratos idosos controles e treinados	62
Figura 9 - Efeito do treinamento aeróbio sobre o conteúdo proteico de GDF15 e SOD2 no músculo sóleo em ratos idosos controles e treinados.	63
Figura 10 - Expressão de GDF15 em mioblastos e miotubos e sua relação com proteínas mitocondriais	73
Figura 11 - Expressão de GDF15 em mioblastos e miotubos e sua relação com o perfil antioxidante.	74
Figura 12 - Consumo de oxigênio dos mioblastos e miotubos.....	74
Figura 13 - Protocolo de indução do cenário oxidativo com Menadiona em células C2C12.	75
Figura 14 - Respostas ao cenário oxidativo em mioblastos e miotubos.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características e resultados dos estudos incluídos.	36
Tabela 2 - Avaliação de risco de viés do JBI para estudos de série de casos	44
Tabela 3 - Comparação do impacto do envelhecimento sobre o peso corporal, capacidade física, GDF15 e estresse oxidativo plasmático entre ratos jovens e idosos.....	60
Tabela 4 - Análise de correlação de GDF15 com idade, capacidade física e marcadores de estresse oxidativo em ratos	63

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

O_2^-	Ânion superóxido
AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder antioxidante redutor de ferro
DNPH	Dinitrofenil hidrazina
GDF15	Fator de diferenciação de crescimento 15
GPX	Glutathione peroxidase
HO_2	Hidroperoxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IC	Grupo idoso controle
IL	Interleucina
IT	Grupo idoso treinado
JC	Grupo jovem controle;
MIC-1	Citocina inibidora de macrófagos 1
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NAG-1	Proteína do gene 1 ativada por anti-inflamatórios não esteroides
NRF2	Fator nuclear eritroide 2
OH	Hidroxila
PDF	Fator de diferenciação prostática
PGC-1 α	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PLAB	Proteína morfogenética óssea placentária
PTGF	Fator de crescimento transformador beta placentário
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral

UPRmt Resposta mitocondrial a proteína mal formada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 ENVELHECIMENTO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL	21
1.2 GDF15 E ENVELHECIMENTO	22
1.3 EXERCÍCIO FÍSICO, ESTRESSE OXIDATIVO E ENVELHECIMENTO	25
2 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA E LACUNA CIENTÍFICA.....	28
3 OBJETIVO GERAL	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3.2 HIPÓTESE.....	30
4 CAPÍTULO I. ESTUDO DE REVISÃO SISTEMÁTICA	31
4.1 MÉTODOS	31
4.1.1 Estratégia de busca.....	31
4.1.2 Seleção dos estudos.....	31
4.1.3 Extração de dados e categorização	32
4.1.4 Análise dos dados	33
4.1.5 Avaliação de qualidade e risco de viés.....	33
4.2 RESULTADOS	34
4.2.1 Resultados da busca	34
4.2.2 Características dos estudos e dos participantes.....	35
4.2.3 Características das intervenções e desfechos	42
4.2.4 Qualidade metodológica	43
4.3 DISCUSSÃO	44
4.3.1 Efeito do exercício físico agudo sobre GDF15	45
4.3.2 Efeito de um programa regular de treinamento sobre GDF15.....	48
4.4 CONCLUSÃO	50
5 CAPÍTULO II. ESTUDO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL	52
5.2 MÉTODOS	52
5.2.1 Animais.....	52
5.2.2 Teste de Capacidade Máxima (TCM)	52
5.2.3 Peso corporal	53
5.2.4 Caracterização dos grupos experimentais	53
5.2.5 Protocolo experimental.....	54

5.2.6 Eutanásia.....	54
5.2.7 Análise do plasma.....	55
5.2.8. Determinação do conteúdo de proteína por <i>Western Blotting</i>	58
5.2.9 Análise estatística	59
5.2 RESULTADOS	59
5.2.1 Impacto do processo de envelhecimento	59
5.2.2 Efeito do treinamento aeróbio em ratos idosos	61
5.3 DISCUSSÃO	64
5.4 LIMITAÇÃO DO ESTUDO	68
5.5 CONCLUSÃO	68
6. CAPÍTULO III. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CULTURA DE CÉLULA.....	69
6.1 MÉTODOS	69
6.1.1 Cultivo de células musculares da linhagem C2C12	69
6.1.2 Análises.....	69
6.1.3 Análise estatística	72
6.2 RESULTADOS	72
6.3 DISCUSSÃO	76
6.4 CONCLUSÃO	78
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	90
APÊNDICES	91

1 INTRODUÇÃO

É de notório saber científico que o envelhecimento populacional é um fenômeno mundial. No Brasil, o número de pessoas com 65 anos ou mais cresceu 57,4% nos últimos 12 anos, alcançando aproximadamente 22,1 milhões de indivíduos, o que representa cerca de 11% da população. Projeções demográficas indicam que, nas próximas três décadas, o número de idosos deve triplicar, aproximando-se do contingente de crianças (IBGE, 2022). Esse cenário impõe grandes desafios para a sociedade moderna, principalmente para os profissionais da área da saúde, pois, à medida que a população idosa cresce, observa-se um aumento exponencial nos agravos de saúde, particularmente nas doenças crônicas não transmissíveis (WHO, 2021).

O envelhecimento é um processo biológico natural, progressivo e multifatorial, caracterizado pelo acúmulo de processos degenerativos que causam danos nas moléculas, células e tecidos, comprometendo a eficiência das funções fisiológicas e diminuindo a capacidade de resistência ou adaptação ao estresse (HAJAM et al., 2022; LIGUORI et al., 2018). Além disso, o envelhecimento é considerado um fator de risco para a maioria das doenças crônicas não transmissíveis, bem como para algumas deficiências funcionais, incluindo câncer, diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, osteomusculares e neurológicas (FRANCESCHI et al., 2018; FURMAN et al., 2019).

Com base nesses pressupostos, nas últimas décadas foram realizadas diversas pesquisas que visam compreender o processo do envelhecimento e seus aspectos fisiopatológicos. Embora os mecanismos do envelhecimento ainda não estejam totalmente esclarecidos na literatura, a teoria dos radicais livres se destaca como uma das hipóteses mais estudadas e associadas às alterações indesejadas que acometem os idosos (BECKMAN; AMES, 1998; DA COSTA et al., 2016; LIGUORI et al., 2018).

Em termos gerais, radical livre se refere a átomos ou moléculas que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, o que pode gerar alta reatividade e prejudicar células adjacentes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Johnson et al. (1999) sugerem que a estrutura celular pode ser danificada por agressões causadas pelos radicais livres, resultando em instabilidade molecular e distorcendo a informação contida em moléculas essenciais, o que compromete o funcionamento do organismo.

Durante as reações metabólicas endógenas, o processo de redução do oxigênio (O_2) resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânions superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Geralmente, a

redução completa do O₂ ocorre nas mitocôndrias, onde a reatividade das EROs é neutralizada pelo sistema antioxidante. Esse sistema atua tanto inibindo quanto atenuando os danos provocados pela ação deletéria das EROs (COHEN, 1989). Os antioxidantes podem agir diretamente, neutralizando as EROs, ou indiretamente, por meio do sistemas enzimáticos. Dessa forma, o sistema antioxidante se divide em duas categorias: o enzimático e o não enzimático. O sistema enzimático é composto por enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo ou adquiridos pela dieta, como a bilirrubina, a ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, vitamina C, vitamina E, β -caroteno (precursor da vitamina A), entre outros (OTEIZA et al., 1995).

É relevante ressaltar que, em condições fisiológicas, a oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo humano. As EROs são geradas constantemente em pequenas quantidades como resultado das reações químicas que ocorrem durante a respiração celular, atuando como importantes moléculas sinalizadoras no organismo (ZWEIER et al., 2010). O sistema antioxidante age por diferentes mecanismos, seja prevenindo a formação das EROs (sistemas de prevenção), neutralizando as EROs (sistemas varredores) ou promovendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas danificadas (sistemas de reparo) (MIKHED; DAIBER; STEVEN, 2015).

Todavia, quando esse sistema está comprometido e a produção de EROs excede a capacidade antioxidante, pode desencadear um cenário o qual favorece a oxidação de biomoléculas gerando metabólitos específicos, conhecidos como marcadores do estresse oxidativo. Esses marcadores são derivados, principalmente, da oxidação de lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (STEPIĆ et al., 2012).

Evidências indicam que altas concentrações de EROs podem acelerar o envelhecimento e aumentar a predisposição a doenças relacionadas à idade (JOHNSON; ROBINSON; NAIR, 2013). A exposição contínua a esses fatores resulta no acúmulo de agressões diárias, diminuindo a capacidade do corpo de reparar lesões e levando à sua multiplicação (JOHNSON; SINCLAIR; GUARENTE, 1999). Além disso, estudos reportaram que os danos oxidativos tendem a aumentar com a idade (PARK; YEO, 2013), sugerindo que a oxidação dos componentes celulares provoca alterações acumulativas que podem culminar em apoptose celular. À medida que o indivíduo envelhece, esse processo pode afetar um número crescente de células, podendo acarretar um cenário nocivo ao organismo (JOHNSON; SINCLAIR; GUARENTE, 1999).

Nesse contexto, a teoria dos radicais livres é uma das principais abordagens para compreender o processo de envelhecimento. Baseada na hipótese de que as perdas funcionais associadas à idade são resultado do acúmulo de danos oxidativos em macromoléculas, como lipídios, DNA e proteínas, a teoria sugere que o aumento dos níveis de radicais livres leva à senescência celular. Esse processo fisiológico interrompe a proliferação celular em resposta a danos que ocorrem durante a replicação, contribuindo para o envelhecimento (LIGUORI et al., 2018). Essa teoria é consistente com a relação inversa observada entre a produção de EROs mitocondrial e tempo de vida em mamíferos (KU; BRUNK; SOHAL, 1993).

Diante disso, a literatura propõe que o envelhecimento e seus aspectos fisiopatológicos podem ser secundário ao estresse oxidativo, o qual induz alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético, comprometendo a integridade funcional do sistema orgânico (HARMAN, 1981).

1.1 ENVELHECIMENTO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

Além dos fatores supracitados, evidências apontam que a produção exacerbada de EROs durante o processo de envelhecimento pode estar associada a um quadro chamado de disfunção mitocondrial. Esse cenário é caracterizado por alterações nas mitocôndrias que comprometem seu funcionamento, bem como o aumento do dano oxidativo do DNA mitocondrial (mtDNA), diminuição no número de cópias de mtDNA, concentrações reduzidas de mRNA nos genes que codificam proteínas mitocondriais e diminuição na taxa de síntese proteica e atividade enzimática mitocondrial (BLOEMBERG; QUADRILATERO, 2019; SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994).

A literatura estabelece que a função mitocondrial diminui com o processo de envelhecimento. Acredita-se que as mitocôndrias se deterioram com a idade, comprometendo a atividade respiratória, acumulando danos ao mtDNA e produzindo quantidades excessivas de EROs (INDO et al., 2015). Bratic et al. (2013) encontraram menores números de mitocôndrias no fígado de camundongos e humanos idosos quando comparados com jovens, o que pode correlacionar com um declínio no conteúdo de mtDNA. Também foram observadas deleções de mtDNA em tecidos como fígado, cérebro e músculo esquelético de indivíduos idosos (CORRAL-DEBRINSKI et al., 1992).

Evidências apontam que altas concentrações de EROs também podem ser uma das causas de mudanças negativas na biogênese mitocondrial. Uma vez que o controle molecular da função mitocondrial representa um aspecto fundamental para produção de EROs e substâncias

antioxidantes, defeitos na integridade desse sistema podem comprometer diversas demandas homeostáticas, levando a um amplo espectro de doenças (BIALA; DHINGRA; KIRSHENBAUM, 2015). Sabe-se que a produção excessiva de EROs se destaca como uma das principais consequências da disfunção mitocondrial e esse cenário exerce efeitos prejudiciais nas células (HAJAM et al., 2022). Diversos estudos mostram que o estresse oxidativo está associado à lesão celular, inativação enzimática, ativação excessiva de substâncias pró-inflamatória, ativação de fatores de indução de apoptose e danos ao DNA (FERRARI; FRANÇA; HONORIO-FRANÇA, 2009; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Com base nesse contexto, estudos mostram que a disfunção mitocondrial pode sinalizar a produção de moléculas capazes de estimular uma resposta compensatória no metabolismo, bem como a produção do fator de crescimento e diferenciação celular 15 (GDF15), uma “mitocina” secretada a partir do estresse mitocondrial (YATSUGA et al., 2015).

1.2 GDF15 E ENVELHECIMENTO

A literatura aponta que o GDF15 pertence à superfamília do fator transformador β (TGF- β). Em humanos, pode ser encontrado na literatura como MIC-1 (Macrophage inhibitory cytokine 1), NAG-1 (NSAID-activated gene 1 protein), NRG-1 (NSAID-regulated gene 1 protein), PTGF (Placental TGF- β), PLAB (Placental bone morphogenetic protein) e PDF (Prostate differentiation fator). Por motivos didáticos, nesta tese, a proteína será chamada de GDF15 (BOOTCOV et al., 1997; YOKOYAMA-KOBAYASHI et al., 1997). O gene GDF15 humano se localiza no cromossomo 19, sendo composto por dois éxons e um íntron (LAWTON et al., 1997; UNSICKER; SPITTAU; KRIEGLSTEIN, 2013). GDF15 é sintetizado como um pro-peptídeo, o qual é homodimerizado e depois clivado pela protease tipo furina no retículo endoplasmático, gerando assim um dímero maduro de 24 kDa (FUJITA et al., 2016; YANG et al., 2017). A ausência de um receptor identificado para GDF15 dificultou anteriormente a avaliação de seu papel fisiológico. No entanto, estudos recentes identificaram um receptor para GDF15 no cérebro e demonstraram que ele é responsável pelos efeitos anorexígenas do GDF15. O receptor em questão é o GFRAL, um receptor específico para GDF15 (EMMERSON et al., 2017; YANG et al., 2017). GFRAL é um receptor com domínio citoplasmático que necessita da fosforilação de um co-receptor de tirosina quinase, chamado de Ret, para induzir sinalização intracelular (EMMERSON et al., 2017). Ainda é controversa a ligação entre GDF15 e receptor de TGF- β em outros tecidos. Yang et al. (2017) realizaram um experimento para investigar a sinalização intracelular induzida por GDF15 em

aproximadamente 30 linhagens celulares, incluindo C2C12, e não identificaram nenhum dos alvos que normalmente seriam ativados pela sinalização de TGF- β . Além disso, não identificaram a expressão de GFRAL em nenhuma das linhagens estudadas, o que evidencia que os efeitos encontrados são decorrentes da ligação de GDF15 com o receptor GFRAL no sistema nervoso central.

Embora em níveis diferentes, a literatura aponta que GDF15 é expresso em diversos órgãos e tecidos humanos, incluindo placenta, rim, pulmão, pâncreas, coração, músculo esquelético, fígado e cérebro (BREIT et al., 2011; TSAI et al., 2016). Essa ampla distribuição sugere uma função multifacetada em diferentes sistemas fisiológicos e fisiopatológicos (LI et al., 2000).

Evidências relatam que a atividade de GDF15 aumenta sob condições de estresse ou a insultos teciduais. Níveis elevados de GDF15 no sangue foram relatados como biomarcador de algumas condições, como câncer, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, envelhecimento e como biomarcador de mortalidade (CONTE et al., 2019; HAGSTRÖM et al., 2017). Estudos realizados em modelos animais submetidos ao estresse mitocondrial mostraram aumento na expressão de GDF15 e de seus níveis circulantes (CHUNG et al., 2017; MORROW et al., 2017).

Por outro lado, valores elevados de GDF15 foram relacionados à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no fígado de camundongos com fibrose, enquanto a deficiência de GDF15 agravou a lesão hepática e a fibrose (CHUNG et al., 2017). Um aumento da expectativa de vida também foi observado apenas em camundongos transgênicos que superexpressaram GDF15 (WANG et al., 2014). Pacientes deficientes para GDF15 desenvolveram maior incidência de infarto do miocárdio e elevados níveis de cardiomiócitos apoptóticos, indicando que GDF15 endógeno limitou o dano do tecido (ROCHETTE et al., 2021). Bootcov et al. (1997) descobriram que a expressão de GDF15 é induzida em macrófagos por IL-1 β , IL-2, TNF- α e TGF- β e limita sua ativação, consequentemente atenuando a inflamação. Além disso, estudos experimentais e clínicos hipotetizam o uso potencial de GDF15 como um novo alvo terapêutico, podendo modular a atividade metabólica e promover uma angiogênese adaptativa e um processo regenerativo cardíaco durante doenças cardiovasculares (ROCHETTE et al., 2021).

Embora a função biológica de GDF15 ainda não está totalmente esclarecida, diversos estudos propõem que GDF15 possa exercer papéis opostos. Enquanto por um lado, estudos sugerem uma função patogênica e pró-inflamatória, outras evidências apontam um papel protetor e anti-inflamatório (CONTE et al., 2020).

Recentemente, GDF15 tem sido fortemente associado com envelhecimento e à longevidade (LEHALLIER et al., 2019; LIU et al., 2021; TANAKA et al., 2018). Observou-se que, em indivíduos saudáveis, assim como em indivíduos jovens, a concentração circulante de GDF15 tende a permanecer baixa. Entretanto, os níveis plasmáticos de GDF15 observados em idosos foram elevados, principalmente na presença de condições patológicas (CONTE et al., 2019; FUJITA et al., 2016). Conte et al. (2020) reportaram que em um envelhecimento saudável, a disfunção mitocondrial pode estimular uma resposta mitocondrial a proteína mal formada (UPRmt) e a produção de mitocinas, como GDF15. Chung et al. (2017) também observaram aumento na expressão de GDF15 em animais nocaute para Crif1, que leva a uma disfunção mitocondrial, indicando que GDF15 é produzido e secretado em resposta à UPRmt.

Assim, acredita-se que o aumento da produção de GDF15 com a idade seja uma resposta compensatória ao estresse fisiológico causado pela disfunção mitocondrial visando reduzir, ainda por meio de mecanismos não esclarecidos, a produção de citocinas inflamatórias ativadas pelas EROs. Dessa forma, o GDF15 parece desempenhar um papel crucial na regulação do metabolismo energético, ajudando a manter a homeostasia sistêmica e atenuar os efeitos adversos do envelhecimento. Em contraste, o envelhecimento associado a doenças relacionadas à idade pode ser acarretado por um desequilíbrio entre altas concentrações de EROs e as respostas inflamatórias (Figura 1).

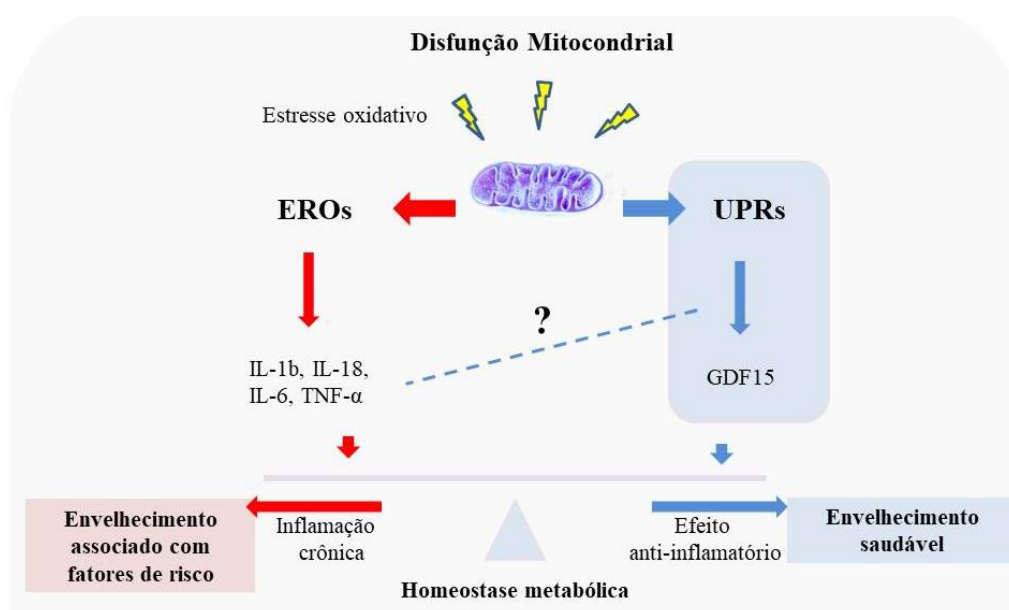


Figura 1 - Representação esquemática do papel do GDF15 no envelhecimento.
Fonte: Adaptado de CONTE (2020).

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO, ESTRESSE OXIDATIVO E ENVELHECIMENTO

A literatura aponta que embora o exercício físico envolva a produção de EROs, citocinas pró-inflamatórias e estresse mitocondrial, o mesmo consegue desencadear respostas crônicas benéficas para contrapor os efeitos adversos do envelhecimento (RADAK et al., 2016). Estudos mostram que a prática regular de exercício físico é considerada benéfica para regular a atividade pró e antioxidante em indivíduos (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLIWELL, 1995; JACOMINI et al., 2015; MILANOVIĆ et al., 2013). Atua na diminuição do estresse oxidativo devido à capacidade de aumentar os níveis das enzimas antioxidantes e diminuir a expressão da enzima NADPH oxidase, contribuindo para um melhor equilíbrio redox (WANG et al., 2019). Estudos indicam que o treinamento aeróbio promove adaptações favoráveis à musculatura esquelética de ratos. Entre essas mudanças, observa-se a redução dos níveis de caspases-3 e da fragmentação do DNA, contribuindo para um efeito protetor contra a apoptose. Além disso, há uma diminuição na produção de EROs e um aumento da capacidade antioxidante, fortalecendo a defesa contra o estresse oxidativo, neutralizando as EROs e protegendo as células (MIKHED; DAIBER; STEVEN, 2015; QUADRILATERO; ALWAY; DUPONT-VERSTEEGDEN, 2011).

Esses efeitos não apenas reduzem o estresse oxidativo, mas também promovem o aumento do número e da função mitocondrial (QUADRILATERO; ALWAY; DUPONT-VERSTEEGDEN, 2011). A biogênese mitocondrial pode ser induzida como resposta adaptativa, melhorando a função mitocondrial e a resistência global ao estresse (DAM; MITCHELL; QUADRILATERO, 2013; YUN; FINKEL, 2014). Diante disso, a prática regular de exercício físico se destaca como indutor de biogênese mitocondrial ao desencadear um estresse fisiológico transitório. Evidências mostram que a atividade contrátil estimula a biogênese mitocondrial por meio do aumento nas concentrações de cálcio citoplasmático e da formação do complexo cálcio/calmodulina, além de um maior consumo de oxigênio e a formação de EROs (GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Ainda, sugere-se que ocorre um aumento da razão AMP/ATP, ativando a proteína quinase dependente AMP (AMPK), a qual atua como um sensor de energia celular. A AMPK é ativada por um aumento da formação de AMP resultante do consumo de ATP durante a contração muscular. Desta forma, a AMPK desempenha diversas funções no metabolismo, incluindo a ativação de PGC-1 α que promove a sinalização para a biogênese mitocondrial e, conseqüentemente, melhor balanço redox (RICHTER et al., 1987).

Recentemente, a literatura aponta que exercício físico também pode estimular a secreção de GDF15. Kleinert et al. (2018) observaram aumento de 34% nos níveis plasmáticos de GDF15 após uma única sessão de exercício físico. Da mesma forma, aumentos transitórios foram detectados após corridas de ciclismo e ultramaratona (CONTE et al., 2020; TCHOU et al., 2009), bem como após uma sessão de treinamento de rugby (GALLIERA et al., 2014). Zhang et al. (2019) mostraram que o aumento agudo de GDF15 induzido pelo exercício físico foi associado à melhora do metabolismo energético em idosos obesos. Esses achados são consistentes com as evidências de Laurens et al. (2020), que relataram que GDF15 aumentou após mimetizar o exercício físico por meio da estimulação elétrica de miotubos humanos.

Acredita-se que o aumento dos níveis de GDF15 possa representar uma resposta metabólica compensatória ao estresse mecânico e metabólico induzido pelo exercício físico (CONTE et al., 2019; TCHOU et al., 2009), auxiliando na reparação e regeneração muscular após o exercício agudo (DE SOUSA et al., 2021). Interessantemente, foi relatado que as concentrações de GDF15 em repouso estão inversamente relacionadas à idade e à aptidão física, com indivíduos jovens e atletas apresentando menores valores de GDF15 (CONTE et al., 2020; ENARSSON et al., 2021).

Dessa forma, permanece incerto na literatura se o GDF15 é considerado exclusivamente um marcador biológico ou se os aumentos intermitentes e repetidos de GDF15, observados durante o exercício, pode desempenhar um papel causal nas adaptações biológicas ao treinamento, incluindo a melhora do perfil oxidativo. Enquanto quatro estudos observaram um aumento nas concentrações de GDF15 após o treinamento regular (GALLIERA et al., 2014; PERRONE et al., 2022; REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; ZHANG; FEALY; KIRWAN, 2019), dois não encontraram diferenças significativas (MUNK et al., 2011; SEO et al., 2021), e um estudo constatou uma redução na concentração de GDF15 após a intervenção (CHANG; NAMKUNG, 2021). A heterogeneidade nos protocolos de treinamento e nas populações estudadas dificulta a interpretação das adaptações do treinamento e do comportamento do GDF15.

Com base nesses pressupostos, a literatura ainda carece de uma caracterização detalhada das alterações na concentração de GDF15 induzidas pelo exercício físico. A variedade de fatores envolvidos no exercício é vasta e pode gerar respostas distintas, especialmente em grupos especiais e sob diferentes condições de treinamento.

O exercício físico regular é amplamente reconhecido como uma estratégia eficaz para regular a atividade pró e antioxidante, contribuindo para atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo, especialmente no contexto do envelhecimento. No entanto, os estudos que

investigam a relação entre exercício físico e GDF15 apresentam resultados inconsistentes. Recentemente, foi sugerido que o aumento do GDF15 induzido pelo exercício físico pode ter efeitos anti-inflamatórios e cardioprotetores, além de melhorar o equilíbrio energético, o metabolismo lipídico, o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina (LERTPATIPANPONG et al., 2021; ROCHETTE et al., 2021; WENG et al., 2021). Considerando a relevância dessas descobertas para aplicações terapêuticas e a necessidade de esclarecer o impacto do exercício sobre o GDF15 e o estresse oxidativo, é fundamental conduzir mais investigações.

2 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA E LACUNA CIENTÍFICA

A teoria dos radicais livres sugere que o acúmulo de EROs contribui para o envelhecimento e para a disfunção mitocondrial, porém a interação entre esses fatores e suas consequências para a saúde em idosos permanecem pouco esclarecidas. Embora o GDF15 seja reconhecido como um biomarcador de estresse e envelhecimento, sua função e seus efeitos adaptativos ou prejudiciais ainda são controversos e não totalmente compreendidos.

Adicionalmente, enquanto a literatura indica que o exercício físico pode induzir a secreção de GDF15 e melhorar o equilíbrio redox, as evidências são inconsistentes quanto ao impacto do exercício regular sobre os níveis de GDF15 e sua associação com o estresse oxidativo e a função mitocondrial. A falta de consenso nos resultados sobre como o GDF15 responde ao exercício, especialmente no envelhecimento, sugere a necessidade de mais pesquisas. Assim, é crucial investigar com mais profundidade como o exercício físico influencia os níveis de GDF15, o estresse oxidativo e a função mitocondrial, e entender se esses efeitos podem ser explorados para intervenções terapêuticas eficazes na promoção da saúde e longevidade.

Visando responder às questões levantadas, a presente tese de doutorado é composta por três estudos, apresentados em três capítulos. Capítulo I: revisão sistemática; capítulo II: estudos experimentais realizados em modelo animal (ratos Wistar); e capítulo III: estudos experimentais realizados em culturas de células C2C12.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do treinamento aeróbio sobre a relação entre a expressão de GDF15 e o estresse oxidativo no envelhecimento.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I

- a) Revisar sistematicamente o efeito do exercício físico agudo e crônico sobre a expressão do GDF15;

Capítulo II - Estudo experimental em modelo animal

- a) Comparar o impacto do envelhecimento sobre a capacidade física, estresse oxidativo e expressão de GDF15 entre ratos jovens e idosos;
- b) Analisar o efeito do treinamento aeróbio para atenuar o impacto do envelhecimento em ratos idosos;
- c) Verificar a relação entre a concentração de GDF15 com o nível de capacidade física, idade e estresse oxidativo;

Capítulo III - Estudo experimental em cultura celular

- a) Analisar a expressão de GDF15 em células C2C12 em diferente estágio celular (mioblastos e miotubos) e sua relação com a função mitocondrial;
- b) Avaliar o efeito protetor do GDF15 após a indução do fenótipo oxidativo mitocondrial;

3.2 HIPÓTESE

O presente estudo espera que, embora o GDF15 seja expresso em contexto de estresse fisiológico, ele apresente um efeito protetor associado à atenuação dos efeitos do envelhecimento, dentre eles, estresse oxidativo e morte celular. Além disso, o treinamento aeróbio pode desempenhar um papel para redução dos níveis de GDF15 em repouso, uma vez que o treinamento crônico promove redução do estresse oxidativo, melhorando a função mitocondrial.

4 CAPÍTULO I. ESTUDO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

A literatura indica que o exercício físico pode estimular a secreção de GDF15, no entanto, ainda há pouco conhecimento sobre o efeito específico de diferentes tipos de exercício físico sobre a expressão de GDF15. Portanto, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre o efeito do exercício físico agudo e crônico sobre a expressão de GDF15 em humanos.

Este estudo foi concluído e submetido à revista *Sports Medicine*. Reia, T.A; Malta, E.S; Dutra, Y.M; Cruz, M.V; Silva, R.F; Zago, A.S. Effects of acute and chronic exercise on GDF15 expression in humans: A Systematic Review.

4.1 MÉTODOS

A presente revisão sistemática foi conduzida segundo as recomendações da *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)* (MOHER et al., 2009) e registrada em um banco de dados internacional de revisões sistemáticas em saúde e assistência social (PROSPERO CRD42024459181). Dois autores independentes realizaram os processos de seleção e extração de dados (TAR e ESM), a análise de qualidade metodológica (RFS e MVC) e a análise do risco de viés (YMD e MVC). Discrepâncias entre os avaliadores foram resolvidas por um terceiro autor (ASZ).

4.1.1 Estratégia de busca

Foi realizada uma busca eletrônica nas seguintes bases de dados: MEDLINE/PubMed, Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL) e Embase. A busca na literatura foi finalizada em 28 de fevereiro de 2024. As bases de dados foram pesquisadas utilizando a combinação dos seguintes descritores (aplicados aos títulos e resumos): (1) *growth differentiation factor 15* OR *GDF-15* OR *GDF15*; AND (2) *exercise* OR *physical activity* OR *physical exercise*. Foram excluídos artigos que não foram publicados em inglês, e não foi aplicada restrição de data na busca.

4.1.2 Seleção dos estudos

Todos os artigos com texto completo acessível foram selecionados para avaliação, caso fossem considerados elegíveis por pelo menos um revisor. O processo de seleção dos estudos foi dividido em duas etapas: (1) os títulos e resumos dos estudos selecionados foram analisados quanto à relevância e (2) o texto completo dos artigos selecionados na primeira etapa, foi analisado e considerado para inclusão com base nos critérios pré-definidos. Além disso, as referências dos estudos selecionados foram examinadas para a identificação de outros estudos elegíveis.

Os critérios de inclusão dos estudos foram: (1) ensaios clínicos ou investigações originais; (2) realizados com humanos; (3) associados ao exercício físico (agudo ou programa de treinamento regular); (4) que realizaram avaliações pré e pós exercício físico agudo ou programa de treinamento regular das concentrações de GDF15 em amostras de sangue ou músculo. Seções de livros, teses, dissertações, artigos de opinião, estudos observacionais, artigos de conferências, intervenções com suplementação e/ou métodos invasivos (como intervenções cirúrgicas, administração intravenosa de fluidos ou nutrientes, medicamentos, agentes anestésicos e contrastes), e revisões que passaram pelo filtro inicial foram excluídos posteriormente. O software Mendeley Desktop 1.17.13 (Elsevier, NY, EUA) foi utilizado para a gestão dos artigos e exclusão de duplicatas.

4.1.3 Extração de dados e categorização

O processo de extração de dados foi realizado utilizando um formulário padronizado que incluía detalhes como o delineamento do estudo, características dos participantes, protocolo de exercício utilizado e os desfechos medidos.

Inicialmente, os dados foram categorizados conforme as características dos participantes, permitindo a investigação dos dados de diferentes populações. Esses dados foram divididos em adultos saudáveis e grupos especiais (incluindo idosos ou participantes com alguma doença ou fator de risco). Posteriormente, os artigos foram categorizados segundo o tipo de exercício físico: exercício físico agudo ou programa de treinamento regular. Para o exercício físico agudo, os dados foram apresentados como tipo de exercício realizado, tempo e duração da sessão. Para o programa de treinamento regular, foram extraídos dados sobre o tipo de exercício, duração da sessão de treinamento, frequência e duração do programa de treinamento. Quanto aos desfechos avaliados, os dados foram separados de

acordo com os métodos utilizados para avaliar as concentrações de GDF15 (plasma ou músculo).

Na presente revisão, o principal desfecho investigado foi o nível de concentração plasmática ou muscular de GDF15 após exercício físico agudo ou regular. Esses resultados são apresentados como mediana (percentil) ou média $\pm$ desvio padrão (DP), erro padrão (EP) e intervalo de confiança (IC). O software MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, EUA) foi utilizado para os dados extraídos de figuras (VIEIRA, 2021).

4.1.4 Análise dos dados

A heterogeneidade da população e das intervenções tornou inviável a realização de uma meta-análise. Portanto, uma abordagem de análise narrativa foi adotada para esta revisão sistemática.

4.1.5 Avaliação de qualidade e risco de viés

A escala PEDro foi utilizada para analisar a qualidade dos ensaios clínicos, considerando 10 critérios. Com base nas pontuações totais, os estudos foram classificados como "qualidade excelente" (9 ou 10 pontos), "boa qualidade" (6-8 pontos), "qualidade razoável" (4 ou 5 pontos) ou "baixa qualidade" (≤ 3 pontos) (DE MORTON, 2009). A avaliação da qualidade não foi utilizada como critério de inclusão.

Devido às diferenças nos desenhos experimentais dos estudos incluídos, julgou-se mais apropriado usar dois instrumentos distintos para avaliar o risco de viés na presente revisão. As Diretrizes da Colaboração Cochrane foram utilizadas para avaliar o risco de viés dos ensaios clínicos (ou seja, estudos que prospectivamente atribuem intervenções relacionadas à saúde dos participantes) (Notice of Revised NIH Definition of Clinical Trial, [s.d.]), e a Avaliação Crítica do Instituto Joanna Briggs (JBI) foi utilizada para estudos de série de casos (ou seja, estudos que fazem observações em uma série de indivíduos recebendo a mesma intervenção) (MATHES; PIEPER, 2017). A análise do risco de viés foi calculada segundo as diretrizes da Colaboração Cochrane, utilizando o software Review Manager, Versão 5.3. O risco de viés foi classificado como alto, baixo ou incerto, considerando cinco domínios metodológicos (seleção, desempenho, detecção, atrito e relato) (HIGGINS et al., 2011). Além disso, a avaliação do JBI foi utilizada para avaliar domínios específicos dos estudos, por meio de 10 perguntas que poderiam ser respondidas com "sim", "não", "incerto"

ou "não aplicável" (baixo risco >70% de "sim", risco moderado 50-69% de "sim", e alto risco <50% de "sim") (MUNN et al., 2020). Qualquer divergência entre os revisores foi discutida e resolvida por consenso.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Resultados da busca

No total, 397 artigos foram identificados nas buscas nos bancos de dados: 256 artigos no EMBASE, 84 no MEDLINE e 57 na CENTRAL. Após a exclusão de artigos duplicados, os títulos e resumos de 302 artigos foram analisados, em seguida, 19 estudos foram selecionados para análise do texto completo. Finalmente, 18 artigos atenderam aos critérios para revisão final e extração de dados. Nenhum estudo adicional foi incluído após a revisão das referências. O processo de seleção dos estudos é apresentado na Figura 2.

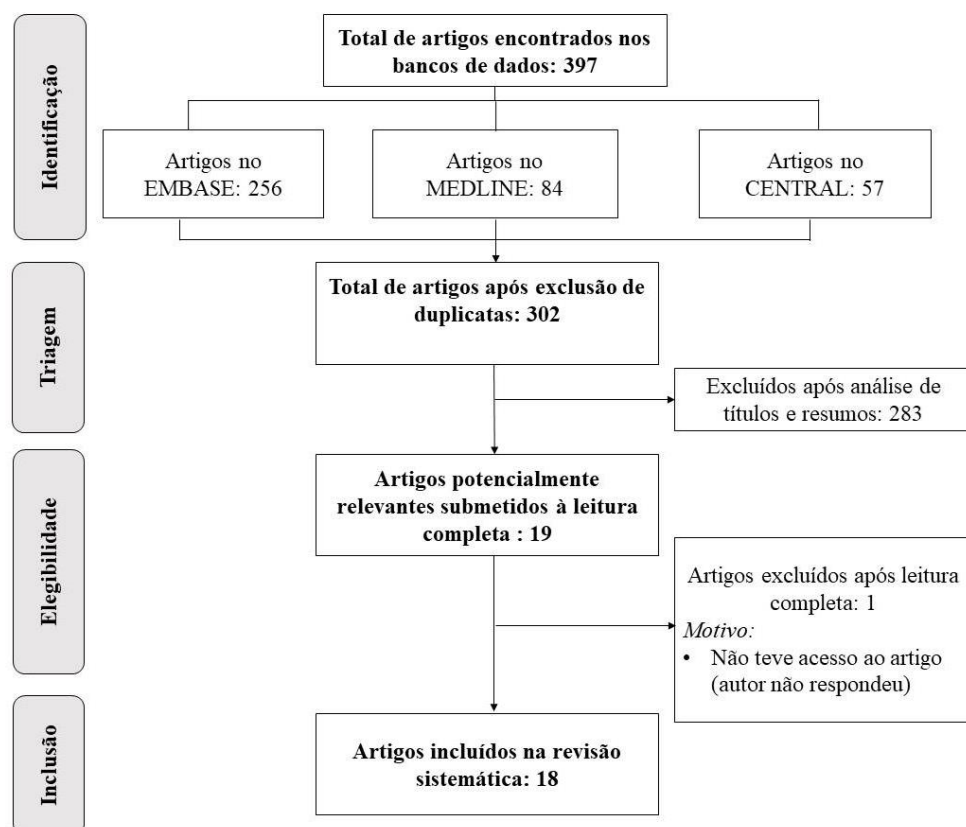


Figura 2 - Fluxograma para a seleção dos estudos.

4.2.2 Características dos estudos e dos participantes

A descrição geral de cada estudo está apresentada na Tabela 1. Dezoito artigos, publicados entre 2009 e 2024, foram selecionados para a análise final. O número total de participantes nesses estudos foi de 546. A maioria dos estudos incluiu apenas homens (CAMPDERRÓS et al., 2020; DE SOUSA et al., 2021; GALLIERA et al., 2014; KALETA-DUSS et al., 2020; KLEINERT et al., 2018; PLOMGAARD et al., 2022; SABARATNAM et al., 2024; TCHOU et al., 2009), embora alguns tenham incluído apenas mulheres (CHANG; NAMKUNG, 2021; SEO et al., 2021), ou uma combinação de homens e mulheres (CONTE et al., 2020; PERRONE et al., 2022; QUIST et al., 2023; YARDLEY et al., 2017; ZHANG; FEALY; KIRWAN, 2019). A média de participantes por estudo foi de 30.3 ± 4.9 , variando entre 7 e 90, e as faixas etárias médias variaram entre 24.0 ± 2.5 e 74.9 ± 4.6 anos. Os estudos incluíram sujeitos saudáveis (KLEINERT et al., 2018; PLOMGAARD et al., 2022), jogadores de rugby (GALLIERA et al., 2014), ciclistas (CONTE et al., 2020), corredores bem treinados (DE SOUSA et al., 2021; KALETA-DUSS et al., 2020; TCHOU et al., 2009), atletas recreativos (CAMPDERRÓS et al., 2020), triatletas moderadamente treinados e de elite (KLEIN et al., 2021a), pacientes com síndrome metabólica (CHANG; NAMKUNG, 2021), doenças cardiovasculares (MUNK et al., 2011; PERRONE et al., 2022; YARDLEY et al., 2017), idosos com sarcopenia (REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; SEO et al., 2021), indivíduos com sobrepeso/obesidade (QUIST et al., 2023; ZHANG; FEALY; KIRWAN, 2019) e pacientes com diabetes tipo 2 (SABARATNAM et al., 2024).

Tabela 1 - Características e resultados dos estudos incluídos.

Autor/ Ano/ Desenho experimental	Participantes	Condição	Treinamento	Análise de GDF15	Resultados	Fonte dos dados
Tchou et al., 2009/ transversal	Homens saudáveis corredores (n=15); idade média 41.2±1.2 anos	Exercício agudo: - Ultramaratona: 246 km em menos de 36h	N/A	Soro/ ELISA	Basal: 563.9 ± 57.1 pg·mL ⁻¹ Pós: 2,311.1 ± 462.3 pg·mL ^{-1*} Pós-48h: 862.0 ± 158.0 pg·mL ^{-1*}	Tabela 1
Munk et al., 2011/ paralelo e controlado	Pacientes com angina estável e implantação de stent (n=36); idade média 60.2±9.3 anos Training (n=18) Control (n=18)	Programa de treinamento: - IT: 4 blocos de 4min a 80-90% da FC _{máx} com pausas ativas de 3min a 60-70% da FC _{máx} (bicicleta ou corrida) - RT: 10min de exercícios abdominais e de coluna Condição controle: - Sem treinamento	1h por sessão; 3x/sem por 6 meses	Plasma/ imunorr adiométrico	Treinamento Basal: 12,240±3,958 ng·L ⁻¹ Pós: 14,835±4,876 ng·L ⁻¹ Controle: Basal: 12,974±3,224 ng·L ⁻¹ Pós: 12,031±2,437 ng·L ⁻¹	Figura 4~
Galliera et al., 2014/ transversal	Jogadores profissionais de rugby (n=29); 27.7±3.9 anos	Programa de treinamento: <i>Treinamento multicomponente:</i> - TR, exercício pliométrico e para habilidades de rugby, TI, esportes livres e TE	TR, pliometria, habilidades de rugby e/ou TI: - 2h por sessão (1 ou mais tipos de treino); 3x/sem por 35 dias. TI, TE, e esportes livres:	Soro/ ELISA	Basal: 152.6 ± 33.4 ng·L ⁻¹ Pós: 193.9± 47.7 ng·L ^{-1*}	Tabela 1

- 2h por sessão;
1x/sem por
35 dias

Yardley et al., 2017/ crossover	Pacientes com transplante cardíaco (n=14)	Exercício agudo: - EE: 30min de corrida a 60-70% do esforço máximo. - EI: 4 blocos de 4min de corrida a 85-95% do esforço máximo, com 3 min de pausa ativa a 60-70% do esforço máximo, em esteira	N/A	Plasma/ ELISA	EE [§] : Basal: 1.03±0.11 ng·mL ⁻¹ Pós-15min: 1.20±0.19 ng·mL ⁻¹ Pós-30min: 1.19±0.19 ng·mL ⁻¹ Pós-1h: 1.12±0.19 ng·mL ⁻¹ Pós-2h: 1.10±0.19 ng·mL ⁻¹ EI: Pós-15min: 1.10±0.11 ng·mL ⁻¹ Pós-30min: 1.15±0.11 ng·mL ⁻¹ Pós-1h: 0.96±0.11 ng·mL ⁻¹ Pós-2h: 0.93±0.08 ng·mL ⁻¹	Tabela 3
Kleinert et al., 2018/ transversal	Homens sudáveis (n=7); 27±1 anos	Exercício agudo: - EE: 1h a do 67% do VO _{2max} em ciclo ergômetro	N/A	Plasma/ ELISA	EE: Basal: 206.4±28.0 pg·mL ⁻¹ Pós-10min: 265.6±38.1 pg·mL ^{-1*} Pós-2h: 345.4 ±45.9 pg·mL ^{-1*#}	Figura 1C~
Zhang et al., 2019/ transversal	Obesos sedentários (n=24); 65.3±0.9 anos	Programa de treinamento: - TE: esteira e/ou ciclo ergômetro a 85% da FC _{máx}	1h por sessão; 5x/sem por 12 semanas	Plasma/ ELISA	Basal: 644.11±42.55 pg·mL ⁻¹ Pós: 704.37 ± 47.19 pg·mL ^{-1*}	Texto
Campderrós et al., 2020/ transversal	Atletas recreacionais masculinos (n=18); 41.7 ±5.0 anos	Exercício agudo: - Maratona: 42.2 km	N/A	Plasma/ ELISA	Basal: 372.8 ± 21.2 pg·mL ⁻¹ Pós: 1,164 ± 124.7 pg·mL ^{-1*} Pós-48h: 347.6 ± 15.8 pg·mL ^{-1#}	Tabela 1
Conte et al.,	Ciclistas	Exercício agudo:	N/A	Plasma/	Basal: 540.2±80.2 pg·mL ⁻¹	Texto

2020/ transversal	(n=47); 45.93 ± 7.3 anos	- Ciclismo de estrada: 130 km; Inclinação total de 1,871m; Duração: 7.5h tempo máximo permitido		ELISA	Pós: 1,623.0±73.1 pg·mL ⁻¹ * Pós-24h: 818.5±80.3 pg·mL ⁻¹ *#	
Kaleta-Duss et al., 2020/ transversal	Corredores amadores (n=35); 39 ± 8 anos	Exercício agudo: - Maratona: 42.2 km por 234 ± 25 min	N/A	Soro/ ELISA	Basal: 51.0 ± 27.6 pg·mL ⁻¹ Pós: 137.3 ± 85.2 pg·mL ⁻¹ * Pós-2sem: 51.7 ± 24.5 pg·mL ⁻¹ #	Tabela 3
de Sousa et al., 2021/ transversal	Corredores amadores Brasileiros (n=57); 41.1±0.9 anos	Exercício agudo: - Maratona: 42 km running por 248.9 ± 5.8 min	N/A	Plasma/ ELISA	Basal: 57.6 (limite superior; limite inferior: 339.7; 22.0) pg·mL ⁻¹ Pós: 114.3 (511.6; 28,3) pg·mL ⁻¹ * Pós-24h: 52.4 (238.0; 11.5) pg·mL ⁻¹ Pós-72h: 66.0 (444.5; 18.8) pg·mL ⁻¹	Texto
Seo et al., 2021/ paralelo	Mulheres idasas com sarcopenia (n=22) TR (n=12): 70.3 ± 5.4 anos Controle (n=10): 72.9 ± 4.8 anos	Programa de treinamento: - TR: grande grupo muscular com treino adicional para pequeno grupo muscular usando elástico a 4-8 da Escala OMNI - Condição controle: - Sem treinamento	1h por sessão; 3x/sem por 16 semanas	Plasma/ ELISA	TR: Basal: 902.0 ± 406.9 pg·mL ⁻¹ Pós: 961.8 ± 355.8 pg·mL ⁻¹ ControlE: Basal: 831.0 ± 262.8 pg·mL ⁻¹ Pós: 949.3 ± 326.7 pg·mL ⁻¹	Tabela 6
Chang et al., 2021/ paralelo	Mulheres com síndrome metabólica	Programa de treinamento: - TE+TR: sessão aeróbia com RPE entre 11–	1h por sessão; 3x/sem por 12 semanas	Soro/ ELISA	TE + TE: Basal: 642.6 ± 65.0 pg·mL ⁻¹ Pós: 570.3 ± 56.1 pg·mL ⁻¹ *	Texto

	(n=29)	13/14-16 e treinamento de força a 7-8 na escala de OMNI			Controle: Basal: $516.3 \pm 62.3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pós: $520.5 \pm 61.9 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	TE + TE (n=15): 60.2 ± 7.9 anos	Condição controle: - Sem treinamento				
	Controle (n=14): 57.5 ± 12.2 anos					
Klein et al., 2021/Estudo 1: crossover; Estudos 2 and 3: transversal	Estudo 1: homens moderadamente treinados (n=20); 24 ± 3.2 anos EE (n=10); ER (n=10) Study 2: triathletas masculinos de elite (n=15); 27.0 ± 3.1 anos Estudo 3: homens moderadamente treinados (n=20); 32.0 ± 8.5 anos	Exercício agudo: Estudo 1: - EE: 1h de ciclismo a 70% do $\text{VO}_{2\text{pico}}$. - ER: 1h com alto volume. Estudo 2: - EE: 4h de ciclismo a 73% da $\text{FC}_{\text{máx}}$ Estudo 3: - Maratona: 42.2 km for 243 ± 8 min	N/A	Plasma/ ELISA	Estudo 1: EE: Basal e: $285.7 \pm 19.3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pós: $329.3 \pm 15.3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-1h: $366.7 \pm 13.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-2h: $357.3 \pm 12.6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-3h: $355.3 \pm 10.6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ ER: Basal: $273.5 \pm 11.8 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pós: $304.6 \pm 13.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-1h: $283.3 \pm 16.5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pós-2h: $320.7 \pm 15.7 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-3h: $334.1 \pm 0.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Estudo 2: Basal: $350.5 \pm 0.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Durante: $501.2 \pm 0.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pós: $1,851.1 \pm 262.2 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-4h: $832.1 \pm 75.4 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-24h: $353.8 \pm 0.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Estudo 3: Basal: $363.6 \pm 0.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Figura 1ABC~

					Pós: $1.628.3 \pm 193.4 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$ Pós-4dias: $347.2 \pm 0.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pós-9dias: $334.1 \pm 0.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	
Perrone et al., 2022/ transversal	Pacientes com síndrome da hipoplasia do coração esquerdo (n=12); 24 ± 2.5 anos	Programa de treinamento: - TE: caminhada e corrida na esteira ou bicicleta a 70% da $FC_{\text{máx}}$	40min por sessão; 3x/sem por 4 semanas	Sangue/ ELISA	Basal: $441.0 \pm 94.2 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pós: $590.1 \pm 126.8 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1*}$	Tabela 2
Plomgaard et al., 2022/ transversal	Homens saudáveis (n=10)	Exercício agudo: - EE: 2h a 60% do $VO_{2\text{max}}$ em cicloergômetro	N/A	Plasma/ ELISA	Basal: $338.1 \pm 24.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Durante: $386.6 \pm 32.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Pós: $407.6 \pm 36.7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Pós-30min: $495.4 \pm 60.3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Pós-1h: $601.5 \pm 95.7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1*}$ Pós-2h: $567.5 \pm 104.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1*}$ Pós-3h: $521.6 \pm 79.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Pós-4h: $532.1 \pm 61.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$	Figura 1A~
Quist et al., 2023/ transversal somente visita 1	Adultos sedentários com sobrepeso/obesidade (n=90); 36 ± 28 anos	Exercício agudo: -EE: ~1h a 60% do $VO_{2\text{max}}$ em cicloergômetro	N/A	Plasma/ ELISA	Basal: 464 (423, 508) Pós: 547 (499, 600) ^a Pós-30min: 353 (488, 586) ^{ab} Pós-1h: 611 (577, 669) ^{abc}	Tabela 1 e Tabela suplementar 2
Rezaei et al., 2024/ paralelo	Homens idosos com sarcopenia (n=19); 74.9 ± 4.6 anos TR (n=10)	Programa de treinamento: - TR: treinamento em suspensão, corpo inteiro, a 60-65% de 1RM Condição controle: - Sem treinamento	1h por sessão; 3x/sem por 8 semanas	Soro/ ELISA	Exercício ^s : Basal: $340.1 \pm 66.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Pós: $365.7 \pm 75.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1*}$ Controle: Basal: $290.3 \pm 36.4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Pós: $300.2 \pm 39.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1*}$	Tabela 3

Sabaratnam et al., 2024/ paralelo	Controle (n=9)					
	Homens sobrepesos/obesos com T2D (n=13), 55.4 ± 2.0 anos; Controle (n=14), 54.7 ± 2.3 yrs	Exercício agudo: - EE: 1h a 70% do VO_{2max} em cicloergômetro	N/A	Plasma; músculo / ELISA e PCR, respectivamente	Expressão mRNA: Grupo Diabetes Tipo 2 Basal: 0.76±0.1 a.u. Pós: 2.71±0.5 a.u.* Pós-3h: 1.22±0.3 a.u.*# Controle Basal: 0.62±0.1 a.u. Pós: 1.86±0.3 a.u.* Pós-3h: 0.76±0.1 a.u.*# Soro: Grupo Diabetes Tipo 2 Basal: 615.3±49.1 pg·mL ⁻¹ Pós: 749.0±70.8 pg·mL ^{-1*} Pós-3h: 745.0±68.8 pg·mL ^{-1*} Controle Basal: 522.9±39.3 pg·mL ⁻¹ Pós: 599.5±47.2 pg·mL ^{-1*} Pós-3h: 572.0±49.1 pg·mL ^{-1*}	Figura 1A [~]

Dados apresentados como mediana (± 5° - 95° percentil) ou média (± desvio padrão, erro padrão ou intervalos de confiança). TI: Treinamento intervalado; EI: Sessão de exercício intervalado; TR: Treinamento resistido; ER: Sessão de exercício resistido; TE: Treinamento de *endurance*; EE: Sessão de exercício de *endurance*; T2D: Diabetes tipo 2; N/A: Não aplicável; *: p<0,05 em relação ao basal; #: p<0,05 em relação ao pós-exercício; \$: p<0,05 efeito de grupo; &: p<0,05 entre grupos; ^a: alteração percentual em comparação ao basal; ^b: alteração percentual em comparação ao pós-exercício; ^c: alteração percentual comparado ao pós-30min; [~]: valores aproximados.

4.2.3 Características das intervenções e desfechos

Todos os estudos avaliaram as concentrações de GDF15 no sangue por meio de ELISA, antes e após a intervenção. Um artigo, além das amostras de sangue, analisou as concentrações de GDF15 no músculo utilizando qRT-PCR (SABARATNAM et al., 2024). As medidas de GDF15 foram realizadas após ultramaratona (TCHOU et al., 2009), maratonas (CAMPDERRÓS et al., 2020; DE SOUSA et al., 2021; KALETA-DUSS et al., 2020) e sessões de exercício de *endurance* (EE) (CONTE et al., 2020; KLEINERT et al., 2018; PLOMGAARD et al., 2022; QUIST et al., 2023; SABARATNAM et al., 2024; YARDLEY et al., 2017), e um estudo investigou três exercícios agudos diferentes: EE combinado com exercício de resistência (ER), sessão de EE e corrida de maratona (KLEIN et al., 2021). Todos os estudos mostraram aumentos significativos nas concentrações de GDF15 no sangue após o exercício agudo (aumento médio de 110.9%, variando de 4.5% a 347.8%). Alguns estudos relataram que os níveis de GDF15 diminuíram após 24h (CONTE et al., 2020), 48h (CAMPDERRÓS et al., 2020; TCHOU et al., 2009) e 2 semanas (KALETA-DUSS et al., 2020) durante o período de recuperação.

Sete estudos analisaram os efeitos do GDF15 após programas de treinamento regular. O protocolo de treinamento mais comum foi de 3 dias por semana, com duração variando entre 4 e 16 semanas, e apenas um estudo adotou uma duração de 6 meses (MUNK et al., 2011). Dois estudos submeteram os voluntários ao treinamento de *endurance* (TE) como intervenção (PERRONE et al., 2022; ZHANG; FEALY; KIRWAN, 2019), dois ao treinamento resistido (TR) (REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; SEO et al., 2021), um ao treinamento intervalado (TI) versus TR (MUNK et al., 2011), outro ao treinamento multicomponente (GALLIERA et al., 2014), e um TE combinado com TR (CHANG; NAMKUNG, 2021). Os níveis de GDF15 aumentaram após o treinamento regular em quatro estudos (GALLIERA et al., 2014; PERRONE et al., 2022; REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; ZHANG; FEALY; KIRWAN, 2019), enquanto dois estudos não apresentaram diferenças significativas (MUNK et al., 2011; SEO et al., 2021), e um estudo observou uma redução na concentração de GDF15 após a intervenção (CHANG; NAMKUNG, 2021).

4.2.4 Qualidade metodológica

Entre os estudos incluídos, 5 foram considerados ensaios clínicos (CHANG; NAMKUNG, 2021; MUNK et al., 2011; QUIST et al., 2023; REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; SEO et al., 2021), atingindo uma pontuação média de 7.8 ± 0.5 u.a na escala PEDro, indicando uma boa qualidade. As pontuações de cada estudo estão disponíveis em Apêndice A. O resumo do risco de viés desses ensaios clínicos é apresentado na Figura 3. De modo geral, os ensaios clínicos incluídos nesta revisão apresentaram baixo risco de viés. Os 5 estudos incluídos apresentaram informações explícitas sobre os métodos utilizados para o cegamento dos participantes e da equipe, dados de desfecho incompletos, relato de desfecho seletivo e outros vieses. Dos 5 estudos incluídos, 4 apresentaram informações insuficientes sobre o processo de alocação (MUNK et al., 2011; QUIST et al., 2023; REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; SEO et al., 2021), 3 sobre a geração de sequência aleatória (MUNK et al., 2011; QUIST et al., 2023; REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024) e 3 sobre o cegamento das avaliações de desfecho (MUNK et al., 2011; REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; SEO et al., 2021).

	Geração de sequência aleatória	Ocultação de alocação	Cegamento de participantes e pessoal	Cegamento de avaliação de desfecho	Desfechos incompletos	Relato de desfecho seletivo	Outros vieses
Chang et al.,	+	+	+	+	+	+	+
Munk et al.,	?	?	+	?	+	+	+
Quist et al.,	?	?	+	+	+	+	+
Rezaei et al.,	?	?	+	?	+	+	+
Seo et al.,	+	?	+	?	+	+	+

Figura 3 - Resumo do risco de viés dos estudos clínicos incluídos.

Os demais estudos incluídos (ou seja, 13 artigos) foram considerados séries de casos, e os resultados são apresentados na Tabela 2. Cinco dos 13 estudos (38%) foram considerados

de alto risco de viés, 5 (38%) foram considerados de baixo risco, e 3 foram considerados de risco moderado (23%). A maioria dos estudos relatou adequadamente as características demográficas dos participantes (61% dos estudos) e utilizou métodos estatísticos apropriados (100% dos estudos). No entanto, a maioria das séries de casos forneceu informações insuficientes para avaliar a inclusão completa dos participantes no estudo (resposta "incerta" em 91% dos estudos para a questão 5) e faltaram informações sobre os critérios de inclusão (nenhuma resposta em 38% dos estudos para a questão 1) e a inclusão consecutiva (nenhuma resposta em 54% dos estudos para a questão 4) dos participantes.

Tabela 2 - Avaliação de risco de viés do JBI para estudos de série de casos.

Estudo	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Sim*	Risco ^{&}
Campderrós et al.,	N	N.A.	N.A.	S	I	S	N.A.	N.A.	N.A.	S	60%	MODERADO
Conte et al.,	N	I	I	N.A.	I	S	N	N.A.	N.A.	S	28%	ALTO
De Sousa et al.,	S	N.A.	N.A.	N	I	S	N.A.	N.A.	N.A.	S	60%	MODERADO
Galliera et al.,	S	N.A.	N.A.	S	I	S	N.A.	N.A.	N.A.	S	80%	BAIXO
Kaleta-Duss et al.,	S	N.A.	N.A.	S	I	S	N.A.	N.A.	N.A.	S	80%	BAIXO
Klein et al.,	N	N.A.	N.A.	N	I	S	N.A.	N.A.	N.A.	S	40%	ALTO
Kleinert et al.,	S	N.A.	N.A.	N	I	S	N.A.	N.A.	N.A.	S	60%	MODERADO
Perrone et al.,	S	U	S	N	I	N	N	S	N.A.	S	44%	ALTO
Plomgaard et al.,	N	N.A.	N.A.	N	N	N	N.A.	N.A.	N.A.	S	20%	ALTO
Sabaratnam et al.,	S	S	S	N	I	S	Y	N.A.	N.A.	S	75%	BAIXO
Tchou et al.,	N	N.A.	N.A.	S	I	N	N.A.	N.A.	N.A.	S	40%	ALTO
Yardley et al.,	S	S	S	S	N.A.	S	S	N.A.	N.A.	S	100%	BAIXO
Zhang et al.,	S	S	S	N.A.	N.A.	S	N	Y	N.A.	S	86%	BAIXO

Q: questão; N: resposta "não"; S: resposta "sim"; I: resposta "incerto"; N.A.: resposta "não se aplica". *: O percentual de respostas "sim" foi calculado apenas para as perguntas aplicáveis; assim, o risco de viés foi classificado como BAIXO com mais de 70% de respostas "sim", MODERADO com 50-69% de respostas "sim" e ALTO com menos de 50% de respostas "sim" (MUNN et al., 2020).

4.3 DISCUSSÃO

A presente revisão sistemática avaliou o efeito do exercício físico sobre a expressão de GDF15 em humanos. Os dezoito artigos incluídos mostraram que diferentes tipos de exercício, tal como, exercício de resistência, *endurance* e corridas de maratona podem promover um aumento agudo nas concentrações de GDF15 no sangue em diversas populações (pessoas saudáveis, atletas e indivíduos obesos). No entanto, foi possível observar que o efeito

de um programa de treinamento regular podem apresentar discrepâncias nesta variável. A concentração de GDF15 aumentou após programa de treinamento em quatro estudos (GALLIERA et al., 2014; PERRONE et al., 2022; REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024; ZHANG; FEALY; KIRWAN, 2019), enquanto dois estudos não mostraram diferença significativa (MUNK et al., 2011; SEO et al., 2021) e, um estudo observou uma redução na concentração de GDF15 após a intervenção (CHANG; NAMKUNG, 2021). Esses resultados ampliam o conhecimento atual sobre o assunto e corroboram com estudos anteriores (CONTE et al., 2020; KLEIN et al., 2021; ROCHETTE et al., 2021), os quais sugerem que o GDF15 pode atuar como uma resposta compensatória às adaptações induzidas pelo exercício e contribuir para promoção da saúde em diferentes populações.

4.3.1 Efeito do exercício físico agudo sobre GDF15

A maioria dos estudos avaliou o efeito do exercício físico agudo sobre o GDF15. Alguns pesquisadores analisaram os níveis de GDF15 após uma maratona e observaram um aumento significativo em relação aos valores basais, com uma redução próximo ao inicial dentro de 24 horas (CAMPDERRÓS et al., 2020; DE SOUSA et al., 2021; KALETA-DUSS et al., 2020; KLEIN et al., 2021; TCHOU et al., 2009). No estudo conduzido por Tchou et al. (2009), o qual investigou a concentração de GDF15 em atletas masculinos que participaram de uma ultramaratona de 246 km, foram realizadas medidas antes, ao final da corrida e 48 horas após a conclusão do evento. Os resultados mostraram um aumento na concentração de GDF15 do início até o final da corrida, com uma redução observada 48 horas depois.

Neste estudo, as concentrações de endoglina e peptídeo natriurético tipo B N-terminal (NT-pro-BNP) também aumentaram significativamente ao final da corrida, possivelmente devido ao aumento do estresse miocárdico, e diminuíram abruptamente 48 horas após a corrida (TCHOU et al., 2009). Esse aumento transitório parece apoiar a hipótese de fadiga cardíaca resultante do estresse miocárdico associado ao exercício físico (EGGERS et al., 2008). Considerando que NT-pro-BNP e GDF15 aumentaram significativamente durante a corrida e tendem a retornar aos valores normais 48 horas após a corrida, especula-se que esses biomarcadores possam desempenhar um papel protetor para os tecidos e vasos cardíacos. O GDF15 interage com seu receptor, GFRAL, ativando as vias PI3K/AKT e CREB1, que estão envolvidas na resistência ao estresse celular e na proliferação celular. Além disso, regula a angiogênese através dos receptores ALK e da fosforilação de Smad, auxiliando na proteção e reparo do miocárdio (ROCHETTE et al., 2021). Essa hipótese é apoiada pelo fato de que o

GDF15, associado a outros biomarcadores, aumenta durante o exercício físico intenso e tende a normalizar durante o período de recuperação (TCHOU et al., 2009).

De maneira similar, esse comportamento do GDF15 foi observado em atletas recreacionais (CAMPDERRÓS et al., 2020), corredores de maratona (DE SOUSA et al., 2021; KALETA-DUSS et al., 2020) e homens moderadamente treinados (KLEIN et al., 2021) que participaram da corrida de maratona (42,2 km). Durante o esforço intenso, especialmente em eventos prolongados como maratonas, há um aumento substancial na produção de GDF15. Estudos explicam que esse aumento é uma resposta ao estresse mecânico e metabólico sobre o tecido muscular. Essas condições ativam várias vias de sinalização intracelular, incluindo a via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), conhecida por regular a expressão de genes de resposta ao estresse, incluindo o GDF15 (CONTE et al., 2019; TCHOU et al., 2009). A literatura relata que o estresse fisiológico pode sinalizar a produção de moléculas capazes de estimular uma resposta compensatória no metabolismo, bem como a produção de GDF15 (CONTE et al., 2019).

Aparentemente, o aumento dos leucócitos, neutrófilos e dos marcadores de dano muscular está associado aos níveis de GDF15 após a corrida. A interação entre esses peptídeos parece desempenhar um papel na reparação e regeneração muscular após corridas prolongadas e de alta intensidade (DE SOUSA et al., 2021). Além disso, outro estudo também mostrou que os níveis de GDF15 pós-corrida apresentaram uma correlação positiva com o aumento da contagem total de leucócitos e com a neutrofilia, supondo que GDF15 possa servir como marcador da resposta inflamatória e do estresse muscular, além de auxiliar na regeneração e adaptação ao estresse (CAMPDERRÓS et al., 2020).

Kaleta et al. (2020) observaram um aumento significativo nas concentrações de biomarcadores cardiovasculares e GDF15 após uma maratona, o que pode indicar uma sobrecarga hemodinâmica aguda do volume e da pressão cardíaca imediatamente após a maratona. Esses achados corroboram com estudos que mostram que, embora as concentrações de GDF15 em repouso sejam inversamente relacionadas ao condicionamento físico e a jovens saudáveis, os níveis de GDF15 aumentam em resposta ao estresse fisiológico transitório, como o exercício físico (CONTE et al., 2020; ENARSSON et al., 2021). O esforço prolongado induz uma resposta inflamatória e afeta os índices de estresse oxidativo, endotelial e das paredes ventriculares, resultando em aumento nas concentrações de GDF15 em comparação com controles saudáveis (TCHOU et al., 2009).

Além disso, Conte et al. (2020) relataram que a concentração de GDF15 no sangue está inversamente associada ao nível de atividade física e associado a marcadores de

inflamação e fraqueza muscular. Pacientes inativos apresentavam concentrações mais altas de GDF15, enquanto pessoas ativas, como ciclistas antes da corrida, exibiam níveis mais baixos em comparação com os sujeitos controle. No entanto, exercícios físicos intensos levaram a um aumento dramático nos níveis plasmáticos de GDF15 nos ciclistas, que após a corrida se igualaram aos níveis observados no grupo controle (CONTE et al., 2020). Uma possível explicação é que o aumento transitório de GDF15 seja uma resposta adaptativa ao estresse agudo, ajudando a equilibrar as respostas oxidativas e inflamatórias para proteger o miocárdio e outros tecidos contra os danos provocados pelo exercício (DE SOUSA et al., 2021).

De maneira semelhante, esse comportamento do GDF15 foi observado em triatletas de elite (KLEIN et al., 2021) e em indivíduos saudáveis (KLEINERT et al., 2018; PLOMGAARD et al., 2022) após 4 horas e 1-2 horas em cicloergômetro, respectivamente. Notavelmente, o aumento do GDF15 foi mais pronunciado após maratonas em comparação com o cicloergômetro. Além disso, foi relatado que exercícios vigorosos de resistência, com duração superior a 2 horas, resultam em concentrações de GDF15 semelhantes às observadas em pacientes com doenças mitocondriais, infecções e câncer (KLEIN et al., 2021). Esses achados confirmam que o exercício prolongado provoca uma resposta inflamatória e afeta significativamente os índices de estresse oxidativo, levando a um aumento nos níveis de GDF15 (TCHOU et al., 2009).

Acredita-se que o aumento do GDF15 induzido pelo exercício físico desempenhe um papel na fadiga como uma estratégia para proteger o organismo e conservar energia (KLEIN et al., 2021). Além disso, a privação crônica de energia foi associada a níveis elevados de GDF15 no plasma, apoiando a ideia de que o GDF15 está envolvido na sinalização metabólica em humanos (PLOMGAARD et al., 2022).

Por outro lado, Yardley et al. (2017) compararam as respostas de GDF15 em pacientes com transplante cardíaco antes, durante e após sessões de exercício de alta intensidade *versus* sessões de exercício de intensidade moderada. Ambas as sessões de treinamento apresentaram um aumento modesto nos níveis de GDF15. É importante destacar que níveis elevados de GDF15 tem sido relatados como biomarcadores de várias condições, como doenças cardiovasculares (CONTE et al., 2019; HAGSTRÖM et al., 2017), o que pode explicar essa resposta no presente estudo, uma vez que os valores já estavam elevados no início. Outra possível explicação é a duração das sessões em comparação com os estudos mencionados, que pode não ter sido suficiente para elevar os níveis de GDF15 (TCHOU et al., 2009).

Consistente com isso, observou-se um aumento na expressão gênica muscular e nos níveis séricos de GDF15 em ambos os grupos (sobrepeso/obesos com diabetes tipo 2 e

controle) após 1 hora em cicloergômetro (SABARATNAM et al., 2024). No entanto, durante a recuperação, a expressão muscular de GDF15 diminuiu em direção aos valores basais, enquanto os níveis séricos de GDF15 permaneceram elevados. Essa falta de correlação entre as mudanças na expressão muscular e os níveis circulantes de GDF15 sugere que o músculo pode não ser o principal tecido responsável pelos elevados níveis circulante de GDF15 em resposta ao exercício agudo (SABARATNAM et al., 2024). Kleinert et al. (2018) também relataram que esse aumento não parece ser mediado somente pela secreção de GDF15 do músculo em exercício, uma vez que as concentrações venosas e arteriais de GDF15 na perna exercitada foram semelhantes. É possível que o GDF15 seja secretado pelo músculo para atuar localmente de forma autócrina ou parácrina. No entanto, vale destacar que a expressão de GFRAL não foi detectada em tecidos periféricos, incluindo o músculo esquelético, em estudos com camundongos (MULLICAN et al., 2017). Dessa forma, supõe-se que os mecanismos que regulam a expressão e secreção específica de tecido durante e após o exercício agudo permanecem desconhecidos.

Em resumo, esses estudos indicam que as concentrações de GDF15 aumentam significativamente em resposta a exercícios físicos agudos, prolongados e de alta intensidade, refletindo um estresse fisiológico transitório e inflamação. Esses efeitos parecem ser consistentes entre diferentes populações, sejam saudáveis ou grupos especiais. O retorno aos níveis basais após o exercício pode sugerir uma associação do GDF15 com o processo de recuperação. No entanto, é crucial reconhecer que a recuperação é um processo complexo e que a relação entre GDF15 e recuperação deve ser considerada com cautela (PEAKE et al., 2017). Essa resposta dinâmica destaca o papel do GDF15 como um marcador de estresse induzido pelo exercício e sugere que ele possa ter funções protetoras e adaptativas na modulação da inflamação e na proteção dos tecidos.

4.3.2 Efeito de um programa regular de treinamento sobre GDF15

Sete estudos desta revisão analisaram os efeitos do GDF15 após programas regulares de treinamento. Foi identificada uma heterogeneidade nos protocolos de treinamento e nas populações estudadas, dificultando comparações diretas entre os estudos, sugerindo, portanto, que as variações nos treinamentos e participantes podem ter efeitos distintos nos níveis de GDF15.

Nesse sentido, dois estudos analisaram idosos com sarcopenia após 8 (REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024) e 16 semanas de treinamento resistido (SEO et al., 2021). No

primeiro estudo, foi observado um aumento significativo no grupo treinado comparado ao grupo controle. Em contraste, no segundo estudo, os níveis de GDF15 não mudaram após 16 semanas de treinamento. Recentemente, níveis elevados de GDF15 foram associados com envelhecimento e doenças ou distúrbios relacionados à idade, como a sarcopenia (OBA et al., 2024), dificultando a interpretação do efeito do treinamento sobre o GDF15 nessa população.

Achados semelhantes foram relatados por Zhang et al. (2019), que analisaram os níveis de GDF15 em 24 indivíduos obesos após 12 semanas de treinamento de *endurance*. Os autores notaram um aumento na concentração de GDF15, bem como uma correlação significativa com a perda de massa adiposa (PLOMGAARD et al., 2022), o que pode estar associado ao efeito lipolítico sugerido do GDF15 (LAURENS et al., 2020). No entanto, os efeitos do treinamento físico na obesidade são complexos de interpretar, pois a obesidade está ligada a níveis elevados de GDF15 (HAGSTRÖM et al., 2017). Assim, a perda de peso induzida pelo exercício pode complicar a avaliação dos efeitos do treinamento sobre a concentração plasmática de GDF15.

Nesse contexto, Munk et al. (2011) relataram que o treinamento físico (TI e TR) durante 6 meses não alterou os níveis plasmáticos de GDF15 em 36 pacientes com angina estável e implante de *stent*. No entanto, Perrone et al. (2022) avaliaram pacientes com síndrome da hipoplasia do coração esquerdo após 4 semanas de TE e observaram um aumento significativo na concentração de GDF15. Essa discrepância pode ser atribuída às diferenças nos protocolos de treinamento. Tanto a intensidade quanto a duração do exercício parecem ser determinantes primários da secreção de GDF15 induzida pelo exercício (GIL et al., 2019; KLEIN et al., 2021). Outra explicação é que níveis elevados de GDF15 são reconhecidos como um biomarcador de doenças cardiovasculares (ROCHETTE et al., 2021). Portanto, a interpretação desses resultados pode ser complexa, já que biomarcadores cardíacos estão ligados às variações nas concentrações de GDF15. Estudos indicam que camundongos deficientes de GDF15 apresentam uma área de infarto maior e maior apoptose de cardiomiócitos, sugerindo que o GDF15 endógeno desempenha um papel cardioprotetor com propriedades antiapoptóticas (ROCHETTE et al., 2021).

Chang et al. (2021) investigaram os efeitos do TE combinado com TR durante 12 semanas em mulheres com síndrome metabólica. Os dados mostraram uma redução nos níveis de GDF15 comparado ao grupo controle. Uma possível explicação é que a síndrome metabólica envolve estresse oxidativo associado à disfunção mitocondrial, ativando respostas compensatórias por meio de moduladores metabólicos, como o GDF15. Supõe-se que altos níveis circulantes de GDF15 sejam induzidos pela exposição ao estresse metabólico

prolongado para restaurar a homeostase metabólica (FUJITA et al., 2016). Assim, os dados sugerem que a intervenção com exercício ajudou a reduzir os níveis desses moduladores de estresse metabólico, resultando em uma diminuição do GDF15 (CHANG; NAMKUNG, 2021). Em consonância com isso, ciclistas ativos apresentaram níveis basais de GDF15 mais baixos quando comparados a sedentários da mesma faixa etária (CONTE et al., 2020).

Apenas um estudo nesta revisão avaliou o efeito do treinamento em indivíduos saudáveis. Jogadores de rugby de elite, submetidos a um período de 35 dias de treinamento multicomponente, apresentaram um aumento nos níveis séricos de GDF15 de 153 para 194 pg•ml⁻¹. No entanto, como os níveis de GDF15 plasmático em repouso são inversamente relacionados à aptidão física (CONTE et al., 2020), esperava-se que estudos de treinamento físico mostrassem uma diminuição nos níveis de GDF15. É possível que intervenções de treinamento de 35 dias sejam muito curtas para evidenciar essa redução esperada. Vale destacar que os níveis absolutos de GDF15 no estudo atual são significativamente mais baixos do que os relatados anteriormente para indivíduos saudáveis (CONTE et al., 2020; KLEIN et al., 2021).

Os efeitos dos programas regulares de treinamento apresentam discrepâncias. Assim, a resposta do GDF15 ao treinamento regular pode depender do protocolo de treinamento, da carga, duração, períodos, características dos participantes (como atividade física, gênero e massa muscular) e do estado de saúde durante os períodos de treinamento e recuperação (SEO et al., 2021).

4.4 CONCLUSÃO

Os dados apresentados na presente revisão sistemática identificaram o GDF15 como um sinal fisiológico induzido por exercício físico e estresse. Observou-se que, em sessões com duração de aproximadamente 1 hora e intensidade moderada a alta, o aumento do GDF15 circulante foi modesto. Por outro lado, o exercício de longa duração (>2,5 h) provocou um aumento de 4 a 5 vezes nos níveis de GDF15 circulante, aproximando-se dos níveis observados em algumas condições patológicas. Esse aumento é geralmente temporário, com os níveis retornando ao basal dentro de 24 a 48 horas após o exercício. Poucos estudos focaram no efeito de programas regulares de treinamento sobre os níveis de GDF15, e os resultados geralmente são discrepantes. A heterogeneidade nos protocolos de treinamento e nas populações dificulta comparações diretas entre os estudos, sendo possível que as

variações no treinamento e nos participantes tenham tido diferentes efeitos nos níveis de GDF15.

Diante disso, são necessários mais estudos para entender melhor como o GDF15 é regulado em resposta ao treinamento e, mais importante, se os aumentos intermitentes e repetidos de GDF15, observados durante o exercício, desempenham um papel causal nas adaptações biológicas ao treinamento, incluindo os benefícios anti-inflamatórios e metabólicos, ou se atuam apenas como um marcador de estresse fisiológico. Além disso, é crucial que futuras pesquisas abordem as lacunas metodológicas identificadas nesta revisão.

5 CAPÍTULO II. ESTUDO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL

Embora haja um consenso sobre o efeito do exercício físico agudo sobre a expressão de GDF15, poucos estudos exploraram a relação entre GDF15 e o treinamento. Além disso, os resultados sobre o impacto do exercício físico crônico sobre GDF15 foram inconsistentes. Devido à importância desses achados para terapias futuras, é crucial investigar como o treinamento regular influencia o GDF15, especialmente no contexto do envelhecimento.

Diante disso, o presente estudo visa analisar o impacto do envelhecimento sobre a expressão de GDF15 e estresse oxidativo, e, em seguida, avaliar os efeitos do treinamento aeróbico para atenuar esses marcadores em ratos idosos.

Este estudo está em fase de preparação para submissão do artigo intitulado “Effects of regular training on GDF15 expression and oxidative stress in aged rats”.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com 45 dias de vida, provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de animais UNESP/ Botucatu com peso 250 a 300 gramas. Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da UNESP campus de Bauru, alocados em gaiolas com até quatro animais, com água e ração fornecidos *ad libitum*, ciclo de iluminação claro-escuro (12h) em temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Faculdade de Ciências, campus Bauru (Processo nº #281/2020, v.1) (Anexo I).

5.2.2 Teste de Capacidade Máxima (TCM)

O teste de esforço máximo aeróbico foi realizado em uma esteira ergométrica, modificada para ratos, equipada com 10 raia suspensas de ferro (Inbramed Millennium, Brasil). Inicialmente, os animais passaram por uma adaptação de 10 minutos a 0,3km/h por um período de 10 dias. Em seguida, todos os animais foram submetidos ao TCM, por meio do

protocolo que preconiza um aumento de 0,3 km/h da velocidade a cada 3 minutos, até que a velocidade máxima suportada pelos animais seja atingida, o que determinou a capacidade física máxima de forma indireta. Esta velocidade foi determinada quando o rato não conseguiu mais correr ao incremento da velocidade estipulada, caracterizando um estado de exaustão. O teste foi realizado no início e a cada 4 semanas até o final do protocolo experimental (BAREL et al, 2010; HERRERA et al, 2020).

5.2.3 Peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente durante o protocolo, em balança eletrônica (Marte AD2000) e os pesos foram expressos em gramas.

5.2.4 Caracterização dos grupos experimentais

Após um período inicial de adaptação e realização do TCM, os animais foram equiparados de forma equitativa com base no peso e capacidade física. Em seguida, os animais foram distribuídos em três grupos:

Grupo jovem controle (JC): ratos jovens (4 meses) que permaneceram sedentários por 8 semanas; grupo idoso controle (IC): ratos idosos (16 meses) que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental; grupo idoso treinado (IT): ratos idosos (16 meses) que permaneceram sedentários durante a vida adulta e iniciaram o programa de treinamento 2 meses antes da eutanásia. Os grupos para as análises finais foram compostos por JC (n=7), IC (n= 7) e IT (n=7), conforme detalhado na Figura 4. Animais com 4 meses de idade foram utilizados no grupo JC para padronização do protocolo experimental, realizando um total de três TCM.

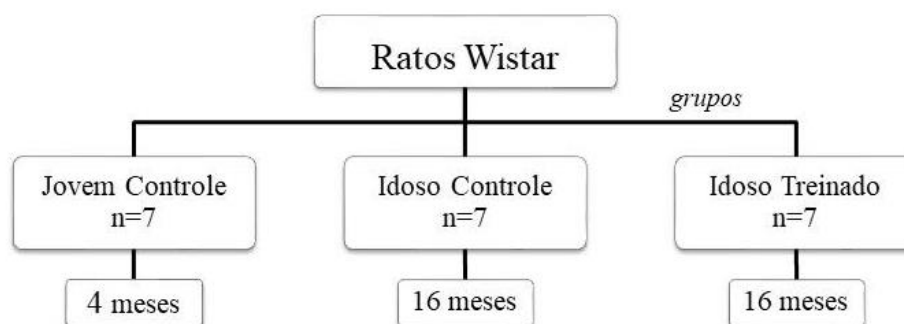


Figura 4 - Caracterização dos animais. Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.2.5 Protocolo experimental

O protocolo experimental teve uma duração total de 59 semanas (14 meses). Os animais foram submetidos ao protocolo quando tinham 2 meses, conforme apresenta a figura 5. Os grupos JC e IC permaneceram sedentários durante todo o protocolo, enquanto o grupo IT iniciou o treinamento aeróbico aos 14 meses de vida. O treinamento foi realizado em esteira ergométrica (Inbramed Millenium, Brasil), com frequência de 5 sessões semanais, 1 hora por dia, durante 8 semanas, em uma intensidade moderada (50-60% do TCM previamente determinado). O TCM foi realizado a cada 4 semanas por todos os grupos e a partir dele, a intensidade do treinamento foi ajustada.

Cabe ressaltar que, a escolha do tipo e da intensidade do treinamento seguiu as diretrizes preconizadas pela literatura (WHO, 2020), a qual recomenda, predominantemente, o treinamento aeróbico a uma intensidade moderada para contrapor os efeitos deletérios do processo de envelhecimento.

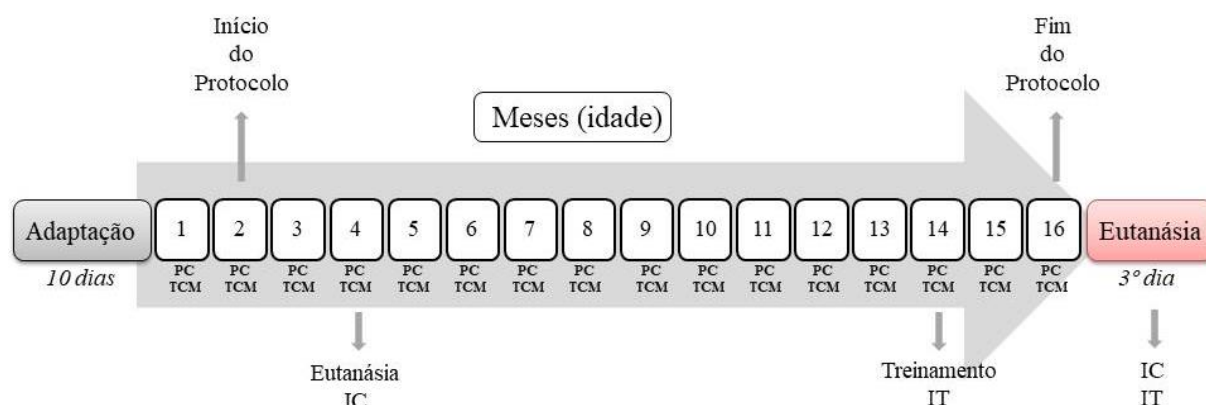


Figura 5 - Protocolo Experimental. PC: peso corporal; TCM: teste de capacidade máxima; JC: grupo jovem controle; IT: grupo idoso treinado; IC: grupo idoso controle. Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.2.6 Eutanásia

A eutanásia de todos os animais ocorreu após 72h da conclusão do protocolo experimental. Os animais foram anestesiados utilizando 20mg/kg de cloridrato de xilasina (ANASEDAN®) e 160mg/kg de cloridrato de ketamina (DOPALEN®), ambos da VETEBRANDS do Brasil, em uma proporção 1:1, equivalente a 0,1mg/100g de peso corporal. Após a anestesia, foi utilizado o método de decapitação, seguido pela coleta de ~5

ml de sangue em tubos heparinizados, os quais foram centrifugados imediatamente a 4000 RPM por 5 minutos. Em seguida, os músculos foram removidos e armazenados imediatamente em um freezer a -80°C para análises posteriores. A escolha do músculo sóleo para o experimento foi baseada em sua composição predominante de fibras musculares tipo 1, que são conhecidas por sua natureza oxidativa. Isso o torna particularmente relevante para estudos relacionados ao metabolismo aeróbio, estresse oxidativo e adaptações ao exercício físico. Adicionalmente, a análise de expressão gênica (Apêndice B) revelou diferenças significativas neste músculo, reforçando sua adequação para investigar os efeitos do GDF15 e suas respostas ao estresse oxidativo. No entanto, os músculos tibial anterior e gastrocnêmio também foram armazenados para análise, a fim de verificar se apresentam resultados consistentes em relação ao sóleo.

5.2.7 Análise do plasma

5.2.7.1 GDF15

A quantificação dos níveis de GDF15 no plasma foi realizada utilizando o kit ELISA da R&D Systems (#DY6385-05), seguindo as orientações do fabricante.

5.2.7.2 Estresse oxidativo

Na presente tese foi avaliado o estresse oxidativo no plasma por técnicas que se baseiam na avaliação de produtos de oxidação de biomoléculas (lipoperoxidação e oxidação de proteínas), pela avaliação de promotores de EROs (peróxido de hidrogênio e NADPH oxidase) ou inibidores (antioxidante enzimático SOD e não enzimático FRAP).

a) Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas no plasma foi conduzida conforme o protocolo estabelecido por Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma solução de albumina bovina como padrão. A absorbância foi mensurada a 208nm por meio do espectrofotômetro IL-593 (Kazuaki®, Wuxi, China).

b) Lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi determinada por dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para a análise de TBARS foi utilizado o protocolo adaptado de Buege e Aust (BUEGE; AUST, 1978), o qual permitiu quantificar a presença de TBARS nas amostras. Em um tubo cônico (falcon 15 ml) foi adicionado 150µL de amostra de plasma, 150 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS), 300µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (P/V) e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% (P/V) para promover a reação. O TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação, enquanto o TBA reage com os produtos da peroxidação lipídica, formando um composto de coloração rosada. A mistura foi agitada e incubada por 20 minutos a 100°C e, em seguida, resfriada em gelo para interromper a reação. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente. Foi retirado 200 µL do sobrenadante da solução centrifugada e adicionado em microplacas de 96 poços para a leitura da absorbância a 535 nm em espectrofotômetro SpectraMaxi® M2 da Molecular Devices. Os valores de TBARS foram expressos em nmol/mg proteína.

c) Oxidação de proteínas (Carbonilas)

O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente. A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma com 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. O plasma (100µL) foi incubado com 900µL de DNPH preparado em solução HCl (2,5 M) por uma hora no escuro e em temperatura ambiente. As amostras foram agitadas a cada 15 minutos durante uma hora, subsequentemente foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20%, e a solução foi incubada no gelo por 10 minutos e centrifugação por 5 min a 2000 rpm para coleta do precipitado de proteínas. Foram realizadas lavagens adicionais com TCA 10% e etanol/acetato (proporção 1:1). O precipitado final foi dissolvido em 500 µL de guanidina (6M) e incubado a 37°C por 10 minutos em banho a 37°C. A absorbância foi determinada em 360nm em espectrofotômetro IL-593 (Kazuaki®, Wuxi, China). (REZNICK; PACKER, 1994). Os valores de proteínas carboniladas foram expressos em nmol/mg proteína.

d) Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O H_2O_2 foi mensurado por meio da oxidação de vermelho de fenol mediada pela solução de peroxidase rabanete (HRP). O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, consistindo de 70 μL de plasma, 180 μL de PRS (contendo tampão dextrose, vermelho de fenol e peroxidase rabanete), incubado a 25 °C por 25 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 5 μL de NaOH. A absorbância foi medida a 630nm utilizando um espectrofotômetro SpectraMaxi® M2 da Molecular Devices. Para a construção da curva foram utilizadas concentrações conhecidas de H_2O_2 seguindo as mesmas etapas (PICK; KEISARI, 1980).

e) Atividade da NADPH OXIDASE

A atividade da enzima foi determinada em plasma e avaliada pela produção de superóxido, em microplaca de 96 poços. Para realização do ensaio foi utilizado 170 μL tampão fosfato 50 mM contendo EDTA 2 mM e sucrose 150 mM, 20 μL de NADPH 1,3 mM e 10 μL de plasma (TIETZE, 1969). A absorbância foi medida a 340 nm utilizando um espectrofotômetro SpectraMaxi® M2 da Molecular Devices.

f) Antioxidante enzimático: superóxido dismutase (SOD)

A quantificação da atividade da SOD é baseada na inibição da reação entre o radical superóxido com o pirogalol. Uma vez que não é possível determinar a concentração da enzima ou sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, a quantificação é expressa em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação no detector. A oxidação do pirogalol resulta na formação de um produto colorido, detectado por espectrofotometria. Portanto, a atividade da SOD foi determinada ao mensurar a velocidade de formação do pirogalol oxidado em unidades relativas. Na mistura de reação, foram utilizados 980 μL de tampão tris-fosfato (50mM) com EDTA (1mM), 5 μL de CAT a 30 μM , 5 μL de plasma e 10 μL de pirogalol (24 mM). A curva padrão foi realizada utilizando diferentes concentrações de SOD (0,060U, 0,120U e 180U), a qual forneceu a equação da reta para realização dos cálculos. A leitura foi realizada por 2 minutos a 420 nm utilizando um espectrofotômetro IL-593 (Kazuaki®, Wuxi, China). A quantificação da atividade da ecSOD foi expressa em USOD/mg proteína (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

g) Antioxidante não enzimático: Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

A capacidade antioxidante não enzimática, FRAP, é baseada na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Assim, a mudança na absorbância é diretamente relacionada ao poder de doação de elétrons presentes na reação. Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso.

A técnica foi realizada em microplaca de 96 poços, na qual adicionou 290 μL de reativo de FRAP (tampão acetato de sódio/ ácido acético, TPTZ 10mM; cloreto férrico hexahidratado 20mM) e 10 μL de plasma, a microplaca foi então incubada durante 5 minutos com agitação à 37°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro SpectraMaxi® M2 da Molecular Devices a 593nm. Para a curva da reação foram utilizados 290 μL de reativo de FRAP e diluição seriada de uma solução-padrão de sulfato ferroso heptahidratado (BENZIE; STRAIN, 1999).

5.2.8. Determinação do conteúdo de proteína por Western Blotting

Alíquotas de músculo sóleo foram homogeneizadas (Polytron PT 1200C) em coquetel anti-protease (Cell lysis buffer 10 #9803 + PMSF) a 4°C. Após 20 minutos de centrifugação em 16.000 RPM à 4°C, o conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi determinado por espectrofotometria pelo método de Bradford, utilizando-se kit comercial (BioRad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão. Alíquotas contendo 80 μg de proteína total foram fervidas a 100°C por 4 minutos em 30% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). O tampão utilizado para a corrida de eletroforese foi o Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3, Sigma Aldrich). As amostras foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida (12%) em equipamento Mini-Transblot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) e, em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose usando o dispositivo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). O bloqueio de ligações não específicas foi feito em tampão TBS-T (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween®20) com 5% de leite durante 90 min.

As membranas foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário (diluídos em proporção de 1:1000 em tampão TBST contendo 3% de Albumina sérica bovina): GDF15 (#sc-515675 Santa cruz), SOD2 (Santa Cruz, H), β -actina (#sc-69879 Santa Cruz). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário *anti mouse* (AP130P),

diluídas em 1:10000 em tampão TBST contendo 5% de leite por 60 min em temperatura ambiente.

A ligação do anticorpo foi detectada utilizando o reagente ECL da fornecedora Amersham (GE Healthcare Life Sciences), conforme instruções do fabricante. As imagens foram obtidas utilizando o sistema de imagem ChemiDoc (BioRad) e a densitometria de banda de proteína foi determinada utilizando o software ImageJ.

5.2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Inicialmente foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido pelos testes T Student (comparação entre dois grupos) ou ANOVA de duas vias para medidas repetidas (comparação entre os grupos nos momentos pré e pós) seguido do post-hoc teste de Tukey. Para os dados com distribuição não normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Testes de correlação de Pearson foram usados para associar GDF15 com capacidade física, idade e marcadores de estresse oxidativo. Foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$. Foi realizado o *fold change* para apresentar os resultados em unidades arbitrárias.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Impacto do processo de envelhecimento

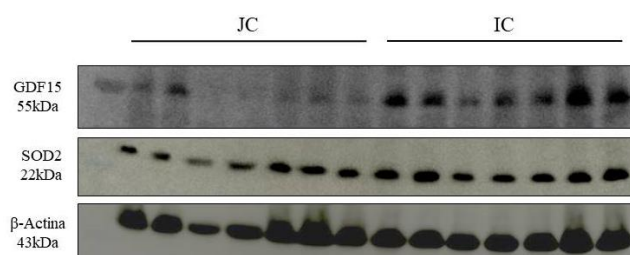
A tabela 3 apresenta o impacto do envelhecimento sobre variáveis como o peso corporal, capacidade física, níveis de GDF15 e marcadores de estresse oxidativo entre os grupos JC e IC. Foi possível observar um menor peso corpóreo no JC quando comparado ao IC, enquanto a capacidade física do JC foi superior comparada ao IC. Não foi possível identificar diferença estatística entre os grupos para GDF15 plasmático. Em relação ao estresse oxidativo, houve maior lipoperoxidação no grupo IC comparada ao JC. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na oxidação de proteínas e nos níveis de NADPH oxidase entre os grupos. Foi observado maior atividade da SOD em IC, enquanto FRAP se mostrou mais elevada em JC.

Tabela 3 - Comparação do impacto do envelhecimento sobre o peso corporal, capacidade física, GDF15 e estresse oxidativo plasmático entre ratos jovens e idosos.

Variáveis	JC (n=7)	IC (n=7)	p
Peso Corporal (g)	424,3 ± 16,76	626,1 ± 27,24	<0,01*
Capacidade física (s)	605,9 ± 36,38	477,7 ± 35,78	0,02*
GDF15 (pg/ml)	773,9 ± 59,71	848,6 ± 58,42	0,388
Oxidação de biomoléculas			
Lipoperoxidação (nmol/mg de proteína)	1,1 ± 0,02	1,35 ± 0,03	<0,01*
Oxidação de proteínas (nmol/mg de proteína)	2,376 ± 0,08	2,493 ± 0,09	0,371
Agentes pro-oxidantes			
NADPH oxidase (μmol/mg de proteína)	0,028 ± 0,003	0,032 ± 0,005	0,5
Peróxido de hidrogênio (μmol H ₂ O ₂)	2,667 ± 0,20	3,03 ± 0,15	0,170
Antioxidantes			
SOD (USOD/mg de proteína)	4,061 ± 0,059	4,363 ± 0,055	<0,01*
FRAP (Fe (II) mM)	0,957 ± 0,106	0,529 ± 0,034	<0,01*

JC (n=7): grupo jovem controle; IC (n=7): grupo idoso controle; GDF15: fator de crescimento e diferenciação celular-15; SOD: superóxido dismutase; FRAP: poder antioxidante redutor de ferro. *p<0,05

Em relação à análise do conteúdo proteico, a figura 6 compara o impacto do envelhecimento sobre a expressão de GDF15 e da enzima antioxidante SOD2 entre JC e IC. Foi possível observar que houve aumento significativo do conteúdo proteico tanto em GDF15 (p=0,01) quanto em SOD2 (p=0,03) no grupo IC comparado ao JC.



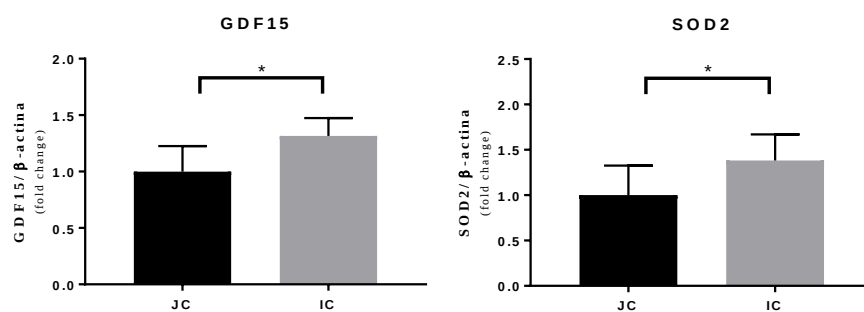


Figura 6 - Comparação do impacto do envelhecimento sobre o conteúdo proteico no músculo sóleo entre ratos jovens e idosos. JC (n=7): grupo jovem controle; IC (n=7): grupo idoso controle; GDF15: fator de crescimento e diferenciação celular-15; SOD2: superóxido dismutase2; * $p < 0,05$.

5.2.2 Efeito do treinamento aeróbio em ratos idosos

A figura 7 mostra a capacidade física e peso corporal em ratos idosos (IC e IT) no momento pré e após 8 semanas de treinamento aeróbio. A capacidade física aumentou somente no grupo IT (IT pré $545,9 \pm 23,93$ e pós $719,6 \pm 29,09$). Também foi possível observar que houve diferença significativa entre os grupos no momento pós ($p < 0,01$). Em relação ao peso corporal, notou-se uma redução significativa em ambos os grupos (IT pré $559,4 \pm 23,77$ e pós $536,0 \pm 18,96$; IC pré $637 \pm 26,28$ e pós $626,1 \pm 27,24$). Também observou diferença significativa entre eles no momento pós ($p < 0,01$).

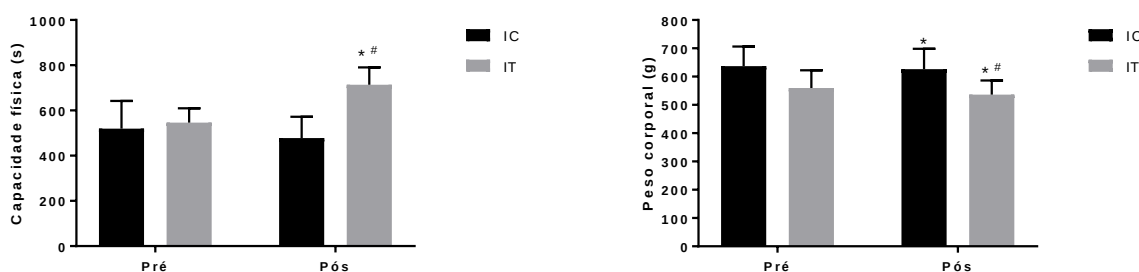


Figura 7 - Efeito do treinamento aeróbio sobre a capacidade física e peso corporal em ratos idosos. * $p < 0,05$ pré vs pós intragrupos; # $p < 0,05$ entre os grupos no momento pós; IC (n=7): grupo idoso controle; IT (n=7): grupo idoso treinado.

A figura 8 mostra o efeito do treinamento aeróbio sobre a análise plasmática de GDF15 (A), marcadores de estresse oxidativo (B-E) e antioxidantes (F e G) entre IC e IT. Os resultados mostraram que teve uma redução significativa de GDF15 plasmático ($p < 0,01$) após 8 semanas de treinamento aeróbio comparado ao grupo que não treinou (IC $814,1 \pm 61,21$ e

IT $392,9 \pm 93,94$). Foi observado o mesmo comportamento em relação aos marcadores de estresse oxidativo, com menor lipoperoxidação ($p=0,02$), oxidação de proteínas ($p=0,02$) e NADPH oxidase ($p<0,01$) após 8 semanas de treinamento. No entanto, peróxido de hidrogênio não apresentou alteração estatisticamente significativa. Em relação ao perfil antioxidante, houve aumento para FRAP ($p=0,01$), embora a atividade da SOD não teve diferença significativa.

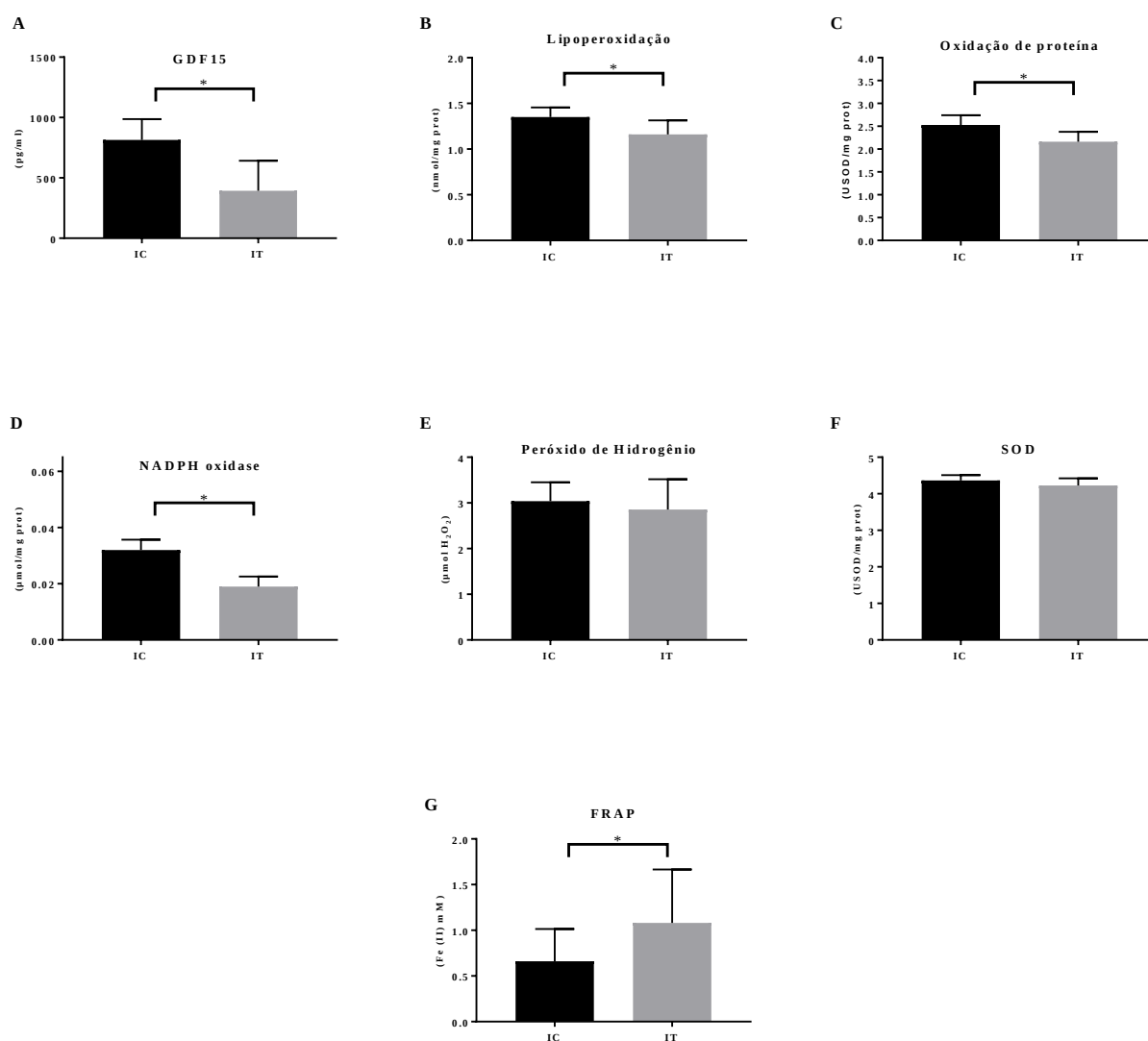


Figura 8 - Efeito do treinamento aeróbio sobre GDF15, estresse oxidativo plasmático em ratos idosos controles e treinados. IC (n=7): grupo idoso controle; IT (n=7): grupo idoso treinado; GDF15: fator de crescimento e diferenciação celular-15; SOD: superóxido dismutase; FRAP: poder antioxidante redutor de ferro. * $p<0,05$

Em relação à análise do conteúdo proteico no músculo sóleo, a figura 9 compara o efeito do treinamento aeróbio sobre a expressão de GDF15 e da enzima antioxidante SOD2

entre ratos idosos controle e treinados (GIC vs GIT). Foi possível observar que o conteúdo proteico de GDF15 ($p < 0,01$) foi menor no grupo IT, no entanto, não houve diferença significativa do conteúdo proteico de SOD2.

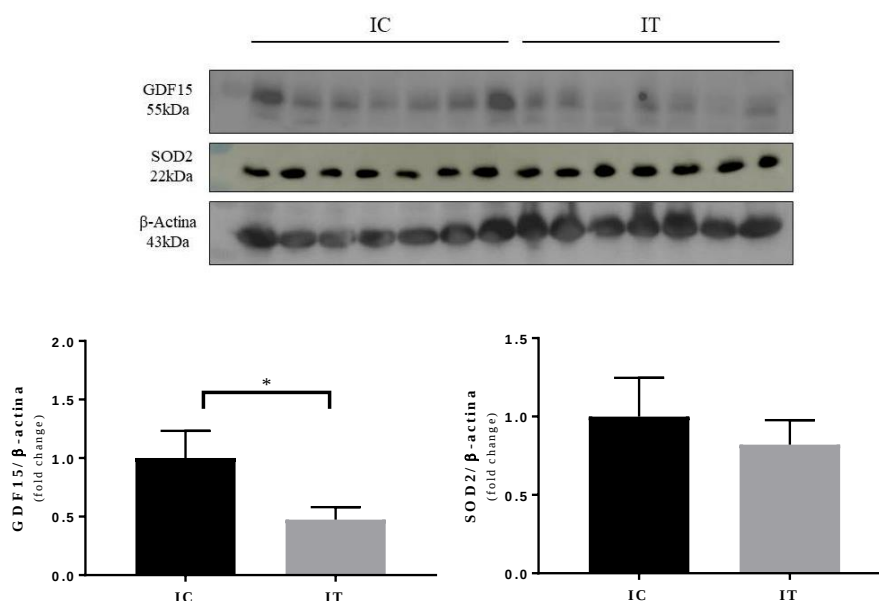


Figura 9 - Efeito do treinamento aeróbio sobre o conteúdo proteico de GDF15 e SOD2 no músculo sóleo em ratos idosos controles e treinados. IC (n=7): grupo idoso controle; IT (n=7): grupo idoso treinado; GDF15: fator de crescimento e diferenciação celular-15; SOD: superóxido dismutase; FRAP: poder antioxidante redutor de ferro. * $p < 0,05$

A Tabela 4 ilustra a análise de correlação do GDF15 com idade, capacidade física e marcadores de estresse oxidativo. Os dados indicam que níveis elevados de GDF15 estão associados à menor capacidade física e FRAP em ratos idosos. Além disso, maiores níveis de GDF15 estão significativamente correlacionados com maior oxidação de proteínas e atividade da NADPH oxidase. Não foram encontradas correlações significativas entre GDF15 e idade, peróxido de hidrogênio, lipoperoxidação ou atividade da SOD.

Tabela 4 - Análise de correlação de GDF15 com idade, capacidade física e marcadores de estresse oxidativo em ratos.

			r	p-value
GDF15 (pg/ml)	vs.	Capacidade física	-0,479	0,038*
	vs.	Idade	-0,316	0,187
	vs.	Lipoperoxidação	0,393	0,107
	vs.	Oxidação de proteína	0,630	0,004*
	vs.	NADPH oxidase	0,501	0,029*
	vs.	Peróxido de hidrogênio	0,160	0,512

vs.	SOD	0,121	0,622
vs.	FRAP	-0,469	0,043*

GDF15: fator de crescimento e diferenciação celular-15; SOD: superóxido dismutase; FRAP: poder antioxidante redutor de ferro. *p<0,05

5.3 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo indicam que o envelhecimento afeta negativamente o peso corporal, a capacidade física e o perfil oxidativo. Em contraste, o treinamento aeróbico a uma intensidade moderada em ratos idosos pode mitigar esses efeitos, resultando em redução do peso corporal e da concentração de GDF15, além de aprimorar a capacidade física e o perfil antioxidante.

Na primeira parte deste estudo, avaliamos o impacto do envelhecimento comparando ratos jovens e idosos (Tabela 3). Observamos um aumento no peso corporal e um declínio na capacidade física em ratos idosos, conforme a literatura sobre os efeitos adversos do envelhecimento (LI et al., 2018; QIN et al., 2020).

Não observamos diferença estatisticamente significativa na concentração plasmática de GDF15 entre os grupos. Uma possível explicação é que a idade dos ratos pode não ter sido suficiente para provocar um aumento substancial nos níveis plasmáticos de GDF15. No entanto, é importante destacar que os ratos idosos apresentaram uma concentração plasmática de GDF15 aproximadamente 10% maior em comparação com os ratos jovens, o que pode representar um aumento clinicamente relevante. É possível que se a idade dos animais do presente estudo fosse um pouco maior, essa diferença teria ocorrido. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que relataram um aumento nos níveis de GDF15 com a idade (BRATIC; LARSSON, 2013; CONTE et al., 2019; FUJITA et al., 2016; LENAZ et al., 1998). Conte et al. (2019) analisaram os níveis plasmáticos de GDF15 em 693 indivíduos com idades entre 21 e 113 anos e observaram um aumento do GDF15 na velhice, com os níveis mais altos encontrados em centenários. Isso é consistente com a disfunção mitocondrial progressiva que ocorre com o envelhecimento (BRATIC; LARSSON, 2013; LENAZ et al., 1998). Especula-se que o GDF15 possa ser secretado em resposta ao estresse e à disfunção celular, podendo atuar como um mecanismo compensatório para a disfunção mitocondrial durante o processo de envelhecimento (FUJITA et al., 2016), sugerindo a hipótese de que o GDF15 pode ter funções protetoras e adaptativas na modulação do ambiente oxidativo.

Em consonância, foi observada uma maior lipoperoxidação em ratos idosos no presente estudo, o que corrobora com a teoria do estresse oxidativo do envelhecimento, baseada na

hipótese do dano estrutural, segundo a qual as perdas funcionais associadas à idade são decorrentes do acúmulo de danos oxidativos às macromoléculas (LIGUORI et al., 2018).

Por outro lado, embora tenha sido observado um aumento de aproximadamente 14,5% nos níveis de NADPH oxidase e H_2O_2 em ratos idosos, essa diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos. É importante destacar que os ratos idosos também apresentaram atividade elevada de SOD. A literatura relata que a NADPH oxidase é a fonte predominante de O_2^- , formado pela redução de um elétron do oxigênio molecular, com elétrons fornecidos pela NADPH oxidase durante a respiração celular (não avaliada neste estudo). A maior parte do O_2^- é dismutado em H_2O_2 pela SOD. Isso poderia explicar maior atividade da SOD observada em ratos idosos no presente estudo como um mecanismo de resposta compensatória (LIGUORI et al., 2018), o que também explica a atenuação desses marcadores de estresse oxidativo (NADPH e H_2O_2) pela atividade da SOD. Outro estudo também comparou ratos machos jovens e idosos e observou um aumento nos níveis de estresse oxidativo em animais idosos, que apresentaram uma maior concentração de H_2O_2 , oxidação proteica (carbonilas) e lipoperoxidação (TBARS), além de um aumento significativo associado à idade nas atividades de SOD, GPx e CAT (JUDGE et al., 2005). Esses aumentos na atividade das enzimas antioxidantes provavelmente ocorreram em resposta ao aumento da produção mitocondrial de O_2^- e H_2O_2 .

Em contraste com o mencionado anteriormente, observamos uma mudança modesta na oxidação de proteínas em ratos idosos. No entanto, Judge et al. (2005) observaram diferenças no estresse oxidativo em ratos com 24 meses de vida. Uma possível explicação para essa discrepância pode ser que os animais utilizados em nosso estudo tinham 16 meses, e a literatura sugere que o dano proteico é acentuado com o envelhecimento avançado (JUDGE et al., 2005; LIGUORI et al., 2018). Isso é apoiado pela observação de que os níveis de proteínas oxidadas aumentaram com a idade dos animais (STADTMAN, 2006).

Nossa hipótese é que ratos em estágio mais avançado de envelhecimento apresentem danos oxidativos mais acentuados do que aqueles em estágios iniciais. A literatura sustenta que a capacidade do corpo de neutralizar o estresse oxidativo diminui com a idade. Isso é evidenciado pelos níveis mais altos de FRAP observados em ratos jovens neste estudo, indicando uma maior capacidade antioxidante não enzimática. Estudos mostraram que organismos mais jovens geralmente possuem sistema de defesa antioxidante mais robusto e eficiente, refletindo em nossos achados (DAVALLI et al., 2016; LIGUORI et al., 2018).

Além disso, a Figura 6 compara o impacto do envelhecimento sobre o conteúdo proteico de GDF15 e SOD2 entre ratos jovens e idosos. Os dados mostraram que os ratos idosos

apresentam maior conteúdo proteico de GDF15 e SOD2 no músculo sóleo. A concentração elevada de GDF15 em ratos idosos pode refletir uma resposta compensatória local para combater a perda muscular relacionada à idade e promover a reparação tecidual, uma vez que o aumento de GDF15 no músculo envelhecido também pode ser associado a condições como sarcopenia e fragilidade (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLIWELL, 1995; WANG et al., 2019).

Essa descoberta corresponde com estudos anteriores que sugerem que o GDF15 ajuda a mitigar o estresse celular e a manter a homeostase tecidual (CHUNG et al., 2017; TSAI et al., 2018), o que também explica a atividade elevada de SOD2 nesse grupo como um mecanismo de resposta compensatória (LIGUORI et al., 2018). A variabilidade na expressão de GDF15 em diferentes tecidos pode explicar a falta de diferenças observadas no nível plasmático (BREIT et al., 2011; TSAI et al., 2016). Supõe-se que o GDF15 possa ser secretado pelo músculo para atuar localmente de forma autócrina ou parácrina, no entanto, a expressão de GFRAL não foi detectada em tecidos periféricos, incluindo o músculo esquelético em camundongos (MULLICAN et al., 2017). Os mecanismos que regulam a expressão e secreção específica do GDF15 tecidual permanecem pouco esclarecidos e, mais investigação é necessária.

Na segunda fase, investigamos o efeito de 8 semanas de treinamento aeróbico em ratos idosos. Conforme esperado, a capacidade física aumentou apenas no grupo de idosos treinados, em consonância com os benefícios bem estabelecidos sobre o exercício físico e melhora da capacidade física (HERRERA et al., 2016; LOPES MOREIRA et al., 2015). Ambos os grupos (controle e treinado) apresentaram uma redução no peso corporal, com uma perda mais acentuada no grupo treinado, apoiando estudos anteriores que demonstraram que o exercício físico contribui para a perda de peso por meio do aumento do gasto energético (ABDOLLAHI DIBA et al., 2024; BROSKEY et al., 2021; TZIMOU et al., 2020). A perda de peso observada no grupo controle pode ser atribuída à perda de massa muscular relacionada à idade, contribuindo para a redução geral do peso corporal ao longo do tempo (GARVEY et al., 2015; OLESEN et al., 2021).

Além disso, o treinamento aeróbico foi eficaz em atenuar os efeitos deletérios do envelhecimento, conforme observado a redução de aproximadamente 2 vezes nas concentrações plasmáticas de GDF15 em ratos idosos treinados. No entanto, nossos resultados contrastam com dois estudos que analisaram idosos com sarcopenia após 8 (REZAEI; ESLAMI; TARTIBIAN, 2024) e 16 semanas de treinamento resistido (SEO et al., 2021). No primeiro estudo, os níveis de GDF15 aumentaram no grupo treinado, enquanto o segundo

estudo não relatou mudanças após 16 semanas. Recentemente, níveis elevados de GDF15 foram associados ao envelhecimento e a doenças e/ou distúrbios relacionados à idade (OBA et al., 2024), dificultando a interpretação desses resultados, especialmente considerando que a sarcopenia também está associada ao aumento das concentrações de GDF15 (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLIWELL, 1995; WANG et al., 2019).

Por outro lado, Chang et al. (2021) demonstraram que 12 semanas de treinamento resistido combinado com treinamento aeróbio reduziu aproximadamente 11% dos níveis de GDF15 em mulheres com síndrome metabólica. Essa redução pode ser explicada pelo papel do GDF15 como uma resposta compensatória ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial na síndrome metabólica (FUJITA et al., 2016). Níveis elevados de GDF15 foram sugeridos como indicadores de estresse metabólico sustentado, e a intervenção com exercício físico parece reduzir esses fatores moduladores do estresse, consequentemente, diminuindo os níveis de GDF15 (CHANG; NAMKUNG, 2021).

De acordo com esses dados, observamos uma redução nos marcadores de estresse oxidativo, incluindo lipoperoxidação, oxidação de proteínas e atividade de NADPH oxidase em ratos idosos treinados, juntamente com um aumento nos níveis de FRAP. Nossos achados estão em consonância com a literatura, indicando que o treinamento melhora a resposta antioxidante e reduz o estresse oxidativo e os sinais pró-inflamatórios relacionados à idade (EL ASSAR et al., 2022). Jacomini et al. (2017) demonstraram que idosos com maior nível de condicionamento físico apresentaram menor lipoperoxidação e oxidação de proteínas, sugerindo que o treinamento pode atuar como um fator protetor contra danos oxidativos. Embora o exercício físico envolva a produção de EROS, citocinas pró-inflamatórias e estresse mitocondrial, ele também pode desencadear respostas crônicas benéficas (RADAK et al., 2016). Estudos mostram que o exercício regular é eficaz na regulação da atividade pró e antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo ao aumentar os níveis de enzimas antioxidantes e diminuir a expressão de NADPH oxidase, melhorando assim o equilíbrio redox (JACOMINI et al., 2015; MILANOVIĆ et al., 2013; WANG et al., 2019). Além disso, sugere-se que o exercício físico ao aumentar a relação AMP/ATP, ativa a AMPK e o PGC-1 α , por sua vez, promove a biogênese mitocondrial e melhora o equilíbrio redox (RICHTER et al., 1987).

Consistente com isso, nossos resultados mostraram que maiores níveis de GDF15 foram associados a uma capacidade física reduzida e a menores níveis de FRAP em ratos idosos. Além disso, níveis elevados de GDF15 foram correlacionados com aumento da oxidação de proteínas e da atividade de NADPH oxidase (Tabela 4). Esses achados estão de acordo com o mencionado anteriormente, o qual a concentração de GDF15 foi inversamente associada aos

níveis de atividade física e correlacionada com maior concentração de marcadores de estresse. Outro estudo também relatou níveis mais altos de GDF15 em pacientes inativos e níveis mais baixos em indivíduos ativos (CONTE et al., 2020), apoiando ainda mais nossos resultados.

5.4 LIMITAÇÃO DO ESTUDO

É comum que estudos sobre estresse oxidativo em ratos idosos utilizem animais em estágios mais avançados de envelhecimento. No entanto, o presente estudo utilizou ratos com 16 meses de vida devido à perda amostral que estava ocorrendo. A decisão de antecipar o experimento foi fundamentada em evidências científicas, como sinais de envelhecimento observados, incluindo redução da pelagem, perda de peso, menor capacidade física e alterações estruturais, como o aumento na rigidez arterial analisado pela velocidade de onda de pulso. Além disso, a análise histológica de animais da mesma faixa etária realizada pelo nosso grupo de pesquisa revelou que ratos com 16 meses apresentaram aumento da produção de colágeno arterial, maior espessura da parede e menor relação parede/luz (resultados ainda não publicados). Fabricio et al. (2020) também demonstraram que ratos a partir de 12 meses já apresentam alterações significativas associadas ao processo de envelhecimento, fortalecendo nossos resultados.

5.5 CONCLUSÃO

Em resumo, nossos achados indicam que o treinamento aeróbio pode atenuar os efeitos adversos do envelhecimento. Observamos melhora na capacidade física e no perfil oxidativo, o que contribuiu para a redução dos níveis de GDF15 em ratos idosos. Além disso, concentrações elevadas de GDF15 foram associadas ao aumento do estresse oxidativo e à menor capacidade física, confirmando a relação encontrada na literatura entre GDF15, capacidade física e estresse oxidativo. Esses resultados apoiam a hipótese de que o treinamento regular pode mitigar os declínios relacionados à idade, melhorando o equilíbrio oxidativo e, assim, reduzindo os níveis de GDF15 em ratos idosos.

6. CAPÍTULO III. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CULTURA DE CÉLULA

Diante do exposto, investigar o efeito protetor do GDF15 em contextos de estresse oxidativo é fundamental para fortalecer a hipótese de que o GDF15 atua como uma resposta compensatória para neutralizar ambientes oxidativos e atenuar os danos celulares.

O presente estudo foi desenvolvido em meio de cultura de células musculares esqueléticas da linhagem C2C12 e realizado no laboratório “Centro de Pesquisas em Obesidade e Comorbidades (OCRC)” da UNICAMP/ Campinas, em colaboração com o Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira.

6.1 MÉTODOS

6.1.1 Cultivo de células musculares da linhagem C2C12

As células C2C12 foram cultivadas em meio de crescimento DMEM (D5648, SigmaAldrich) contendo glicose (25 mM), suplementado por 10% de soro bovino fetal, 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). O plaqueamento foi realizado em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços e, após as células atingirem aproximadamente 70% de confluência, a diferenciação celular foi induzida pela substituição do meio de cultivo para o meio DMEM contendo glicose (25 mM), 2% de soro de cavalo, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) durante 5 dias. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados em mioblastos (células não diferenciadas) e em miotubos (células diferenciadas).

Tratamento:

Para induzir um aumento de EROs e estabelecer um cenário oxidativo nas células, foi conduzido um *time course* para determinar a concentração de Menadiona (Sigma-Aldrich) e o tempo de tratamento adequados. Em seguida, as células C2C12 foram incubadas com Menadiona (8 µM) em placas pretas de 96 poços durante 3h a 37°C e 5% de CO₂.

6.1.2 Análises

6.1.2.1 Consumo de oxigênio

As células C2C12 foram distribuídas em placas de 6 poços ou garrafas de 75 cm². O experimento envolveu tanto mioblastos quanto miotubos. Assim que as células atingiram aproximadamente 70% de confluência ou alcançaram o estágio de diferenciação, foram removidas das placas de cultivo por meio da incubação com Tripsina a 37° e 5% de CO₂ por 10 min. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.000 g, em temperatura ambiente durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1 ml de solução PBS para subsequente quantificação e padronização do número de células a serem utilizadas no experimento. A contagem celular foi realizada utilizando câmara de Neubauer e o consumo de oxigênio foi avaliado utilizando com 1x10⁶ células. Inicialmente foi mensurado o consumo de oxigênio basal sem adição de substrato. Em seguida, oligomicina foi adicionada para inibir a ATP sintase e avaliar a respiração ligada ao ATP. O CCCP foi introduzido para despolarizar a membrana mitocondrial e permitir a avaliação da respiração máxima (respiração desacoplada). Por fim, a antimicina A foi adicionada para inibir o complexo III da cadeia respiratória, bloqueando o consumo de oxigênio mitocondrial e permitindo a análise do consumo de oxigênio não-mitocondrial. Cada etapa foi seguida de um período de estabilização para monitoramento preciso do consumo de oxigênio e a coleta dos dados foi realizada em tempo real para análise detalhada da eficiência da respiração mitocondrial em cada etapa. Esse processo foi monitorado por meio do equipamento Oroboros Oxygraph-2K e do software DatLab (OROBOROS, Innsbruck, Áustria) para a aquisição de dados e análises.

6.1.2.2 Determinação de espécies reativas de oxigênio - MitoSOX

Para mensurar EROs mitocondrial foi realizado o ensaio MitoSOX (M36008, Invitrogen, EUA), conforme as instruções do fabricante. Após 3h de tratamento com Menadiona (8 µM), o meio de cultura foi removido dos poços e as células C2C12 foram incubadas com 100 µL de MitoSOX (5µM) e com o corante de DNA Hoechst 33342 10 µg/mL (H3570, ThermoFisher, EUA), preparados em KBB contendo 11 mM de glicose, por 30min à 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, a fluorescência foi medida em leitor de microplaca (SpectraMax i3, Molecular Devices), com excitação/emissão = 510/580 nm. A fluorescência do MitoSOX foi normalizada pela fluorescência do Hoechst, com excitação/emissão = 350/461 nm.

6.1.2.3 Morte celular

Inicialmente, as células C2C12 foram incubadas com Menadiona (8 μ M) em placa preta de 96 poços durante 3h a 37°C e 5% de CO₂. Para analisar morte celular, as células foram coradas com os intercalantes de DNA Hoechst 33342 10 μ g/mL (H3570, ThermoFisher, EUA) e iodeto de propídio 5 μ g/mL (P1304MP, ThermoFisher, EUA). Para isso, foi removido o meio de tratamento de cada poço e adicionados 100 μ L de meio de cultura contendo os corantes Hoechst 33342 e iodeto de propídio. Após 15 min de incubação a 37°C e 5% de CO₂ foram removidos 100 μ L do meio de cada poço e adicionados 100 μ L de meio DMEM. Para contagem das células, foram aplicadas máscaras para os comprimentos de onda DAPI (excitação em 350 nm e emissão em 470 nm; Hoechst) e Texas red (excitação em 596 nm e emissão em 615 nm; iodeto de propídio), lidas em leitor de fluorescência (SpectraMax i3, Molecular Devices). O resultado foi obtido a partir da razão entre as células marcadas com iodeto de propídio e as células marcadas com Hoechst.

6.1.2.4 Determinação do conteúdo de proteína por *Western Blotting*

As células foram coletadas no dia 0 (mioblastos) e no dia 5 de diferenciação celular (miotubos). A extração foi realizada utilizando tampão RIPA contendo inibidores de fosfatases e proteases. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por meio de um sonificador e centrifugadas a 16000g por 16 min a 4°C. A concentração total de proteínas no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria utilizando o método de *Bradford* (BioRad Kit, Hercules, CA) com albumina sendo utilizada como padrão. Após a quantificação, foram preparadas alíquotas contendo 60 μ g de proteína total, as quais foram incubadas a 70°C por 5 min em 30% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol).

O tampão utilizado para a corrida de eletroforese foi o Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3, Sigma Aldrich). As amostras foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida (12%) em equipamento Mini-Transblot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) e, logo em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose usando o dispositivo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). O bloqueio de ligações não específicas foi feito em tampão TBS-T (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween®20) com 5% de leite durante 60 min. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário (diluídos em proporção de 1:1000 em tampão TBST contendo 3% de Albumina sérica bovina): SOD2 (Santa Cruz, H), catalase (Cell signaling), GPx (Cell signaling #9272), NRF2 (#sc-365949 Santa Cruz), GDF15 (#sc-515675 Santa cruz), PGC1 α

(#1202 Calbiochem), β -actina (#sc-69879 Santa Cruz, Citrato Sintase (Santa Cruz). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário *anti rabbit* (AP188P) ou *anti mouse* (AP130P), diluídas em 1:10000 em tampão TBST contendo 5% de leite por 60 min em temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando o reagente ECL da fornecedora Amersham (GE Healthcare Life Sciences), conforme instruções do fabricante. As imagens foram obtidas utilizando o sistema de imagem ChemiDoc (BioRad) e a densitometria de banda de proteína foi determinada utilizando o software ImageLab (BioRad).

6.1.3 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos) e os resultados foram expressos como média $\pm$ DP. Foram realizados os testes T Student (comparação entre dois grupos) ou ANOVA (comparação entre três ou mais grupos) seguido do post-hoc teste de Tukey. Foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$.

6.2 RESULTADOS

A figura 10 apresenta a análise do conteúdo proteico de GDF15 e proteínas relacionadas à função mitocondrial (PGC1- α , NRF2 e Citrato Sintase), enquanto a figura 11 apresenta a análise do conteúdo proteico de enzimas antioxidantes (Catalase, SOD2 e GPx). As análises foram realizadas em células C2C12, em mioblastos e miotubos. Dessa forma, foi possível observar que houve um aumento significativo do conteúdo proteico de GDF15 em miotubos quando comparados aos mioblastos ($p < 0,01$). Enquanto os mioblastos apresentaram maior conteúdo proteico de NRF2 ($p = 0,04$). No entanto, não foram identificadas diferenças significativas para PGC1- α e Citrato Sintase entre mioblastos e miotubos. Além disso, no painel B, foi notado que a Catalase apresentou teor proteico maior nos mioblastos ($p < 0,01$), enquanto a SOD2 aumentou nos miotubos ($p < 0,01$). Já GPx, não apresentou diferença significativa entre mioblastos e miotubos. Além disso, ao aferir a respiração máxima mitocondrial em mioblastos e miotubos, (Figura 12) foi possível observar aumento significativo na capacidade máxima em miotubos ($p = 0,01$).

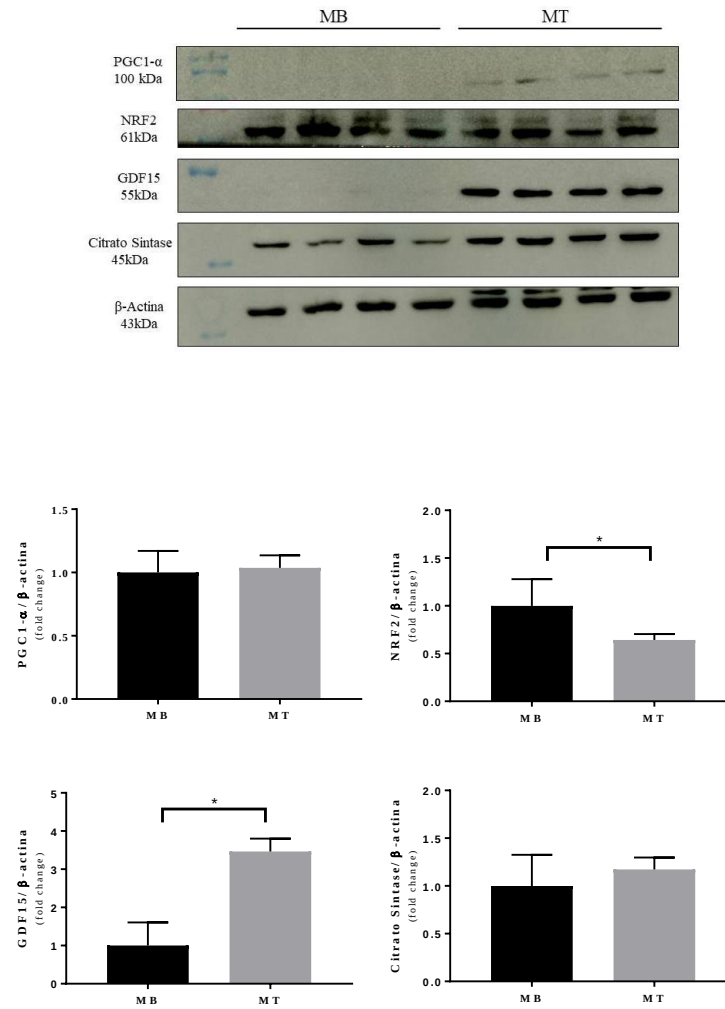


Figura 10 - Expressão de GDF15 em mioblastos e miotubos e sua relação com proteínas mitocondriais. MB: mioblastos; MT: miotubos; NRF2: fator relacionado ao fator nuclear eritroide 2; PGC1-α:coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma; GDF15: fator de crescimento e diferenciação celular-15; *p<0,05

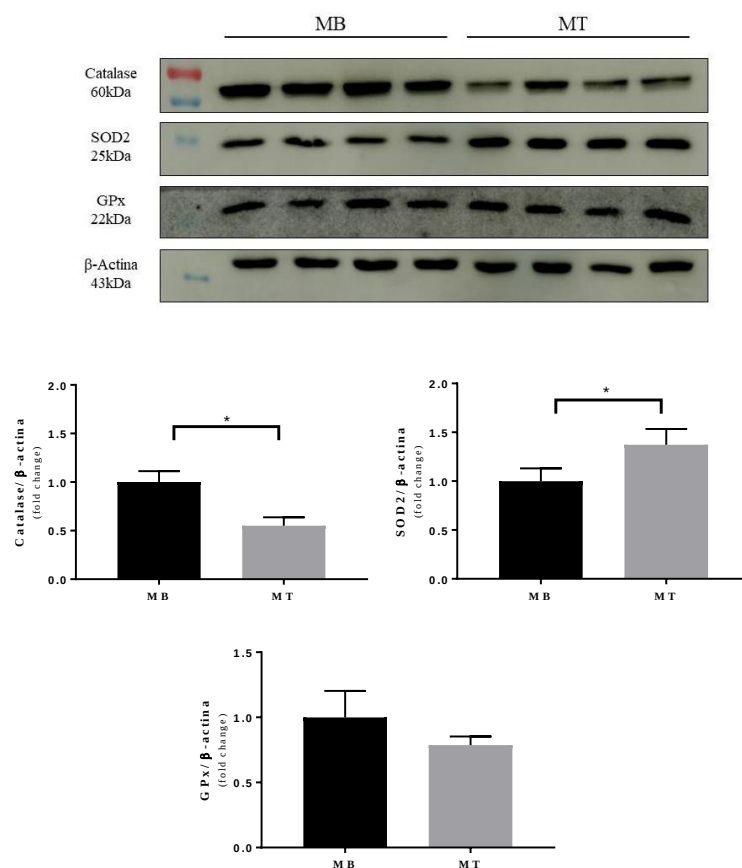


Figura 11 - Expressão de GDF15 em mioblastos e miotubos e sua relação com o perfil antioxidante. MB: mioblastos; MT: miotubos; SOD2: superóxido dismutase 2; GPX: glutathiona peroxidase; * $p < 0,05$

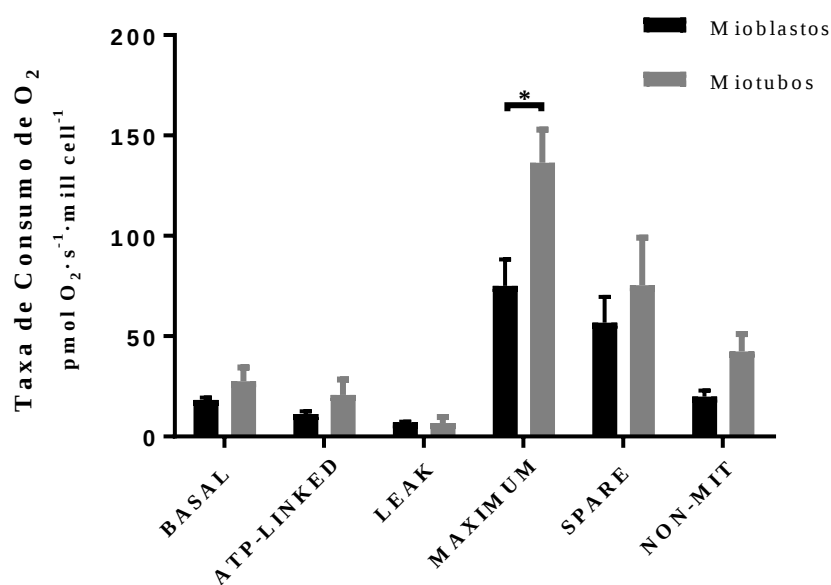


Figura 12 - Consumo de oxigênio dos mioblastos e miotubos.

A figura 13 ilustra o tratamento realizado com 8 μ M de Menadiona em células musculares C2C12 para induzir um cenário oxidativo. Foi possível observar que as células que foram tratadas com Menadiona apresentaram um aumento significativo tanto na geração de EROs ($p<0,01$) quanto na taxa morte celular ($p=0,03$) em comparação com as células controle.

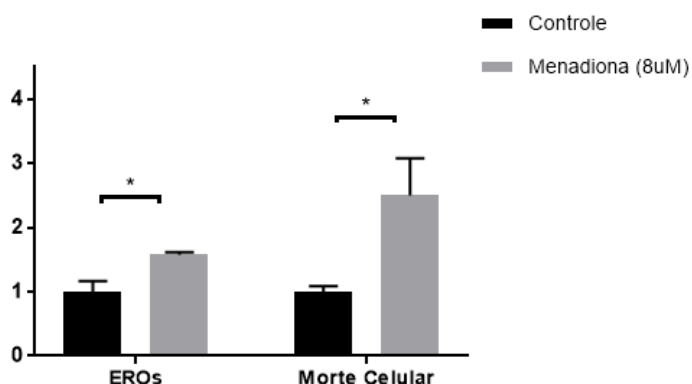


Figura 13 - Protocolo de indução do cenário oxidativo com Menadiona em células C2C12. EROs: espécies reativas de oxigênio.

Para analisar o efeito protetor do GDF15, a figura 14 demonstra o ensaio de EROs e morte celular em cenário oxidativo (tratado com 8 μ M de Menadiona, figura 13) em diferentes contextos: em mioblastos, que não observou expressão de GDF15, e, em miotubos, os quais apresentaram expressão de GDF15, conforme demonstrado previamente na figura 4. Dessa forma, foi possível observar que em um ambiente oxidativo, nos mioblastos, houve uma maior geração de EROs ($p<0,01$) e uma taxa de morte celular superior ($p<0,03$) quando comparados aos miotubos.

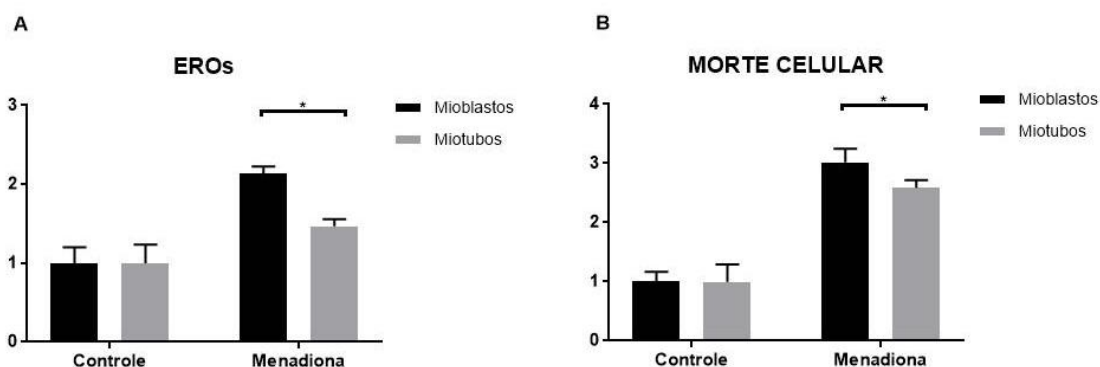


Figura 14 - Respostas ao cenário oxidativo em mioblastos e miotubos. EROs: espécies reativas de oxigênio.

6.3 DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo indicam que o GDF15 pode desempenhar um papel protetor contra o estresse oxidativo, evidenciado pela redução na geração de EROs e na taxa de morte celular em miotubos, ressaltando sua importância na preservação da função mitocondrial em células musculares diferenciadas.

Para avaliar o efeito protetor do GDF15, analisamos sua expressão em diferentes estágios celulares, comparando mioblastos e miotubos, e sua relação com a função mitocondrial. Observamos que GDF15 é mais expresso em miotubos, corroborando com o estudo de Ge et al. (2013) que demonstraram que o silenciamento de GDF15 em células C2C12 prejudicou a fusão dos mioblastos. Além disso, também foi relatado que a expressão de GDF15 durante a diferenciação muscular pode ser regulada por fatores de transcrição como MYOG, MEF2 e MYOD, conhecidos por desempenharem papéis essenciais na proliferação e fusão de mioblastos (MASTROYIANNPOULOS et al., 2012; ZHANG; SHA; HARTE, 2010). Esses achados sugerem que o GDF15 pode desempenhar um papel ativo na diferenciação celular, essencial para o desenvolvimento, regeneração e manutenção dos tecidos musculares, fortalecendo a hipótese de que o aumento transitório de GDF15 após exercício físico agudo pode ser uma resposta compensatória para a reparação tecidual muscular (DE SOUSA et al., 2021).

Na figura 12, foi possível observar maior consumo de oxigênio quando GDF15 está presente. Similarmente, Chung et al. (2017) demonstraram que o tratamento com GDF15 recombinante em células C2C12 aumentou a taxa de consumo de oxigênio de maneira dependente da dose, especialmente quando induzida pelo desacoplador mitocondrial CCCP. Esse efeito sugere que o GDF15 pode melhorar a função mitocondrial sob condições de estresse energético, promovendo um aumento na respiração celular.

Com base nos nossos achados, é possível explicar o aumento exacerbado de GDF15 após exercícios físicos intensos, em que as demandas metabólicas são intensificadas, como observado em ultramaratonas (TCHOU et al., 2009). Esse aumento pode ser interpretado como uma resposta adaptativa ao estresse mitocondrial, ajudando a preservar a função celular e a proteger os tecidos musculares contra os danos decorrentes do aumento do consumo de oxigênio e da produção EROs (KLEIN et al., 2021; PLOMGAARD et al., 2022). Embora o aumento do consumo de oxigênio em miotubos possa ser associado a seu maior conteúdo mitocondrial (KUMAR et al., 2020), não observamos diferenças significativas em PGC-1 α

(Figura 10). Isso sugere que o efeito do GDF15 sobre a função mitocondrial e o consumo de oxigênio pode ocorrer independentemente da biogênese mitocondrial.

Além disso, Santos (2022) também demonstrou que os mioblastos apresentaram maior atividade metabólica sob maior expressão de GDF15, o que pode apontar um papel específico do GDF15 na regulação metabólica e na adaptação ao estresse durante esforços físicos intensos, auxiliando na homeostase energética e na atenuação do estresse oxidativo, o que também pode explicar maior concentração de SOD2 e menor NRF2 na presença de GDF15 (Figura 10 e 11).

Diante disso, a figura 13 ilustra o tratamento realizado com 8 μ M de Menadiona em células musculares C2C12 para induzir um cenário oxidativo, o que apresentou aumento tanto na geração de EROs quanto na taxa de morte celular em comparação com as células que não receberam o tratamento. Esses achados sugerem que, embora a Menadiona não simule diretamente o envelhecimento, reforça a hipótese de que o aumento do GDF15 em ratos idosos possa ser uma resposta compensatória para neutralizar o dano associado ao envelhecimento (CONTE et al., 2020). Assim como o aumento transitório após o exercício físico (CAMPDERRÓS et al., 2020; DE SOUSA et al., 2021; KALETA-DUSS et al., 2020). Além disso, a redução dos níveis basais de GDF15 observada em ratos idosos após treinamento regular reforça a hipótese de que a redução do estresse oxidativo poderia diminuir a necessidade de uma resposta compensatória pelo GDF15, levando à normalização dos seus níveis.

Os resultados apresentados na Figura 14 corroboram com a hipótese de um efeito protetor do GDF15 em condições de estresse oxidativo. A ausência de GDF15 resultou em maior produção de EROs e aumento da morte celular, o que é consistente com as descobertas de Santos (2022). Nesse estudo, o silenciamento de GDF15 foi associado a um aumento dos níveis de Caspase-3, uma enzima crucial no processo de apoptose, além de um aumento na taxa de morte celular, sugerindo que a ausência de GDF15 intensifica os mecanismos de morte celular programada. Esses achados complementam as observações anteriores e reforçam a hipótese de que o GDF15 desempenha um papel crucial na atenuação do dano celular induzido pelo estresse oxidativo. Considerando tanto sua função na melhora da respiração mitocondrial quanto na proteção contra o estresse oxidativo, os resultados fortalecem a ideia de que o GDF15 atua como um regulador da homeostase celular, especialmente em situações de estresse energético elevado, como o envelhecimento e o exercício físico intenso.

6.4 CONCLUSÃO

Em suma, os resultados indicam que o GDF15 desempenha um papel crucial na resposta celular ao estresse oxidativo em células musculares C2C12, especialmente em miotubos. A expressão de GDF15 em miotubos parece estar associada a uma maior resistência ao estresse oxidativo, como evidenciado pela menor geração de EROs e na taxa de morte celular, em comparação com os mioblastos. Esses achados sugerem que o GDF15 pode atuar como um importante fator protetor contra danos oxidativos, contribuindo para a preservação da função mitocondrial em células musculares diferenciadas.

No entanto, para fortalecer essas conclusões, são necessários mais estudos que investiguem o impacto do silenciamento e da superexpressão de GDF15 nas mesmas condições experimentais realizadas no presente estudo (perspectivas futuras). Essas investigações são fundamentais por oferecerem uma nova perspectiva sobre o papel protetor do GDF15, podendo revelar novas abordagens para a atenuação do estresse oxidativo e para a preservação da saúde celular dos idosos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, a revisão sistemática revela que o GDF15 é um marcador sensível ao estresse fisiológico, com sua expressão variando em resposta à intensidade e duração do exercício físico. Exercícios intensos e prolongados elevam significativamente os níveis de GDF15, aproximando-os dos observados em condições patológicas; contudo, esses aumentos são geralmente transitórios, retornando aos níveis basais dentro de 24 a 48 horas.

No contexto do envelhecimento, o GDF15 reflete o aumento do estresse oxidativo e a diminuição da capacidade física. Entretanto, o treinamento aeróbio regular parece reduzir os níveis basais de GDF15 em idosos, possivelmente por sua eficácia em atenuar os efeitos adversos do envelhecimento.

Além disso, estudos em células musculares indicam que o GDF15 exerce uma função protetora contra o estresse oxidativo, contribuindo para a preservação da função mitocondrial. Esses achados sugerem que, apesar de sua elevação em situações adversas, o GDF15 desempenha um papel compensatório importante, ajudando a mitigar os impactos negativos do envelhecimento. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o GDF15 influencia as adaptações ao exercício físico e sua função protetora.

7.1 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

As descobertas revelam que o GDF15 é não apenas um marcador sensível ao estresse fisiológico e ao envelhecimento, mas também desempenha um papel protetor crucial contra o estresse oxidativo. As implicações clínicas dessas descobertas são vastas.

Primeiramente, a avaliação dos níveis de GDF15 pode servir como um biomarcador para avaliar o estado de estresse fisiológico e o impacto do envelhecimento nos idosos. Isso pode ajudar na identificação precoce de condições patológicas relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação, permitindo intervenções mais direcionadas.

Além disso, a redução dos níveis basais de GDF15 por meio do treinamento aeróbio regular, juntamente com a melhora do equilíbrio oxidativo, reforça que o exercício físico pode ser uma estratégia terapêutica eficaz para atenuar os efeitos adversos do envelhecimento. Programas de exercícios personalizados podem ser desenvolvidos para populações idosas ou pacientes com condições relacionadas ao estresse oxidativo, visando reduzir o risco de complicações associadas.

Finalmente, a função protetora do GDF15 contra o estresse oxidativo pode abrir caminhos para o desenvolvimento de terapias que potencializem esse efeito, promovendo a saúde mitocondrial e a resistência ao estresse celular. Isso pode ser particularmente relevante no tratamento de doenças degenerativas e outras condições relacionadas ao envelhecimento. No entanto, mais pesquisas são necessárias para compreender os mecanismos envolvidos e como esses conhecimentos podem ser aplicados clinicamente de maneira eficaz.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI DIBA, M. et al. Effect of a 12-Week High-Calorie-Expenditure Multimodal Exercise Program on Health Indices in Women With Overweight: Protocol for a Randomized Controlled Trial. **JMIR research protocols**, v. 13, n. 1, p. e51599, 13 jun. 2024.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological reviews**, v. 78, n. 2, p. 547–581, abr. 1998.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 15–27, 1999.
- BIALA, A. K.; DHINGRA, R.; KIRSHENBAUM, L. A. Mitochondrial dynamics: Orchestrating the journey to advanced age. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 83, p. 37–43, 1 jun. 2015.
- BLOEMBERG, D.; QUADRILATERO, J. Autophagy, apoptosis, and mitochondria: Molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 317, n. 1, p. C111–C130, 2019.
- BOOTCOV, M. R. et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11514–11519, out. 1997.
- BOOTCOV, M. R. et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11514–11519, 14 out. 1997.
- BRATIC, A.; LARSSON, N. G. The role of mitochondria in aging. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 3, p. 951–957, 1 mar. 2013.
- BREIT, S. N. et al. The TGF- β superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: a pleiotrophic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. **Growth factors (Chur, Switzerland)**, v. 29, n. 5, p. 187–195, out. 2011.
- BROSKEY, N. T. et al. Effect of Aerobic Exercise-induced Weight Loss on the Components of Daily Energy Expenditure. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 53, n. 10, p. 2164–2172, 1 out. 2021.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, n. C, p. 302–310, 1 jan. 1978.
- CAMPDERRÓS, L. et al. Altered GDF15 and FGF21 Levels in Response to Strenuous Exercise: A Study in Marathon Runners. **Frontiers in physiology**, v. 11, 19 nov. 2020.
- CHANG, J. S.; NAMKUNG, J. Effects of Exercise Intervention on Mitochondrial Stress Biomarkers in Metabolic Syndrome Patients: A Randomized Controlled Trial. **International**

journal of environmental research and public health, v. 18, n. 5, fev. 2021.

CHUNG, H. K. et al. Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis. **The Journal of cell biology**, v. 216, n. 1, p. 149–165, jan. 2017.

CHUNG, H. K. et al. GDF15 deficiency exacerbates chronic alcohol- and carbon tetrachloride-induced liver injury. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Annals of internal medicine**, v. 111, n. 11, p. 918–931, 1989.

CONTE, M. et al. Human Aging and Longevity Are Characterized by High Levels of Mitokines. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 74, n. 5, p. 600–607, 1 maio 2019.

CONTE, M. et al. GDF15 Plasma Level Is Inversely Associated With Level of Physical Activity and Correlates With Markers of Inflammation and Muscle Weakness. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 915, 2020.

CONTE, M. et al. GDF15 Plasma Level Is Inversely Associated With Level of Physical Activity and Correlates With Markers of Inflammation and Muscle Weakness. **Frontiers in immunology**, v. 11, 12 maio 2020.

CONTE, M. et al. Mitochondria, immunosenescence and inflammaging: a role for mitokines? **Seminars in immunopathology**, v. 42, n. 5, p. 607–617, 1 out. 2020.

CORRAL-DEBRINSKI, M. et al. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. **Nature genetics**, v. 2, n. 4, p. 324–329, 1992.
DA COSTA, J. P. et al. A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects. **Ageing research reviews**, v. 29, p. 90–112, 1 ago. 2016.

DAM, A. D.; MITCHELL, A. S.; QUADRILATERO, J. Induction of mitochondrial biogenesis protects against caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in L6 myoblasts. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1833, n. 12, p. 3426–3435, dez. 2013.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS letters**, v. 369, n. 2–3, p. 131–135, 7 ago. 1995.

DAVALLI, P. et al. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 3565127, 1 jan. 2016.

DE MORTON, N. A. The PEDro scale is a valid measure of the methodological quality of clinical trials: a demographic study. **The Australian journal of physiotherapy**, v. 55, n. 2, p. 129–133, 2009.

DE SOUSA, C. A. Z. et al. Time Course and Role of Exercise-Induced Cytokines in Muscle Damage and Repair After a Marathon Race. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 752144, 2021.
EGGERS, K. M. et al. Growth-differentiation factor-15 for early risk stratification in patients with acute chest pain. **European Heart Journal**, v. 29, n. 19, p. 2327, out. 2008.

EL ASSAR, M. et al. Effect of Physical Activity/Exercise on Oxidative Stress and Inflammation in Muscle and Vascular Aging. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, ago. 2022.

EMMERSON, P. J. et al. The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. **Nature medicine**, v. 23, n. 10, p. 1215–1219, 1 out. 2017.

ENARSSON, M. et al. Association between Cardiorespiratory Fitness and Circulating Proteins in 50-Year-Old Swedish Men and Women: a Cross-Sectional Study. **Sports medicine - open**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2021.

FABRICIO, M. F. et al. Standardization of a new non-invasive device for assessment of arterial stiffness in rats: Correlation with age-related arteries' structure. **MethodsX**, v. 7, 1 jan. 2020.

FERRARI, C. K. B.; FRANÇA, E. L.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Nitric oxide, health and disease. <http://jab.zsf.jcu.cz/doi/10.32725/jab.2009.019.html>, v. 7, n. 4, p. 163–173, 2009.

FRANCESCHI, C. et al. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. **Frontiers in medicine**, v. 5, n. MAR, 1 mar. 2018.

FUJITA, Y. et al. Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. **Geriatrics & gerontology international**, v. 16 Suppl 1, p. 17–29, 1 mar. 2016.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, 1 dez. 2019.

GALLIERA, E. et al. Acute exercise in elite rugby players increases the circulating level of the cardiovascular biomarker GDF-15. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 74, n. 6, p. 492–499, set. 2014.

GARVEY, S. M. et al. Molecular and metabolomic effects of voluntary running wheel activity on skeletal muscle in late middle-aged rats. **Physiological reports**, v. 3, n. 2, fev. 2015.

GE, Y. et al. RNAi Screen Reveals Potentially Novel Roles of Cytokines in Myoblast Differentiation. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68068, 2 jul. 2013.

GIL, C. I. et al. Role of GDF15 in active lifestyle induced metabolic adaptations and acute exercise response in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20120, 1 dez. 2019.

GOMEZ-CABRERA, M. C.; DOMENECH, E.; VIÑA, J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. **Free radical biology & medicine**, v. 44, n. 2, p. 126–131, 15 jan. 2008.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 393, n. 4, p. 561–564, 19 mar. 2010.

HAGSTRÖM, E. et al. Growth Differentiation Factor 15 Predicts All-Cause Morbidity and

Mortality in Stable Coronary Heart Disease. **Clinical chemistry**, v. 63, n. 1, p. 325–333, 1 jan. 2017.

HAJAM, Y. A. et al. **Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives**. *Cells*, 2022.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, v. 186, n. C, p. 1–85, 1 jan. 1990.

HARMAN, D. The aging process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 11, p. 7124–7128, 1981.

HERRERA, N. A. et al. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. **Journal of hypertension**, v. 34, n. 10, p. 1967–1976, out. 2016.

HIGGINS, J. P. T. et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 343, n. 7829, 29 out. 2011.

INDO, H. P. et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2015.

JACOMINI, A. M. et al. Training Status as a Marker of the Relationship between Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Blood Pressure in Older Adult Women. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 8262383, 2015.

JACOMINI, A. M. et al. Influence of Estimated Training Status on Anti and Pro-Oxidant Activity, Nitrite Concentration, and Blood Pressure in Middle-Aged and Older Women. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

JOHNSON, F. B.; SINCLAIR, D. A.; GUARENTE, L. Molecular biology of aging. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 291–302, 22 jan. 1999.

JOHNSON, M. L.; ROBINSON, M. M.; NAIR, S. K. Skeletal muscle aging and the mitochondrion. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 24, n. 5, p. 247–256, maio 2013.

JUDGE, S. et al. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 1–21, mar. 2005.

KALETA-DUSS, A. M. et al. Myocardial Injury and Overload among Amateur Marathoners as Indicated by Changes in Concentrations of Cardiovascular Biomarkers. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 17, ago. 2020.

KLEIN, A. B. et al. Pharmacological but not physiological GDF15 suppresses feeding and the motivation to exercise. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1041, fev. 2021.

KLEIN, A. B. et al. Pharmacological but not physiological GDF15 suppresses feeding and the motivation to exercise. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1041, fev. 2021.

KLEINERT, M. et al. Exercise increases circulating GDF15 in humans. **Molecular metabolism**, v. 9, p. 187–191, mar. 2018.

KU, H. H.; BRUNK, U. T.; SOHAL, R. S. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. **Free radical biology & medicine**, v. 15, n. 6, p. 621–627, 1993.

LAURENS, C. et al. Growth and differentiation factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and promotes lipolysis in humans. **JCI insight**, v. 5, n. 6, 26 mar. 2020.

LAWTON, L. N. et al. Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. **Gene**, v. 203, n. 1, p. 17–26, 5 dez. 1997.

LEHALLIER, B. et al. Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan. **Nature medicine**, v. 25, n. 12, p. 1843–1850, 1 dez. 2019.

LENAZ, G. et al. Oxidative stress, antioxidant defences and aging. **BioFactors**, v. 8, n. 3–4, p. 195–204, 1 jan. 1998.

LERTPATIPANPONG, P. et al. The anti-diabetic effects of NAG-1/GDF15 on HFD/STZ-induced mice. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

LI, F.-H. et al. Beneficial alterations in body composition, physical performance, oxidative stress, inflammatory markers, and adipocytokines induced by long-term high-intensity interval training in an aged rat model. **Experimental gerontology**, v. 113, p. 150–162, nov. 2018.

LI, P. X. et al. Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20127–20135, 30 jun. 2000.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 1 jan. 2018.

LIU, H. et al. GDF15 as a biomarker of ageing. **Experimental gerontology**, v. 146, 1 abr. 2021.

LOPES MOREIRA, L. et al. Treinamento aeróbio contínuo versus treinamento acumulado: Uma comparação de seus efeitos e desempenho em modelo animal. **RBPFX - Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 9, n. 56, p. 605–616, 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MASTROYIANNPOULOS, N. P. et al. Down-Regulation of Myogenin Can Reverse Terminal Muscle Cell Differentiation. **PLOS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29896, 3 jan. 2012.

MATHES, T.; PIEPER, D. Clarifying the distinction between case series and cohort studies in systematic reviews of comparative studies: potential impact on body of evidence and workload. **BMC Medical Research Methodology**, v. 17, n. 1, 17 jul. 2017.

MIKHED, Y.; DAIBER, A.; STEVEN, S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15918–15953, 13 jul. 2015.

MILANOVIĆ, Z. et al. Age-related decrease in physical activity and functional fitness among elderly men and women. **Clinical interventions in aging**, v. 8, p. 549–556, 2013.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, jul. 2009.

MORROW, R. M. et al. Mitochondrial energy deficiency leads to hyperproliferation of skeletal muscle mitochondria and enhanced insulin sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 10, p. 2705–2710, mar. 2017.

MULLICAN, S. E. et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. **Nature medicine**, v. 23, n. 10, p. 1150–1157, 1 out. 2017.

MUNK, P. S. et al. Response of growth differentiation factor-15 to percutaneous coronary intervention and regular exercise training. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v. 45, n. 1, p. 27–32, 13 fev. 2011.

MUNN, Z. et al. Methodological quality of case series studies: an introduction to the JBI critical appraisal tool. **JBI evidence synthesis**, v. 18, n. 10, 2020.

OBA, K. et al. Serum Growth Differentiation Factor 15 Levels Predict the Incidence of Frailty Among Patients with Cardiometabolic Diseases. **Gerontology**, jan. 2024.

OLESEN, A. T. et al. Age-related myofiber atrophy in old mice is reversed by ten weeks voluntary high-resistance wheel running. **Experimental gerontology**, v. 143, 1 jan. 2021.

OTEIZA, P. I. et al. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 4, p. 823–829, 1995.

PARK, D. C.; YEO, S. G. Aging. **Korean journal of audiology**, v. 17, n. 2, p. 39–44, set. 2013.

PEAKE, J. M. et al. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 3, p. 559–570, 1 mar. 2017.

PERRONE, M. A. et al. The Effects of Exercise Training on Cardiopulmonary Exercise Testing and Cardiac Biomarkers in Adult Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome and Fontan Circulation. **European Heart Journal, Supplement**, v. 24, p. K98, 2022.

PERRONE, M. A. et al. The Effects of Exercise Training on Cardiopulmonary Exercise

Testing and Cardiac Biomarkers in Adult Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome and Fontan Circulation. **European Heart Journal, Supplement**, v. 24, p. K98, 2022.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1–2, p. 161–170, 1980.

Pirâmide etária | Educa | Jovens - IBGE. Disponível em:

<<https://educa.ibge.gov.br/jovens/materias-especiais/18318-piramide-etaria.html>>. Acesso em: 12 set. 2024.

PLOMGAARD, P. et al. GDF15 is an exercise-induced hepatokine regulated by glucagon and insulin in humans. v. 13, p. 1037948, 2022.

QIN, F. et al. Maximum oxygen consumption and quantification of exercise intensity in untrained male Wistar rats. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

QUADRILATERO, J.; ALWAY, S. E.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme**, v. 36, n. 5, p. 608–617, out. 2011.

QUIST, J. S. et al. Effects of acute exercise and exercise training on plasma GDF15 concentrations and associations with appetite and cardiometabolic health in individuals with overweight or obesity - A secondary analysis of a randomized controlled trial. **Appetite**, v. 182, p. 106423, mar. 2023.

RADAK, Z. et al. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. **Free radical biology & medicine**, v. 98, p. 187–196, 1 set. 2016.

REZAEI, S.; ESLAMI, R.; TARTIBIAN, B. The effects of TRX suspension training on sarcopenic biomarkers and functional abilities in elderlies with sarcopenia: a controlled clinical trial. **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, v. 16, n. 1, 2024.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, n. C, p. 357–363, 1 jan. 1994.

RICHTER, E. A. et al. Contraction-associated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle. **FEBS letters**, v. 217, n. 2, p. 232–236, 15 jun. 1987.

ROCHETTE, L. et al. GDF15 and Cardiac Cells: Current Concepts and New Insights. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, 2 ago. 2021.

SABARATNAM, R. et al. Acute Exercise Increases GDF15 and Unfolded Protein Response/Integrated Stress Response in Muscle in Type 2 diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, jan. 2024.

SANTOS, B. C. F. **GDF15 induces oxidative metabolism by a mechanism mediated by the PGC1 α /PPAR axis in muscle cells | Unicamp.** Disponível em:

<<https://unicamp.br/en/unicamp/teses/2022/12/07/gdf15-induz-o-metabolismo-oxidativo-por-um-mecanismo-mediado-pelo-eixo-pgc1appar/>>. Acesso em: 16 ago. 2024.

SEO, M. W. et al. Effects of 16 Weeks of Resistance Training on Muscle Quality and Muscle Growth Factors in Older Adult Women with Sarcopenia: A Randomized Controlled Trial. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 13, 1 jul. 2021.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 23, p. 10771–10778, 8 nov. 1994.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Free radical research**, v. 40, n. 12, p. 1250–1258, dez. 2006.

STEPIĆ, S. et al. Impact of oxidative stress indicated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl levels (PC) on ethoxyresorufin-o- deethylase (EROD) induction in common carp (*Cyprinus carpio*). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 8, p. 4785–4793, 2012.

TANAKA, T. et al. Plasma proteomic signature of age in healthy humans. **Aging cell**, v. 17, n. 5, 1 out. 2018.

TCHOU, I. et al. Growth-differentiation factor-15, endoglin and N-terminal pro-brain natriuretic peptide induction in athletes participating in an ultramarathon foot race. **Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 14, n. 6, p. 418–422, set. 2009.

TCHOU, I. et al. Growth-differentiation factor-15, endoglin and N-terminal pro-brain natriuretic peptide induction in athletes participating in an ultramarathon foot race. **Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 14, n. 6, p. 418–422, set. 2009.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

TSAI, V. W. W. et al. Anorexia-cachexia and obesity treatment may be two sides of the same coin: role of the TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15. **International journal of obesity (2005)**, v. 40, n. 2, p. 193–197, 1 fev. 2016.

TSAI, V. W. W. et al. The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 353–368, 2018.

TZIMOU, A. et al. Effects of lifelong exercise and aging on the blood metabolic fingerprint of rats. **Biogerontology**, v. 21, n. 5, p. 577–591, 1 out. 2020.

UNSICKER, K.; SPITTAU, B.; KRIEGLSTEIN, K. The multiple facets of the TGF- β family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 24, n. 4, p. 373–384, ago. 2013.

VIEIRA, L. H. P. Matlab code to extract figure values. 2021.

WANG, B. et al. effect of physical activity on independent living ability among community-dwelling elderly in urban areas of Liaoning Province in China: a population-based study. **BMJ open**, v. 9, n. 10, 1 out. 2019.

WANG, X. et al. hNAG-1 increases lifespan by regulating energy metabolism and insulin/IGF-1/mTOR signaling. **Aging**, v. 6, n. 8, p. 690–704, 2014.

WENG, J. H. et al. Colchicine acts selectively in the liver to induce hepatokines that inhibit myeloid cell activation. **Nature metabolism**, v. 3, n. 4, p. 513–522, 1 abr. 2021.

WHO. WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour. **WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour**, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases (CVDs). [s.d.].

YANG, L. et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. **Nature medicine**, v. 23, n. 10, p. 1158–1166, out. 2017.

YARDLEY, M. et al. Immediate response in markers of inflammation and angiogenesis during exercise: a randomised cross-over study in heart transplant recipients. **Open heart**, v. 4, n. 2, p. e000635, 2017.

YATSUGA, S. et al. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. **Annals of neurology**, v. 78, n. 5, p. 814–823, 1 nov. 2015.

YOKOYAMA-KOBAYASHI, M. et al. Human cDNA encoding a novel TGF-beta superfamily protein highly expressed in placenta. **Journal of biochemistry**, v. 122, n. 3, p. 622–626, set. 1997.

YUN, J.; FINKEL, T. Mitohormesis. **Cell metabolism**, v. 19, n. 5, p. 757–766, 6 maio 2014.

ZHANG, H.; FEALY, C. E.; KIRWAN, J. P. Exercise training promotes a GDF15-associated reduction in fat mass in older adults with obesity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 316, n. 5, p. E829–E836, maio 2019.

ZHANG, H.; FEALY, C. E.; KIRWAN, J. P. Exercise training promotes a GDF15-associated reduction in fat mass in older adults with obesity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 316, n. 5, p. E829–E836, 1 maio 2019.

ZHANG, K.; SHA, J.; HARTER, M. L. Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. **The Journal of cell biology**, v. 188, n. 1, p. 39–48, 11 dez. 2010.

ZWEIER, J. L. et al. Mechanisms of Nitrite Reduction to Nitric Oxide in the Heart and Vessel Wall. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 22, n. 2, p. 83, 2 fev. 2010.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado de aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Bauru

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito do exercício físico e da suplementação de nitrito no controle cardiovascular de ratos idosos**", registrada com o nº **281/2020 Vol. 1**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. ANDERSON SARANZ ZAGO - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 27/05/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 01/07/2020 a 30/06/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo/Wistar
Nº de animais	96
Peso/Idade	200-250g/45 dias
Sexo	Macho
Origem	Centro de Pesquisa e Produção de Animais da UNESP-Botucatu


Profª Associada Sandra Lia do Amaral Cardoso
Coordenadora da CEUA

APÊNDICES

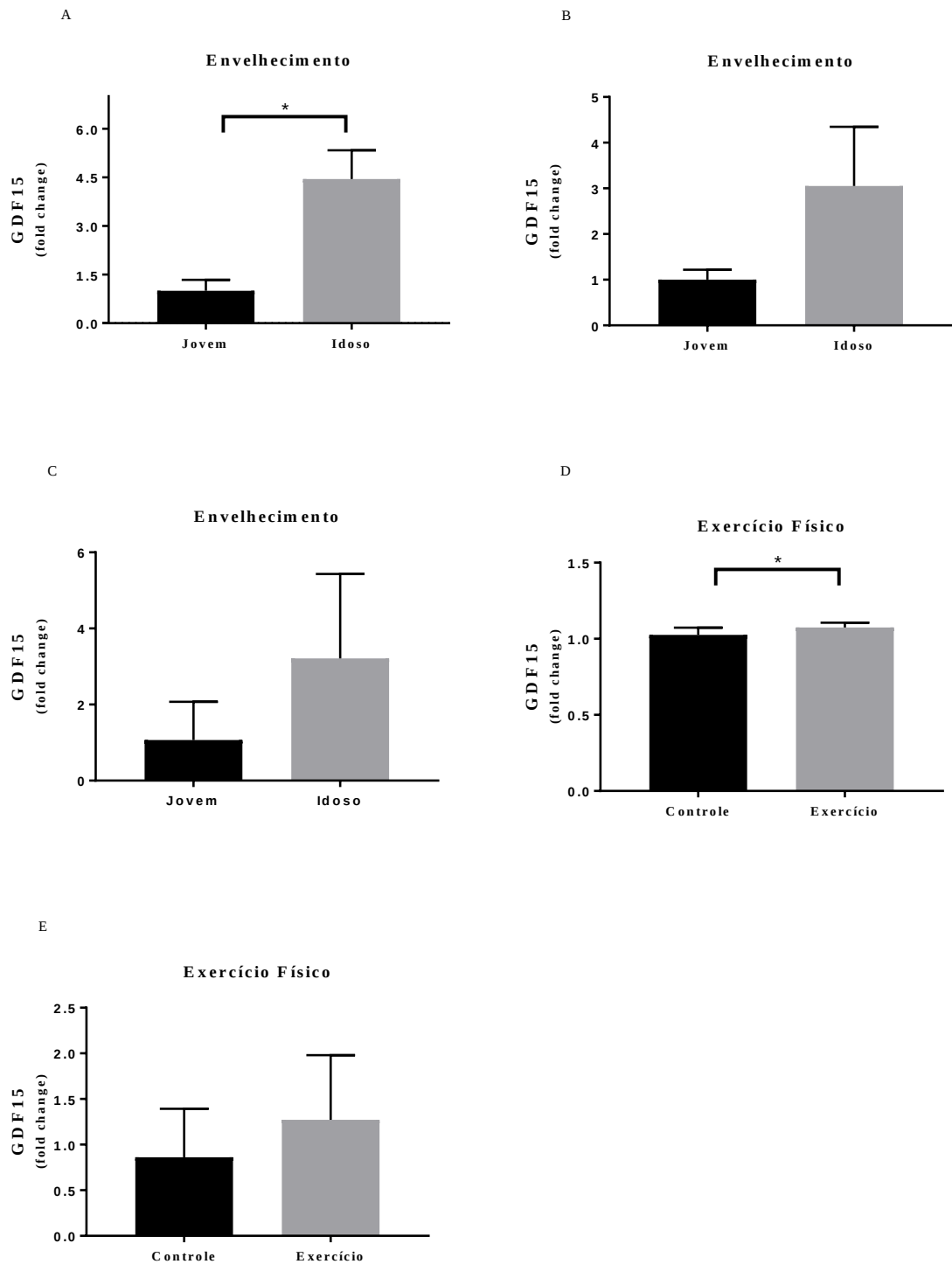
APÊNDICE A – Pontuação individual dos ensaios clínicos referente à escala PEDro

Criteria		Munk et al., 2011	Seo et al., 2021	Chang et al., 2021	Quist et al., 2023	Rezaei et al., 2024
		Yes(1)/ No(0)	Yes/No	Yes/No	Yes/No	Yes/No
1	Eligibility (<i>not usual in the final score</i>)	1	1	1	1	1
2	Subjects were randomly assigned	1	1	1	1	1
3	Blind distribution	1	1	1	1	1
4	Similar group	1	1	1	1	1
5	Subjects were blinded	0	0	1	0	0
6	Therapists were blinded	0	0	1	0	0
7	Assessors were blinded	0	0	1	1	0
8	Results measured in >85% of participants	1	1	1	1	1
9	Intento-treat analysis	1	1	1	1	1
10	Intergroup comparison	1	1	1	1	1
11	Measures of variability	1	1	1	1	1
Total Score		7	7	10	8	7

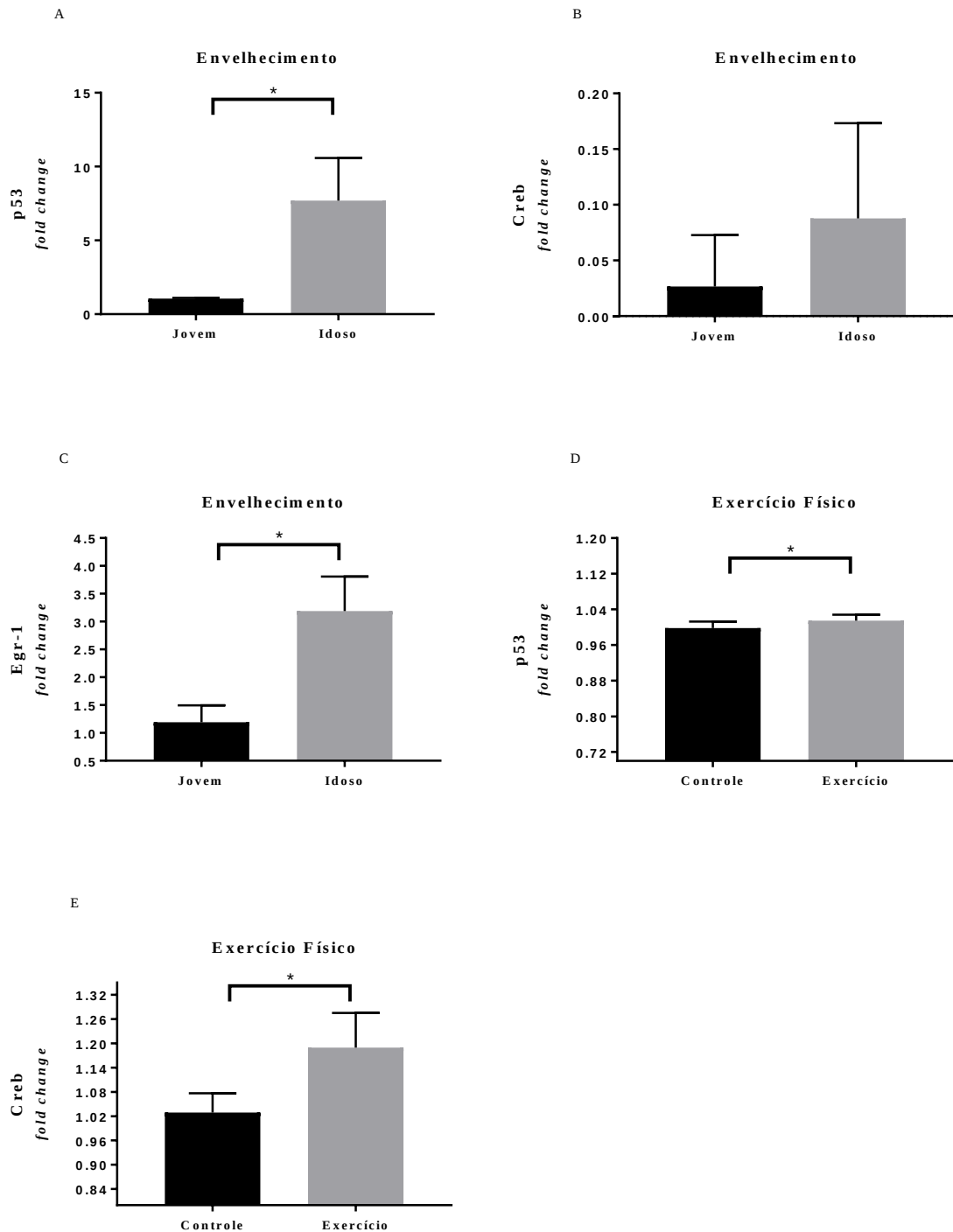
APÊNDICE B – Análise de dados de *rna-seq* e *array profile* em modelos de envelhecimento e exercício físico

Foi realizada uma análise prévia de *RNA-seq* e *Array profile* antes de prosseguir com os experimentos para fundamentar e orientar a pesquisa. Ambas as técnicas proporcionam alta resolução na quantificação da expressão gênica e oferecem abordagens complementares. A partir da revisão de literatura, selecionamos GDF15 e seus fatores de transcrição como alvos de estudo em modelos de envelhecimento e exercício físico. Foi notável que a literatura foi consensual ao afirmar que o exercício físico agudo eleva os níveis de GDF15 devido ao estresse fisiológico. No entanto, essas análises contribuíram para fortalecer a hipótese da ausência de estudos sobre o treinamento crônico e GDF15. Isso ressalta a importância de explorar esse contexto.

Resultados



Expressão de GDF15 através da análise de bancos públicos de dados (*RNA-seq* e *Array profile*), em envelhecimento e exercício físico. A-) sóleo de camundongos jovens vs. idosos (*RNA-seq* GSE198266); B-) células musculares de camundongos jovens vs. idosos (*Array profile* GSE47104); C-) gastrocnêmio de camundongos jovens vs. idosos (*RNA-seq* GSE198266); D-) miotubos humanos controle vs. miotubos estimulados por pulso elétrico (*Array profile* GSE44051); E-) sóleo de camundongos controle vs. exercício (*RNA-seq* GSE198266).



Expressão dos fatores de transcrição reguladores de GDF15 através da análise de bancos públicos de dados (RNA-seq e Array profile), em envelhecimento e exercício físico. A-) células satélites de músculos de camundongos jovens vs. idosos (Array profile GSE50821); B-) sóleo de camundongos jovens vs. idosos (RNA-seq GSE198266); C-) células musculares de camundongos jovens vs. idosos (Array profile GSE57373); D-) miotubos humanos controle vs. miotubos estimulados por pulso elétrico (Array profile GSE44051); E-) sóleo de camundongos controle vs. exercício (RNA-seq GSE198266).