



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

O uso da suplementação de cetoanálogos e cafeína para o estudo do metabolismo de aminoácidos no exercício em modelos de experimentação humana e animal

Aluno: Anibal Monteiro de Magalhães Neto

Orientador: Luiz Cláudio Cameron

UBERLÂNDIA – MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

O uso da suplementação de cetoanálogos e cafeína para o estudo do metabolismo de aminoácidos no exercício em modelos de experimentação humana e animal

Aluno: Anibal Monteiro de Magalhães Neto

Orientador: Luiz Cláudio Cameron

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica).

UBERLÂNDIA – MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- M188u Magalhães Neto, Aníbal Monteiro de, 1973-
O uso da suplementação de cetoanálogos e cafeína para o estudo do metabolismo de aminoácidos no exercício em modelos de experimentação humana e animal [manuscrito] / Aníbal Monteiro de Magalhães Neto. – 2011.
121 f. : il.

Orientador: Luiz Cláudio Cameron.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. 2. Amônia - Metabolismo - Teses. 3. Aminoácidos - Metabolismo - Teses. I. Cameron, Luiz Cláudio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 612.766.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

O uso da suplementação de cetoanálogos e cafeína para o estudo do metabolismo de aminoácidos no exercício em modelos de experimentação humana e animal

Aluno: Anibal Monteiro de Magalhães Neto

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Cláudio Cameron (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Adriana Bassini (Titular)
Prof. Dr. Ana Graci Madurro-Brito (Titular)
Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato (Titular)
Prof. Dr. Nilson Penha Silva (Titular)

Data da Defesa: 29/07/2011.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Prof. Dr. L. C. Cameron

Lista de Abreviaturas

AA	Aminoácidos
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
ADP	Adenosina difosfato
AFMU	5-acetilamina-6-formalamina-3-metiluracil
AGL	Ácido Graxo Livre
Ala	Alanina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ARs	Receptor de adenosina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
BCAT	BCAA aminotransferase
BCKA	Cetoanálogos de cadeia ramificada
BCKDH	Complexo enzimático alfa cetoácido de cadeia ramificada desidrogenase
Ca ²⁺	Ion cálcio
CAF	Cafeína
CHO	Carboidratos
COX	Ciclo oxigenase
CP	Creatina fosfato
CYP	Citocromo 450
DOP	Dopamina
EAAT1	Transportadores glutamato na fenda sináptica 1
EAAT2	Transportadores glutamato na fenda sináptica 2
EH	Encefalopatia hepática
GDH	Glutamato desidrogenase
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetase
GTP	Guanosina trifosfato

H ⁺	Íon hidrogênio
IMP	Inosina monofosfato
K ⁺	Íon potássio
LBP	Laboratório de Bioquímica de Proteínas
N ₂	Nitrogênio
Na ⁺	Íon sódio
NAT2	N-acetiltransferase
NH ₃	Amônia
NH ₄ ⁺	Íon amônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
OCT	Ornitina transcarbamilase
Pi	Fosfato inorgânico
PLA	Placebo
PNC	Ciclo das purinas nucleotídeos
PÓS	Pós-sinápticas
PRE	Pré-sinápticas
SER	Serotonina
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TE	Tempo de exaustão
T _{MÁX}	Tempo para alcançar o pico da concentração plasmática
VO ₂	Capacidade de consumo de oxigênio
VO _{2MÁX}	Capacidade máxima de consumo de oxigênio
XO	Xantina oxidase

Sumário

Apresentação	1
RESUMO	3
ABSTRACT.....	4
Capítulo I	5
PARTE 1: A cafeína	6
1. Origens e histórias sobre o café	6
2. Cafeína.....	8
2.1. Absorção da cafeína	8
2.2. Farmacocinética da cafeína	9
3. Variação farmacocinética do metabolismo da cafeína.....	12
3.1. Idade.....	12
3.2. Ação analgésica e antiinflamatória.....	12
3.3. Exercício físico	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
PARTE 2: Metabolismo de Amônia	37
1. Amônia	37
1.1. Metabolismo e transporte de amônia	39
1.2. Efeitos provocados pela toxicidade da amônia.....	41
2. Exercícios físicos e amônia	45
2.1. Efeitos do exercício físico de alta intensidade e curta duração sobre o metabolismo da amônia	49
3. Suplementação de cetoanálogos e exercício físico	56
4. Suplementação e esportômica	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Capítulo II	76
Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. Br J Nutr. 2010 Nov;104(10):1438-42.	
Capítulo III	82
Metabolic changes during a field experiment in a world-class windsurfing athlete: a trial with multivariate analyses. OMICS. 2011 Oct;15(10):695-704.	
Capítulo IV	93
Caffeine decreases systemic urea in elite soccer players during intermittent exercise. Med Sci Sports Exerc. 2012 Nov 6.	
Conclusão Geral	119
ANEXO	120

Apresentação

Em humanos, durante os exercícios físicos o músculo esquelético produz amônia que é parcialmente liberada para o sangue. A velocidade de utilização de adenosina trifosfato (ATP) pela contração muscular e da desaminação da adenosina monofosfato (AMP) são as maiores responsáveis pela gênese de amônia durante o exercício. A amônia é tóxica ao organismo humano e sua toxicidade está relacionada a distúrbios neurológicos e a queda do desempenho físico. É proposto que a produção de amônia consequente do exercício físico pode ser um fator responsável pela diminuição da capacidade cognitivo-física e pode afetar a performance em atletas.

Nesta tese, investigamos em modelos experimentais humanos e animais os efeitos da suplementação de cafeína e/ou cetoanálogos na amonemia durante o exercício físico intenso de curta duração. O interesse nesse sistema está baseado em investigações realizadas nos últimos anos, no Laboratório de Bioquímica de Proteínas (LBP), no qual se tem utilizado o exercício físico como modelo para induzir uma elevação da amonemia e ao mesmo tempo, estudar o metabolismo de aminoácidos. Desta forma, as modificações metabólicas originadas a partir da suplementação de cafeína e cetoanálogos podem indicar caminhos para melhorar o desempenho físico e novos alvos terapêuticos.

Assim, para melhor compreensão desse assunto, esta tese está dividida em quatro capítulos, sendo: o primeiro capítulo com a fundamentação teórica sobre o tema, o segundo, terceiro e quarto capítulos com a apresentação de estudos realizados publicados em periódicos científicos, e a conclusão geral sobre os resultados obtidos nesta tese.

O capítulo I foi dividido em duas partes. Na primeira parte está à fundamentação teórica sobre a xantina cafeína, destacando sua utilização no decorrer da história, sua síntese e metabolização em mamíferos. Ademais, descreve-se a relação dessa xantina com o exercício físico em diferentes volumes e intensidades. Na segunda parte está à fundamentação teórica sobre a amônia, destacando sua síntese e toxicidade, sua relação com o exercício físico, dieta cetogênica e depleção de glicogênio. Além disso, apresenta-se um breve ensaio

sobre o uso das modernas tecnologias para análise da esportômica, um novo conceito em ciências “ômicas” proposto pelo grupo do LBP.

O capítulo II apresenta o estudo dos efeitos da suplementação aguda de cetoanálogos e aminoácidos no metabolismo de amônia em ratos durante a realização de exercício físico de resistência. Esse estudo está no formato de artigo por já ter sido publicado no periódico *British Journal of Nutrition* (2010).

O capítulo III mostra o estudo das alterações metabólicas durante um experimento de campo em um atleta de classe mundial de windsurf. Nesse estudo apresentam-se os resultados obtidos através do uso das ciências “ômicas”, tornando-o um estudo com análises multivariadas. Esse estudo também está no formato de artigo por já ter sido publicado no periódico *OMICS: A Journal of Integrative Biology* (2011).

O capítulo IV apresenta o estudo das mudanças nas concentrações de ureia, amônia e aminoácidos no plasma em resposta ao exercício físico em jogadores de futebol de elite suplementados com cafeína. Esse estudo também está no formato de artigo por já ter sido publicado no periódico *Medicine & Science in Sports & Exercise* (2012).

Ao final desta tese está a conclusão geral, na qual estão apresentados os achados de forma sintetizada, assim como a importância destes estudos para compreender o efeito da suplementação de cafeína e cetoanálogos no metabolismo dos compostos nitrogenados e na performance física, a fim de divulgação científica dos seus benefícios na capacidade cognitivo-física em humanos e murinos. Para assim, promover e dar suporte científico para novos estudos na área.

RESUMO

A amônia (nesse trabalho descrito como sinônimo de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) é tóxica e promove efeitos deletérios no sistema nervoso central de humanos e murinos. O metabolismo da amônia e o aumento de sua concentração nos tecidos podem ser estudados pela realização de exercícios físicos. Os distúrbios temporários no sistema nervoso central causado pelo exercício são similares aos observados na doença hepática e desordens neurodegenerativas. Desta forma, os exercícios de alta intensidade têm sido implicados com o desenvolvimento de fadiga e exaustão física devido ao aumento nas concentrações da amônia plasmática. A utilização da suplementação de cetoanálogos e/ou cafeína diminui a concentração de amônia no sangue durante o exercício para promover melhor desempenho. Desta maneira, a suplementação de cetoanálogos e/ou cafeína associada ao exercício físico podem retardar ou superar o efeito tóxico da elevação da amônia. Este estudo verificou o efeito protetor das suplementações de cetoanálogos e cafeína contra os compostos nitrogenados, e o desempenho físico de humanos e ratos submetidos ao exercício físico de alta intensidade e curta duração.

Palavras-chaves: Amonemia, Cafeína, Cetoácidos.

ABSTRACT

Ammonia (described in this study as a synonym for $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) is toxic and promotes deleterious effects on the central nervous system of human and murine. The ammonia metabolism and increase the concentration of ammonia in tissues can be studied by physical exercises. The temporary disturbances in the central nervous system caused by exercise are similar to those observed in liver disease and neurodegenerative disorders. Thus, the high-intensity exercise has been implicated in the development of fatigue and exhaustion due to increased plasma ammonia concentrations. The use of ketoanalogues and/or caffeine supplementation decreases the concentration of ammonia in the blood during exercise to promote better performance. Thus, ketoanalogues and/or caffeine supplementation combined with exercise can delay or overcome the toxic effect of high ammonia. This study investigated the protective effect of ketoanalogues and caffeine supplementation against nitrogen compounds, and the physical performance in humans and rats subjected to physical exercise of high intensity and short duration.

Key-words: Amonemia, Caffeine, Keto acids.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

PARTE 1: A cafeína

1. ORIGENS E HISTÓRIAS SOBRE O CAFÉ

Quando se fala em café, logo se lembra da cafeína, pelo fato dessa bebida ser popularmente conhecida por conter essa substância. Sobre a história do café há uma vasta trilha a ser percorrida, essa afirmação advém de profícuas leituras, bem como de pesquisas cujo início se afigura a questão central deste estudo.

A árvore do café selvagem que se encontra em diversas partes do continente africano pode ter sido cultivada por inúmeras tribos ao longo do deserto do Saara estendendo até a Arábia Saudita. Existem pouquíssimas evidências de que as pessoas desta época tinham conhecimento de que a produção da cafeicultura poderia produzir uma bebida tão útil nos tempos islâmicos e estenderia para todo mundo passando por gerações e gerações. Desta forma, belíssimas estórias foram narradas pelos primeiros usuários do café, que era uma bebida desconhecida, todavia, isto proporcionou inúmeras fábulas mitológicas. Dentre as muitas fábulas existentes sobre a origem do café, nesta tese, limitaremos apenas na qual o Arcanjo Gabriel ofereceu a Maomé um café, segundo a lenda, fora preparado no céu e, assim, abençoado por Deus, pois Maomé se encontrava sonolento para realizar sua meditação diária, próxima aos montes de Meca. Conta-se que ao tomar a bebida sagrada, a sonolência foi logo superada. Um gole desse café celeste foi suficiente para torná-lo tão vigoroso, que o fez sair em profecia para unificação do povo árabe (Fredholm 2011).

De acordo com as lendas, o que se parece é que os primeiros grãos de café foram ingeridos (*in natura*), e também moídos e misturados com pasta de gordura o que era servido como um lanche de viagem, o que era bastante estimulante para os diversos povos que usavam as rotas árabes. Somente por volta do ano 1000 a.C, os povos nômades utilizaram os grãos moídos que eram deixados “torrar” no alto calor do deserto, e logo este processo ser concluído fazia infusão com água fervente (Fredholm 2011).

A palavra "café" deriva da palavra *qahva* (ou *qahwah*), que é uma palavra árabe que denota uma bebida feita a partir de plantas. A partir de culturas iniciais na Etiópia, o cultivo de pés de café logo passou a ser dominado pelo Iêmen. A

cidade de Mocha se tornou um grande centro na produção de café e seu nome passou a designar a bebida. Agora, o café é cultivado em 50 países diferentes ao redor do mundo (Fredholm 2011).

Nas últimas décadas, o uso de cafeína tem crescido, provavelmente não só pelo consumo do café, mas sim devido ao aumento do consumo de refrigerantes e derivados. Os espanhóis e holandeses popularizaram a cafeína na Europa durante o período de conquistas das rotas marítimas européias. Pode-se dizer que, atualmente, a cafeína é mundialmente consumida, fazendo parte da cultura de muitos países e sendo vital para algumas economias, sendo a Grã-Bretanha, a Escandinávia e os EUA, os maiores consumidores deste alcalóide do café (Choi e Curhan 2007).

Os países latinos têm tradicionalmente o hábito de tomar o café mais concentrado, com maior teor de cafeína, enquanto que os americanos preferem o café bem mais diluído, de preferência descafeinado. Isto porque a bebida não é tão popular nos Estados Unidos como é no Brasil e em Cuba. Nossa cultura adotou o hábito de ingerir bebidas cafeinadas devido ao incremento mental e retardo da fadiga (Burke 2008; Beedie e Foad 2009).

Por ser a substância psicoativa mais consumida no mundo, o consumo habitual da cafeína este associado a fatores demográficos, sociais e por último a componentes hereditários. Através do genoma humano, em um estudo com a participação com mais de 40.000 participantes, em sua maioria sendo formado por pares de gêmeos, descobriram dois possíveis genes que possam estar associados com o consumo de cafeína, os quais são: AHR7p21 e CYP1A215q24. Ambos os genes são possíveis candidatos relacionados às propriedades farmacocinética e farmacodinâmica da cafeína. A abordagem através do genoma vem ganhando destaque como um poderoso instrumento capaz de descobrir novos loci relacionados aos efeitos benéficos e tóxicos pelo uso da cafeína (Cornelis et al. 2011).

2. CAFEÍNA

A cafeína (CAF) é uma metilxantina, que pertence a um grupo de compostos lipídicos solúveis denominados de purinas, quimicamente conhecida como 1,3,7-trimetilxantina (Figura 1) (Heckman et al. 2010).

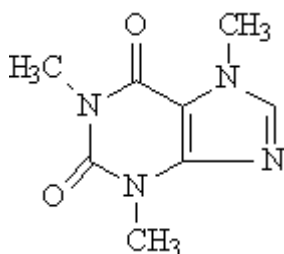


Figura 1. Cafeína. 1,3,7-Trimetilxantina (C₈H₁₀N₄O₂; 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purino-2,6-diona). Adaptado por Heckman et al. (2010).

As metilxantinas têm duas ações celulares bem caracterizadas que são: a grande habilidade em inibir as fosforilases do ciclo dos nucleotídeos, aumentando, desse modo, o adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular; e o antagonismo a ação de mediadores dos receptores de adenosina (ARs). As metilxantinas provocam no organismo humano ações como relaxamento da musculatura lisa, estimulação do sistema nervoso central (SNC) e do músculo cardíaco (Debler et al. 1989; Davis et al. 2003; Deslandes et al. 2005).

2.1. ABSORÇÃO DA CAFEÍNA

A cafeína pode ser administrada via oral e absorvida pelo trato gastrointestinal tendo aproximadamente 100% da sua biodisponibilidade, tendo um pico plasmático ($T_{MÁX}$) entre 30-45 min após a ingestão com clearance renal muito rápido e meia-vida plasmática por volta de 3 a 7 horas (Dash e Gummadi 2006). Estudos mostram que menos de 5% de cafeína administrada é recuperada inalterada na urina (forma de excreção) em humanos e murinos. A absorção de cafeína em alimentos e bebidas não parece ser dependente da idade, sexo,

genética e doença ou consumo de drogas, álcool e nicotina (Fredholm et al. 1999; Conway et al. 2003; Magkos e Kavouras 2005; Heckman et al. 2010).

Essas metilxantinas estão distribuídas em todos os tecidos corporais (plasma, fluido cérebro espinhal, saliva, bile, sêmen, leite materno, cordão umbilical e sangue) em volumes similares de 0,4-0,6 L/kg, e não há acúmulo do uso de cafeína por longo período nem os seus metabólitos no corpo (Greer et al. 2000). Estudos mostram que as concentrações de cafeína plasmática diminuem mais rapidamente do que as concentrações dos seus metabólitos como exemplo a paraxantina, e desta forma, as concentrações de cafeína podem ser utilizadas para determinação da sua farmacocinética em humanos e ratos (Scott et al. 1984; Turner et al. 2009).

2.2. FARMACOCINÉTICA DA CAFEÍNA

A cafeína é metabolizada no fígado por desmetilação e oxidação na posição 8, pela remoção dos grupos metila 1 e 7, cuja reação será catalizada pelo citocromo P450, formando três grupamentos metilxantina (Kot e Daniel 2007) (Figura 2). Essa xantina é metabolizada de forma similar em humanos, bem como em cachorros, coelhos e ratos (Arnaud 2011), sendo que, a maior parte dessa metabolização (84%) se processa na forma de paraxantina (1,7-dimetilxantina), seguida de teofilina (1,3-dimetilxantina) e de teobromina (3,7-dimetilxantina), por meio da mudança na posição dos grupos metila 1,3,7 (Sinclair e Geiger 2000; Lozano et al. 2007; Ashihara et al. 2008).

Oportuno destacar que, em humanos e outros mamíferos a biotransformação da cafeína gera coprodutos metabolicamente ativos, os quais são: paraxantina, teobromina e teofilina. A potência farmacológica das metilxantinas cresce na ordem: teofilina > cafeína > teobromina (Graham 2001b; McLean e Graham 2002; Heckman et al. 2010).

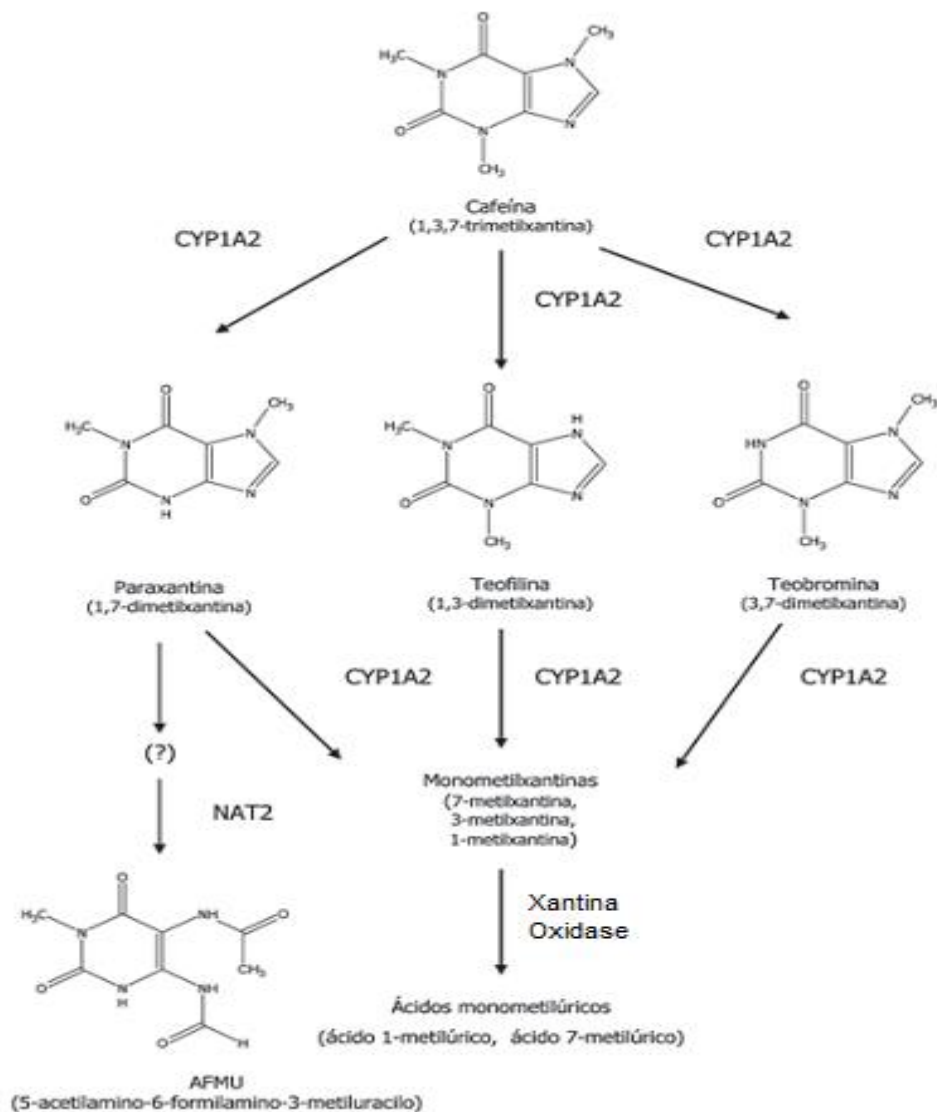


Figura 2. Metabolismo da cafeína em humanos e outros animais. CYP1A2: citocromo P450; NAT2: N-acetiltransferase; XO: xantina oxidase; AFMU: 5-acetilamina-6-formilamina-3-metiluracilo. Adaptado de Lozano et al. (2007).

O estudo de Arnaud (2011) mostrou que uma única dose de cafeína de 4mg/kg, as concentrações plasmáticas máximas foram observadas entre 1 a 2 horas com meia-vida de 2,5 a 5 horas. As variações plasmáticas de cafeína foram relatadas com meia-vida de 2,3 a 10 horas, indicando variabilidade intersubstancial na sua eliminação (Blanchard e Sawers 1983a). A meia-vida da teofilina e teobromina são aproximadamente de 6,2 a 7,2 horas e foram

significativamente maiores que os da cafeína e paraxantina 4,1 a 3,1 horas (Lelo et al. 1986).

A toxicocinética de teobromina, cafeína, teofilina e paraxantina pela sua biodisponibilidade, absorção e sua via de excreção pelas enzimas envolvidas nesse processo são semelhante entre humanos e cães, coelhos, ratos e camundongos (Walton et al. 2001). A enzima CYP1A2 tem sido detectada somente no fígado e representa cerca de 20% do total de citocromos P450 (CYP) no fígado humano, onde seu teor de proteína corresponde a 12,7, sendo 6,2% do total de CYP responsável por mais de 90% da depuração da cafeína (Shimada et al. 1994; van Soeren e Graham 1998; Verbeeck 2008).

Estudos em *in vivo* e em *in vitro* sugerem que as isoenzimas CYPs envolvidas nas vias de desmetilação, ao contrário das isoenzimas responsáveis pela hidroxilação, são reguladas por um mesmo fator comum (Dash e Gummadi 2006; Daly 2007).

A cafeína antagoniza os ARs provocando aumento da síntese de neurotransmissores e a neurotransmissão dopaminérgica no SNC (Nehlig et al. 1992). Tais modificações nesses neurotransmissores poderiam em parte, explicar o uso abusivo da cafeína (Nehlig 1999). A intoxicação aguda nas pessoas não habituadas ao consumo da cafeína provoca inquietação, nervosismo, excitação, insônia, rubor facial, diurese, alterações digestivas, contrações musculares, tremor, rapidez no pensamento, taquicardia ou arritmia cardíaca e sensação de infatigabilidade (Fredholm et al. 1999; Fredholm 2011).

Por outro lado, o uso crônico da CAF induz adaptações celulares que provocam tolerância e dependência física. Sintomas como cefaléia, irritabilidade e sonolência são descritos na literatura (Shapiro 2007; Shapiro 2008). É postulado que o efeito dose-dependente seja causado pelo aumento da sensibilidade dos ARs (Antonίου et al. 2005; Solinas et al. 2005). A “up regulation” dos ARs é considerada um dos possíveis mecanismos responsáveis por esta tolerância (Sahin et al. 2007; Jacobson 2009). A variação genética influencia na tolerância e dependência individual pela exposição à CAF (Sawynok e Liu 2003; Fisone et al. 2004; Li et al. 2008; Egawa et al. 2009; Jacobson 2009). Desta forma, o consumo continuado de cafeína gera acentuado hábito necessitando que o indivíduo

aumente as doses para obter o mesmo efeito do uso agudo da substância (Nehlig e Boyet 2000; Sawynok e Liu 2003; Tunncliffe e Shearer 2008).

3. VARIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DO METABOLISMO DA CAFEÍNA

Pode-se dizer que existem alguns determinantes que afetam o metabolismo da cafeína nos organismos vivos, destacaremos neste trabalho apenas três destes determinantes, os quais são: idade, ação analgésica e antiinflamatória e exercício físico.

3.1. IDADE

Foram estudados parâmetros farmacocinéticos da cafeína em homens jovens e idosos, nos quais, a administração de doses similares por via oral ou intravenosa foi calculada pela taxa de excreção da cafeína na urina. Não houve diferenças significativas na meia-vida do metabolismo da cafeína, e dessa forma, de acordo com nossa investigação podemos afirmar que o envelhecimento não altera sua eliminação. Em contraste com seres humanos, o mesmo fato não ocorre com o modelo animal (rato) uma vez que têm observado um aumento da idade-dependente de meia-vida da cafeína em seus organismos (Blanchard e Sawers 1983b).

3.2. AÇÃO ANALGÉSICA E ANTIINFLAMATÓRIA

A cafeína é um antagonista dos receptores de adenosina A1, A2A e A2B, e é conhecida como um analgésico que em combinação com drogas não esteróides antiinflamatórias que produzem efeitos intrínsecos antinociceptivo em humanos. Através de estudos em modelos animais, essa ação conjunta é capaz de inibir a atividade da prostaglandina H2 sintase também conhecida com cicloxigenase (COX), podendo explicar o alívio aos sintomas da inflamação e dor (Sawynok 2011).

A cafeína tem sido um componente importante nas formulações de analgésicos contendo ácido acetilsalicílico. Os estudos clínicos publicados nas

décadas de 1960 e 1970 indicavam que os analgésicos que possuíam cafeína em sua fórmula eram capazes de produzir os mesmos efeitos dos analgésicos, porém, de forma individualizada. No entanto, na metade dos anos 80, uma análise de 30 estudos clínicos comprovou a potente ação da cafeína em conjunto ao paracetamol e aspirina como analgésicos (Zhang 2001).

Os principais objetivos estabelecidos para a ação da cafeína e suas respectivas concentrações se dão pelo antagonismo exercido nos ARs A1, A2A e A2B (Fredholm et al. 1999; Antoniou et al. 2005). Já os ARs A2AAR e A3AR têm baixa afinidade que necessitam tipicamente de concentrações μM para serem ativados, geralmente funcionando em condições de estresse celular. Os ARs podem estar acoplados principalmente a proteína G inibitória, por exemplo, os A1 e A3, ou estimulatória, como os A2A e A2B (Antoniou et al. 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos receptores de adenosina. Distribuição e afinidade dos ARs por ação agonista em ratos. Os A1 e A2A tem maior localização cerebral enquanto os A2B e A3 estão distribuídos em tecidos periféricos fora do cérebro. Adaptado de Bassini (2005).

Tipo	Afinidade	Localização	
		Distribuição no CNS	Tecidos e órgãos
A ₁	Alta	Córtex cerebral, hipocampo, corpo estriado, tálamo e cerebelo	Coração, fígado, adipócitos
A _{2A}	Alta	Corpo estriado, n. Acumben, tubérculo olfatório, globo pálido, córtex cerebral e hipocampo	Coração, pulmão, adipócitos
A _{2B}	Baixa	Hipocampo inferior, tálamo, hipotálamo, corpo estriado	Intestino delgado, bexiga, pulmão
A ₃	Baixa	Hipocampo inferior, tálamo, córtex cerebral e cerebelo	Pulmão, fígado

A adenosina (ADO) está envolvida em vários aspectos da regulação da dor, e sua atuação em receptores específicos promovem ações periféricas ou centrais em diversos tecidos (Tabela 2) (Sawynok e Liu 2003; Shapiro 2007; Sawynok 2011). O interesse em explorar o sistema de adenosina foi refletido no desenvolvimento do potencial de novos agentes analgésicos (receptores agonistas, antagonistas ou reguladores, como os inibidores da adenosina

quinase). Além disso, é importante conhecer o impacto que a cafeína pode ter sobre uma gama de agentes terapêuticos, nessa ótica, manteremos nossa atenção para o antagonismo competitivo da cafeína.

Tabela 2. Identificação dos ARs A1, A2A e A2B em estruturas celulares imunoreativas no músculo estriado de humanos por imunohistoquímica. A intensidade da coloração foi marcada como: – não coloração; + baixa intensidade de coloração; ++ moderada intensidade de coloração; +++ alta intensidade de coloração. Adaptado de Lynge e Hellsten (2000).

Estruturas imunoreativas	A ₁	A _{2A}	A _{2B}
Capilares			
Células endoteliais	+++	+++	+++
Vasos Sanguíneos Maiores que Capilares			
Células endoteliais	+	+	+
Células do músculo liso	+	+	++
Fibras do Tipo I			
Membrana plasmática	-	++	+++
Citosol	-	++	-
Fibra do Tipo II			
Membrana plasmática	-	++	+++
Citosol	-	+(+)	++

Nesse contexto, os efeitos antagônicos da cafeína na ADO podem ser descrito pela estimulação cardíaca e aumento da pressão arterial regulado pela estimulação simpática. A ADO age como neurotransmissor promovendo a inibição da liberação de noradrenalina no SNC (Daly 2007; Ribeiro e Sebastiao 2010). E desta forma, a cafeína estimula o sistema simpático aumentando a liberação de noradrenalina e a taxa de ativação espontânea dos neurônios noradrenérgicos. A ADO inibe a liberação pré-sináptica de dopamina no SNC (Tarnopolsky e Cupido 2000; Shapiro 2008). Os mecanismos de ação central e periférica por competir diretamente com os ARs (Figura 3) faz a CAF desencadear importantes alterações metabólicas e fisiológicas, culminando na melhora do desempenho atlético (Graham e Spriet 1995; Graham 2001a; Graham 2001b).

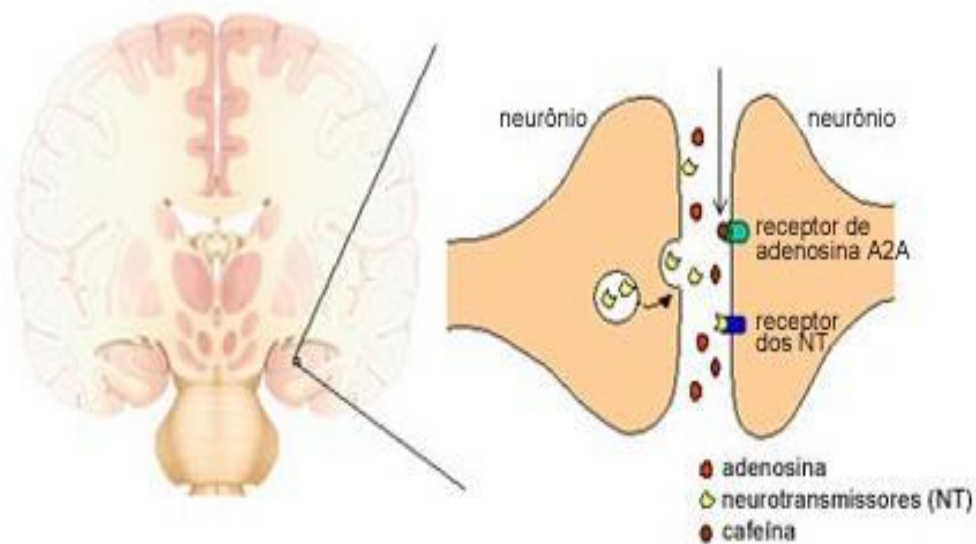


Figura 3. Atividade modulatória da adenosina e a cafeína no na atividade neuronal. A cafeína compete com a adenosina pelos seus receptores. Adaptado de Bassini (2005).

3.3. EXERCÍCIO FÍSICO

Todas as formas de exercício físico (agudo ou crônico) produzem modificações no organismo. Essas mudanças podem resultar em respostas agudas e crônicas, independentemente, do tipo de exercício. O sistema metabólico sempre responde ao estímulo induzido pela intensidade do exercício. O estudo dos efeitos da cafeína no exercício requer um conhecimento dos seus mecanismos de ação a nível celular e sistêmico (Cox et al. 2002; Burke 2008; Astorino et al. 2008).

Assim, existem pelo menos três teorias que tentam explicar o efeito ergogênico da cafeína durante o exercício físico postulado por Graham e Spriet (1995).

A primeira envolve o efeito direto da cafeína no SNC, afetando a percepção subjetiva de esforço e/ou a propagação dos sinais neurais entre o cérebro e a junção neuromuscular (Walton et al. 2001). A estimulação do ciclo das purinas nucleotídeos (PNC) pela cafeína aumentando a liberação de catecolaminas, em particular a epinefrina (Graham 2001b; Battram et al. 2005). Essa xantina inibe as

fosfodiesterases aumentando a concentração de AMPc, liberando os estoques de Ca^{2+} intracelular. Esse efeito provoca o aumento na exocitose de neurotransmissores e secreções endócrinas, resultando em estimulação psíquica e motora, além de atuar sobre a contração muscular.

A segunda teoria a ser discutida é a ação direta da CAF no músculo esquelético. As alterações nos íons, particularmente Na^+ e K^+ ; inibição da PDE, levam a um aumento na concentração de AMPc; efeito direto sobre a regulação metabólica de enzimas semelhantes às fosforilases; e o aumento na mobilização de Ca^{2+} através do retículo sarcoplasmático. Além disso, a cafeína aumenta a concentração sérica de Na^+ após 30 min de exercício e atenua a saída de K^+ do meio intra para o extracelular durante a contração intensa (Hawke et al. 1999; Jin et al. 2009). A membrana é mantida por mais tempo excitada pela redução do potencial de membrana do sarcolema retardando o aparecimento da fadiga. A cafeína por sua vez estimula a entrada de cátions mono e divalentes modulando canais não-seletivos de cátions (Posterino e Dunn 2008; Jin et al. 2009) e aumentando o Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático e inibindo sua recaptação (Hawke et al. 2000; Sigalas et al. 2009). Assim, é provável que a cafeína possa influenciar na sensibilidade das miofibrilas ao Ca^{2+} (Roy et al. 2001; Rush e Spriet 2001; Tarnopolsky 2008). Esse pode ser outro mecanismo de ação celular, capaz de explicar os efeitos ergogênicos da cafeína nos exercícios de endurance (Tarnopolsky e Cupido 2000; Sahin et al. 2007).

E por último compreende-se que a cafeína aumenta a oxidação das gorduras e redução na oxidação de carboidratos (CHO), causando aumento na mobilização dos ácidos graxos livres (AGL) e glicerol dos tecidos e/ou nos estoques intramusculares (Hawley et al. 1998; Graham 2001b). Esse efeito supostamente ocorreria de maneira indireta por meio do aumento na produção de catecolaminas na circulação (Graham 2001b), particularmente a epinefrina no repouso e exercício ou, diretamente, por antagonismo aos receptores de adenosina, aumentando o consumo de glicose plasmática e diminuindo o consumo de glicogênio muscular (Chesley et al. 1998). A inibição da ação da enzima fosfodiesterase é responsável pelo aumento do tempo de meia-vida do AMPc, e dessa forma, a cafeína incrementa a taxa de lipólise (McLean e Graham 2002; Battram et al. 2005).

A diminuição do estímulo da insulina provocada pela cafeína inibe a atividade da glicogênio sintetase, assim, causando menor consumo de glicose pelo músculo esquelético ativo (Jackman et al. 1996; Hawley et al. 1998; Greer et al. 2000; Laurent et al. 2000; Magkos e Kavouras 2005). A soma dessas ações pode levar a uma maior economia do glicogênio, aumento na oxidação das gorduras e diminuição da oxidação de CHO (Hadjicharalambous et al. 2006; Green et al. 2007; Tunnicliffe e Shearer 2008). Essas modificações no metabolismo de CHO e AGL são capazes de ativar o funcionamento cerebral, o que de certa forma, retarda o aparecimento da fadiga central e periférica.

Nota-se que, a fadiga durante o exercício físico é um fenômeno complexo cujas causas parecem depender do tipo de esforço. Existe algum consenso atualmente na distinção entre esforços curtos e intensos, e esforços prolongados e moderados (Ataka et al. 2008; Glaister et al. 2008). A fadiga tem sido caracterizada como a incapacidade de manter uma atividade física, o que causa redução do desempenho ou paralisação da atividade. Devido à complexidade do tema, houve uma divisão didática e metodológica, a fim de tornar mais fácil a sua utilização. Assim, aparecem os termos fadiga crônica e aguda, sendo a primeira um somatório de processos de recuperação incompleto durante um período de treinamento, e a segunda está relacionada com a incapacidade de realizar uma determinada atividade em uma única sessão de treinamento. Assim, essa última pode ser subdividida em central e periférica (Hespel et al. 2002; Kalmar e Cafarelli 2004; Rosenthal et al. 2008).

Dessa forma, os efeitos da cafeína sobre a fadiga são discutidos com especial atenção nas interações entre ADO e dopamina. Há indicações de que a cafeína afeta o sistema de atenção e os receptores D2 de dopamina também tem demonstrado modular as redes neurais envolvidos na atenção seletiva e involuntária (Tabela 3) (Davis et al. 2003; Daly 2007).

Tabela 3. Receptores centrais de adenosina que são afetados pela exposição à cafeína em humanos. Adaptado de Bassini (2005).

Receptor	Tipos de neurônios	Efeito da ADO	Ação
A ₁	Todos os tipos de neurônios (inespecíficos), especialmente ligados aos receptores D ₁ de dopamina	Antagonista	Desinibição da liberação do transmissor
A _{2a}	Co-localizados com os receptores D ₂ de dopamina	Antagonista	Incremento da transmissão via receptores de dopamina D ₂ .

Essas modificações causadas pela cafeína nesses receptores (gráfico acima) podem contribuir positivamente no desempenho esportivo em atletas de diversas modalidades.

A utilização da cafeína como recurso ergogênico durante os exercícios físicos é capaz de induzir as seguintes modificações: diminuir o tempo de reação e prolongar a fadiga pela ação hipoanalgésica discutida anteriormente; tanto no SNC como no músculo. A percepção subjetiva de esforço é afetada reduzindo a dor muscular, pelo bloqueio dos ARs; o estado de agitação e alerta é aumentado melhorando o desempenho em atletas que fazem o uso dessa substância. Portanto, a ação ergogênica dessa xantina vem sendo utilizada em competições há quase três décadas (Davis et al. 2003; Motl et al. 2003; Gliottoni e Motl 2008; Gliottoni et al. 2009).

Em 2004, após a exclusão da cafeína pela Agência Mundial de Anti-Doping da lista de substâncias restritas, ela e os suplementos os quais contêm esse composto na sua formulação vêm sendo largamente utilizados no meio esportivo (Figura 4) (Deldicque e Francaux 2008; Dascombe et al. 2010; Goldstein et al. 2010). Nesse contexto, fatores como condição física do usuário, o modo (intervalado ou contínuo) e a intensidade (baixa, média e alta) na qual o exercício se realiza, vem ganhando destaque na literatura científica e não científica.

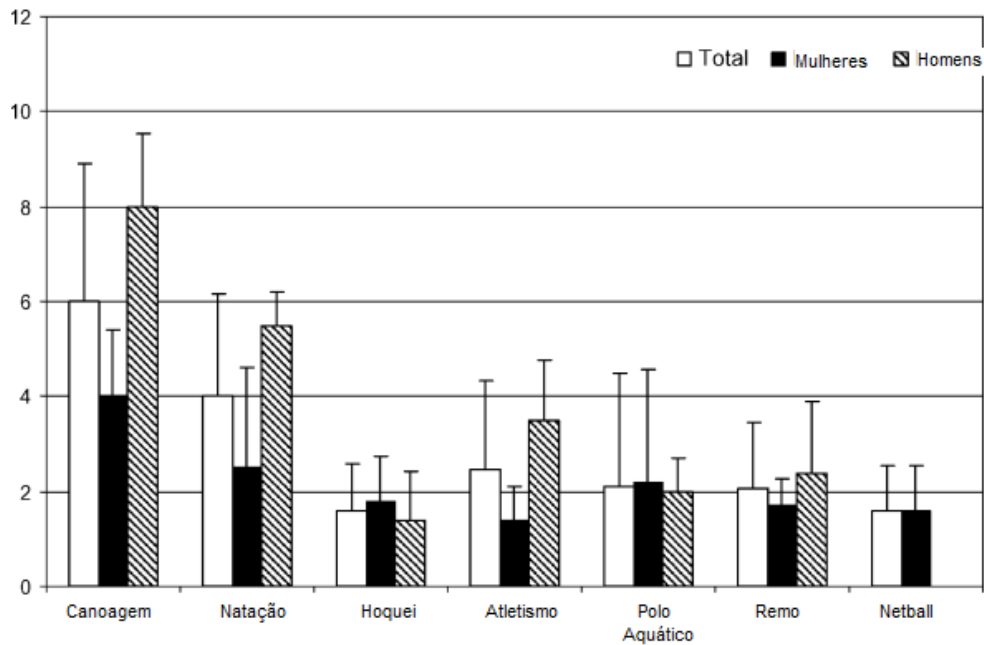


Figura 4. Média \pm erro padrão de suplementos nutricionais (eixo Y) utilizados por atletas de diferentes modalidades (eixo X). Adaptado por Dascombe et al. (2010).

Vários estudos já analisaram o efeito ergogênico da cafeína sobre a performance, pelas atividades de força e endurance em diversos protocolos e desenhos experimentais empregados a atletas (Kalmar e Cafarelli 2004). A capacidade de realizar qualquer exercício físico é dependente da ativação do músculo esquelético, e assim, com a progressão do exercício, seja pela intensidade ou duração, a capacidade de gerar força máxima voluntária vai diminuindo, dessa forma, manter-se na mesma intensidade com o passar do tempo faz com que fibras nervosas do SNC sejam acionadas (Ataka et al. 2008). Com isso, poderá haver falhas na excitação do músculo esquelético para sustentar ativação muscular durante o esforço (Figura 5).

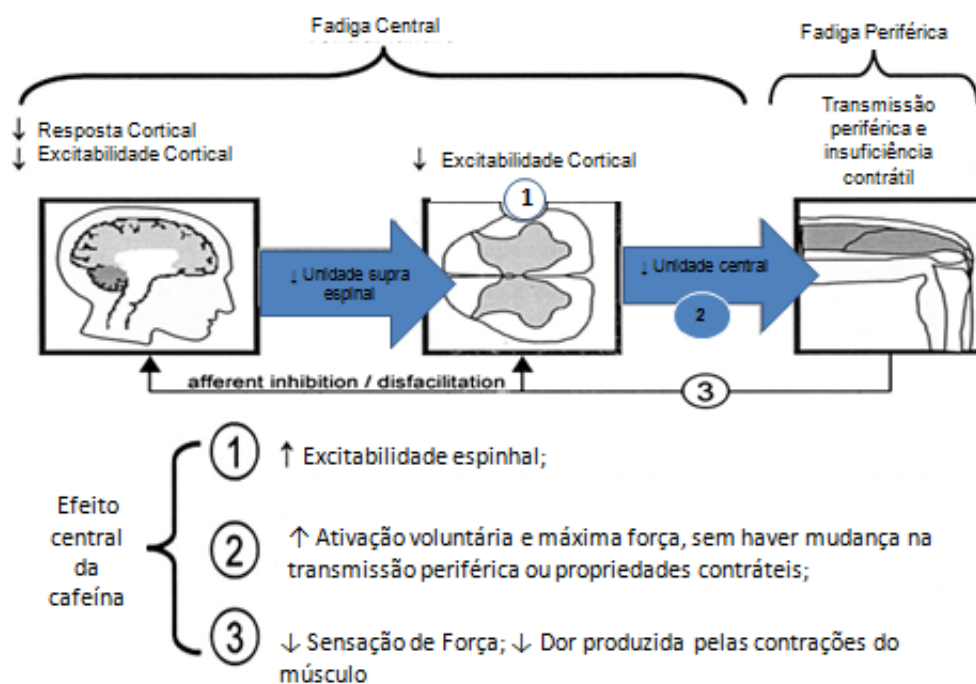


Figura 5. Os efeitos da cafeína na fadiga central em humanos. A fadiga pode ocorrer em vários pontos ao longo da via motora (córtex até o músculo). Adaptado por Kalmar e Cafarelli (2004).

Nota-se que em seres humanos não é possível medir as mudanças ocorridas diretamente no córtex até o músculo. Portanto, estudos *in vitro* tentam elucidar essa lacuna na literatura através de algumas respostas, por meio de pesquisas, sobre ação da cafeína em neurotransmissores (Figura 6). A literatura indica claramente que as ações da adenosina e da cafeína variam de acordo com receptor-alvo e sua respectiva localização no SNC. A relação entre a cafeína, serotonina e fadiga é um bom exemplo dessa complexidade.

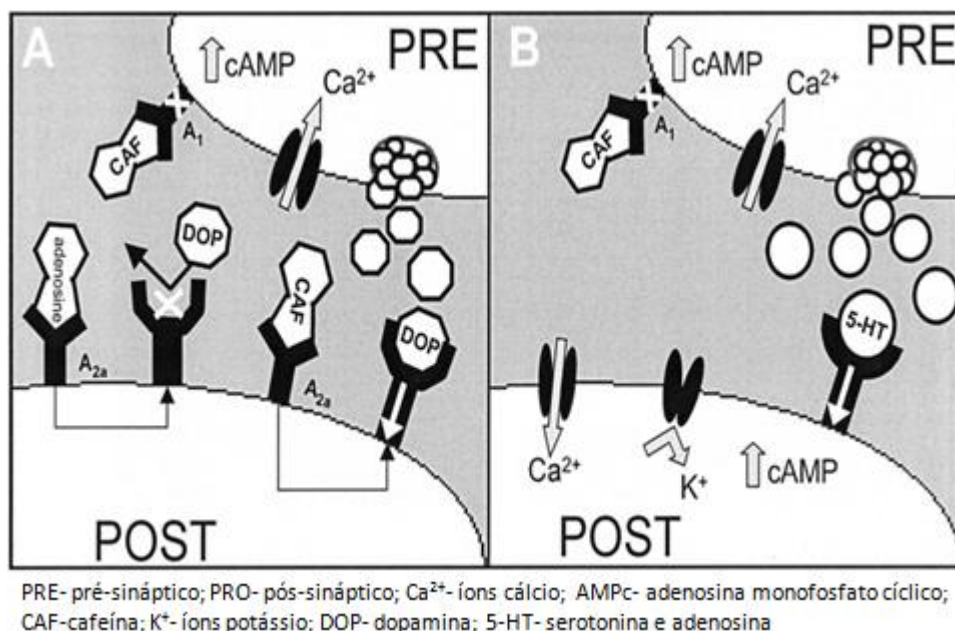


Figura 6. Efeitos da cafeína sobre dois neurotransmissores. Os pré-sinápticos e pós-sinápticos tem sido aplicados para compreender a fadiga central. Adaptado por Kalmar e Cafarelli (2004).

Nas membranas pré-sinápticas (PRE), a adenosina impede a liberação de neurotransmissores como dopamina no esquema A e serotonina no esquema B pela ligação dos receptores A1 na figura acima. Este pode ser o resultado de uma diminuição no influxo de íons Ca²⁺ gerando uns efeitos diretos na maquinaria do neurotransmissor, ou pode ser uma via secundária pela diminuição da AMPc. A cafeína bloqueia a inibição da adenosina e aumenta a liberação desses neurotransmissores pós-sinápticos (POST), a adenosina também se liga aos receptores na membrana POS A2A e impede que a dopamina se ligue ao seu receptor (Ferré 2008). A cafeína bloqueia o receptor A2A e promove a transmissão dopaminérgica. Os efeitos serotoninérgicos nos POST podem aumentar a excitabilidade espinal através de uma diminuição no influxo de íons K⁺ e a geração de uma corrente de íons Ca²⁺ para dentro do neurotransmissor mantendo hiperpolarizada à membrana do neurônio motor (Fredholm et al. 1999; Hawke e Willmets 1999; Fredholm 2011). Embora os efeitos da cafeína sobre os ARs terem sido simplificados a complexidade desses mecanismos nos dão uma

maior clareza de como pode funcionar o efeito ergogênico dessa substância na performance humana.

Os efeitos da cafeína sobre a contratilidade muscular, usando o exercício físico prolongado com intensidade de moderada a alta como modelo de entender o aparecimento da exaustão e a performance são bem descritos na literatura (Hawley et al. 1998; van Soeren e Graham 1998; Roy et al. 2001; Bishop et al. 2005; Goldstein et al. 2010). Por outro lado, percebe-se que, os exercícios de alta intensidade e curta duração começam agora a ganhar destaque nessa literatura.

Os efeitos ergogênico da cafeína sobre o desempenho físico em exercícios de alta intensidade e curta duração (força, velocidade e potência) nos primeiros 10 minutos têm sido poucos estudados (Astorino et al. 2010). Além disso, os resultados encontrados até o momento são bastante controversos, o que impossibilita conclusões definitivas. As maiores dificuldades para interpretação dos resultados produzidos por esses estudos concentram-se nos diferentes delineamentos utilizados, nas diferentes doses de CAF administradas, nas diferenças entre os protocolos e também na falta de maior rigidez metodológica no trabalho com seres humanos, pois alguns trabalhos destacam o efeito placebo da cafeína (Cox et al. 2002; Bell e McLellan 2003; Astorino et al. 2008; Beedie e Foad 2009; Duncan et al. 2009; Woolf et al. 2009; Simmonds et al. 2010).

No entanto, novas pesquisas nos mostram os efeitos contrários sobre a suplementação da cafeína nos exercícios de curta duração e alta intensidade. Na crescente busca, verifica-se que, Simmonds et al. (2010) avaliaram oito ciclistas profissionais, nos parâmetros de troca gasosa (cinética VO_2) como tempo de exaustão (TE) após realizarem exercício com 120% de volume de oxigênio máximo ($VO_{2MÁX}$). Os resultados mostraram que a cafeína tem aumentado o volume total de treinamento durante uma sessão de exercício. A média de TE foi de aproximadamente 15% maior durante no grupo CAF comparado com o grupo placebo (PLA).

Por meio do teste de percepção de dor em exercício de alta intensidade no músculo do quadríceps realizado no experimento com homens saudáveis universitários avaliou-se o volume de treinamento de curta duração e alta intensidade com a suplementação de CAF antes do experimento. Assim, os voluntários da pesquisa realizaram 1 hora de sessão de exercício entre 75-80%

VO_{2MÁX} e os resultados demonstram que o efeito da suplementação no grupo CAF foi capaz de promover um efeito de hipoanalgesia comparado com o PLA. Desta forma, nos testes de percepção de dor, o grupo CAF apresentou maior tolerância ao volume de treinamento em relação ao grupo placebo (Gliottoni e Motl 2008; Gliottoni et al. 2009).

Observa-se que, protocolos com animais experimentais tem se tornado uma alternativa para tentar entender os efeitos da cafeína sobre as fadigas central e periférica. Apesar de que a dependência pelo consumo da cafeína esteja bem estabelecida em seres humanos, alguns resultados são questionáveis pelo seu efeito placebo (Nehlig et al. 1992; Nehlig 1999; Nehlig e Boyet 2000; Pollo et al. 2008). No entanto, ao contrário dos humanos, os modelos experimentais animais, em especial os ratos, vêm ganhando certo destaque nas pesquisas com suplementação de CAF (Jordá et al. 1988; Hongu e Sachan 2000; James et al. 2005). Vale dizer que a utilização de animais experimentais, em especial *Rattus Novergicus*, é capaz de permitir uma investigação mais direta para diversos sistemas envolvidos na auto-administração da CAF, e dessa forma, está se tornando mais comum na literatura quando comparada ao consumo de cafeína nos seres humanos (Dingle et al. 2008; Egawa et al. 2009).

Como foi evidenciado, a fadiga é a incapacidade de continuar uma ação motora que ocorre em interferência direta no exercício físico. As utilizações de exercícios físicos de alta intensidade em modelos animais para quantificar a fadiga através da mensuração de alguns padrões bioquímicos e fisiológicos são bem descritos na literatura científica (Totsuka et al. 2003; Davidson et al. 2006; Booth et al. 2010).

No entanto, um protocolo de exercício tão eficiente, para induzir fadiga em roedores vem ganhando um enfoque em investigações mais recentes, como o levantamento de peso com saltos verticais com estimulação elétrica ou não (Tamaki et al. 1992; Roy et al. 1997; Wirth et al. 2003; Barauna et al. 2005; Haraguchi et al. 2010; Franco et al. 2011).

Cabe anotar que, estudos com músculos isolados de ratos submetidos a diferentes concentrações de cafeína mostraram aumento tanto na força quanto na potência muscular (Rossi et al. 2001; Totsuka et al. 2003; James et al. 2005; Wondmikun et al. 2006). Esses resultados mostram alterações nos componentes

contráteis do músculo e assim, confirmam os estudos *in vivo*. Por sua vez podemos propor em nosso estudo a utilização dos modelos humanos e animais (ratos) submetidos ao protocolo de exercício com alta intensidade e curta duração. Este modelo de exercício faz parte da rotina de nosso trabalho em laboratório o que nos serviu de base para estudarmos o metabolismo da amônia (Bassini 2008). Dessa forma, nossa ênfase se concentra na suplementação de cafeína em ambos modelos experimentais (humanos e ratos) e sua relação com metabolismo de amônia que será nossa fundamentação evidenciada no seguinte tópico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonioni K, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Papathanasiou G, Bekris E, Marselos M, Panlilio L, Müller CE, Goldberg SR, Ferré S. A detailed behavioral analysis of the acute motor effects of caffeine in the rat: involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Dec;183(2):154-62.

Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(200):33-91.

Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 2008 Feb;69(4):841-56.

Astorino TA, Rohmann RL, Firth K. Effect of caffeine ingestion on one-repetition maximum muscular strength. *Eur J Appl Physiol*. 2008 Jan;102(2):127-32.

Ataka S, Tanaka M, Nozaki S, Mizuma H, Mizuno K, Tahara T, Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, Kuratsune H, Kajimoto O, Watanabe Y. Effects of oral administration of caffeine and D-ribose on mental fatigue. *Nutrition*. 2008 Mar;24(3):233-8.

Barauna VG, Batista ML Jr, Costa Rosa LF, Casarini DE, Krieger JE, Oliveira EM. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 Apr;32(4):249-54.

Bassini A. O exercício como modelo para estudo do metabolismo de aminoácidos e amônia - Tese de Doutorado. Apresentado ao Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. 2008.

Bassini A. Sinergia da cafeína e exercícios nas alterações metabólicas e hematológicas em jogadores de futebol - Dissertação de Mestrado. Apresentado ao programa de Pós Graduação da Universidade Castelo Branco. Mestrado em ciência da motricidade humana. 2005.

Battram DS, Graham TE, Richter EA, Dela F. The effect of caffeine on glucose kinetics in humans--influence of adrenaline. *J Physiol*. 2005 Nov 15;569(Pt1):347-55.

Beedie CJ, Foad AJ. The placebo effect in sports performance: a brief review. *Sports Med*. 2009;39(4):313-29.

Bell DG, McLellan TM. Effect of repeated caffeine ingestion on repeated exhaustive exercise endurance. *Med Sci Sports Exerc*. 2003 Aug;35(8):1348-54.

Bishop NC, Fitzgerald C, Porter PJ, Scanlon GA, Smith AC. Effect of caffeine ingestion on lymphocyte counts and subset activation in vivo following strenuous cycling. *Eur J Appl Physiol*. 2005 Mar;93(5-6):606-13.

Blanchard J, Sawers SJ. Relationship between urine flow rate and renal clearance of caffeine in man. *J Clin Pharmacol*. 1983b Apr;23(4):134-8.

Blanchard J, Sawers SJ. The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983a ;24(1):93-8.

Booth FW, Laye MJ, Spangenburg EE. Gold standards for scientists who are conducting animal-based exercise studies. *J Appl Physiol*. 2010 Jan;108(1):219-21.

Burke LM. Caffeine and sports performance. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008 Dec;33(6):1319-34.

Chesley A, Howlett RA, Heigenhauser GJ, Hultman E, Spriet LL. Regulation of muscle glycogenolytic flux during intense aerobic exercise after caffeine ingestion. *Am J Physiol*. 1998 Aug;275(2 Pt 2):R596-603.

Choi HK, Curhan G. Coffee, tea, and caffeine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Rheum.* 2007 Jun 15;57(5):816-21.

Conway KJ, Orr R, Stannard SR. Effect of a divided caffeine dose on endurance cycling performance, postexercise urinary caffeine concentration, and plasma paraxanthine. *J Appl Physiol.* 2003 Apr;94(4):1557-62.

Cornelis MC, Monda KL, Yu K, Paynter N, Azzato EM, Bennett SN, Berndt SI, Boerwinkle E, Chanock S, Chatterjee N, Couper D, Curhan G, Heiss G, Hu FB, Hunter DJ, Jacobs K, Jensen MK, Kraft P, Landi MT, Nettleton JA, Purdue MP, Rajaraman P, Rimm EB, Rose LM, Rothman N, Silverman D, Stolzenberg-Solomon R, Subar A, Yeager M, Chasman DI, van Dam RM, Caporaso NE. Genome-Wide Meta-Analysis Identifies Regions on 7p21(AHR) and 15q24 (CYP1A2) As Determinants of Habitual Caffeine Consumption. *PLoS Genet.* 2011 Apr;7(4): e1002033.

Cox GR, Desbrow B, Montgomery PG, Anderson ME, Bruce CR, Macrides TA, Martin DT, Moquin A, Roberts A, Hawley JA, Burke LM. Effect of different protocols of caffeine intake on metabolism and endurance performance. *J Appl Physiol.* 2002 Sep;93(3):990-9.

Daly JW. Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Aug;64(16):2153-69.

Dascombe BJ, Karunaratna M, Cartoon J, Fergie B, Goodman C. Nutritional supplementation habits and perceptions of elite athletes within a state-based sporting institute. *J Sci Med Sport.* 2010 Mar;13(2):274-80.

Dash SS, Gummadi SN. Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnol Lett.* 2006 Dec;28(24):1993-2002.

Davidson SR, Burnett M, Hoffman-Goetz L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Feb;38(2):250-5.

Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Feb;284(2):R399-404.

Debler EA, Wajda I, Manigault I, Burlina AP, Lajtha A. Effects of caffeine on amino acid transport in the brain. *Neurochem Int.* 1989;14(1):55-60.

Deldicque L, Francaux M. Functional food for exercise performance: fact or foe? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008 Nov;11(6):774-81.

Deslandes AC, Veiga H, Cagy M, Piedade R, Pompeu F, Ribeiro P. Effects of caffeine on the electrophysiological, cognitive and motor responses of the central nervous system. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jul;38(7):1077-86.

Dingle RN, Dreumont-Boudreau SE, Lolordo VM. Caffeine dependence in rats: effects of exposure duration and concentration. *Physiol Behav.* 2008 Sep;95(1-2):252-7.

Duncan MJ, Lyons M, Hankey J. Placebo effects of caffeine on short term resistance exercise to failure. *Int J Sports Physiol Perform.* 2009 Jun;4(2):244-53.

Egawa T, Hamada T, Kameda N, Karaike K, Ma X, Masuda S, Iwanaka N, Hayashi T. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. *Metabolism.* 2009 Nov;58(11):1609-17.

Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem.* 2008 May;105(4):1067-79.

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Apr;61(7-8):857-72.

Franco FS, Costa NM, Ferreira SA, Carneiro-Junior MA, Natali AJ. The effects of a high dosage of creatine and caffeine supplementation on the lean body mass composition of rats submitted to vertical jumping training. *J Int Soc Sports Nutr.* 2011 Mar 1;8:3.

Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999 Mar;51(1):83-133.

Fredholm BB. Notes on the history of caffeine use. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(200):1-9.

Glaister M, Howatson G, Abraham CS, Lockey RA, Goodwin JE, Foley P, McInnes G. Caffeine supplementation and multiple sprint running performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2008 Oct;40(10):1835-40.

Gliottoni RC, Meyers JR, Arngrimsson SA, Broglio SP, Motl RW. Effect of caffeine on quadriceps muscle pain during acute cycling exercise in low versus high caffeine consumers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2009 Apr;19(2):150-61.

Gliottoni RC, Motl RW. Effect of caffeine on leg-muscle pain during intense cycling exercise: possible role of anxiety sensitivity. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2008 Apr;18(2):103-15.

Goldstein ER, Ziegenfuss T, Kalman D, Kreider R, Campbell B, Wilborn C, Taylor L, Willoughby D, Stout J, Graves BS, Wildman R, Ivy JL, Spano M, Smith AE, Antonio J. International society of sports nutrition position stand: caffeine and performance. *J Int Soc Sports Nutr.* 2010 Jan 27;7(1):5.

Graham TE, Spriet LL. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *J Appl Physiol*. 1995 Mar;78(3):867-74.

Graham TE. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports Med*. 2001a;31(11):785-807.

Graham TE. Caffeine, coffee and ephedrine: impact on exercise performance and metabolism. *Can J Appl Physiol*. 2001b;26 Suppl:S103-19.

Green JM, Wickwire PJ, McLester JR, Gendle S, Hudson G, Pritchett RC, Laurent CM. Effects of caffeine on repetitions to failure and ratings of perceived exertion during resistance training. *Int J Sports Physiol Perform*. 2007 Sep;2(3):250-9.

Greer F, Friars D, Graham TE. Comparison of caffeine and theophylline ingestion: exercise metabolism and endurance. *J Appl Physiol*. 2000 Nov;89(5):1837-44.

Hadjicharalambous M, Georgiades E, Kilduff LP, Turner AP, Tsofliou F, Pitsiladis YP. Influence of caffeine on perception of effort, metabolism and exercise performance following a high-fat meal. *J Sports Sci*. 2006 Aug;24(8):875-87.

Haraguchi FK, Silva ME, Neves LX, Dos Santos RC, Pedrosa ML. Whey protein precludes lipid and protein oxidation and improves body weight gain in resistance-exercised rats. *Eur J Nutr*. 2010 Aug;50(5):331-9.

Hawke TJ, Allen DG, Lindinger MI. Paraxanthine, a caffeine metabolite, dose dependently increases $[Ca^{2+}]_i$ in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2000 Dec;89(6):2312-7.

Hawke TJ, Willmets RG, Lindinger MI. K^+ transport in resting rat hind-limb skeletal muscle in response to paraxanthine, a caffeine metabolite. *Can J Physiol Pharmacol*. 1999 Nov;77(11):835-43.

Hawley JA, Brouns F, Jeukendrup A. Strategies to enhance fat utilization during exercise. *Sports Med.* 1998 Apr;25(4):241-57.

Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7 trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* 2010 Apr;75(3):R77-87.

Hespeel P, Op't Eijnde B, van Leemputte M. Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxation time in humans. *J Appl Physiol.* 2002 Feb;92(2):513-8.

Hongu N, Sachan DS. Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. *J Nutr.* 2000 Feb;130(2):152-7.

Jackman M, Wendling P, Friars D, Graham TE. Metabolic catecholamine, and endurance responses to caffeine during intense exercise. *J Appl Physiol.* 1996 Oct;81(4):1658-63.

Jacobson KA. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):1-24.

James RS, Kohlsdorf T, Cox VM, Navas CA. 70 microM caffeine treatment enhances in vitro force and power output during cyclic activities in mouse extensor digitorum longus muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2005 Sep;95(1):74-82.

Jin NG, Koh SD, Sanders KM. Caffeine inhibits nonselective cationic currents in interstitial cells of Cajal from the murine jejunum. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 Oct;297(4):C971-8.

Jordá A, Saéz GT, Portolés M, Pallardó FV, Jimenez-Nacher I, Gascoó E. In vitro effect of caffeine on some aspects of nitrogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochimie.* 1988 Oct;70(10):1417-21.

Kalmar JM, Cafarelli E. Caffeine: a valuable tool to study central fatigue in humans? *Exerc Sport Sci Rev.* 2004 Oct;32(4):143-7.

Kot M, Daniel WA. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol Rep.* 2007 May-Jun;59(3):296-305.

Laurent D, Schneider KE, Prusaczyk WK, Franklin C, Vogel SM, Krssak M, Petersen KF, Goforth HW, Shulman GI. Effects of caffeine on muscle glycogen utilization and the neuroendocrine axis during exercise. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Jun;85(6):2170-5.

Lelo A, Birkett DJ, Robson RA, Miners JO. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1986 Aug;22(2):177-82.

Li W, Dai S, An J, Li P, Chen X, Xiong R, Liu P, Wang H, Zhao Y, Zhu M, Liu X, Zhu P, Chen JF, Zhou Y. Chronic but not acute treatment with caffeine attenuates traumatic brain injury in the mouse cortical impact model. *Neuroscience.* 2008 Feb 19;151(4):1198-207.

Lozano RP, Tafalla DB, Albaladejo MF. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adiciones.* 2007;19(3):225-238.

Lynge J, Hellsten Y. Distribution of adenosine A1, A2A and A2B receptors in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 2000 Aug;169(4):283-90.

Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(7-8):535-62.

McLean C, Graham TE. Effects of exercise and thermal stress on caffeine pharmacokinetics in men and eumenorrheic women. *J Appl Physiol.* 2002 Oct;93(4):1471-8.

Motl RW, O'Connor PJ, Dishman RK. Effect of caffeine on perceptions of leg muscle pain during moderate intensity cycling exercise. *J Pain*. 2003 Aug;4(6):316-21.

Nehlig A, Boyet S. Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. *Brain Res*. 2000 Mar 6;858(1):71-7.

Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev*. 1992 May-Aug;17(2):139-70.

Nehlig A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999 Mar;23(4):563-76.

Pollo A, Carlino E, Benedetti F. The top-down influence of ergogenic placebos on muscle work and fatigue. *Eur J Neurosci*. 2008 Jul;28(2):379-88.

Posterino GS, Dunn SL. Comparison of the effects of inorganic phosphate on caffeine-induced Ca²⁺ release in fast- and slow-twitch mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Jan;294(1):C97-105.

Ribeiro JA, Sebastião AM. Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 Suppl 1:S3-15.

Rosenthal TC, Majeroni BA, Pretorius R, Malik K. Fatigue: an overview. *Am Fam Physician*. 2008 Nov 15;78(10):1173-9.

Rossi R, Bottinelli R, Sorrentino V, Reggiani C. Response to caffeine and ryanodine receptor isoforms in mouse skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Aug;281(2):C585-94.

Roy BD, Bosman MJ, Tarnopolsky MA. An acute oral dose of caffeine does not alter glucose kinetics during prolonged dynamic exercise in trained endurance athletes. *Eur J Appl Physiol*. 2001 Aug;85(3-4):280-6.

Roy RR, Wilson R, Edgerton VR. Architectural and mechanical properties of the rat adductor longus: response to weight-lifting training. *Anat Rec*. 1997 Feb;247(2):170-8.

Rush JW, Spriet LL. Skeletal muscle glycogen phosphorylase a kinetics: effects of adenine nucleotides and caffeine. *J Appl Physiol*. 2001 Nov;91(5):2071-8.

Sahin B, Galdi S, Hendrick J, Greene RW, Snyder GL, Bibb JA. Evaluation of neuronal phosphoproteins as effectors of caffeine and mediators of striatal adenosine A2A receptor signaling. *Brain Res*. 2007 Jan 19;1129(1):1-14.

Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol*. 2003 Apr;69(5):313-40.

Sawynok J. Methylxanthines and pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(200):311-29.

Scott NR, Chakraborty J, Marks V. Determination of caffeine, theophylline and theobromine in serum and saliva using high-performance liquid chromatography. *Ann Clin Biochem*. 1984 Mar;21 (Pt2):120-4.

Shapiro RE. Caffeine and headaches. *Curr Pain Headache Rep*. 2008 Aug;12(4):311-5.

Shapiro RE. Caffeine and headaches. *Neurol Sci*. 2007 May;28 Suppl 2:S179-83.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jul;270(1):414-23.

Sigalas C, Bent S, Kitmitto A, O'Neill S, Sitsapesan R. Ca(2+)calmodulin can activate and inactivate cardiac ryanodine receptors. *Br J Pharmacol.* 2009 Mar;156(5):794-806.

Simmonds MJ, Minahan CL, Sabapathy S. Caffeine improves supramaximal cycling but not the rate of anaerobic energy release. *Eur J Appl Physiol.* 2010 May;109(2):287-95.

Sinclair CJ, Geiger JD. Caffeine use in sports. A pharmacological review. *J Sports Med Phys Fitness.* 2000 Mar;40(1):71-9.

Solinas M, Ferré S, Antoniou K, Quarta D, Justinova Z, Hockemeyer J, Pappas LA, Segal PN, Wertheim C, Müller CE, Goldberg SR. Involvement of adenosine A1 receptors in the discriminative-stimulus effects of caffeine in rats. *Psychopharmacology.* 2005 May;179(3):576-86.

Tamaki T, Uchiyama S, Nakano S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1992 Aug;24(8):881-6.

Tarnopolsky M, Cupido C. Caffeine potentiates low frequency skeletal muscle force in habitual and nonhabitual caffeine consumers. *J Appl Physiol.* 2000 Nov;89(5):1719-24.

Tarnopolsky MA. Effect of caffeine on the neuromuscular system-potential as an ergogenic aid. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Dec;33(6):1284-9.

Totsuka Y, Nagao Y, Horii T, Yonekawa H, Imai H, Hatta H, Izaike Y, Tokunaga T, Atomi Y. Physical performance and soleus muscle fiber composition in wild-derived and laboratory inbred mouse strains. *J Appl Physiol.* 2003 Aug;95(2):720-7.

Tunncliffe JM, Shearer J. Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Dec;33(6):1290-300.

Turner S, Manuele MG, Davicino R, Ferraro G, Filip R, Anesini C. Effect of caffeine on the secretion of peroxidase in rat submandibular gland: a study of its mechanism of action. *Arch Oral Biol.* 2009 Feb;54(2):179-84.

van Soeren MH, Graham TE. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. *J Appl Physiol.* 1998 Oct;85(4):1493-501.

Verbeeck RK. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Dec;64(12):1147-61.

Walton K, Dorne JL, Renwick AG. Uncertainty factors for chemical risk assessment: interspecies differences in the in vivo pharmacokinetics and metabolism of human CYP1A2 substrates. *Food Chem Toxicol.* 2001 Jul;39(7):667-80.

Wirth O, Gregory EW, Cutlip RG, Miller GR. Control and quantitation of voluntary weight-lifting performance of rats. *J Appl Physiol.* 2003 Jul;95(1):402-12.

Wondmikum Y, Soukup T, Asmussen G. Effects of caffeine at different temperatures on contractile properties of slow-twitch and fast-twitch rat muscles. *Physiol Res.* 2006;55(6):641-52.

Wolf K, Bidwell WK, Carlson AG. Effect of caffeine as an ergogenic aid during anaerobic exercise performance in caffeine naïve collegiate football players. *J Strength Cond Res.* 2009 Aug;23(5):1363-9.

Zhang WY. A benefit-risk assessment of caffeine as an analgesic adjuvant. *Drug Saf.* 2001;24(15):1127-42.

PARTE 2: Metabolismo de Amônia

1. AMÔNIA

O nitrogênio e o hidrogênio constituem os elementos químicos para a síntese da amônia, que se apresenta na natureza, na forma gasosa (NH_3), e em solução, eminentemente, na forma de amônio (NH_4^+). Em água o NH_4^+ é formado a partir da NH_3 na reação de equilíbrio $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ (Bosoi e Rose 2009).

Apesar do nitrogênio ser essencial na produção da amônia, sua fonte mais abundante encontra-se na atmosfera (N_2) e poucos organismos vivos o utilizam diretamente, necessitando para tal, de um evento, composto por várias etapas, denominada de ciclo do nitrogênio. Uma dessas etapas, chamada de fixação, possibilita a transformação do N_2 em amônia, através de organismos autótrofos. Por outro lado, organismos heterótrofos (animais multicelulares), não têm essa habilidade e obtêm o N_2 na forma de aminoácidos ou outros compostos orgânicos produzidos por organismos autótrofos (Bredemeier e Mundstock 2000).

Partindo dessa premissa, a amônia pode ser originada de vários compostos, assim como pode ser encontrada na atmosfera pela decomposição de animais nitrogenados e também de matéria vegetal. No ser humano, em primeiro estágio, ela é absorvida a partir da via entérica originária de produção da microbia e, em segundo, é produzida pelas reações de desaminação dos aminoácidos e da adenosina monofosfato (AMP) (Hellsten et al. 1999; Clay e Hainline 2007; Bosoi e Rose 2009).

No organismo humano, a amônia pode se apresentar como NH_4^+ ou como gás NH_3 dependendo do pH. Como o pK da amônia a 37°C é de 9,15; cerca de 98% da amônia se encontra na forma ionizada nos fluídos fisiológicos (Felipo e Butterworth 2002b; Bosoi e Rose 2009). Por não se difundir facilmente o NH_4^+ necessita de mecanismos de transporte (Cooper 2001).

Diversos sistemas do organismo humano podem produzir amônia, entre eles: o SNC, intestino, fígado, rim e músculo (Olde Damink et al. 2002; Córdoba e Minguez 2008) (Figura 7).

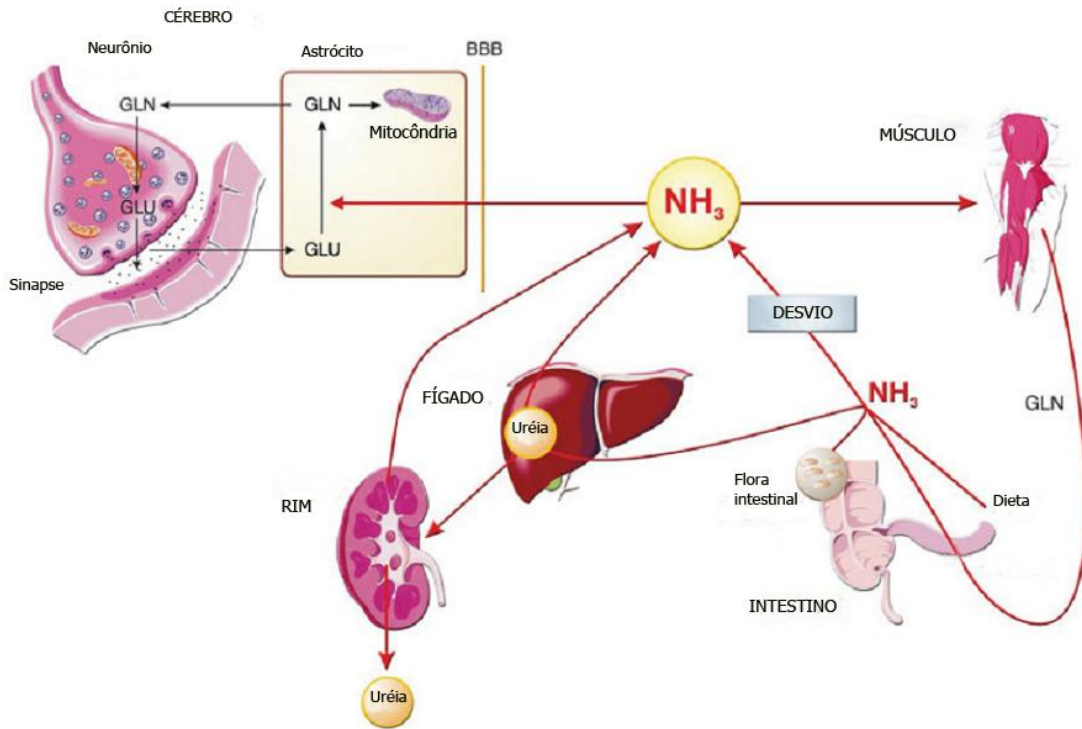


Figura 7. Órgãos responsáveis pela produção de amônia. Adaptado de Córdoba e Minguez (2008).

A amônia por ser extremamente tóxica nos mamíferos, tendo que ser excretá-la de alguma forma, sendo assim as formas de excreção: amoniotélicos (excretam na mesma forma), uricotélicos (excretam na forma de urato), e ureotélicos (excretam na forma de ureia, no caso dos mamíferos) (Nelson e Cox 2010).

Nota-se que, como sua forma de base livre é gasosa e lipofílica, ela pode difundir-se facilmente pelas células através das membranas e assim ser considerada um indicador de diversas funções metabólicas. Nesta tese referenciaremos como amônia a soma total de amônia livre (NH₃) e íon amônio (NH₄⁺).

Em condições fisiológicas normais, a maioria da amônia sistêmica é liberada pelo intestino ou trato gastrointestinal, onde compostos nitrogenados, principalmente glutamina (Gln) e ureia, além de restos bacterianos, são quebrados por uma combinação de atividades enzimáticas, tal como a glutaminase, cuja atividade no trato gastrointestinal é muito alta, proporcionando a

formação de grandes quantidades de amônia, que é posteriormente, transportada para a circulação portal hepática. Essa por sua vez, fornece amônia para o fígado, onde podem sofrer ações do ciclo da ureia para formar ureia ou, da glutamina sintetase (GS) para formar Gln. Uma vez formados, ureia e Gln reentram na circulação e através de um sistema de intercâmbio entre órgãos, ou são eliminados do organismo pela urina, ou utilizados para manter o equilíbrio ácido-básico e nitrogenado (Olde Damink et al. 2002; van de Poll et al. 2004; Córdoba e Minguez 2008).

Percebe-se que, esse eficiente sistema de desintoxicação garante que concentrações plasmáticas de amônia sejam mantidas dentro de um baixo intervalo de não mais do que 50-100 $\mu\text{mol/L}$ (Felipo e Butterworth 2002b). O intercâmbio entre o trato gastrointestinal, fígado e rins, proporciona significativamente a homeostase de amônia, no entanto, outros tecidos e órgãos, tais como o cérebro e o músculo esquelético também contribuem para o metabolismo e regulação da amônia (Olde Damink et al, 2002).

Deve-se ressaltar que, as principais fontes geradoras de amônia, são provenientes da ação putrefativa das bactérias sobre compostos nitrogenados do conteúdo intestinal, processos de desaminação oxidativa e transaminação dos aminoácidos da dieta e dos tecidos; e pelo ciclo das purinas nucleotídeos, via desaminação da AMP (Mutch e Banister 1983; Huizenga et al. 1994).

1.1. METABOLISMO E TRANSPORTE DE AMÔNIA

Dentre as principais presunções, a grande quantidade de amônia produzida e liberada pela atividade bacteriana é transportada através da mucosa epitelial para a circulação portal hepática, por uma combinação de difusão passiva e mecanismos de transporte ativo, sendo posteriormente metabolizada no fígado onde poderá sofrer ações do ciclo da ureia, formado ureia ou da glutamina sintetase para formar glutamina, esses metabólitos reentram na circulação e através de um sistema de intercâmbio entre órgãos, ou são eliminados do organismo pela urina, ou utilizados para manter o equilíbrio ácido-básico e nitrogenado (van de Poll et al. 2004; Córdoba e Minguez 2008) (Figura 8). Em

torno de 1% da amônia permanece no trato gastrointestinal para ser excretada na matéria fecal (Wilkinson et al. 2010).

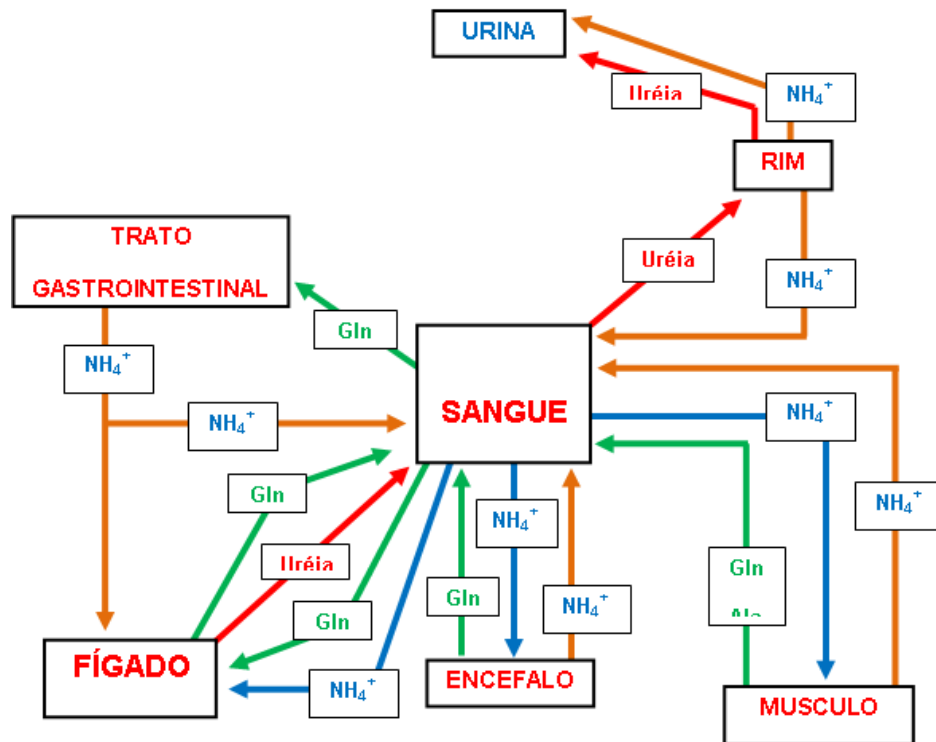


Figura 8. Transporte e metabolismo de amônia interórgãos. Setas em laranja: exportação de NH_3 pelos órgãos; setas em azul: transporte de NH_3 da corrente sanguínea para órgãos; setas em verde: transporte de NH_3 de forma não tóxica; setas em vermelho: detoxificação de NH_3 via produção de ureia. Adaptado de Banister e Cameron (1990).

Nota-se que, o principal sistema de detoxificação de amônia em mamíferos é o ciclo da ureia (Wu 2009), conforme demonstrado na figura 9. Um bloqueio, uma insuficiência, deficiência ou alterações genéticas de enzimas desse complexo pode resultar em consequências severas para os seres humanos como danos hepáticos, hiperamonemia, encefalopatias e conseqüentemente efeitos deletérios no SNC (van Hall et al. 1999; Olde Damink et al. 2002).

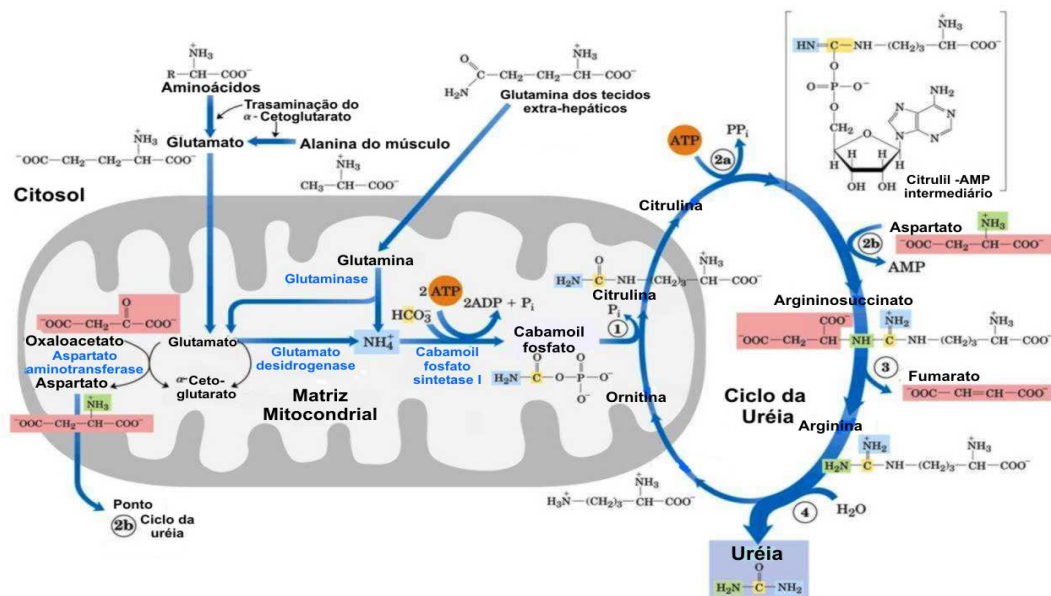


Figura 9. Ciclo da ureia e reações que levam aminoácidos para o ciclo. As enzimas catalisadoras dessas reações estão distribuídas entre a matriz mitocondrial e o citosol. Um grupamento amino entra no ciclo da ureia como carbamoil fosfato, formado na matriz; o outro entra como aspartato, formado na matriz por transaminação do oxaloacetato e glutamato, catalisado pela aspartato aminotransferase. O ciclo da ureia consiste em quatro passos: 1- Formação de citrulina a partir de ornitina e carbamoil fosfato; a citrulina passa para o citosol. 2- Formação de argininosuccinato através do intermediário citrulil-AMP (entrada do segundo grupo amino). 3- Formação de arginina a partir de argininosuccinato; essa reação libera fumarato, que entra o ciclo do ácido cítrico. 4- Formação de ureia; essa reação também regenera ornitina. Adaptado de Nelson e Cox (2010).

1.2. EFEITOS PROVOCADOS PELA TOXICIDADE DA AMÔNIA

Ressalta-se, por oportuno, que a amonemia pode ser resultante de desordens enzimáticas do ciclo da ureia, tais como na ornitina transcarbamilase (OCT), responsável pela etapa de conversão de ornitina em citrulina, ou ainda, por lesão hepática, provocada por ingestão de toxinas (inclusive etanol), infecções virais ou doenças autoimunes (Cooper 2001; Kelly e Stanley 2001).

O fígado metaboliza amônia em ureia e a redução da capacidade de remoção do metabólito tóxico, associada a desordens do ciclo da ureia ou lesão

hepática, resulta em amonemia elevada (Felipo e Butterworth 2002a; Walker 2009).

A elevação nos níveis de amônia é desviada para outra via, quando esses níveis aumentam também na corrente sanguínea a função cerebral fica comprometida (Monfort et al. 2002). O metabolismo do SNC, a sua função e estrutura são afetadas por múltiplos caminhos (Albrecht e Wegrzynowicz 2005). Por exemplo, a síntese de Gln nos astrócitos é associada à resposta neurotóxica pela ação da amônia que ultrapassa a barreira hematencefálica (Nybo et al. 2005). De todo o exposto, pode-se afirmar que, as concentrações elevadas de NH_3 no cérebro resultam em alterações no metabolismo que afetam a regulação das atividades de enzimas importantes, como a glutaminase, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase (GDH) (Bosoi e Rose 2009).

Tradicionalmente, alguns dos efeitos deletérios incluem alterações no metabolismo energético dos neurônios, com menor capacidade de gerar adenosina trifosfato (ATP); e no funcionamento dos astrócitos (Chan et al. 2000; Felipo e Butterworth 2002a). A hiperamonemia pode direcionar uma redução do glutamato (Glu) e aumento de lactato e Gln no SNC (Odland et al. 2000).

No SNC, o metabolismo da amônia está diretamente relacionado ao ciclo glutamina/glutamato, que é essencial para os neurônios glutamatérgicos. Esse ciclo envolve a síntese de glutamato no terminal pré-sináptico pela reação de desaminação oxidativa catalisada pela GDH, assim, esse glutamato liberado na fenda sináptica é responsável pela transmissão do impulso nervoso (Kelly e Stanley 2001).

A alteração na regulação de neurotransmissores provocada pela hiperamonemia ocasiona desequilíbrio nos sistemas glutamatérgico, GABAérgico e serotoninérgico que altera as vias de transdução cerebral associadas a diferentes tipos de receptores de Glu como os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), provocando a hiperatividade desses receptores que funcionam como canais de Ca^{2+} , e dessa forma, aumentando a atividade da Na^+/K^+ -ATPase que levaria a uma maior depleção da ATP (Hertz et al. 2000; Cooper 2001), o que pode ser suficiente para causar excitotoxicidade neural e/ou morte (Brustovetsky et al. 2001; Butterworth 2001) (Figura 10). Essas alterações no SNC podem resultar em ataxia, falta de coordenação, falta de concentração e diminuição da cognição

(Nybo et al. 2005). Os astrócitos seriam alterados morfologicamente, através do inchamento (swelling) que provoca um aumento da pressão intracraniana (Chan et al. 2000; Kelly e Stanley 2001).

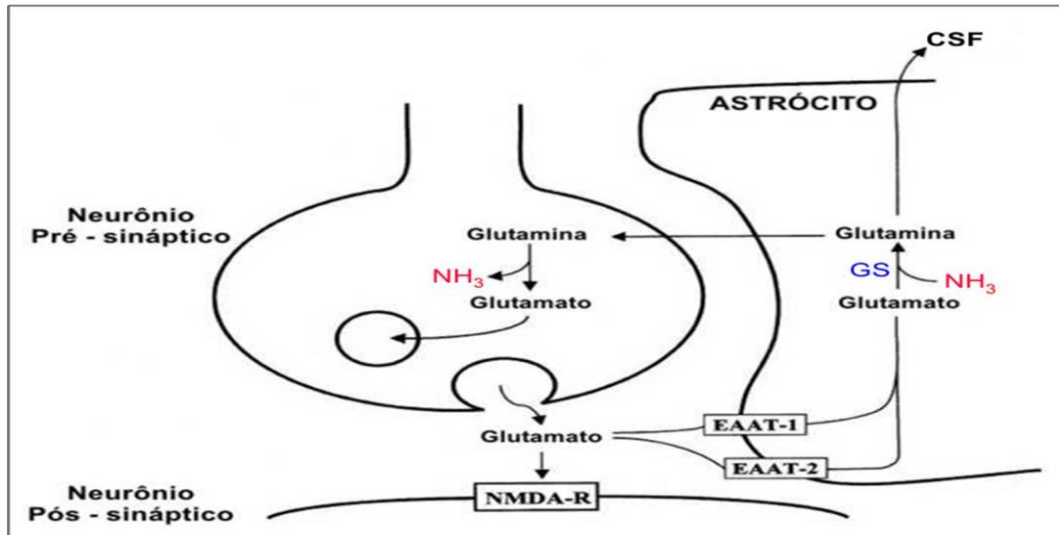


Figura 10. A sinapse do glutamato e "ciclo glutamina-glutamato". O glutamato é liberado na fenda sináptica do neurônio pré-sináptico, onde atua os receptores do neurônio pós-sináptico para simplificação, somente o receptor NMDA (NMDA-R) é mostrado. O excesso de glutamato é então captado pelos astrócitos através de transportadores de glutamato EAAT-1 e/ou EAAT-2. A exposição do cérebro a elevação da amônia resulta em uma expressão reduzida de EAAT-1 e EAAT-2, aumentando as concentrações extracelulares de glutamato. Adaptado de Felipo e Butterworth (2002b).

Partindo dessa premissa, observa-se que os mecanismos pelos quais concentrações elevadas de amônia exercem sua neurotoxicidade ainda não estão bem esclarecidos. Considera-se que, um aumento da amonemia desencadeada por uma insuficiência hepática contribui para o desenvolvimento de um edema cerebral, assim, pacientes com cirrose e encefalopatia hepática (EH), normalmente não apresentam sinais clínicos de um edema cerebral e ostensivo aumento da pressão intracraniana (Schliess et al. 2009). Além disso, observações clínicas não demonstram uma consistente correlação entre a concentração

plasmática de amônia e a manifestação dos sintomas da EH (Shawcross et al. 2005; Zwingmann 2007). No entanto, estratégias para redução de uma amonemia elevada continuam a ser um processo chave de abordagem terapêutica (Bosoi e Rose 2009; Norenberg et al. 2009).

A amônia produzida é transportada entre os órgãos pela corrente sanguínea como descrito anteriormente (Córdoba e Minguez 2008). É oportuno destacar que, indivíduos saudáveis e em repouso, apresentam uma concentração de amônia relativamente baixa nos líquidos corporais e teciduais (Sahlin 1994). Já os portadores de doenças hepáticas crônicas, com falência hepática aguda ou com grave pressão intracraniana, demonstram um aumento acentuado da amonemia, conforme a tabela 4 (Clemmesen et al. 1999; Clemmesen et al. 2000; Olde Damink et al. 2002).

Tabela 4. Concentração de amônia no sangue arterial, venoso e em doenças hepáticas. Adaptado de Prado (2010).

	Amônia ($\mu\text{mol/L}$)	Referências
Sangue e Plasma	22 – 113 (arterial)	(Clemmesen, Kondrup et al., 2000)
Sangue e Plasma	20 – 259 (venoso)	(Olde Damink, Deutz et al., 2002)
Indivíduos Saudáveis	45 (arterial)	(Clemmesen, Kondrup et al., 2000)
Fluido cérebro espinhal (CSF)	20-100	(Clemmesen, Gerbes et al., 1999)
Cirrose hepática	60-80	(Clemmesen, Kondrup et al., 2000)
Doença aguda hepática	90-120	(Olde Damink, Deutz et al., 2002)
Falência hepática	150-180	(Clemmesen, Kondrup et al., 2000)
Falência hepática e grave pressão intracraniana	~ 340	(Clemmesen, Gerbes et al., 1999)

Nesse sentido, nota-se que pequenas concentrações de amônia acima do nível basal têm ação tóxica sobre o SNC, sendo a ela creditada a possibilidade de ser um dos precursores chave da fadiga central e periférica, por alterar as

concentrações de neurotransmissores e a disponibilidade de ATP, ocasionando entre outros fatores a perda da coordenação motora (Banister e Cameron 1990). Assim, a elevação da amonemia pode causar uma série de danos tanto no cérebro quanto nos músculos esqueléticos (Bachmann et al. 2004). A produção de amônia pela desaminação dos aminoácidos pode levar a níveis elevados significativos de amônia sistêmica (90 e > 200 $\mu\text{mol/L}$) (Hellsten et al. 1999; Nybo et al. 2005). Esses são níveis de três a dez vezes maiores do que os comumente observados em indivíduos saudáveis em repouso, que pode variar de 20-80 $\mu\text{mol/L}$ (van Hall et al. 1995). As únicas condições semelhantes de níveis elevados de amonemia somente são observadas na presença de certas complicações patológicas, como a EH. Entretanto, níveis elevados do metabólito podem provocar efeitos negativos no desempenho físico (Mujika et al. 2004; Nybo e Secher 2004; Nybo et al. 2005). Assim, durante o exercício físico, mecanismos de detoxicação devem ser utilizados (Hirai et al. 1995; Yuan et al. 2002). Em razão disso, durante o exercício físico, surgem vários produtos do metabolismo energético, entre os quais a elevação da amonemia, que é tolerada devido a uma proteção por mecanismos ainda desconhecidos (Sahlin 1994) (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de amônia em fluidos e tecidos corporais em diferentes intensidades de exercício físico. Adaptado por Prado (2010).

	Plasma	Eritrócitos	Miócitos	Suor
Exercício a 75-80% VO_2máx até fadiga ou por 30min				
Amônia ($\mu\text{mol/L}$)	170 \pm 29	337	566	7.140 \pm 768
Exercício a 100% VO_2máx até a fadiga				
Amônia ($\mu\text{mol/L}$)	120 \pm 18	392	1.354	X

2. EXERCÍCIOS FÍSICOS E AMÔNIA

Nesse contexto, qualquer forma de exercício físico executado por um indivíduo intensifica diferentes vias metabólicas produtoras de ATP. Dessa forma, o próprio exercício físico pode favorecer a um aumento da amonemia, no qual a

magnitude de sua produção depende da intensidade do exercício (Bangsbo et al. 1991; Graham e MacLean 1992).

Observa-se que, a descoberta de produção de amônia pelo músculo foi relatada por Parnas e colaboradores no final de 1920. Sendo que a elevação da amônia induzida pelo exercício é frequentemente associada a um maior estresse energético. O trabalho mecânico aumenta a taxa de hidrólise de ATP excedendo a velocidade de ressíntese, o que acarreta aumento da concentração intracelular de AMP e amônia (Mutch e Banister 1983; Wilkinson et al. 2010).

No músculo esquelético existem duas grandes fontes de produção de amônia: o catabolismo de aminoácidos e o ciclo das purinas nucleotídeos (PNC) (Hellsten et al. 1999).

O catabolismo de aminoácidos, pode se tornar uma importante fonte energética, principalmente se os estoques de carboidratos estiverem reduzidos (Blomstrand e Saltin 1999). A degradação de aminoácidos eleva a produção de amônia, principalmente, se os níveis musculares e hepáticos de glicogênio estiverem baixos (Figura 11) (Broberg e Sahlin 1988; Broberg e Sahlin 1989; Snow et al. 2000).

O PNC é outra forma extrema de aproveitamento energético. O acúmulo de adenosina difosfato (ADP), AMP e H^+ , estimulam a AMP deaminase. Essa enzima, através do processo de hidrólise, deamina a AMP, levando ao aumento das concentrações intracelulares de inosina monofosfato (IMP) e amônia (Meyer e Terjung 1980; Fischer et al. 2007). Em condições de concentrações normais de ATP, guanosina trifosfato (GTP) e aumento na concentração de fosfato inorgânico (P_i), o IMP é reaminado pela entrada de aspartato (Asp) e GTP catalizado pela adenilsuccinato sintetase formando adenilsuccinato, podendo fornecer fumarato, alimentando o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Tais eventos estão associados com a velocidade de desaminação da AMP (Meyer et al. 1980; Meyer e Terjung 1980; Broberg e Sahlin 1989; Korzeniewski 2006).

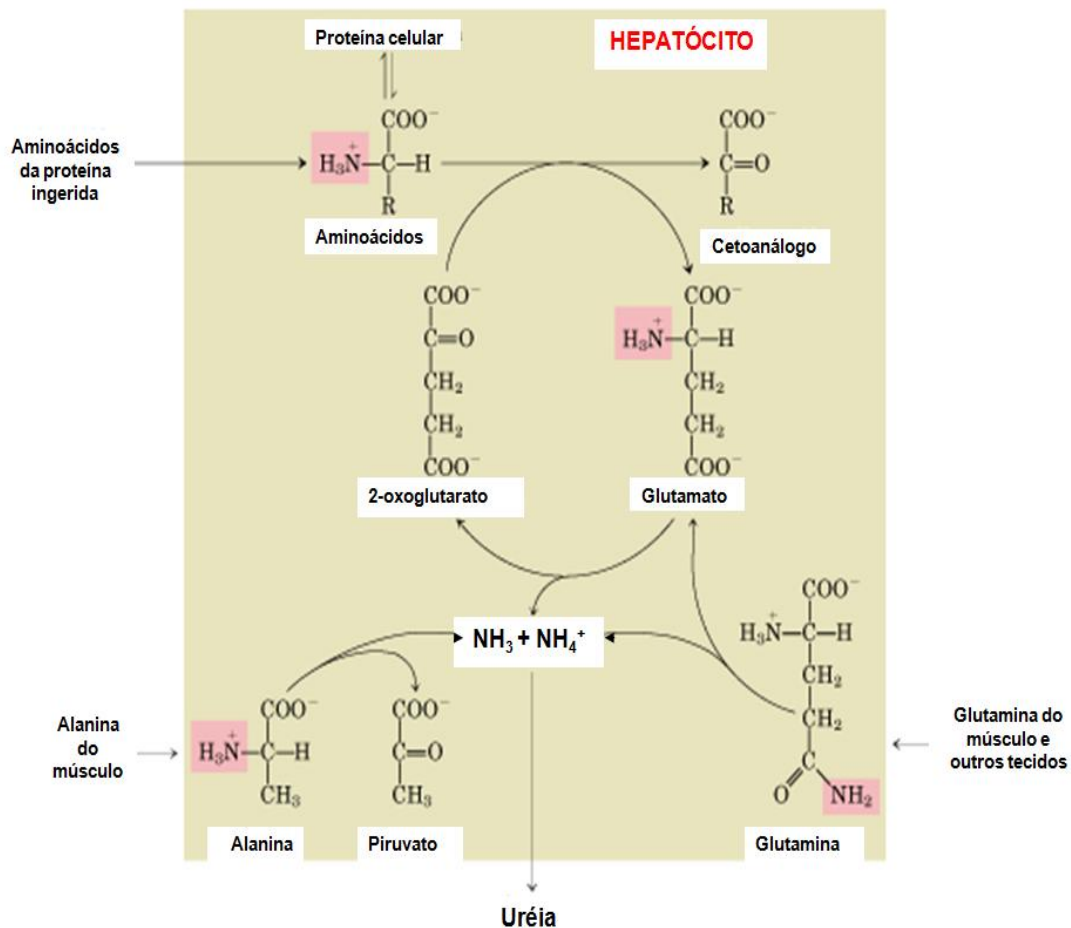


Figura 11. Catabolismo de aminoácidos no fígado de vertebrados. Grupo amino na cor rosa. Adaptado de Nelson e Cox (2010).

De tal forma, a AMP também pode ser desfosforilada a adenosina pela ação da enzima 5' nucleotidase, que é deaminada a inosina pela ação da adenosina deaminase. Devido a incapacidade do músculo reverter a síntese de inosina, essa é transformada em hipoxantina, xantina e deixa o músculo para ser metabolizado nos hepatócitos formando urato (Hellsten et al. 1997; Hellsten et al. 1998; Hellsten et al. 2004). Vale ressaltar que, o PNC também possui outras funções tais como: manutenção da alta taxa ATP/ADP e reabastecimento dos intermediários do TCA (Tullson e Terjung 1991; Tullson e Terjung 1999) (Figura 12).

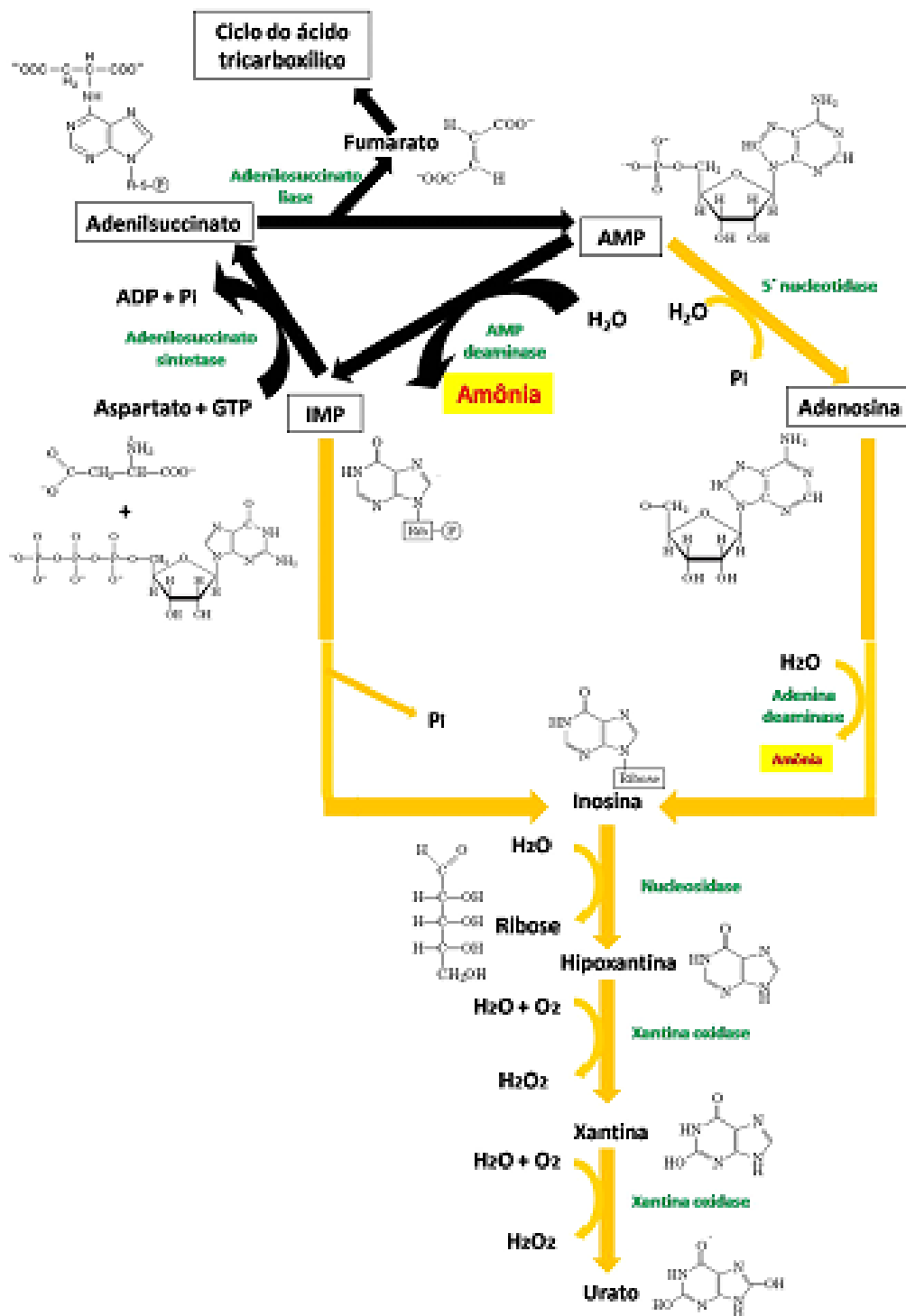


Figura 12. Intermediários metabólicos na gênese de amônia e urato. O ciclo das purinas nucleotídeos é demonstrado pelas setas pretas. Adaptado de Prado (2010).

A amônia e seu íon amônio ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) são produtos da degradação de compostos nitrogenados e são considerados indicadores de diversas funções metabólicas durante o exercício físico a principal fonte de produção de amônia é o músculo. Se o exercício for prolongado, os aminoácidos podem contribuir com 5% a 10% do total de energia utilizada proveniente de reações anapleróticas ou neoglicogênicas (Wagenmakers et al. 1991; Wagenmakers 1998a; Wagenmakers 1998b). Assim, o músculo tem uma grande capacidade de produção de amônia durante o exercício e essa produção é acompanhada pela gênese concomitante de alanina, glutamina e pela grande captação de glutamato como descrito anteriormente.

2.1. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO DE ALTA INTENSIDADE E CURTA DURAÇÃO SOBRE O METABOLISMO DA AMÔNIA

Percebe-se que, durante o exercício físico intenso, a elevação da amonemia é frequentemente associada a um maior estresse energético causado pelo desequilíbrio entre o suprimento e a demanda de ATP (Hellsten et al. 1998; Nielsen et al. 2003). Assim, parece que durante um exercício de alta intensidade, a maior fonte é dada pela desaminação do AMP, pois a taxa de utilização de ATP, no músculo esquelético, é maior do que a taxa de ressíntese causando um acúmulo de ADP e AMP. Para evitar um acúmulo de AMP dentro da célula, essa é deaminada em IMP com liberação de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ livre. O IMP resultante, como já comentado, será degradado em hipoxantina e urato, representantes finais do metabolismo das purinas (Hellsten et al. 1999; Zhao et al. 2000; Schulz e Heck 2003).

Assim, com a contração muscular intensa ocorre uma maior hidrólise da ATP em ADP, Pi e H^+ , podendo levar a uma menor ressíntese da ATP pela creatina fosfato (CP) (catalisada pelo creatina quinase) e um acúmulo de ADP (Banister e Cameron 1990). Uma concentração elevada de ADP promove a ativação da mioquinase, enzima responsável pela síntese de ATP e AMP a partir de ADP. A relação entre as concentrações de ATP, ADP e AMP é importante na regulação do metabolismo, sendo assim, a produção de AMP pela mioquinase deve ser equilibrada, isso ocorre a partir da ativação da AMP deaminase que leva

a uma maior produção de IMP, amônia e urato (Katz et al. 1986; Broberg e Sahlin 1989) (Figura 13). A fase de reaminação ocorre durante o repouso, quando é cessada a atividade intensa da hidrólise da ATP (Graham e MacLean 1998). Porém, outra possibilidade, é que no exercício intenso, aproximadamente 50-60% da AMP deaminase torna-se ligada a miofibrila, causando uma maior degradação de AMP para IMP. Tal reação estimularia a ação da adenilato quinase (mioquinase), favorecendo a formação de ATP pelo ADP para aumentar a disponibilidade de energia e manter a contração muscular intensa (Wilkinson et al. 2010).

Nota-se que, a diminuição do pH da célula muscular durante um exercício intenso, também constitui um fator para a ativação da AMP deaminase. Este efeito é pronunciado em fibras de contração rápida, pois essas são mais sensíveis às mudanças de pH e tem maior capacidade de desaminação de AMP (Meyer et al. 1980; Dudley e Terjung 1985a; Dudley e Terjung 1985b).

Verifica-se que, parte da amônia é incorporada ao Glu pela GS que o converte em Gln e essa é liberada pela célula muscular (Wagenmakers 1998a; Wagenmakers 1998b). Parte da amônia difunde-se, livremente, através das membranas celulares, participando em diversas reações enzimáticas nas células do SNC (Felipo e Butterworth 2002a; Hellsten et al. 1996; Graham e MacLean 1998; Hellsten et al. 1998; Rafey et al. 2003; Hediger et al. 2005; Kaya et al. 2006).

Assim, a queda do desempenho com repetidos movimentos muscular é causada pela redução de CP, aumento de H^+ , prejuízo na função do retículo sarcoplasmático ou alguma fadiga induzida por um agente ainda desconhecido (van Hall et al. 1999; Snow et al. 2000). Acredita-se que, o acúmulo progressivo de amônia possa também causar fadiga (Banister e Cameron 1990).

Embora algumas questões não estejam claras, o exercício físico também pode promover um aumento da amonemia, aumentando a toxicidade cerebral e muscular, induzindo fadiga central e periférica (Banister e Cameron 1990; Wilkinson et al. 2010). Por outro lado, os exercícios de alta intensidade são utilizados para estudar a amonemia, visto ser um bom modelo que induz a amonemia *in vivo* (Guezennec et al. 1998).

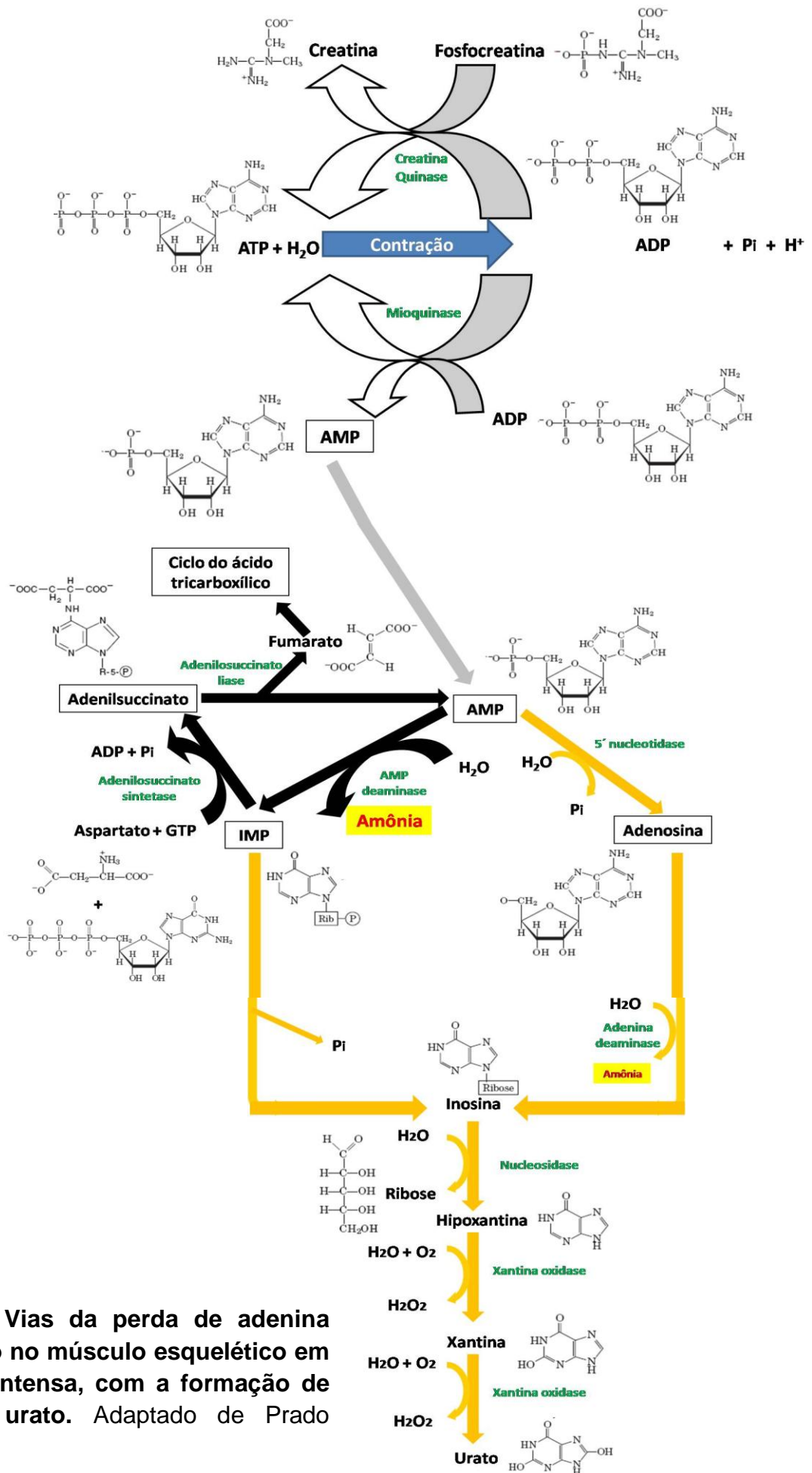


Figura 13. Vias da perda de adenina nucleotídeo no músculo esquelético em contração intensa, com a formação de amônia e urato. Adaptado de Prado (2010).

produzida em tecidos extra-hepáticos (músculo esquelético, por exemplo), esta precisa ser transportada desses tecidos para o fígado, através do sangue, para detoxicação (Graham e MacLean 1992). As concentrações plasmáticas de amônia na circulação sistêmica são controladas por processo coordenado, em que a maioria da amônia gerada nos tecidos extra-hepáticos é metabolizada a Gln (Figura 14). Neste caso, a Gln pode ser o transportador de amônia na corrente sanguínea (Holecek 2002; Wu 2009). Para isso, a amônia é combinada com o Glu, através da GS, para formar e liberar Gln. A Gln, uma forma não-tóxica de transporte da amônia, é transportada pelo sangue para o fígado e rins. No hepatócito é convertida em Glu e amônia, pela enzima glutaminase. O Glu formado, também é trabalhado pela GDH, liberando mais amônia e produzindo esqueletos de carbono que são utilizados como combustível metabólico (Ament et al. 1997; Wagenmakers 1998b).

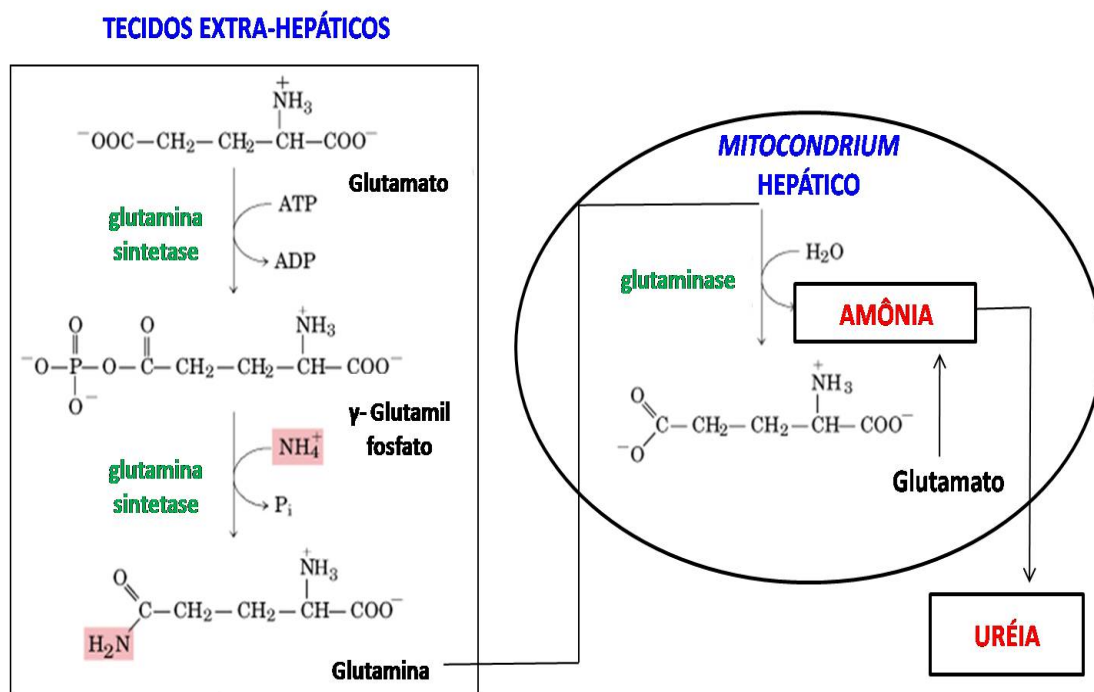


Figura 14. A glutamina transporta a amônia na corrente sanguínea. Adaptado de Nelson e Cox (2010).

Vale ressaltar, que vários cetooanálogos (esqueletos de carbono), formados após remoção do grupo amino de aminoácidos, podem fornecer intermediários para o TCA, ciclo que ocupa um papel central no metabolismo oxidativo. Este fenômeno metabólico é denominado de anaplerose, que significa a entrada de carbono no TCA por outras vias e não pela reação da Acetil-CoA via citrato sintase (Gibala 2003; Bowtell et al. 2007). Pelas vias anapleróticas, esqueletos de carbono de aminoácidos glicogênicos e cetogênicos podem contribuir na ressíntese de ATP pelo fornecimento de intermediários no TCA (Owen et al. 2002) (Figura 15). A concentração desses intermediários demonstra-se aumentada de 5 a 10 vezes mais no músculo esquelético, tanto de ratos como de humanos, dentro de cinco minutos do início do exercício, sugerindo que estes possam ser usados para aumentar o fluxo do TCA e favorecer a ressíntese de ATP via fosforilação oxidativa (Wagenmakers 1998a).

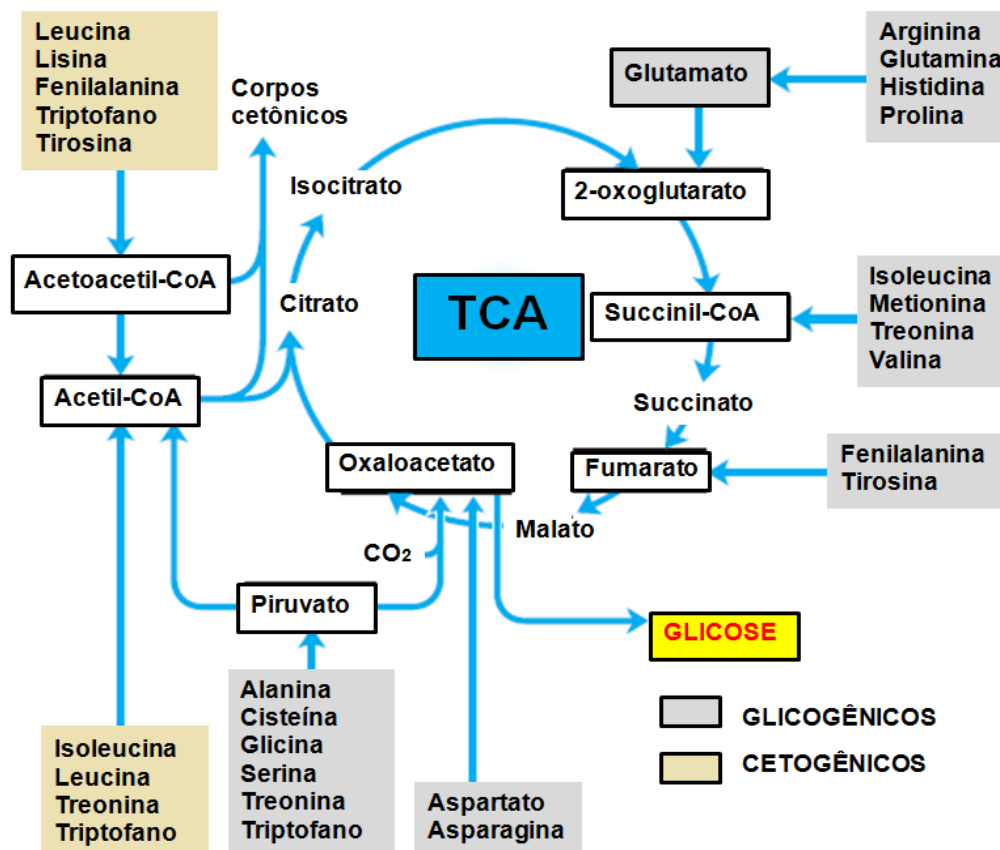


Figura 15. Destino catabólico dos aminoácidos via anaplerose. TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico. Adaptado de Nelson e Cox (2010).

Como os músculos em contração vigorosa operam em anaerobiose, há uma produção, não apenas de amônia da quebra de proteínas, mas também piruvato e lactato da glicólise. Esses produtos precisam encontrar um caminho para o fígado (a amônia para ser convertida em ureia e excretada; o piruvato para formar nova glicose; e o lactato para formar nova glicose por gliconeogênese) (Desvergne et al. 2006; Mizushima 2007; Wu 2009).

Apesar do fígado ser o principal órgão envolvido no catabolismo de aminoácidos, três aminoácidos com cadeias laterais ramificadas (leucina, isoleucina e valina), também denominados de BCAA, são oxidados como combustíveis, principalmente nos tecidos musculares, adiposo, renal e cerebral. Esses tecidos extra-hepáticos têm uma BCAA aminotransferase (BCAT) e uma α -cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase (BCKDH), que age em todos os três aminoácidos, contribuindo assim para a ressíntese de ATP (Hauschildt e Brand 1980; Holecek 2002; Layman 2002; Shimomura et al. 2006) (Figura 16).

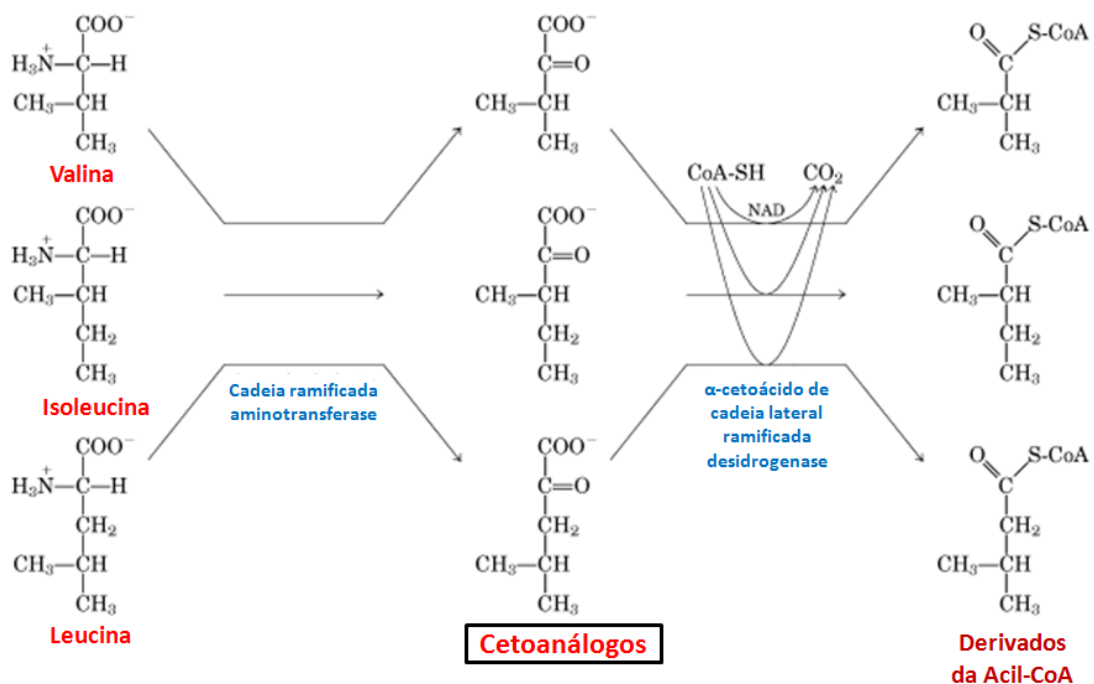


Figura 16. Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. Adaptado de Nelson e Cox (2010).

A capacidade de cetoanálogos de aminoácidos essenciais serem transaminados por derivados de amônia foi confirmada proporcionando uma dieta quase livre de proteínas na insuficiência renal crônica e diminuição na produção de substâncias nitrogenadas tóxicas, tais como a amônia e ureia, e também reduções plasmáticas da creatinina (Chow e Walser 1974; Burns et al. 1978; Ell et al. 1978; Giordano et al. 2000; Savica et al. 2005).

A utilização de manipulações dietéticas e o consumo de substâncias com o propósito de aumentar a performance são um fenômeno que cresce a cada dia, e com a cafeína não poderia ser diferente já que esta tem sido utilizada no sentido de favorecer alterações orgânicas e melhorar o desempenho (Graham e Spriet 1995; Sinclair e Geiger 2000). Por outro lado, estratégias nutricionais são sugeridas para reduzir a depleção energética e a elevação da amonemia aguda e transitória, induzida pelo exercício, por meio da manipulação de dietas e suplementos, com o objetivo de aumentar a carga energética celular e, portanto minimizar o aumento da amônia (Madsen et al. 1996; Bruce et al. 2001; Andrews et al. 2003; Langfort et al. 2004).

Modificações dietéticas, especialmente uma redução da ingestão de proteínas, em indivíduos com insuficiência renal crônica são bem descritos na literatura (Attman et al. 1979; Alvestrand et al. 1983; Garibotto et al. 1995). e a possibilidade de usar cetoanálogos como suplemento em dietas pobres em proteína na insuficiência hepática, obesidade ou deficiência enzimática no ciclo da ureia gerou interesse pelas suas respostas metabólicas obtidas (Hauschildt e Brand 1980; Löfberg et al. 1997).

O uso de cetoanálogos foi sugerido pela primeira vez em 1967 durante um curso de terapia na insuficiência renal crônica como suplemento dietético visto o baixo conteúdo de proteína dietética que deve ser ingerida na uremia elevada crônica. A idéia é que o nitrogênio em excesso, causados por estas condições, na forma de amônia, poderia fornecer seu grupo amino para um cetoanálogo no paciente com uremia elevada, mantendo o equilíbrio nitrogenado e diminuindo as concentrações sanguíneas de ureia, e ao mesmo tempo, produzir uma importante fonte de aminoácidos essenciais para síntese de proteínas (Walser 1978a; Walser 1978b; Walser 1990; Masud et al. 1994).

3. SUPLEMENTAÇÃO DE CETOANÁLOGOS E EXERCÍCIO FÍSICO

Os cetoanalogos são usados como substituição de seus respectivos aminoácidos para manter o balanço de nitrogênio, onde, ao mesmo tempo em que supre as necessidades de aminoácidos essenciais do organismo, promove diminuição da disponibilidade de nitrogênio, reduzindo assim a formação de compostos nitrogenados tóxicos resultantes do metabolismo (Almeida 2010) (Figura 17).

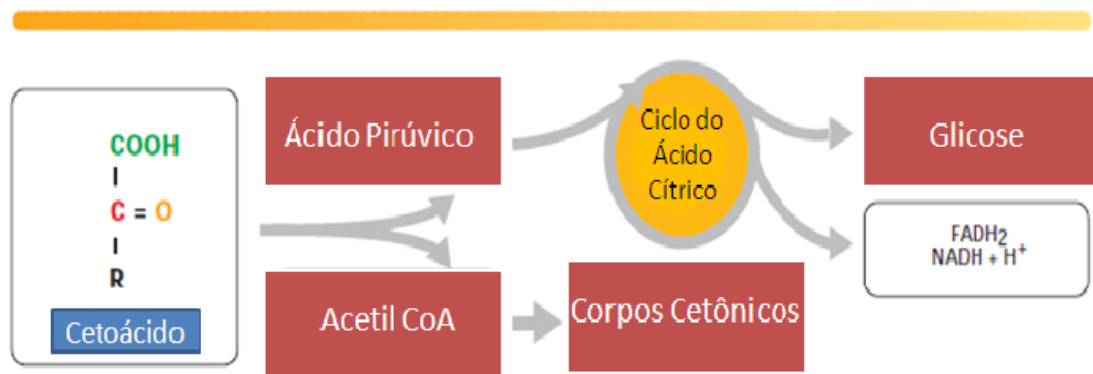


Figura 17. Destino do cetoácido formado por desaminação oxidativa. Adaptado de Almeida (2010).

Entre os possíveis benefícios do uso de cetoácidos associada a restrição de protéica convencional, estão à diminuição mais acentuada de sintomas urêmicos, acidose metabólica, hiperfosfatemia e resistência insulínica (Teplan et al. 2000). Sabe-se que no músculo, o BCAA e seus cetoanalogos são mantidos em equilíbrio por reações de transaminases reversíveis com o 2-oxoglutarato e Glu. O Glu é subsequencialmente transaminado com piruvato para produzir Alanina (Ala) e regenerar 2-oxoglutarato. A Ala sintetizada pelo músculo pode ser substrato para gliconeogênese hepática. A proporção pelo qual o suplemento de cetoanalogos de aminoácidos de cadeia ramificada é convertido para BCAA, dependerá do equilíbrio dessas reações (Dalton e Chantler 1983).

Os aminoácidos livres são substratos para síntese protéica, para a anaplerose e gliconeogênese. Durante o metabolismo, os aminoácidos são deaminados ou transaminados em reações que podem resultar na formação de cetoácidos e a amônia (Schloerb 1966; Cooper 2001; Kelly e Stanley 2001). Os aminoácidos são um importante combustível energético para ressíntese de ATP, principalmente durante o exercício físico intenso (Figura 18) (Blomstrand e Saltin 1999; Graham e Adamo 1999).

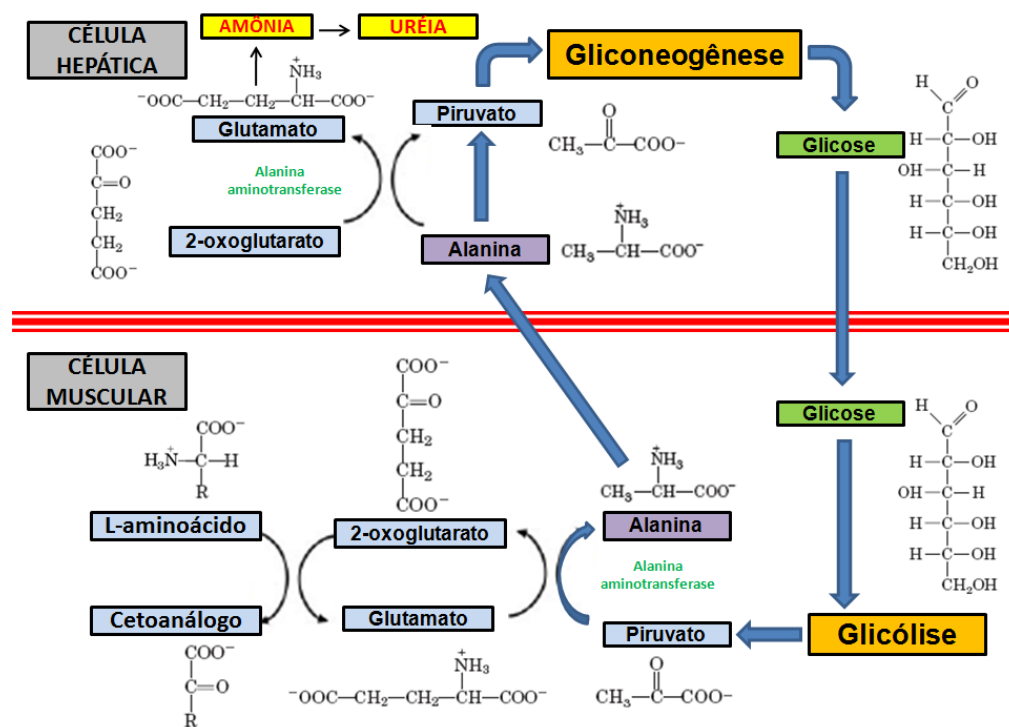


Figura 18. Ciclo alanina-glicose. Adaptado de Desvergne et al. (2006).

Hauschildt e Brand (1980) investigaram a eficiência de conversão (transaminação) dos cetoanálogos de aminoácidos de cadeia ramificada em seus aminoácidos correspondentes em ratos submetidos à dieta pobre em proteína pela atividade das três enzimas que afetam o metabolismo dos cetoanálogos de aminoácidos de cadeia ramificada: BCAT e BCKDH (fígado, rim e cérebro); e GDH (fígado). Foi verificada uma diminuição drástica da BCKDH hepática, favorecendo a transaminação. Sabe-se que uma má nutrição de proteína ativa a

BCKDH (Kalantar-Zadeh et al. 2004). Além disso, o exercício também aumenta a atividade (desfosforilação) da BCKDH (van Hall et al. 1996).

Durante o exercício físico, vários aminoácidos são recrutados em maior velocidade, para obtenção de energia e manutenção da glicemia. Sempre que um aminoácido deve ser utilizado para gerar energia ou em neoglicogênese, este é desaminado para a sua entrada nas diversas vias metabólicas, como foi discutido anteriormente. A gênese da amônia está intimamente correlacionada com o tipo de atividade física, treinamento prévio, alimentação e herança genética. É sabido que a produção de amônia está relacionada ao sexo, sendo sua produção maior em homens, provavelmente devido a sua maior massa muscular (Derave et al. 1997). O incremento da excreção de amônia está correlacionado ao aumento da concentração de lactato no sangue (Ament et al. 1997). A baixa produção de amônia, assim como a de lactato, tem sido considerada um fator de contribuição ao melhor condicionamento físico (Schulz e Heck 2003). O aumento progressivo da amonemia observado durante a atividade física intensa é um marcador do estresse muscular correlacionado a utilização de aminoácidos metabolicamente (Snow et al. 2000). A diminuição da amoniogênese é assim uma das preocupações a ser estabelecida por profissionais que orientam atletas.

Atualmente, novas modalidades terapêuticas são estudadas com o objetivo de atenuar alterações inerentes às complicações causadas pela elevação da amonemia tais como a EH, doença renal e no esporte em geral com o objetivo de reduzir a fadiga central e periférica. No Brasil esse suplemento já está disponível no mercado, embora limitado devido ao alto custo, o Ketosteril® Fresenius Kabi, onde é descrito sua composição na tabela 6.

Tabela 6. Composição do Ketosteril® Fresenius Kabi.

Keto analogue or amino acid	(mg)
Calcium 3-methyl-2-oxovaleric acid (α -ketoanalogue of isoleucine)	335
Calcium-methyl-2-oxovaleric acid (α -ketoanalogue of leucine)	505
Calcium-2-oxo-3-phenylpropionic acid (α -ketoanalogue of phenylalanine)	430
Calcium-3-methyl-2-oxobutyric acid (α -ketoanalogue of valine)	340
Calcium-DL-2-hydroxy-4-(methylthio)-butyric acid (α -hydroxyanalogue of methionine)	295
L-lysine acetate (= L-lysine 75 mg)	525
L-threonine	265
L-tryptophan	115
L-histidine	190
L-tyrosine	150
Total nitrogen content per tablet	180

4. SUPLEMENTAÇÃO E ESPORTÔMICA

Estudos realizados no Laboratório de Bioquímica de Proteína (LBP), onde esta tese foi realizada, utilizam o exercício associado à manipulação dietética como modelo experimental objetivando entender alterações metabólicas que provoquem um estado de hiperamonemia transitória, para investigar os seus efeitos sobre o metabolismo (Bassini-Cameron et al. 2007; Carvalho-Peixoto et al. 2007; Bassini-Cameron et al. 2008; Almeida et al. 2010; Prado et al. 2011).

Assim, estudar as possíveis modificações a partir da suplementação de cafeína e cetoanálogos podem proporcionar novos alvos terapêuticos, além de indicar caminhos para melhorar o desempenho atlético. É oportuno destacar que,

em nosso trabalho investigativo, nossas reflexões se pautaram no efeito da suplementação de cafeína e cetanoálogos e suas prováveis proteções contra a elevação da amonemia. Sabe-se que, uma elevada concentração de amonemia é capaz de promover fadiga central e periférica, e que um melhor controle na produção de amônia melhoraria o desempenho do exercício físico.

O LBP também vem estudando novas técnicas analíticas com a finalidade de diagnosticar o estado que encontra o metabolismo do atleta, em repouso, durante o treinamento físico, a prova olímpica, a recuperação e o descanso, para dar possibilidades de intervenções tanto nutricionais quanto de mudança do treino, para assim, transformar o atleta olímpico em campeão. Entender como o metabolismo do atleta funciona durante o exercício físico e quais as suas causas e consequências são fundamentais para a escolha das técnicas analíticas de investigação do metabolismo do atleta olímpico. A proposta dessas técnicas analíticas consiste em adotar a plataforma de espectrometria de massas para realizar essas investigações, além das análises laboratoriais clínicas rotineiras.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica instrumental utilizada para identificar compostos desconhecidos, para quantificar compostos conhecidos e para identificar a estrutura e propriedades químicas das moléculas. No princípio, era utilizada somente na determinação de massas atômicas, porém com o aprimoramento dessa técnica, ela já vem sendo empregada na busca de informações sobre a composição elementar das amostras; a composição das moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas; a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; a estrutura e composição de superfícies sólidas; e as relações isotópicas de átomos nas amostras. A detecção dos compostos pode ser obtida com pequenas quantidades de amostra, e o espectro de massas gerado de cada composto é único e pode ser utilizado como uma identidade específica para caracterizá-lo (Baran et al. 2009).

Desta forma, a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica são cascatas integradoras das ciências “ômica”, para melhor compreender e descrever as respostas dos mecanismos bioquímicos e biológicos do metabolismo de um indivíduo (Boccard et al. 2010), conforme ilustrado na figura 19.

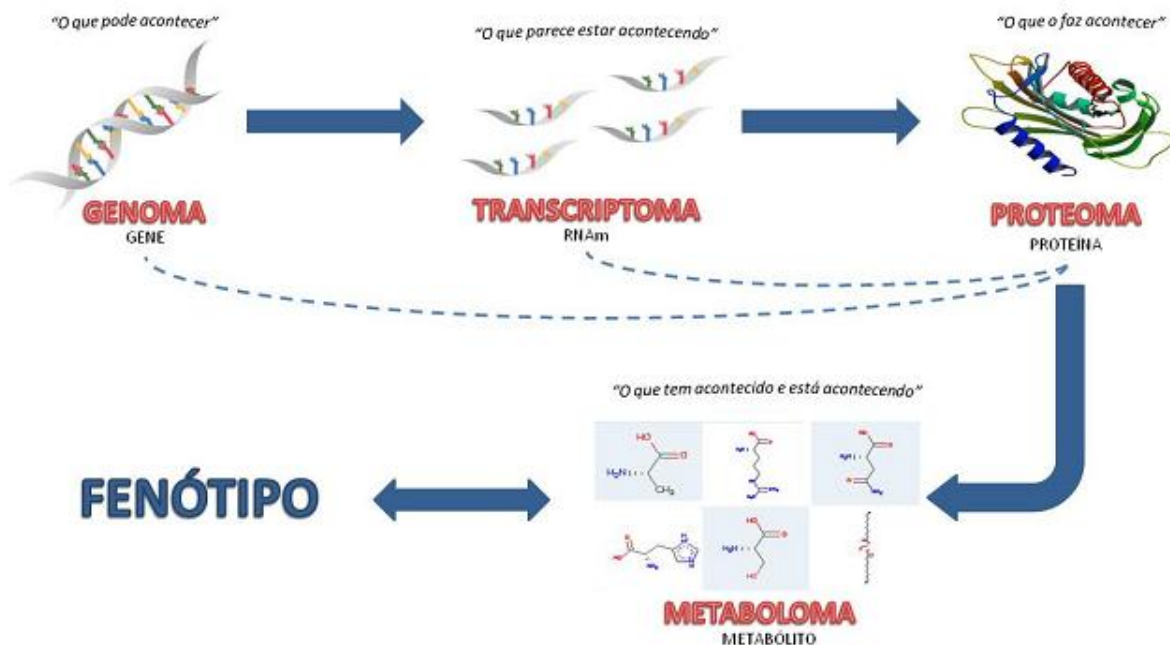


Figura 19. Cascata “Ômica” e seus pontos de regulação. Adaptado de Resende (2010).

Nota-se que o metabolismo celular é integrado, e que são vários os metabólitos que participam em diversas reações bioquímicas diferentes. O metaboloma de uma célula tem capacidade de responder rapidamente a qualquer alteração ambiental, de doença e/ou genética, porém os dados metabolômicos estão associados à complexidade química e à variação da concentração, o que dificulta a sua compreensão global (Dettmer et al. 2007; Baran et al. 2009).

Comparando diversos dados de atletas que realizaram exercício físico e foram suplementados com cetoanálogos ou não, em ambiente controlado ou não, surgiu a necessidade de adaptação dos protocolos clássicos de estudo à realidade do atleta de alto rendimento. Nestes experimentos, o sujeito é avaliado no seu ambiente de treinamento diário, com as condições ambientais e adversas únicas implicadas a ele. e nessa concepção, voltada ao alto rendimento se firmou o conceito denominado Esportômica (Resende, 2010).

As análises da esportômica têm por finalidade compreender o comportamento das vias metabólicas durante o exercício e a recuperação, nos quais, os resultados dos metabólitos permitem avaliar o atleta tanto na prescrição nutricional (alimentação e suplementação), quanto no seu treinamento,

prevenindo exercícios de *overtraining* (excesso de carga), subtreinamento e utilização inadequada de suplementos. Vale ressaltar, que durante o processo de avaliações dos parâmetros clínicos do atleta, faz-se necessário, estabelecer um protocolo de avaliação metabólica individualizada (Resende 2010).

Portanto, as técnicas analíticas, como os exames laboratoriais e a espectrometria de massas, podem ser utilizadas para a avaliação metabólica, permitindo investigar e intervir de maneira científica, na prescrição, controle e acompanhamento dos processos de treinamento desse atleta, auxiliando-o com intervenções para a sua adaptação ao exercício físico na melhoria da sua performance atlética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrecht J, Wegrzynowicz M. Endogenous neuro-protectants in ammonia toxicity in the central nervous system: facts and hypotheses. *Metab Brain Dis.* 2005 Dec;20 (4):253-63.

Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, Magalhães-Neto A, Cameron LC. Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. *Br J Nutr.* 2010 Nov;104(10):1438-42.

Almeida RD. Uso de cetoanálogos reduz amonemia sanguínea em ratos submetidos a exercícios físicos - Tese de Doutorado. Apresentado ao Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

Alvestrand A, Fürst P, Bergström J. Intracellular amino acids in uremia. *Kidney Int Suppl.* 1983 Dec;16:S9-16.

Ament W, Huizenga JR, Mook GA, Gips CH, Verkerke GJ. Lactate and ammonia concentration in blood and sweat during incremental cycle ergometer exercise. *Int J Sports Med.* 1997 Jan;18(1):35-9.

Andrews JL, Sedlock DA, Flynn MG, Navalta JW, Ji H. Carbohydrate loading and supplementation in endurance-trained women runners. *J Appl Physiol.* 2003 Aug;95(2):584-90.

Attman PO, Bucht H, Isaksson B, Uddebom G. Nitrogen balance studies with amino acid supplemented low-protein diet in uremia. *Am J Clin Nutr.* 1979 Oct;32(10):2033-9.

Bachmann C, Braissant O, Villard AM, Boulat O, Henry H. Ammonia toxicity to the brain and creatine. *Mol Genet Metab.* 2004 Apr;81 Suppl 1:S52-7.

Bangsbo J, Gollnick PD, Graham TE, Saltin B. Substrates for muscle glycogen synthesis in recovery from intense exercise in man. *J Physiol.* 1991 Mar;434:423-40.

Banister EW, Cameron BJ. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med.* 1990 May;11 Suppl 2:S129-42.

Baran R, Reindl W, Northen TR. Mass spectrometry based metabolomics and enzymatic assays for functional genomics. *Curr Opin Microbiol.* 2009 Oct;12(5):547-52.

Bassini-Cameron A, Monteiro A, Gomes A, Werneck-de-Castro JP, Cameron L. Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. *Br J Sports Med.* 2008 Apr;42(4):260-6.

Bassini-Cameron A, Sweet E, Bottino A, Bittar C, Veiga C, Cameron LC. Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions. *Br J Sports Med.* 2007 Aug;41(8):523-30

Blomstrand E, Saltin B. Effect of muscle glycogen on glucose, lactate and amino acid metabolism during exercise and recovery in human subjects. *J Physiol.* 1999 Jan 1;514 (Pt 1):293-302.

Boccard J, Veuthey JL, Rudaz S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. *J Sep Sci.* 2010 Feb;33(3):290-304.

Bosoi CR, Rose CF. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis.* 2009 Mar;24(1):95-102.

Bowtell JL, Marwood S, Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size: functional importance for oxidative

metabolism in exercising human skeletal muscle. *Sports Med.* 2007;37(12):1071-88.

Bredemeier C, Mundstock CM. "Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas." *Ciência Rural* 2000; 30(2): 365-372.

Broberg S, Sahlin K. Adenine nucleotide degradation in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Appl Physiol.* 1989 Jul;67(1):116-22.

Broberg S, Sahlin K. Hyperammonemia during prolonged exercise: an effect of glycogen depletion? *J Appl Physiol.* 1988 Dec;65(6):2475-7.

Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL, Boobis LH, Williams C, Bowtell JL. Glutamine supplementation promotes anaplerosis but not oxidative energy delivery in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Apr;280(4):E669-75.

Brustovetsky N, Brustovetsky T, Dubinsky JM. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem.* 2001 Jan;76(2):425-34.

Burns J, Cresswell E, Ell S, Fynn M, Jackson MA, Lee HA, Richards P, Rowlands A, Talbot S. Comparison of the effects of keto acid analogues and essential amino acids on nitrogen homeostasis in uremic patients on moderately protein-restricted diets. *Am J Clin Nutr.* 1978 Oct;31(10):1767-75.

Butterworth RF. Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings. *Metab Brain Dis.* 2001 Jun;16(1-2):55-65.

Carvalho-Peixoto J, Alves RC, Cameron LC. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007 Dec;32(6):1186-90.

Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int.* 2000 Aug-Sep;37(2-3):243-8.

Chow KW, Walser M. Substitution of five essential amino acids by their alpha-keto analogues in the diet of rats. *J Nutr.* 1974 Sep;104(9):1208-14.

Clay AS, Hainline BE. Hyperammonemia in the ICU. *Chest.* 2007 Oct;132(4):1368-78.

Clemmesen JO, Kondrup J, Ott P. Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology.* 2000 Jun;118(6):1131-9.

Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):648-53.

Cooper AJ. Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7(4):280-6.

Córdoba J, Mínguez B. Hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis.* 2008 Feb;28(1):70-80.

Dalton RN, Chantler C. The relationship between branched-chain amino acids and alpha-keto acids in blood in uremia. *Kidney Int Suppl.* 1983 Dec;16:S61-6.

Derave W, Bouckaert J, Pannier JL. Gender differences in blood ammonia response during exercise. *Arch Physiol Biochem.* 1997 Apr;105(2):203-9.

Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 2006 Apr;86(2):465-514.

Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 2007 Jan-Feb;26(1):51-78.

Dudley GA, Terjung RL. Influence of acidosis on AMP deaminase activity in contracting fast-twitch muscle. *Am J Physiol.* 1985a Jan;248(1 Pt 1):C43-50.

Dudley GA, Terjung RL. Influence of aerobic metabolism on IMP accumulation in fast-twitch muscle. *Am J Physiol.* 1985b Jan;248(1 Pt 1):C37-42.

Ell S, Fynn M, Richards P, Halliday D. Metabolic studies with keto acid diets. *Am J Clin Nutr.* 1978 Oct;31(10):1776-83.

Felipo V, Butterworth RF. Mitochondrial dysfunction in acute hyperammonemia. *Neurochem Int.* 2002a May;40(6):487-91.

Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol.* 2002b Jul;67(4):259-79.

Fischer H, Esbjörnsson M, Sabina RL, Strömberg A, Peyrard-Janvid M, Norman B. AMP deaminase deficiency is associated with lower sprint cycling performance in healthy subjects. *J Appl Physiol.* 2007 Jul;103(1):315-22.

Garibotto G, Deferrari G, Robaudo C, Saffioti S, Sofia A, Russo R, Tizianello A. Disposal of exogenous amino acids by muscle in patients with chronic renal failure. *Am J Clin Nutr.* 1995 Jul;62(1):136-42.

Gibala MJ. Anaplerosis of the muscle tricarboxylic acid cycle pool during contraction: does size matter? *J Physiol.* 2003 Apr 15;548(Pt 2):334.

Giordano M, Castellino P, Ohno A, DeFronzo RA. Differential effects of amino acid and ketoacid on protein metabolism in humans. *Nutrition.* 2000 Jan;16(1):15-21.

Graham TE, Adamo KB. Dietary carbohydrate and its effects on metabolism and substrate stores in sedentary and active individuals. *Can J Appl Physiol*. 1999 Oct;24(5):393-415.

Graham TE, MacLean DA. Ammonia and amino acid metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992 Jan;70(1):132-41.

Graham TE, MacLean DA. Ammonia and amino acid metabolism in skeletal muscle: human, rodent and canine models. *Med Sci Sports Exerc*. 1998 Jan;30(1):34-46.

Guezennec CY, Abdelmalki A, Serrurier B, Merino D, Bigard X, Berthelot M, Pierard C, Peres M. Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids. *Int J Sports Med*. 1998 Jul;19(5):323-7.

Hauschildt S, Brand K. Effects of branched-chain alpha-keto acids on enzymes involved in branched-chain alpha-keto acid metabolism in rat tissues. *J Nutr*. 1980 Aug;110(8):1709-16.

Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of urate transport. *Physiology*. 2005 Apr;20:125-33.

Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjødin B, Richter EA. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol*. 1997 Jan 1;498 (Pt 1):239-48.

Hellsten Y, Richter EA, Kiens B, Bangsbo J. AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol*. 1999 Nov 1;520 Pt 3:909-20.

Hellsten Y, Sjødin B, Richter EA, Bangsbo J. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol*. 1998 Apr;274(4 Pt 1):E600-6.

Hellsten Y, Skadhaug L, Bangsbo J. Effect of ribose supplementation on resynthesis of adenine nucleotides after intense intermittent training in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Jan;286(1):R182-8.

Hertz L, Yu AC, Kala G, Schousboe A. Neuronal-astrocytic and cytosolic-mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. *Neurochem Int*. 2000 Aug-Sep;37(2-3):83-102.

Hirai T, Minatogawa Y, Hassan AM, Kido R. Metabolic inter-organ relations by exercise of fed rat: carbohydrates, ketone body, and nitrogen compounds in splanchnic vessels. *Physiol Behav*. 1995 Mar;57(3):515-22.

Holecek M. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition*. 2002 Feb;18(2):130-3.

Huizenga JR, Tangerman A, Gips CH. Determination of ammonia in biological fluids. *Ann Clin Biochem*. 1994 Nov;31 (Pt 6):529-43.

Kalantar-Zadeh K, Mehrotra R, Fouque D, Kopple JD. Metabolic acidosis and malnutrition-inflammation complex syndrome in chronic renal failure. *Semin Dial*. 2004 Nov-Dec;17(6):455-65.

Katz A, Broberg S, Sahlin K, Wahren J. Muscle ammonia and amino acid metabolism during dynamic exercise in man. *Clin Physiol*. 1986 Aug;6(4):365-79.

Kaya M, Moriwaki Y, Ka T, Inokuchi T, Yamamoto A, Takahashi S, Tsutsumi Z, Tsuzita J, Oku Y, Yamamoto T. Plasma concentrations and urinary excretion of purine bases (uric acid, hypoxanthine, and xanthine) and oxypurinol after rigorous exercise. *Metabolism*. 2006 Jan;55(1):103-7.

Kelly A, Stanley CA. Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001;7(4):287-95.

Korzeniewski B. AMP deamination delays muscle acidification during heavy exercise and hypoxia. *J Biol Chem.* 2006 Feb 10;281(6):3057-66.

Langfort J, Czarnowski D, Zendzian-Piotrowska M, Zarzeczny R, Górski J. Short-term low-carbohydrate diet dissociates lactate and ammonia thresholds in men. *J Strength Cond Res.* 2004 May;18(2):260-5.

Layman DK. Role of leucine in protein metabolism during exercise and recovery. *Can J Appl Physiol.* 2002 Dec;27(6):646-63.

Löfberg E, Wernerman J, Anderstam B, Bergström J. Correction of acidosis in dialysis patients increases branched-chain and total essential amino acid levels in muscle. *Clin Nephrol.* 1997 Oct;48(4):230-7.

Madsen K, MacLean DA, Kiens B, Christensen D. Effects of glucose, glucose plus branched-chain amino acids, or placebo on bike performance over 100 km. *J Appl Physiol.* 1996 Dec;81(6):2644-50.

Masud T, Young VR, Chapman T, Maroni BJ. Adaptive responses to very low protein diets: the first comparison of ketoacids to essential amino acids. *Kidney Int.* 1994 Apr;45(4):1182-92.

Meyer RA, Gilloteaux J, Terjung RL. Histochemical demonstration of differences in AMP deaminase activity in rat skeletal muscle-fibres. *Experientia.* 1980 Jun 15;36(6):676-7.

Meyer RA, Terjung RL. AMP deamination and IMP reamination in working skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1980 Jul;239(1):C32-8.

Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007 Nov 15;21(22):2861-73.

Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipo V. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochem Int.* 2002 Aug-Sep;41(2-3):95-102.

Mujika I, Padilla S, Pyne D, Busso T. Physiological changes associated with the pre-event taper in athletes. *Sports Med.* 2004;34(13):891-927.

Mutch BJ, Banister EW. Ammonia metabolism in exercise and fatigue: a review. *Med Sci Sports Exerc.* 1983;15(1):41-50.

Nelson DL, Cox MM. A oxidação dos aminoácidos e a produção de ureia. In: Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Princípios de Bioquímica.* 5ª edição. Savier Editora. São Paulo/SP. 2010: 486-513.

Nielsen JJ, Kristensen M, Hellsten Y, Bangsbo J, Juel C. Localization and function of ATP-sensitive potassium channels in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Feb;284(2):R558-63.

Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis.* 2009 Mar;24(1):103-17.

Nybo L, Dalsgaard MK, Steensberg A, Møller K, Secher NH. Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *J Physiol.* 2005 Feb 15;563(Pt 1):285-90.

Nybo L, Secher NH. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. *Prog Neurobiol.* 2004 Mar;72(4):223-61.

Odland LM, Heigenhauser GJ, Spriet LL. Effects of high fat provision on muscle PDH activation and malonyl-CoA content in moderate exercise. *J Appl Physiol.* 2000 Dec;89(6):2352-8.

Olde Damink SW, Deutz NE, Dejong CH, Soeters PB, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int.* 2002 Aug;41(2-3):177-88.

Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem.* 2002 Aug 23;277(34):30409-12.

Prado ES, de Rezende Neto JM, de Almeida RD, Dória de Melo MG, Cameron LC. Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammonemia response during exercise under ketogenic conditions. *Br J Nutr.* 2011 Feb 16:1-5.

Prado ES. Suplementação de cetanoálogos como quelantes nas concentrações sanguíneas elevadas de amônia durante o exercício prolongado e dieta cetogênica. Tese de Doutorado. Apresentado ao programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

Rafey MA, Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, Abramson RG. Uric acid transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003 Sep;12(5):511-6.

Resende NM. Análise metabólica e metabolômica de atleta olímpico: Uma nova proposta para um nexus bioquímico. – Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

Sahlin K. Ammonia metabolism in humans during exercise. In: Maughan RJ, Shirreffs, SM. *Biochemistry of exercise.* 1994; 9 ed. (40): 497-510.

Savica V, Santoro D, Ciolino F, Mallamace A, Calvani M, Savica R, Bellinghieri G. Nutritional therapy in chronic kidney disease. *Nutr Clin Care.* 2005 Apr-Jun;8(2):70-6.

Schliess F, Görg B, Häussinger D. RNA oxidation and zinc in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis.* 2009 Mar;24(1):119-34.

Schloerb PR. Essential L-amino acid administration in uremia. *Am J Med Sci.* 1966 Dec;252(6):650-9.

Schulz H, Heck H. Glycogen Depletion As Indication for Ammonia Determination in Exercise Testing. *Eur J of Sport Scienc.* 2003 Set; 3(3): 1-9.

Shawcross DL, Olde Damink SW, Butterworth RF, Jalan R. Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metab Brain Dis.* 2005 Sep;20(3):169-79.

Shimomura Y, Honda T, Shiraki M, Murakami T, Sato J, Kobayashi H, Mawatari K, Obayashi M, Harris RA. Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. *J Nutr.* 2006 Jan;136(1 Suppl):250S-3S.

Snow RJ, Carey MF, Stathis CG, Febbraio MA, Hargreaves M. Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2000 May;88(5):1576-80.

Teplan V, Schück O, Horácková M, Skibová J, Holecek M. Effect of a keto acid-amino acid supplement on the metabolism and renal elimination of branched-chain amino acids in patients with chronic renal insufficiency on a low protein diet. *Wien Klin Wochenschr.* 2000 Oct 27;112(20):876-81.

Tullson PC, Terjung RL. Adenine nucleotide metabolism in contracting skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 1991;19:507-37.

Tullson PC, Terjung RL. IMP degradative capacity in rat skeletal muscle fiber types. *Mol Cell Biochem.* 1999 Sep;199(1-2):111-7.

van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE, Fearon KC, Dejong CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr.* 2004 Feb;79(2):185-97.

van Hall G, MacLean DA, Saltin B, Wagenmakers AJ. Mechanisms of activation of muscle branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase during exercise in man. *J Physiol.* 1996 Aug 1;494 (Pt 3):899-905.

van Hall G, Saltin B, Wagenmakers AJ. Muscle protein degradation and amino acid metabolism during prolonged knee-extensor exercise in humans. *Clin Sci.* 1999 Nov;97(5):557-67.

van Hall G, van der Vusse GJ, Söderlund K, Wagenmakers AJ. Deamination of amino acids as a source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol.* 1995 Nov 15;489 (Pt 1):251-61.

Wagenmakers AJ, Beckers EJ, Brouns F, Kuipers H, Soeters PB, van der Vusse GJ, Saris WH. Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. *Am J Physiol.* 1991 Jun;260 (6 Pt1):E883-90.

Wagenmakers AJ. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. *Exerc Sport Sci Rev.* 1998a; 26:287-314.

Wagenmakers AJ. Protein and amino acid metabolism in human muscle. *Adv Exp Med Biol.* 1998b; 441:307-19.

Walker V. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes Obes Metab.* 2009 Sep;11(9):823-35.

Walser M. Keto-analogues of essential amino acids in the treatment of chronic renal failure. *Kidney Int Suppl.* 1978a Jun;(8):S180-4.

Walser M. Principles of keto acid therapy in uremia. *Am J Clin Nutr.* 1978b Oct;31(10):1756-60.

Walser M. Role of branched-chain ketoacids in protein metabolism. *Kidney Int.* 1990 Oct;38(4):595-604.

Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue. *Prog Neurobiol*. 2010 Jul;91(3):200-19.

Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009 May;37(1):1-17.

Yuan Y, So R, Wong S, Chan KM. Ammonia threshold-comparison to lactate threshold, correlation to other physiological parameters and response to training. *Scand J Med Sci Sports*. 2002 Dec;12(6):358-64.

Zhao S, Snow RJ, Stathis CG, Febbraio MA, Carey MF. Muscle adenine nucleotide metabolism during and in recovery from maximal exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2000 May;88(5):1513-9.

Zwingmann C. The anaplerotic flux and ammonia detoxification in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2007 Dec;22(3-4):235-49.

Capítulo II

Artigo publicado no British Journal of Nutrition

Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, Magalhães-Neto AM, Cameron LC. Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. Br J Nutr. 2010 Nov;104(10):1438-42.

Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise

Rosemeire Dantas de Almeida^{1,2,3}, Eduardo Seixas Prado^{1,2,3,4}, Carlos Daniel Llosa¹, Anibal Magalhães-Neto^{1,2,5} and Luiz-Claudio Cameron^{1,2,6*}

¹Laboratory of Protein Biochemistry, Federal University of State of Rio de Janeiro, Av. Pasteur, 296, Urca, Rio de Janeiro, Brazil

²Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Av. Pará, 1720, Umarama, Uberlândia, Brazil

³Biological and Health Sciences Center, Tiradentes University, Av. Murilo Dantas, S/N, Farolândia, Aracaju, Brazil

⁴Poet João Freire Ribeiro School, Sergipe Secretary of Education, Av. Nação, S/N, Jardins, Aracaju, Brazil

⁵Biological and Health Sciences Institute – Federal University of Mato Grosso, Rodovia MT-100, Km 3,5, Pontal do Araguaia, Mato Grosso, Brazil

⁶Graduate Program in Human Movement Science – University Castelo Branco – RJ – Brazil – Av. Salvador Allende, 6.700, Recreio Rio de Janeiro, Brazil

(Received 17 November 2009 – Revised 11 May 2010 – Accepted 12 May 2010 – First published online 2 July 2010)

During exercise, ammonia levels are related to the appearance of both central and peripheral fatigue. Therefore, controlling the increase in ammonia levels is an important strategy in ameliorating the metabolic response to exercise and in improving athletic performance. Free amino acids can be used as substrates for ATP synthesis that produces ammonia as a side product. Keto analogues act in an opposite way, being used to synthesise amino acids whilst decreasing free ammonia in the blood. Adult male rats were divided into four groups based on receiving either keto analogues associated with amino acids (KAAA) or a placebo and resistance exercise or no exercise. There was an approximately 40% increase in ammonia due to KAAA supplementation in resting animals. Exercise increased ammonia levels twofold with respect to the control, with a smaller increase (about 20%) in ammonia levels due to exercise. Exercise itself causes a significant increase in blood urea levels (17%). However, KAAA reduced blood urea levels to 75% of the pre-exercise values. Blood urate levels increased 28% in the KAAA group, independent of exercise. Supplementation increased glucose levels by 10% compared with control animals. Exercise did not change glucose levels in either the control or supplemented groups. Exercise promoted a 57% increase in lactate levels in the control group. Supplementation promoted a twofold exercise-induced increase in blood lactate levels. The present results suggest that an acute supplementation of KAAA can decrease hyperammonaemia induced by exercise.

Ammonia: Urate: Urea: Resistance exercise

Ammonia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) is a toxic metabolite with deleterious effects on the central nervous system⁽¹⁾. Exercise can be used as a model to study ammonia metabolism in an intensity-dependent way^(2–5). During prolonged exercise, ammonia is mainly produced by the catabolism of amino acids⁽⁶⁾. On the other hand, during high-intensity exercise, the largest source of ammonia production is from AMP deamination⁽⁷⁾. Ammonia levels are related to the appearance of both central and peripheral fatigue⁽⁸⁾. Therefore, controlling increases in ammonia is an important strategy in ameliorating the metabolic response to exercise and in improving athletic performance^(9,10).

The combination of keto analogues with amino acids has been used to treat patients with chronic kidney disease (CKD), portal systemic encephalopathy and hyperammonaemia^(11,12). Free amino acids can be used as substrates for ATP synthesis, which produces ammonia as a side product⁽¹³⁾.

In an opposite manner, the use of keto analogues associated with amino acids (KAAA) has been proposed as a way to synthesise amino acids whilst decreasing free ammonia^(14,15). During metabolism, amino acids are deaminated or transaminated to form keto acids via release of the amino group⁽¹⁶⁾. These reactions are reversible, and the use of keto analogues could reduce the blood ammonia concentration, resulting in the production of amino acids⁽¹⁷⁾. Thus, keto analogues may serve as nutritional supplements to synthesise amino acids of high biological value, especially in CKD patients. Furthermore, it is acknowledged that resistance and aerobic exercise programmes may serve important roles in the approach to the treatment, prevention and slowed progression of CKD⁽¹⁸⁾.

Although KAAA supplementation is effective in the treatment of CKD, particularly for postponing the necessity for dialysis, the use of KAAA is not popular due to its cost and

Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; Ctl group, control group (neither keto analogues associated with amino acids nor exercise); Ex group, exercise-only group; KA group, keto analogues associated with amino acids-only group; KAAA, keto analogues associated with amino acids; KAEx group, keto analogues associated with amino acids and exercise group.

* **Corresponding author:** Professor L.-C. Cameron, email cameron@unirio.br

the requirement for a low protein intake⁽¹⁹⁾. Thus, there has been a lack of interest in studies involving KAAA due to the lack of cost effectiveness in its use as a therapeutic agent. This lack of interest has limited the number of new papers published on the mechanism of action of KAAA. In the present study, we evaluated the effect of KAAA supplementation on ammonia production and blood urea levels during resistance exercise, showing metabolic effects that can enhance performance and post-exercise recovery.

Materials and methods

Male Wistar rats (12 weeks of age and body mass ranging from 280 to 350 g) were divided into four groups of twelve animals each. The group that received only KAAA (KA group) and the group that received KAAA and exercise (KAEx group) received 0.1 g Ketosteril[®] (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) in 0.5 ml water (0.3 g/kg). The composition of the KAAA mixture per tablet was as follows: α -keto analogues of isoleucine, 335 mg; leucine, 505 mg; phenylalanine, 430 mg; valine, 340 mg; α -hydroxy analogue of methionine, 295 mg; L-lysine acetate, 75 mg; L-threonine, 265 mg; L-tryptophan, 115 mg; L-histidine, 190 mg; L-tyrosine, 150 mg. The group that received neither KAAA nor exercise (control (Ctl) group) and the group that received only exercise (Ex group) received 0.5 ml of 0.9% NaCl, 1 h before exercise by oral administration. The animals were maintained in collective cages (four per cage) at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with a photoperiod of 12 h and fed *ad libitum* (diet and water). The study was approved by the Ethics Committee in Research of the University of Tiradentes, and followed the Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings.

Resistance exercise was performed according to a previous study⁽²⁰⁾ after familiarisation and determination of the load that was to be applied according to the one repetition maximum (IRM) test. Familiarisation consisted of attaching the animal to the exercise device daily without stimulating the animals to exercise, starting 6 d before the experiment. The IRM test was performed 1 d before resistance exercise and determined the heaviest weight that could be lifted. On the day of the experiment, fifty repetitions were performed with a load equal to 75% of IRM. The animals were stimulated to perform the repetitions through sticker electrodes (Axelgaard ValuTrode CF3200; Axelgaard Manufacturing Co. Ltd, Fallbrook, CA, USA) placed in the tail and connected to an electrostimulator (4 mA to 15 mA at 1 Hz for 1 s; Quark Dualpex 961; Quark Medical Products, São Paulo, Brazil).

Blood was collected through cardiac puncture before exercise (Ctl and KA groups) or immediately after exercise (Ex and KAEx groups). The blood samples were immediately centrifuged to obtain sera, which was subsequently frozen and stored at -70°C for future biochemical analysis. Biochemical analyses of glucose, urea, urate and creatinine concentrations were performed using commercially available spectrophotometric assays (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Lactate and ammonia were measured using an enzymic UV method (Randox, Crumlin, Co. Antrim, UK) on a Dade Model Dimension RXL Automated Chemistry Analyzer (Dade Behring, Eschborn, Germany), and haematological parameters were analysed using a Sysmex SE-9500 Automated Hematology Analyzer (TOA Medical Electronics, Kobe, Japan). Standard

curves were taken at a minimum r value of 0.98 and the experimental points were always within the calibration curve and at least 20% above the lower limit of detection.

Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA. Significances ($P < 0.05$) were confirmed using the Tukey test as a *post hoc* analysis. Data are reported as mean values with their standard errors.

Results

We used a weight-lifting exercise to evaluate the effect of KAAA on blood ammonia concentration after resistance

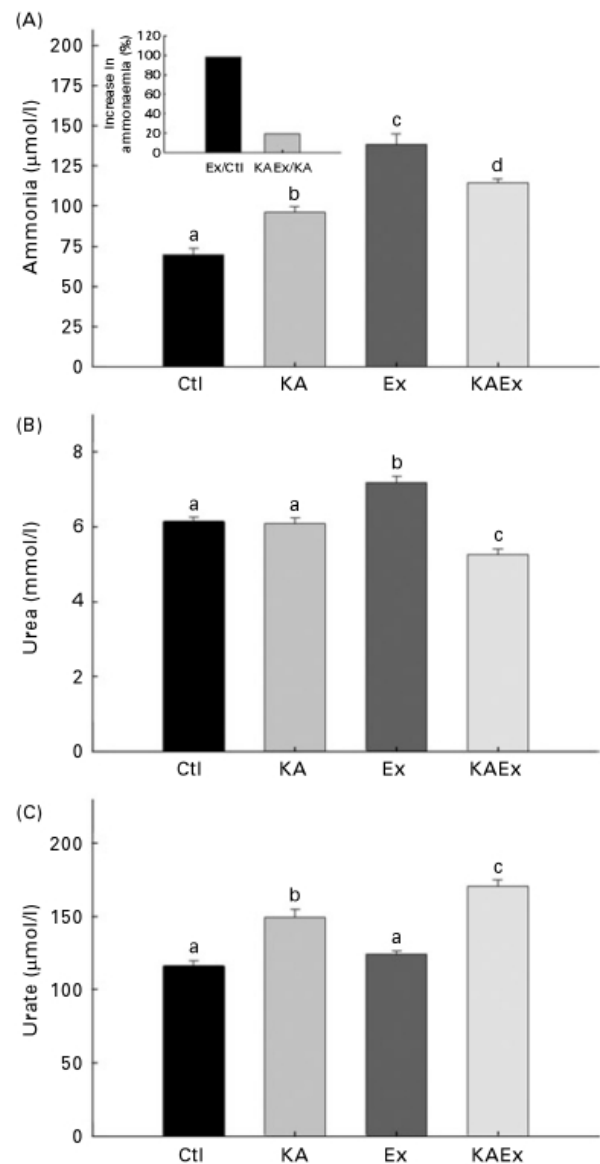


Fig. 1. Acute supplementation of keto analogues associated with amino acids (KAAA) affects ammonia (A), urea (B) and urate (C) metabolism. Ctl, control group (neither KAAA nor exercise); KA, KAAA-only group; Ex, exercise-only group; KAEx, KAAA and exercise group. Values are means, with standard errors represented by vertical bars. ^{a,b,c,d} Mean values with unlike letters were significantly different ($P < 0.05$). Inset of Fig. 1(A) shows the increase in ammonia levels in experimental and control groups when normalised against rest values.

exercise. There was an increase of about 40% in ammonia in resting animals due to KAAA supplementation. Compared with unsupplemented controls, exercise resulted in a twofold increase in ammonia levels in the animals. However, the supplemented group had a much smaller increase (about 20%) in ammonia levels after exercise (Fig. 1(A)). Since KAAA is proposed to decrease blood urea levels, we evaluated the response of blood urea to acute KAAA supplementation during exercise. We did not measure the effect of supplementation on blood urea at rest. With no supplementation, exercise significantly increased blood urea levels by 17% compared with the levels in the Ctl group. However, with KAAA supplementation, blood urea was reduced to 75% of the pre-exercise values (Fig. 1(B)).

To differentiate the ammonia production derived from AMP deamination from that derived from amino acid deamination, we measured urate, the end metabolite of inosine monophosphate. Blood urate levels increased 28% in the group supplemented with KAAA, independent of exercise. This effect was enhanced in the supplemented group after exercise. There was no change in blood urate levels in the control group in response to exercise (Fig. 1(C)).

KAAA supplementation has been shown to increase creatinine clearance. Our study model did not detect a change in blood creatinine in response to exercise. However, blood creatinine decreased by 40% in the groups supplemented with KAAA, independent of exercise (Table 1).

To understand the effect of KAAA on glucose maintenance, we measured glucose levels after exercise. Supplementation increased glucose levels in resting animals by 10%. Exercise did not change glucose levels in either the Ctl or KAEx groups (Table 1).

Blood lactate is an indicator of glucose utilisation during exercise. Exercise promoted a 57% increase in blood lactate in the Ctl group. The supplementation promoted a twofold exercise-induced increase in blood lactate (Table 1).

Discussion

It is widely reported that ammonia production increases during exercise and that ammonia could be a deleterious metabolite that promotes fatigue^(8,20,21). The production of ammonia can lead to significantly elevated systemic ammonia levels to levels between 90 and > 200 $\mu\text{mol/l}$. Patients with either liver or kidney disease also show sharp increases in ammonia levels that may range from 70 to 300 $\mu\text{mol/l}$ in liver disorder patients^(1,22). Patients with CKD have lower peak levels of ammonia during exercise, but experience ammonia increases

of about 30–60% compared with resting values^(1,23,24). KAAA has been widely used as a supplement to treat patients with kidney failure and as a therapeutic agent for liver failure and encephalopathy⁽¹²⁾. Additionally, regular physical activity and close clinical and dietary monitoring, including the use of keto analogues, should be recommended in patients with CKD⁽²⁵⁾.

One of the problems associated with human studies has been ensuring that subjects have adhered to the recommended diet and have properly taken the supplements. Here, we used a previously described resistance exercise animal method⁽¹⁹⁾ to investigate a possible ammonia-chelating effect of KAAA during exercise in rats. The production of ammonia during exercise occurs via both AMP deamination and branched-chain amino acid metabolism⁽¹⁾.

The use of KAAA increased ammoniaemia during the resting state, demonstrating that amino acid metabolism during exercise is associated with anaplerosis of Krebs cycle intermediates^(26,27). Increases in ammonia levels in response to exercise can be managed through the use of amino acids or carbohydrates that interfere with ammonia metabolism⁽²⁸⁾. It is possible to propose that the amino acids in the supplement are being used either as carbon skeleton donors to obtain energy or as gluconeogenic precursors. Even with an increase in ammonia levels at rest, KAAA supplementation was able to reduce the exercise-induced increase in blood ammonia by 80%. When compared with the non-supplemented exercise group, the absolute decrease was 20%. Previous data in our laboratory showed that there is a habituation of basal ammonia levels in response to amino acid supplementation, since the resting ammonia level decreases with an increase in basal blood urea levels correlated to supplementation time⁽³⁾. On the basis of these data, we postulate that the effect of KAAA supplementation on basal ammonia levels can be diminished by chronic KAAA use.

Our exercise model increased ammonia and urea levels in animals without any changes in urate levels. It has been pointed out that excess ammonia is metabolised to urea by the liver for excretion to minimise toxicity⁽²⁾. During exercise, KAAA was able to decrease the blood urea concentration to 75% of the resting urea level. This finding is related to the widely described therapeutic effect of KAAA (for a review, see Savica *et al.*⁽¹³⁾). Urate appears more quickly in blood in response to exercise compared with urea⁽²⁹⁾. KAAA supplementation increased resting urate levels. However, we detected changes in blood urate in the supplemented exercise group when compared with the non-supplemented exercise group after resistance exercise. It is known that during

Table 1. Creatinine, glucose and lactate as obtained from the four supplementation protocols (Mean values with their standard errors)

Group...	Ctl		KA		Ex		KAEx	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Creatinine (mmol/l)	47.66 ^a	0.91	28.89 ^b	0.71	47.49 ^a	0.76	27.76 ^b	0.76
Glucose (mmol/l)	6.11 ^a	0.12	6.64 ^b	0.20	6.06 ^a	0.12	6.81 ^b	0.16
Lactate (mmol/l)	2.66 ^a	0.08	2.67 ^a	0.07	4.18 ^b	0.09	5.44 ^c	0.09

Ctl, control (no keto analogues associated with amino acids or exercise); KA, keto analogues associated with amino acids only; Ex, exercise only; KAEx, keto analogues associated with amino acids and exercise.

^{a,b,c} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$; ANOVA).

high-intensity exercise such as resistance exercise, the largest quantity of urate is produced when the ATP:ADP ratio decreases which leads to increases in both AMP deamination and urate synthesis⁽⁸⁾. It is possible that our resistance exercise model with fifty repetitions activates pathways associated with resistance and prolonged exercise. KAAA supplementation promoted an increase in creatinine clearance. This is a well-described effect of this supplement in chronically ill patients⁽¹²⁾. Taking these results together, we postulate that the majority of ammonia production results from the deamination of amino acids instead of AMP^(7,8,30).

Some studies have shown that amino acid supplementation increased the pool of Krebs cycle intermediates during exercise^(5,31). KAAA supplementation produced a 10% increase in resting glucose levels that were maintained even after exercise. Since KAAA is a mixture of ketogenic and glucogenic keto analogues and amino acids, we postulate that KAAA provide glucose for exercise. It is important to state that the use of the amino acids from KAAA as carbon skeleton donors augments the net ammonia release. On the other hand, the anaplerosis using the keto analogues does not increase ammonia release. However, both situations increase ATP synthesis, leading to a decelerating ammonia production due to AMP deamination.

The results of the present study showed that KAAA supplementation exacerbated blood lactate levels after exercise. It is known that lactate is formed during glycolysis in active skeletal muscles and many conditions can attenuate lactate levels during exercise, such as muscle glycogen depletion⁽³²⁾. Thus, such alterations in the present study may be explained by KAAA providing glucose for exercise through gluconeogenesis. Since the central nervous system has no effective urea cycle and depends on the synthesis of glutamine for removal of the excess ammonia^(9,33), high levels of blood ammonia have been proposed to be related to the development of both local and central fatigue^(9,21,34). Here, we describe for the first time that acute supplementation of KAAA can be used to reduce the increase in ammonia levels caused by resistance exercise. The practical significance of these findings may be important for the individual exerciser and merits further research to examine the efficacy of chronic KAAA intake. Therefore, we believe that the present study contributes important data to our understanding of metabolism and that these findings could be helpful for the development of future therapies.

Acknowledgements

The present study was supported in part by Tiradentes University.

R. D. A., E. S. P. and L.-C. C. were responsible for the study design. All authors contributed to data collection and interpretation, and manuscript writing.

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Wilkinson DJ, Smeeton NJ & Watt PW (2010) Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol* **91**, 200–219.
2. Felipe V & Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* **67**, 259–279.
3. Bassini-Cameron A, Monteiro AN, Gomes A, *et al.* (2008) Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. *Br J Sports Med* **42**, 260–266.
4. Alvear-Ordenes I, García-López, De Paz JA, *et al.* (2005) Sweat lactate, ammonia, and urea in rugby players. *Int J Sports Med* **26**, 632–637.
5. Roeykens J, Magnus L, Rogers R, *et al.* (1998) Blood ammonia–heart rate relationship during graded exercise is not influenced by glycogen depletion. *Int J Sports Med* **19**, 26–31.
6. Snow R, Carey M, Stathis C, *et al.* (2000) Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol* **88**, 1576–1580.
7. Graham TE & MacLean DA (1992) Ammonia and amino acid metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Can J Physiol Pharmacol* **70**, 132–141.
8. Hellsten Y, Richter EA, Kiens B, *et al.* (1999) AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol* **520**, 909–920.
9. Nybo L, Dalsgaard MK, Steensberg A, *et al.* (2005) Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *J Physiol* **15**, 285–290.
10. Hirai T, Minatogawa Y, Hassan AM, *et al.* (1995) Metabolic interorgan relations by exercise of fed rats: carbohydrates, ketone body, and nitrogen compounds in splanchnic vessels. *Physiol Behav* **57**, 515–522.
11. Meneguello MO, Mendonça JR, Lancha AH Jr, *et al.* (2003) Effect of arginine, ornithine and citrulline supplementation upon performance and metabolism of trained rats. *Cell Biochem Funct* **21**, 85–91.
12. Walser M (1990) Role of branched-chain ketoacids in protein metabolism. *Kidney Int* **38**, 595–604.
13. Savica V, Santoro D, Ciolino F, *et al.* (2005) Nutritional therapy in chronic kidney disease. *Nutr Clin Care* **8**, 70–76.
14. Wu G (2009) Amino acids: metabolism, functions and nutrition. *Amino Acids* **37**, 1–17.
15. Walser M (1975) Ketoacids in the treatment of uremia. *Clin Nephrol* **3**, 180–186.
16. Furst P (1989) Amino acid metabolism in uremia. *J Am Coll Nutr* **8**, 310–323.
17. Walser M (1975) Nutritional effects of nitrogen-free analogues of essential amino acids. *Life Sci* **17**, 1011–1020.
18. Johansen KL (2005) Exercise and chronic kidney disease: current recommendations. *Sports Med* **35**, 485–499.
19. Burns J, Cresswell E, Ell S, *et al.* (1978) Comparison of the effects of keto acid analogues and essential acids on nitrogen homeostasis in uremic patients on moderately protein restricted diets. *Am J Clin Nutr* **31**, 1767–1775.
20. Tamaki T, Shuichi U & Shoichi N (1992) A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc* **24**, 881–886.
21. Banister EW & Cameron BJ (1990) Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med* **11**, 129–142.
22. Olde Damink SW, Deutz NE, Dejong CH, *et al.* (2002) Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int* **41**, 177–188.
23. Pimentel JL Jr, Brusilow SW & Mitch WE (1994) Unexpected encephalopathy in chronic renal failure: hyperammonemia complicating acute peritonitis. *J Am Soc Nephrol* **5**, 1066–1073.
24. Deferrari G, Garibotto G, Robaudo C, *et al.* (1981) Brain metabolism of amino acids and ammonia in patients with chronic renal insufficiency. *Kidney Int* **20**, 505–510.
25. Cupisti A, Licitra R, Chisari C, *et al.* (2004) Skeletal muscle and nutritional assessment in chronic renal failure patients on a protein-restricted diet. *J Intern Med* **255**, 115–124.

26. Gibala MJ, Lozej M, Tarnopolsky MA, *et al.* (1997) Low glycogen and branched-chain amino acid ingestion do not impair anaplerosis during exercise in humans. *Am J Physiol* **272**, E239–E244.
27. Gibala MJ, MacLean C, Graham TE, *et al.* (1998) Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size and estimated cycle flux in human muscle during exercise. *Am J Physiol* **275**, E235–E242.
28. Carvalho-Peixoto J, Alves RC & Cameron LC (2007) Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* **32**, 1186–1190.
29. Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, *et al.* (2008) High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med* **42**, 589–593.
30. Zhao F, Xu S, Du L, *et al.* (2000) AMP makes native snake muscle fructose-1,6-bisphosphatase to an alkaline enzyme. *Sci China C Life Sci* **43**, 1–7.
31. Bruce M, Constantini-Teodosiou D, Greenhaff PL, *et al.* (2001) Glutamine supplementation promotes anaplerosis but not oxidative energy delivery in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **280**, E669–E675.
32. Mourtzakis M & Graham TE (2002) Glutamate ingestion and its effects at rest and during exercise in humans. *J Appl Physiol* **93**, 1251–1259.
33. Suárez I, Bodega G & Fernandez B (2002) Glutamine synthase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int* **41**, 123–142.
34. Cooper AJ (2001) Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **7**, 280–286.

Capítulo III

Artigo publicado no OMICS: A Journal of Integrative Biology

Resende NM, Magalhães-Neto AM, Bachini F, Castro LE, Bassini A, Cameron LC. Metabolic changes during a field experiment in a world-class windsurfing athlete: a trial with multivariate analyses. OMICS. 2011 Oct;15(10):695-704.

Metabolic Changes During a Field Experiment in a World-Class Windsurfing Athlete: A Trial with Multivariate Analyses

Nathália Maria Resende,^{1,2} Anibal Monteiro de Magalhães Neto,^{1,2,3} Flávio Bachini,¹
Luís Eduardo Viveiros de Castro,^{1,4,5} Adriana Bassini,¹ and L.C. Cameron^{1,2,5,6}

Abstract

Physical exercise affects hematological equilibrium and metabolism. This study evaluated the biochemical and hematological responses of a male world-class athlete in sailing who is ranked among the top athletes on the official ISAF ranking list of windsurfing, class RS:X. The results describe the metabolic adaptations of this athlete in response to exercise in two training situations: the first when the athlete was using the usual training and dietary protocol, and the second following training and nutritional interventions based on a careful analysis of his diet and metabolic changes measured in a simulated competition. The intervention protocol for this study consisted of a 3-month facility-based program using neuromuscular training (NT), aerobic training (AT), and nutritional changes to promote anabolism and correct micronutrient malnutrition. Nutritional and training intervention produced an increase in the plasma availability of branched-chain amino acids (BCAAs), aromatic amino acids (AAAs), alanine, glutamate, and glutamine during exercise. Both training and nutritional interventions reduced ammonemia, uricemia, and uremia. In addition, we are able to correct a significant drop in potassium levels during races by correct supplementation. Due to the uniqueness of this experiment, these results may not apply to other windsurfers, but we nonetheless had the opportunity to characterize the metabolic adaptations of this athlete. We also proposed the importance of in-field metabolic analyses to the understanding, support, and training of world-class elite athletes.

Introduction

PHYSICAL EXERCISE AFFECTS hematological equilibrium and metabolism (Ament and Verkerke, 2009; Rose and Richter, 2009). When energy demands increase, muscle glycogen, free amino acids, and fat are used as substrates to maintain muscle contraction (Westertep, 2010). Blood metabolites have been used to understand exercise intensity and muscle injury (Bassini-Cameron et al., 2007, 2008). Both the amount and the kinetics of the blood levels of these biomarkers and molecules are correlated with the damage caused by physical exercise (Bessa et al., 2008; Burd et al., 2009). Indeed, these responses together can be used as a tool to manage training, thereby increasing metabolic adaptation to exercise stress (Coffey and Hawley, 2007).

Some theories have suggested that the metabolism of amino acids plays an important role in producing central fatigue (for an elegant review, see Wilkinson et al., 2010). At the end of the 1980s, Blomstrand and colleagues (1988) proposed in a series of articles that central fatigue could be related to the plasma concentrations of aromatic (AAA) and branched-chain (BCAA) amino acids, their ratio and their relationship with tryptophan availability and serotonin production. However, some data have shown that tryptophan supplementation can extend exercise (Javierre et al., 2010; Segura and Ventura, 1988). In the 1990s, Banister and Cameron (1990) proposed that the increase in ammonia during exercise could lead to central fatigue. Because hyperammonemia has been linked to several central nervous system (CNS) conditions, it is probably linked to the

¹Laboratory of Biochemistry of Proteins, Federal University of State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

²Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

³Biological and Health Sciences Institute, Federal University of Mato Grosso, Mato Grosso, Brazil.

⁴Brazilian Olympic Committee, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵Graduate Program in Neurology, Federal University of State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁶Graduate Program in Human Movement Science—University Castelo Branco, Rio de Janeiro, Brazil.

glutamatergic system (Cauli et al., 2008). It is likely that adequate training and diet can improve the cellular machinery, thereby expanding chemical energy accumulation and transduction. These improvements can lead to better energy metabolism by decreasing the deleterious effects of metabolites and increasing both physical and mental performance (de Almeida et al., 2010; Prado et al., 2011).

Windsurfing is a water sport that mixes surfing and sailing (Sedlacek, 2009). Its practice depends on three basic conditions: the athlete, environment, and equipment. Little is known about metabolism in windsurfing athletes because most articles in this area have focused on physiological parameters (Campillo et al., 2007; Castagna et al., 2007, 2008; Chamari et al., 2003; Melis et al., 2003; Pérez-Turpin et al., 2009; Vogiatzis et al., 2002) and injuries (Dyson et al., 2006; Hetsroni et al., 2006; McCormick and Davis, 1988; Nathanson and Reinert, 1999; Nathanson et al., 2008; Neville and Folland, 2009; Nickel et al., 2004; Orchard et al. 2002; Petersen et al., 2003).

The tactical and strategic decisions needed during a windsurfing competition require a mixture of force and resistance training. In this study, we evaluated a world champion windsurfer who is ranked among the top athletes by the official International Sailing Federation (ISAF) ranking. We investigated metabolic changes in response to a simulated competition in an in-field investigation and metabolic responses to a nutritional and training intervention.

Materials and Methods

Subject

This study evaluated a male world-class athlete in sailing from the windsurfing discipline, class RS:X. The athlete was well instructed regarding the procedures and signed a written informed consent. The study was approved by the Ethics Committee for Human Research of the Federal University of State of Rio de Janeiro and conformed to the requirements and guidance for carrying out research in human subjects (Health National Council, Brazil, 2010). During the trials, the athlete did not have health problems or use ergogenic substances or any other drugs. In addition, clinical examinations, anthropometric measurements, and laboratory tests were performed. Laboratory tests included hematological and biochemical analyses, which allowed any metabolic anomalies that could affect the results or impair their interpretation to be diagnosed.

Experimental design

We simulated a typical Olympic regatta. The athlete performed a race, rested for 30 min, and then competed in another race. Each race lasted 30 min. Blood samples were collected both before and after the races (T1–T4). An additional sample was collected after 120 min of rest (T5). Note that the experimental design provides information regarding the athlete's metabolic condition before and after the first exercise bout (T1–T2), before and after resting (T2–T3), before and after the second exercise bout (T3–T4), and before and after metabolic recuperation (T4–T5).

Figure 1 shows that blood was collected following in-field situations. The experimental time line and blood collection times (T1–T5) are shown.

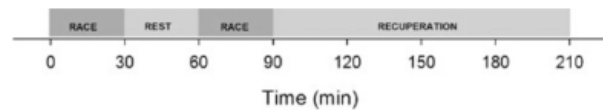


FIG. 1. Experimental design. Blood was collected following in field situations. The experimental timeline and blood collection times (T1–T5) are shown.

Two trials (A and B) were conducted under similar environmental conditions ($^{\circ}\text{C}$; % relative humidity; wind velocity in km/h). The first trial was conducted using regular training and a regular diet. After analysis of the results, diet and training were modified, and the second trial was conducted.

Training interventions

The exercise program was constructed according to the American College of Sports Medicine Guidelines (ACSM Position Stand, 1998). The intervention protocol for this study consisted of a 3-month facility-based program using neuromuscular training (NT) and aerobic training (AT).

The training protocol was designed to strengthen the most important large muscle groups for windsurfing-specific activities and to improve cardiorespiratory capabilities. The athlete was asked to perform the NT twice weekly for 3 h each session for a total of 36 training sessions, and the AT twice weekly for 30 min each session for a total of 24 training sessions on different days from the NT. During each training session, the athlete was under direct supervision from a physical therapist and a trained exercise instructor.

The volume and intensity of the intervention protocol was controlled by oxygen uptake and by a cardiofrequency GPS (Garmin Forerunner[®] 405CX) that continuously recorded time, distance, pace and heart rate during the training.

Nutritional intervention

We suggested that the athlete should keep his regular dietary habits during the trials. During the intervention, we suggested nutritional changes to promote anabolism, achieving an intake of 16 MJ (20% from proteins, 60% from carbohydrates). The athlete was instructed to increase the number of meals to a minimum of six per day. We instructed the athlete to consume high biological-value proteins and carbohydrates in all meals, combining different absorption times from both nutrients (e.g., casein vs. whey protein; starch vs. maltodextrine). We also prescribed an intake of multivitamins and multiminerals to reload micronutrients, especially potassium, immediately before and after training.

Laboratory analysis

Samples for biochemical assays were collected from the antecubital vein and centrifuged ($3,000\times g$; 10 min). All of the blood sampling procedures, centrifugation, and blood storage were carried out immediately after collection to avoid the loss of volatile compounds. Serum and plasma were aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for later analysis. The blood, serum, and plasma were analyzed in duplicate or triplicate, when necessary, and corrected against a standard curve with no fewer than five points.

Biochemical analyses were conducted using an automatic analyzer (ADVIA® 1200 Chemistry System, Siemens, USA). Alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), creatine phosphokinase muscle-brain fraction (CKMB), lactate dehydrogenase (LDH), γ -glutamyltransferase (γ GT), creatinine, glucose, urate, and urea were measured by enzymatic methods. Chloride, phosphate, serum iron, transferrin saturation, and total iron-binding capacity were quantified by colorimetric methods. Sodium and potassium were measured by the ion selective electrode method. Creatine phosphokinase (CK) was measured using a kinetic method, and α -1-acid glycoprotein (AGP) was measured using a turbidimetric method. Albumin and total protein were evaluated by an electrophoretic method. Amino acids were measured by a high-performance liquid chromatography (HPLC) method, and free testosterone was quantified by a radioimmunoassay method. Total testosterone and insulin were assessed by electrochemiluminescence. Erythropoietin, ferritin, and myoglobin were measured by chemiluminescence methods. Total cholesterol, phospholipids, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), very-low-density lipoprotein (VLDL), and total lipids and triacylglycerols (TG) were measured by the Charbroll & Charonnat method.

Samples for hematological assays were collected into a tube with K₃-EDTA (Vacuette, Greiner Bio-One, Germany) and stored at 4°C for later automated analysis (COULTER® STKS™ Hematology Flow Cytometer, Beckman Coulter, Fullerton, CA). White cell counts (total and differential) were performed, and red blood cells and platelets were also measured. We also analyzed coagulation, bleeding time, capillary fragility, clot retraction, platelet count, prothrombin time, and activity by coagulometric methods.

Data presentation

To facilitate visualization and comparison, some data were normalized to the T1 measurement of each trial (absolute values are referenced in each figure). All other data are given as an absolute value.

Results

Branched chain amino acids

Plasma branched chain amino acids (BCAA) were assessed because they play important roles in protein synthesis and are used as a primary energy source by muscles. Our results showed that during trial A, isoleucine decreased by 23% after the first race and did not change thereafter. The plasma amino acid concentration reached 32% of the original level after the second race and remained at this value until after recuperation. The plasma concentration of valine decreased by 21% after the first race and did not change until the second race, during which it decreased an additional 41% (62% total). We were not able to measure a recovery until after recuperation. A similar curve was measured for leucine. Nutritional and training intervention produced a change in BCAA plasma availability. During trial B, isoleucine decreased by 42% during the first race and maintained the same concentration until the end of the second race. After recuperation, the plasma amino acid concentration returned to almost the T1

value. The same happened with both valine and leucine plasma concentrations (Fig. 2).

Aromatic amino acids

Aromatic amino acids (AAA) are ketoglucogenic and can directly be used by hepatocytes for gluconeogenesis. During trial A, our results showed that AAA decreased by nearly 15% after the first race, did not change during the rest period, and then decreased again by approximately 40% after the second

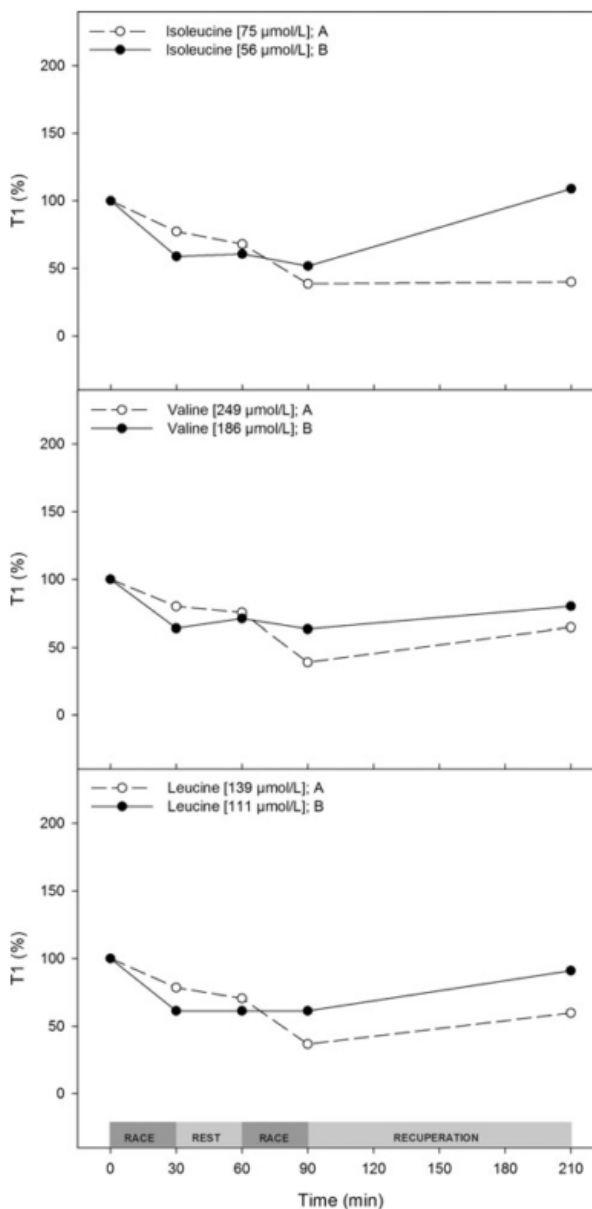


FIG. 2. Intervention decreases BCAA consumption during the second regatta followed by faster restoration of plasma amino acid levels. Trial A (○) and trial B (●) plasma branched chain amino acid (isoleucine, valine, and leucine) levels normalized (%) to the T1 value. T1 values are shown in the inset.

race. We did not measure an increase in the plasma amino acid pool after recuperation. After intervention, the plasma tyrosine concentration remained constant during the trial. Both plasma tryptophan and phenylalanine fluctuated almost 15–20% during the races, never dropping below 100%. Their concentration increased to levels ~30% greater than the pretrial conditions (Fig. 3).

Glutamine, glutamate, and alanine

The measurement of glutamine, glutamate, and alanine concentrations in plasma is important because of their roles in

energy production in metabolism. The plasma concentrations of both glutamine and alanine decreased by more than 50% during trial A and failed to recover during the recuperation period. Plasma glutamate levels fluctuated less (up to 70% of rest). During trial B, no changes were observed in plasma glutamine or alanine levels. In contrast, glutamate showed opposite plasma concentration kinetics when compared to trial A (Fig. 4).

Metabolic pathways

Ammonia is a waste product from the metabolism of amino acids and other nitrogenous compounds. In trial A, ammo-

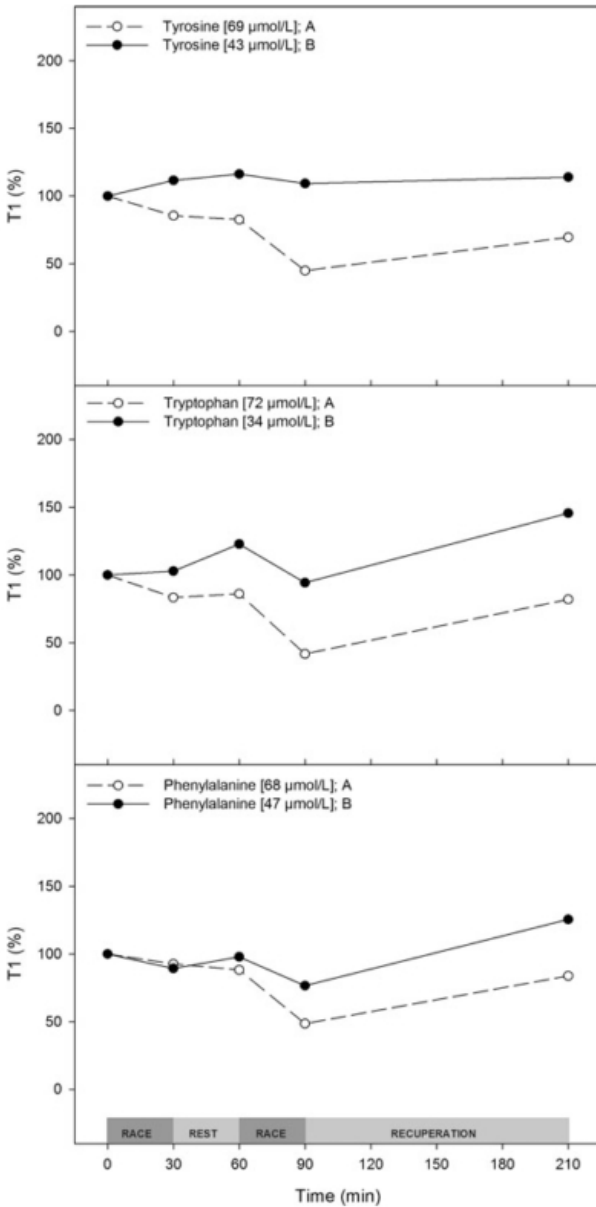


FIG. 3. Intervention decreases the consumption of aromatic amino acids during exercise. Trial A (○) and trial B (●) plasma aromatic amino acid (tyrosine, tryptophan, and phenylalanine) levels normalized (%) to the T1 value. T1 values are shown in the inset.

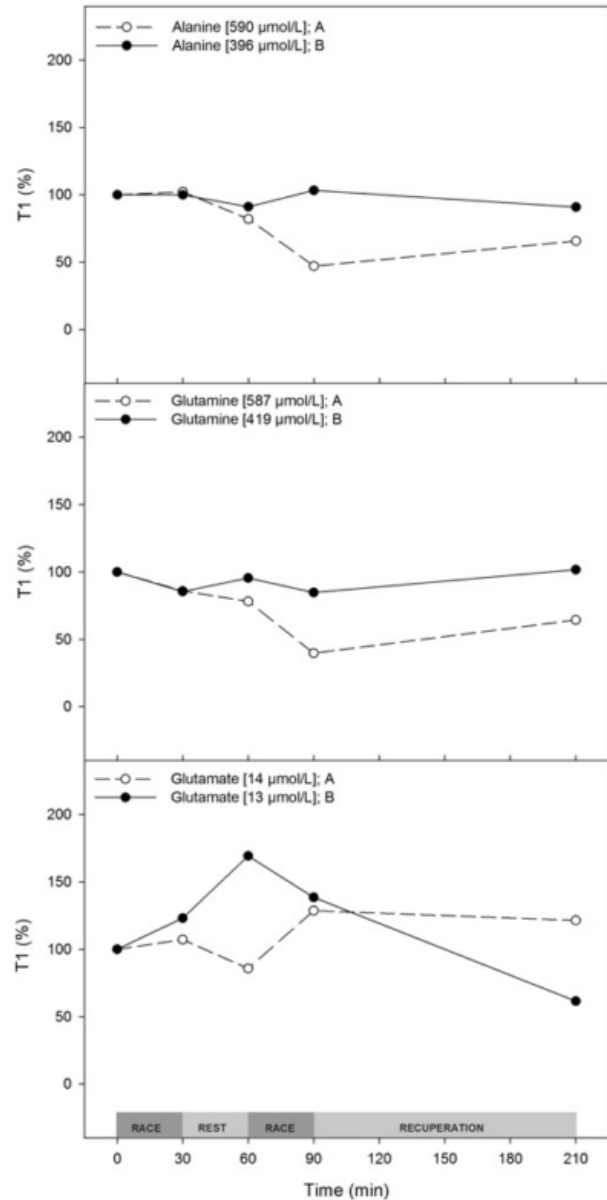


FIG. 4. Both training and diet decrease the use of glutamine and alanine. Trial A (○) and trial B (●) plasma amino acid concentrations normalized (%) to the T1 value. T1 values are shown in the inset.

nemia increased in response to exercise 20–30% more than it did in trial B. In both trials, exercise promoted approximately a sixfold rise in ammonemia after the races, and this returned to initial levels at rest (Fig. 5).

Urate is the final catabolite from purines and is an indicator of the rate of IMP production. To indirectly evaluate the contribution of myokinase to ATP production, we measured plasma urea concentrations. Urate rose nearly 20% more during trial A compared to trial B. During trial A, urate increased by up to 35%, reaching a 60% increase when compared with the prerace value. During trial A, urea consistently rose by approximately 20% with a slower increase during recuperation, reaching a final elevation of 25%. After intervention, the average increase in urea during the entire trial was 5% (Fig. 6).

Gluconeogenesis is one of the destinations of amino acid metabolites. To understand the effects of windsurfing exercise on amino acid metabolism, we measured the changes in both serum glucose and insulin. During trial A, glycemia rose by ~70% after the first race and decreased after the 30-min rest. In the second race, glycemia rose again, reaching a value 43% greater than the prerace value. During trial B, plasma glucose did not change in response to the first race and had a delayed increase compared to trial A. Glucose reached the pretrial values in both trials. Insulin decreased in both trials in response to the two races. In the first race of trial A, insulin decreased by 35% compared to preexercise levels. During the second race, insulin dropped by 55% compared with T1. Insulin returned to the initial concentration after recuperation. During trial B, a similar pattern was observed with a smaller variation when compared with trial A (Fig. 7).

Muscle stress biomarkers

Creatinine, an indicator of exercise muscle injury, increased in both trials. During trial A, the basal plasma creatinine concentration was 10% lower than in trial B, and it increased by ~15–30% during the trial. AST increased by 15–20% during trial A and demonstrated a small fluctuation during trial B. However, the ALT plasma concentration fluctuated by

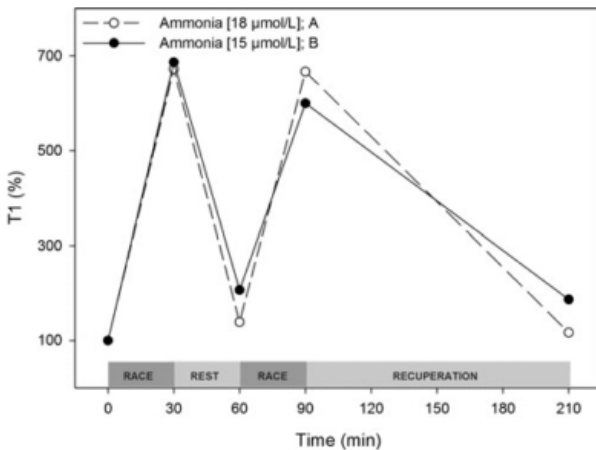


FIG. 5. Intervention does not affect exercise-induced ammonemia. Trial A (○) and trial B (●) ammonia concentrations normalized (%) to the T1 value. T1 values are shown in the inset.

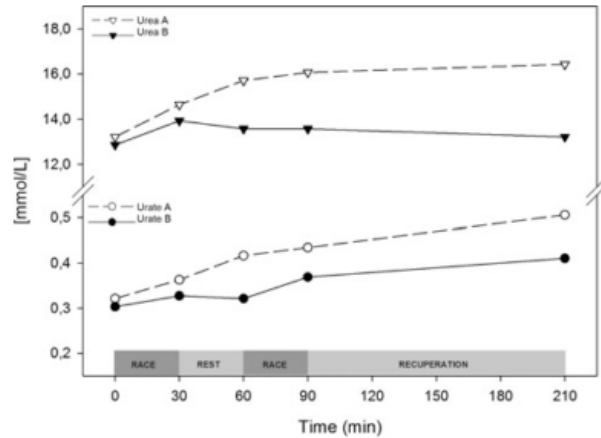


FIG. 6. Interventions reduce both uremia and uricemia increases due to exercise. Trial A (○) and trial B (●) plasma urea and urate concentrations are shown as absolute values (mmol/L).

5–10% in both trials. Other hepatic injury biomarkers, such as ALP, γGT, and AGP, did not change during either trial (data not shown).

The classic muscle injury marker CK increased by approximately 150% during trial A. During trial B, basal CK was almost sevenfold higher than in trial A. However, the plasma concentration of this enzyme showed a 30% fluctuation during trial B. CKMB is a very specific muscle injury marker and

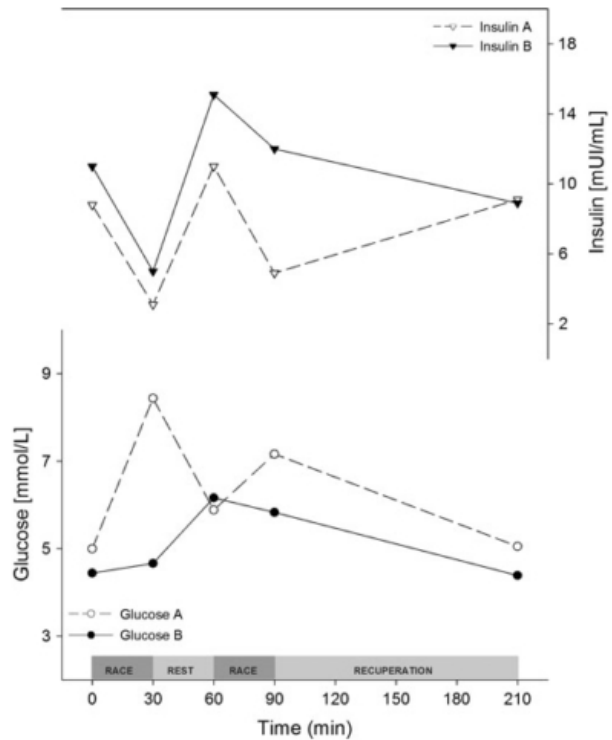


FIG. 7. Intervention decreases glycemic fluctuations. Trial A (○) and trial B (●) plasma insulin and glucose concentrations are shown as absolute values (mUI/mL and mmol/L).

acutely responded to exercise in both trials, with a much greater response in trial A.

LDH is a well-known delayed muscle injury marker, and it increased by up to 40%. In trial B, even with higher basal concentrations of CK and LDH, we observed a much smaller increase in these three markers than what was observed in trial A (Figs. 8 and 9).

During trial A, blood leukocytes increased by approximately 300% after the races and did not change after recuperation. The neutrophil count contributed the most to this increase. Lymphocytes in blood increased in response to exercise and decreased after resting (Fig. 10).

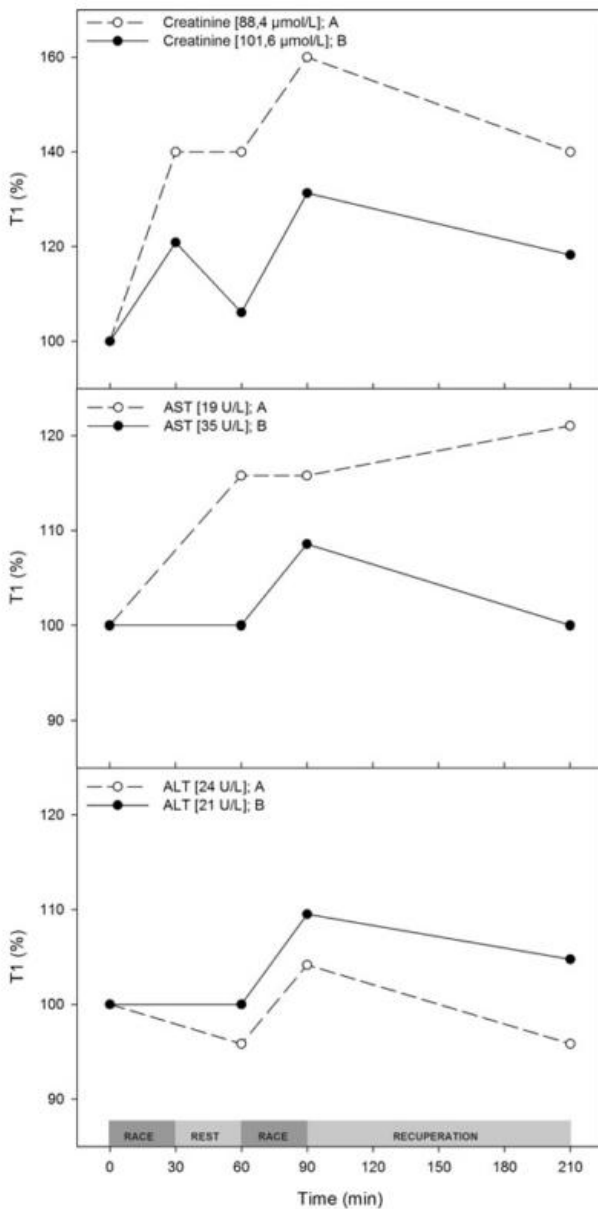


FIG. 8. Changes in stress markers between trials. Trial A (○) and trial B (●) plasma creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels normalized (%) to the T1 value. T1 values are shown in the inset.

Hydroelectrolytic status

No changes in erythrocyte count or hematocrit were found at any time point during either trial (data not shown). Even without signals of dehydration, tropical windsurfing athletes can lose water and electrolytes due to sweating and low rehydration. To evaluate the athlete's blood mineral composition, we measured the main inorganic electrolytes. We did not detect any changes in sodium or chloride during either trial (data not shown). In trial A, phosphate increased by 50–70%

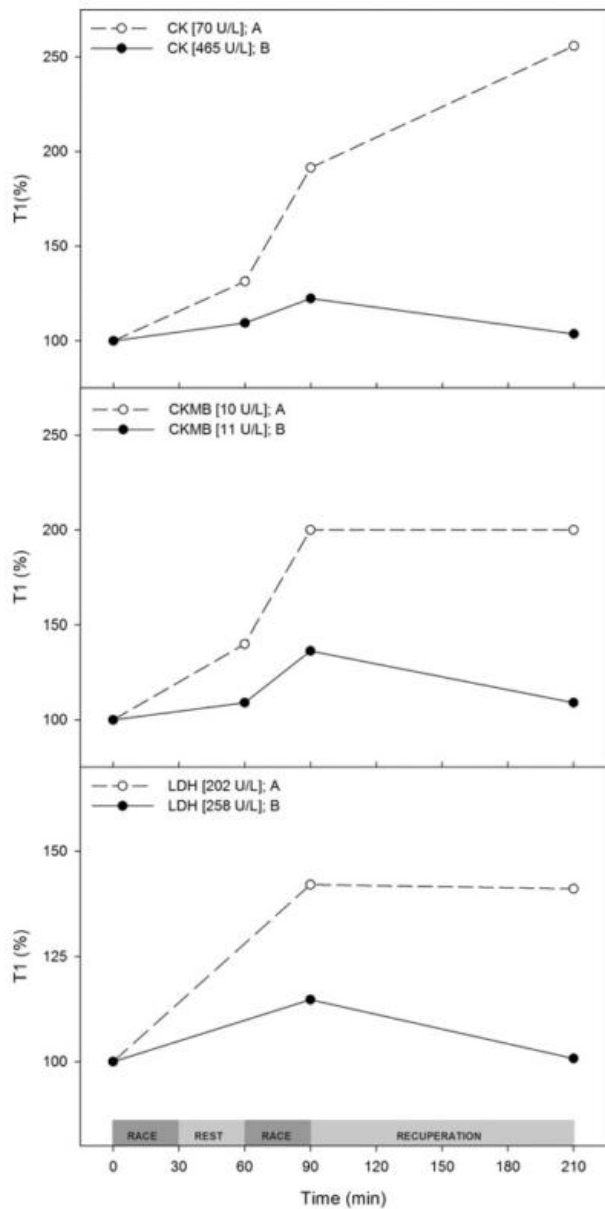


FIG. 9. Physical training associated with diet reduces muscle microinjuries. Trial A (○) and trial B (●) plasma creatine phosphokinase (CK), creatine phosphokinase muscle-brain fraction (CKMB) and lactate dehydrogenase (LDH) levels normalized (%) to the T1 value. T1 values are shown in the inset.

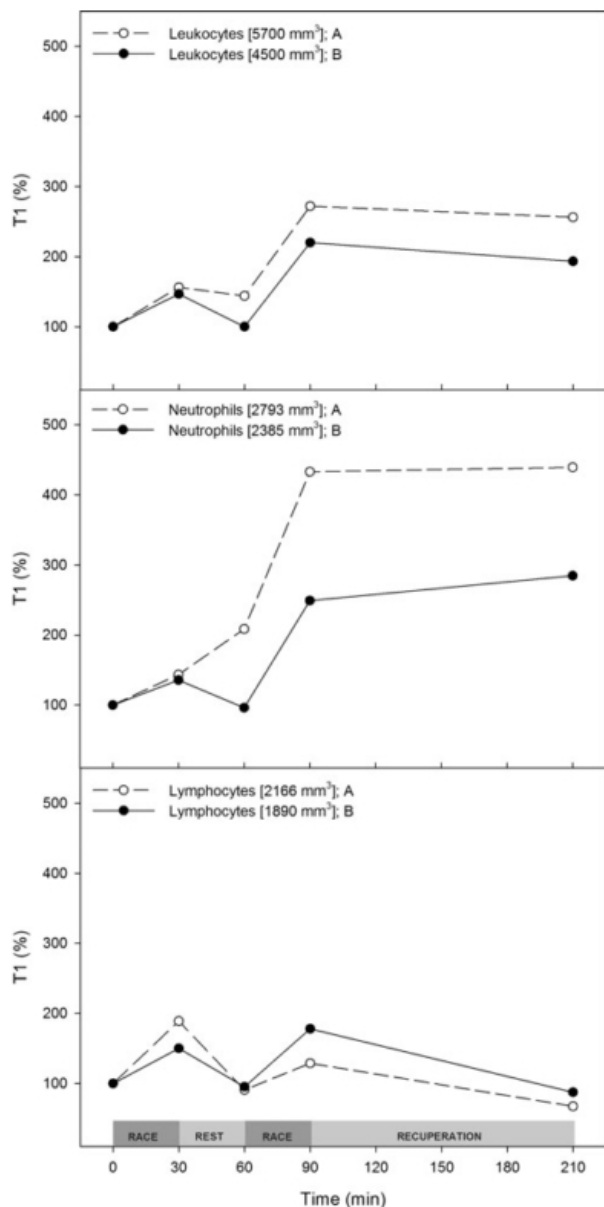


FIG. 10. Intervention changes the neutrophil response. Trial A (○) and trial B (●) plasma white blood cell (leukocytes, neutrophils, and lymphocytes) numbers normalized (%) to the T1 value. T1 values are shown in the inset.

in response to exercise; it decreased after rest but never reached the basal level. This effect was mitigated by the intervention. Potassium levels decreased during trial A to 3.3 mmol/L and slowly recovered during the experimental period without reaching basal levels. These changes were abolished by the intervention (Fig. 11).

Discussion

Windsurfing competitions require that physical preparation be combined with tactical and strategic decision making. Due to the need for rapid CNS responses, it is important to

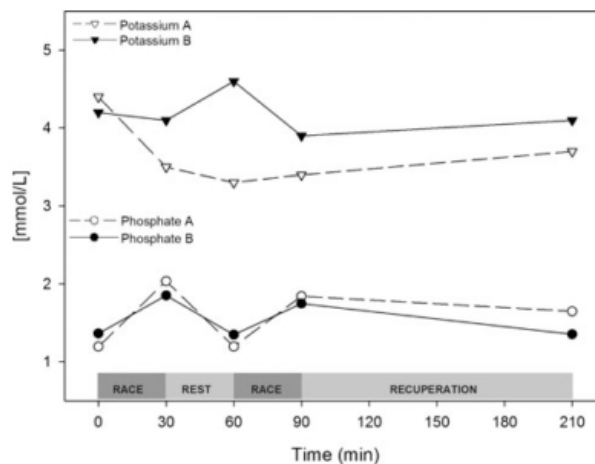


FIG. 11. Interventions prevent kalemia from dropping during the regatta without changing the phosphate response. Trial A (○) and trial B (●) plasma potassium and phosphate concentrations are shown as absolute values (mmol/L).

reduce metabolites that can be deleterious to short-term judgment and/or cognition. In this way, metabolic evaluations can lead to interventions that decrease exercise-induced stress and thereby improve physical and mental performance. Here, we describe a series of metabolic evaluations performed on a world-class windsurfing athlete.

Exercise intensity can be evaluated by increases in the plasma levels of CK, CKMB or LDH (Matsumoto et al., 2009; Rodrigues et al., 2010; Shave et al., 2002). Acute metabolic stress was clearly much greater in trial A than in trial B. In addition, the basal levels of both CK and LDH were higher in trial B. These results suggest that adaptation occurred due to exercise-induced muscle injury during training, resulting in an adjustment of the muscles to exercise-linked stress. In fact, during our studies, plasma AST levels were much higher than those of ALT. It has been show previously by our lab that the AST and ALT biomarkers are also related to hepatic injury. These biomarkers can be used to monitor muscle stress when compared with increases in γ GT and alkaline phosphatase (Bassini-Cameron et al., 2007).

It is a well-documented fact that white blood cells are released in response to exercise, and neutrophil release is linked to exercise intensity and duration (Bessa et al., 2008). This effect seems to be regulated by differential cytokine release (Giraldo et al, 2009; Li and Gleeson, 2004). In our study, leukocytes increased by almost 300% in response to trial A, an effect mostly due to the increase in neutrophils (>400%). After intervention, leukocyte and neutrophils response increased by approximately 200 and 250%, respectively, compared with rest levels. Neither leukocytes nor neutrophils returned to their basal levels.

The response of white blood cells (WBCs) to exercise seems to depend on both cytokine and myokine regulation (Haugen et al., 2010; Mathur and Pedersen, 2008; Pedersen et al., 2007). In this study, we measured an acute increase of lymphocytes in response to each exercise bout, which returned to basal levels after exercise stress. Metabolic stress is correlated with the increase in WBCs in response to exercise. In fact, increases in carbohydrate availability and cortisol response, a gluconeogenic hormone,

have been used as a link in integrated WBC and metabolic pathways (Peake et al., 2005). Some of our results suggest an increase in metabolic reserves after the intervention, measured as a decrease in gluconeogenesis.

Alanine, glutamine, and BCAA levels in the blood were severely depleted during the first trial. In fact, even after recuperation, their levels remained low. BCAAs have different oxidation rates in liver and muscle (for a review, see Harper et al., 1984). Isoleucine seemed to be somewhat more affected than valine and leucine, which can be explained by the fact that isoleucine is a precursor of glutamine and alanine, which are the most important gluconeogenic amino acids. Similarly, AAAs, which are generally metabolized in hepatocytes, were consumed less during the first exercise bout of trial A and then decreased quickly after the second bout. Phenylalanine and BCAA were similarly consumed in both trials, but with a different pattern regarding recuperation. However, the plasma concentration of Tyr and Trp did not change after the intervention. These data fit the current understanding of the interorgan metabolism of the BCAAs glutamine and arginine proposed by Wu's group (Li et al., 2007; Wu, 2009). In fact, it is reasonable to suppose that because the concentration of an amino acid in blood affects its ratio in the brain (Crowell et al., 1990), it is very important to establish training goals that lead to the maintenance of plasma amino acid levels.

In the first race of trial A, even with an ~70% increase in glycemia, insulin decreased to 35% of its preexercise levels. This is a well-described metabolic effect that occurs during exercise in the presence of catecholamines (Bangsbo et al., 2007; Kraemer and Ratamess, 2005). In fact, in trial A, glucose increased during exercise in a typical gluconeogenic response. After the intervention, BCAAs, which are still being consumed during exercise, reacted better to the recuperation step. In addition, alanine, glutamine and AAA plasma concentrations were almost unaffected. These data suggest that in trial A, amino acids were being used by the muscles as an energy source and by the liver to produce glucose. A similar result showing that carbohydrate availability and insulin secretion are linked to training conditions was recently reported (Mikulski et al., 2010). These data reinforce the idea of a greater metabolic stress in trial A than in trial B.

Multiple studies have shown that various diet adequacies and supplementations can decrease ammonia production in response to exercise (Bassini-Cameron et al., 2008; Carvalho-Peixoto et al., 2008). This decrease in ammonemia is mainly due to decreased myokinase demand, which is in turn is due to an increase in ATP production from other metabolic sources (Almeida and Cabral, 2010). In both trials, ammonia increased after exercise bouts and returned to basal levels during rest and recuperation. To reinforce these analyses, we were able to show that urea increased in trial A, but we saw only a small increase in trial B. Urate levels also showed a smaller increase in trial B compared with trial A. Because urea is the final product of ammonia metabolism and urate is the final product of purine metabolism, it is reasonable to propose that the intervention could promote a metabolic adaptation that decreased the amount of ATP generated by myokinase by the use of amino acids.

Our data suggest that the intervention abolished the potassium response to exercise observed in trial A. Phosphate levels were also moderated by the intervention. These minerals participate in many metabolic processes, including

muscle contraction, normal heart rhythm, nerve impulse conduction, oxygen transport, oxidative phosphorylation, enzyme activation, immune functions, antioxidant activity, bone health, and regulating blood pH. An adequate amount of minerals is necessary for optimal functioning of processes that are accelerated during exercise (Dressendorfer et al., 2002; Speich et al., 2001; Williams, 2005).

In this study, we evaluated metabolic adaptation in a world champion windsurfer in two different training situations: the first when the athlete was using the usual training and dietary protocols, and the second after a careful analysis of his diet and in-field metabolic changes as measured in a simulated competition. To summarize, we propose that, in response to the dietetic and training intervention, BCAA consumption was decreased during the second race and AAA, Ala, Glu, and Gln blood consumption was protected. It seems that the intervention also promoted a decrease in ammonemia, uricemia, and uremia in response to exercise. As a corollary to the diminished metabolic stress, inflammatory and muscle injury markers also decreased, which could show that the intervention had a positive effect on the athlete's response to exercise.

During the last decade in our laboratory, we have used exercise together with dietary modifications to cause metabolic stress in our studies of metabolism. Our studies are conducted in the field to mimic the real challenges faced during sports situations. Due to the uniqueness of this approach and the differences between it and standard experimental protocols, we call this approach "sportomics." In this sense, sportomics is the use of "-omics" sciences together with classical clinical laboratory analysis (e.g., enzymatic determinations, ELISA, Western blotting, and other analytical procedures) to understand sport-induced modifications. Due to the uniqueness of this experiment, these results may not apply to other windsurfers, but we nonetheless had the opportunity to characterize the metabolic adaptations of this athlete. We also propose the importance of in-field metabolic analyses in the understanding, support, and training of elite athletes.

Author Disclosure Statement

The authors declare that no conflicting financial interests exist.

References

- Almeida TS, Cabral BJ. (2010). Ab initio approach to the electronic properties of sodium-ammonia clusters: comparison with ammonia clusters. *J Chem Phys* 132, 094307.
- Ament W, Verkerke GJ. (2009). Exercise and fatigue. *Sports Med* 39, 389–422.
- American College of Sports Medicine Position Stand. (1998). The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 30, 975–991.
- Bangsbo J, Iaia FM, Krstrup P. (2007). Metabolic response and fatigue in soccer. *Int J Sports Physiol Perform* 2, 111–127.
- Banister EW, Cameron BJ. (1990). Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med* 11(Suppl 2):S129–S142.
- Bassini-Cameron A, Sweet E, Bottino A, Bittar C, Veiga C, Cameron LC. (2007). Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions. *Br J Sports Med* 41, 523–530.

- Bassini-Cameron A, Monteiro A, Gomes A, Werneck-de-Castro JP, Cameron LC. (2008). Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. *Br J Sports Med* 42, 260–266.
- Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, Gandra PG, Nunes LS, Bassini-Cameron A, et al. (2008). High-intensity ultra-endurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med* 42, 589–593.
- Blomstrand E, Celsing F, Newsholme EA. (1988). Changes in plasma concentrations of aromatic and branched-chain amino acids during sustained exercise in man and their possible role in fatigue. *Acta Physiol Scand* 133, 115–121.
- Burd NA, Tang JE, Moore DR, Phillips SM. (2009). Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J Appl Physiol* 106, 1692–1701.
- Campillo P, Leszczynski B, Marthe C, Hespel JM. (2007). Electromyographic analysis on a windsurfing simulator. *J Sports Sci Med* 6, 135–141.
- Carvalho-Peixoto J, Alves RC, Cameron LC. (2007). Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 1186–1190.
- Castagna O, Vaz Pardal C, Brisswalter J. (2007). The assessment of energy demand in the new Olympic windsurf board: Neilpryde RS:X. *Eur J Appl Physiol* 100, 247–252.
- Castagna O, Brisswalter J, Lacour JR, Vogiatzis I. (2008). Physiological demands of different sailing techniques of the new Olympic windsurfing class. *Eur J Appl Physiol* 104, 1061–1067.
- Cauli O, Rodrigo R, Boix J, Piedrafita B, Agusti A, Felipe V. (2008). Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G503–G511.
- Chamari K, Moussa-Chamari I, Galy O, Chaouachi M, Koubaa D, Hassen CB, et al. (2003). Correlation between heart rate and performance during Olympic windsurfing competition. *Eur J Appl Physiol* 89, 387–392.
- Coffey VG, Hawley JA. (2007). The molecular bases of training adaptation. *Sports Med* 37, 737–763.
- Crowell PL, Block KP, Repa JJ, Torres N, Nawabi MD, Buse MG, et al. (1990). High branched-chain alpha-keto acid intake, branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity, and plasma and brain amino acid and plasma keto acid concentrations in rats. *Am J Clin Nutr* 52, 313–319.
- de Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, Magalhaes-Neto A, Cameron LC. (2010). Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. *Br J Nutr* 104, 1438–1442.
- Dressendorfer RH, Petersen SR, Lovshin SE, Keen CL. (2002). Mineral metabolism in male cyclists during high-intensity endurance training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 12, 63–72.
- Dyson R, Buchanan M, Hale T. (2006). Incidence of sports injuries in elite competitive and recreational windsurfers. *Br J Sports Med* 40, 346–350.
- Giraldo E, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. (2009). Exercise intensity-dependent changes in the inflammatory response in sedentary women: role of neuroendocrine parameters in the neutrophil phagocytic process and the pro-/anti-inflammatory cytokine balance. *Neuroimmunomodulation* 16, 237–244.
- Harper AE, Miller RH, Block KP. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 4, 409–454.
- Haugen F, Norheim F, Lian H, Wensaas AJ, Dueland S, Berg O, et al. (2010). IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C807–C816.
- Hetsroni I, Mann G, Ayalon M, Frankl U, Nyska M. (2006). Extensor digitorum longus tendonitis in windsurfing due to footstrap fixation. *Clin J Sport Med* 16, 74–75.
- Javierre C, Segura R, Ventura JL, Suárez A, Rosés JM. (2010). L-tryptophan supplementation can decrease fatigue perception during an aerobic exercise with supramaximal intercalated anaerobic bouts in young healthy men. *Int J Neurosci* 120, 319–327.
- Kraemer WJ, Ratamess NA. (2005). Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 35, 339–361.
- Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. (2007). Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 98, 237–252.
- Li TL, Gleeson M. (2004). The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling on leukocyte redistribution, neutrophil degranulation, IL-6, and plasma stress hormone responses. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14, 501–516.
- Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm* 2008;2008: 109502.
- Matsumoto K, Koba T, Hamada K, Sakurai M, Higuchi T, Miyata H. (2009). Branched-chain amino acid supplementation attenuates muscle soreness, muscle damage and inflammation during an intensive training program. *J Sports Med Phys Fitness* 49, 424–431.
- McCormick DP, Davis AL. (1988). Injuries in sailboard enthusiasts. *Br J Sports Med* 22, 95–97.
- Melis F, Crisafulli A, Rocchitta A, Tocco F, Concu A. (2003). Does reduction of blood prolactin levels reveal the activation of central dopaminergic pathways conveying reward in top athletes? *Med Hypotheses* 61, 133–135.
- Mikulski T, Ziemba A, Nazar K. (2010). Metabolic and hormonal responses to body carbohydrate store depletion followed by high or low carbohydrate meal in sedentary and physically active subjects. *J Physiol Pharmacol* 61, 193–200.
- Nathanson AT, Reinert SE. (1999). Windsurfing injuries: results of a paper- and Internet-based survey. *Wilderness Environ Med* 10, 218–225.
- Nathanson AT, Fischer EG, Mello MJ, Baird J. (2008). Injury and illness at the Newport-Bermuda race 1998–2006. *Wilderness Environ Med* 19, 129–132.
- Neville V, Folland JP. (2009). The epidemiology and aetiology of injuries in sailing. *Sports Med* 39:129–145.
- Nickel C, Zernial O, Musahl V, Hansen U, Zantop T, Petersen W. (2004). A prospective study of kitesurfing injuries. *Am J Sports Med* 32, 921–927.
- Orchard J, James T, Alcott E, Carter S, Farhart P. (2002). Injuries in Australian cricket at first class level 1995/1996 to 2000/2001. *Br J Sports Med* 36, 270–275.
- Peake J, Wilson G, Mackinnon L, Coombes JS. (2005). Carbohydrate supplementation and alterations in neutrophils, and plasma cortisol and myoglobin concentration after intense exercise. *Eur J Appl Physiol* 93, 672–678.
- Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 103, 1093–1098.
- Pérez-Turpin JA, Cortell-Tormo JM, Suárez-Llorca C, Andreu-Cabrera E, Llana-Belloch S, Pérez-Soriano P. (2009). Relationship between anthropometric parameters, physiological responses, routes and competition results in formula windsurfing. *Acta Kinesiol Univ Tartuensis* 14, 95–110.
- Petersen W, Rau J, Hansen U, Zantop T, Stein V. (2003). Mechanisms and prevention of windsurfing injuries. *Sportverletz Sportschaden* 17, 118–122.

- Prado ES, de Rezende Neto JM, de Almeida RD, Doria de Melo MG, Cameron LC. (2011). Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions. *Br J Nutr* 16, 1–5.
- Rodrigues BM, Dantas E, de Salles BF, Miranda H, Koch AJ, Willardson JM, et al. (2010). Creatine kinase and lactate dehydrogenase responses after upper-body resistance exercise with different rest intervals. *J Strength Cond Res.* 24, 1657–1662.
- Rose AJ, Richter EA. (2009). Regulatory mechanisms of skeletal muscle protein turnover during exercise. *J Appl Physiol* 106, 1702–1711.
- Sedlaczek P. (2009). History, cultural context and terminology of Windsurfing. *Stud Phys Cult Tour* 16, 115–123.
- Segura R, Ventura JL. (1988). Effect of L-tryptophan supplementation on exercise performance. *Int J Sports Med* 9:301–305.
- Shave R, Dawson E, Whyte G, George K, Ball D, Collinson P, Gaze D. (2002). The cardiospecificity of the third-generation cTnT assay after exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc* 34, 651–654.
- Speich M, Pineau A, Ballereau F. (2001). Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clin Chim Acta* 312, 1–11.
- Vogiatis I, De Vito G, Rodio A, Madaffari A, Marchetti M. (2002). The physiological demands of sail pumping in Olympic level windsurfers. *Eur J Appl Physiol* 86, 450–454.
- Westerterp KR. (2010). Physical activity, food intake, and body weight regulation: insights from doubly labeled water studies. *Nutr Rev* 68, 148–154.
- Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. (2010). Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol* 91, 200–219.
- Williams MH. (2005). Dietary supplements and sports performance: minerals. *J Int Soc Sports Nutr* 2, 43–49.
- Wu G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1–17.

Address correspondence to:

L.C. Cameron

Laboratory of Protein Biochemistry

UNIRIO

Rio de Janeiro, Brazil

E-mail: cameron@unirio.br

Capítulo IV

Artigo publicado no *Medicine & Science in Sports & Exercise*

Bassini A, Magalhães-Neto AM, Sweet E, Bottino A, Veiga C, Tozzi MB, Pickard MB, Cameron LC. Caffeine decreases systemic urea in elite soccer players during intermittent exercise. Med Sci Sports Exerc. 2012 Nov 6.

. . . Published ahead of Print

Caffeine Decreases Systemic Urea in Elite Soccer Players during Intermittent Exercise

Adriana Bassini^{1,2}, Aníbal M. Magalhães-Neto^{1,2,3}, Eric Sweet⁴, Altamiro Bottino⁵, Carlos Veiga⁶, Marta B. Tozzi⁷, Megan B. Pickard⁸, Luiz-Claudio Cameron^{1,2}

¹Laboratory of Biochemistry of Proteins, Federal University of State of Rio de Janeiro, Brazil

²Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Brazil

³Biological Sciences and Health Institute, Federal University of Mato Grosso, Brazil

⁴Institute of Neurology Deolindo Couto, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

⁵Botafogo de Futebol and Regatas, Rio de Janeiro, Brazil

⁶National Institute of Traumatic Orthopedics, Rio de Janeiro, Brazil

⁷Jockey Clube Brasileiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁸Department of Psychology, University of Virginia, United States of America

Accepted for Publication: 15 October 2012

Medicine & Science in Sports & Exercise® **Published ahead of Print** contains articles in unedited manuscript form that have been peer reviewed and accepted for publication. This manuscript will undergo copyediting, page composition, and review of the resulting proof before it is published in its final form.

Please note that during the production process errors may be discovered that could affect the content.

Copyright © 2012 American College of Sports Medicine

Caffeine Decreases Systemic Urea in Elite Soccer Players during Intermittent Exercise

Adriana Bassini^{1,2}, Aníbal M. Magalhães-Neto^{1,2,3}, Eric Sweet⁴, Altamiro Bottino⁵, Carlos Veiga⁶, Marta B. Tozzi⁷, Megan B. Pickard⁸ and Luiz-Claudio Cameron^{1,2*}

¹Laboratory of Biochemistry of Proteins - Federal University of State of Rio de Janeiro, Brazil

²Institute of Genetics and Biochemistry - Federal University of Uberlândia, Brazil

³Biological Sciences and Health Institute - Federal University of Mato Grosso, Brazil

⁴Institute of Neurology Deolindo Couto - Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

⁵Botafogo de Futebol e Regatas - Rio de Janeiro, Brazil

⁶National Institute of Traumatic Orthopedics - Rio de Janeiro, Brazil

⁷Jockey Clube Brasileiro - Rio de Janeiro, Brazil

⁸Department of Psychology - University of Virginia, USA

***Corresponding author:** L. C. Cameron, Ph.D.

Av. Pasteur, 296 - Urca - Rio de Janeiro-RJ - Brazil - CEP 22290-240

Phone: +55 21 2542 5204

Fax: +55 21 2542 5280

E-mail: cameron@unirio.br

Running title: Caffeine decreases exercise-induced uremia

The authors declare that they have no financial competing interests and that no funding agencies supported this project.

Author disclosures: A. Bassini, A.M. Magalhães-Neto, E.W.S. Sweet, A. Bottino, C. Veiga, M.B. Tozzi, M.B. Pickard and L.C. Cameron declare no conflicts of interest.

Abstract

Purpose: We investigated the effects of caffeine on the ammonia and amino acid metabolism of elite soccer players. **Methods:** In the double-blind, randomized study, the athletes (n=19) received 5 mg·kg⁻¹ caffeine or lactose (LEx, control) and performed 45 min of intermittent exercise followed by an intermittent recovery test (Yo-Yo IR2) until exhaustion. The caffeine-supplemented athletes were divided into two groups (CEx and SCEX) depending on their serum caffeine levels (< 900% and > 10,000%, respectively). The data were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test (p < 0.05 was considered to be statistically significant). **Results:** Caffeine supplementation did not significantly affect the performance (LEx, 12.3 ± 0.3 km·h⁻¹, 1449 ± 378 m; CEx, 12.2 ± 0.5 km·h⁻¹, 1540 ± 630 m; SCEX, 12.3 ± 0.5 km·h⁻¹, 1367 ± 330 m). Exercise changed the blood concentrations of several amino acids and increased the serum concentrations of ammonia, glucose, lactate, and insulin. The LEx group showed an exercise-induced increase in valine (~ 29%), which was inhibited by caffeine. Higher serum caffeine levels abolished the exercise-induced increase (~ 24-27%) in glutamine but did not affect the exercise-induced increase in alanine (~110-160%) and glutamate (42-61%). In response to exercise, the SCEX subjects did not exhibit an increase in uremia and showed a significantly lower increase in their serum arginine (15%), citrulline (16%), and ornithine (ND) concentrations. **Conclusion:** Our data suggest that caffeine might decrease systemic urea by decreasing the glutamine serum concentration, which decreases the transportation of ammonia to the liver and thus urea synthesis.

Keywords: valine; arginine; citrulline and ornithine

Introduction

Paragraph Number 1 Athletes have increasingly used caffeine as an ergogenic supplement because it increases the blood epinephrine concentrations, which leads to an increase in the metabolism and promotes a greater power output during high intensity exercise. This effect is associated with increased glucose levels both at rest and during exercise (2). Caffeine also changes the metabolism through the mobilization of free fatty acids and the sparing of glycogen (12). Although several studies have attempted to elucidate the amino acids metabolism during exercise, the combined effects of caffeine and exercise on the amino acid metabolism remain obscure (6, 20, 36, 37).

Paragraph Number 2 In the human body, ammonia (NH_3) is mostly present in its ionized form ammonium (NH_4^+); hereafter, "ammonia" refers to the combination of NH_3 and NH_4^+ . At rest, most of the body's ammonia is produced by enteric microbiota and, to a smaller extent, by either amino acids or the deamination of purine derivatives, mostly AMP (1). The ATP/ADP ratio reflects the energy state of the cell and is effectively regulated by the rate of enzymatic ATP synthesis. During exercise, a decrease in the stored ATP and a transient increase in the ADP levels activate myokinase, which leads to the formation of AMP (3). Both AMP deamination and, to a lesser amount, branched-chain amino acid deamination lead to an increase in the intracellular ammonia, which requires active transport to leave the cytoplasm. The ammonia leaves the cells, enters the blood for further detoxication, and is excreted mostly as urea. Ammonemia increases during exercise in an intensity-dependent manner (5, 7). A hyperammonemic state changes the function of the blood-brain barrier and is postulated to cause different cerebral dysfunctions (8) and central fatigue during exercise through the engagement of the metabotropic glutamate receptors (34, 38).

Paragraph Number 3 We previously proposed that exercise can be used as a tool to study metabolic stress. Also, intermittent exercise, in addition to a continuous exercise protocol, provides invaluable data that can be used to understand metabolic changes (5, 6, 11, 32). We recently proposed a sportomics approach to mimic both the real challenges and the conditions that

are faced during sports situations (10,17,33). Sportomics combines the use of "-omics" sciences with classic clinical laboratory analyses to understand sport-induced modifications.

Paragraph Number 4 In this manuscript, we describe the changes in the concentrations of amino acids and other metabolites in the blood of elite soccer players during caffeine supplementation using a sportomics-designed study. Based on our previous findings, we hypothesize that caffeine might affect both ammonia genesis and metabolism during exercise and thus evaluated the effect of this supplement during exercise.

Methods

Subjects

Paragraph Number 5 This double-blind, randomized study was conducted according to the guidelines dictated by the Declaration of Helsinki. All of the procedures involving human subjects were approved by the Ethics Committee for Human Research at the Federal University of the State of Rio de Janeiro (117/2007, renewed in 2011) and met the requirements regulating research on human subjects (Health National Council, Brazil, 1996). The nature of the study and the procedures involved were described to all of the subjects, and written informed consent was obtained from all of the subjects. The experiment was conducted as described in a previous study (6). Briefly, professional soccer players (n = 19) from a major league team affiliated with the Confederação Brasileira de Futebol (CBF, Brazilian Soccer Confederation) voluntarily participated in the study. To maximize the control over the large number of experimental variables that can potentially influence the results, we conducted the experiment during the preparation phase training for the Brazilian Soccer Championship to ensure that all of the athletes had similar diets, training regimes, and resting and sleeping conditions.

Paragraph Number 6 None of the subjects had a medical history of health problems or were using ergogenic substances or any other drugs. In addition, the athletes were subjected to clinical examinations, anthropometric

measurements, and laboratory tests to ensure homogeneity among the groups. The initial laboratory tests included hematological and biochemical analyses, which allowed the diagnosis of any metabolic anomalies that could affect the results or impair their interpretation. As previously described, the 85 biochemical analyses that were conducted allowed us to select individuals with the following conditions: a similar carbohydrate, lipid, and protein metabolism; a similar oxygen transport efficiency; similar macronutrient anabolism and catabolism indicators; a normal water and electrolyte metabolism; no infection or parasitic infestation; a well-balanced body water content; and undisturbed hepatic and renal function (6). All of the subjects exhibited normal metabolic functions, and no differences between the subjects were detected before the experiment (data not shown). In addition, the athletes exhibiting biochemical outliers in the results were removed from the experimental procedure (data not shown). Furthermore, we did not find evidence of hemoconcentration (i.e., < 2%) during the exercise protocol (data not shown).

Experimental design

Paragraph Number 7 Caffeine, xanthine, or any other substance that could mask the results were not ingested by the athletes for 72 h prior to the blood collection. On the day of the experiment, blood was collected from fasting soccer players, i.e., before breakfast (PRE). The players were randomly divided into two groups and provided with a specific breakfast supplemented with either caffeine or lactose.

Paragraph Number 8 After receiving breakfast and the supplements, the subjects were driven to the testing location, which required 15 min. After 20 min of warm up (exercises for articular movement and elongation), the subjects performed the intermittent exercise test protocol under the heart rate accompaniment (Figure 1).

Paragraph Number 9 All of the subjects had previously performed the test twice during the general preparation phase training to ensure their familiarity with the testing procedure. On the day of the test, each subject performed an intermittent exercise protocol. Briefly, this protocol included two sessions of a 45 min variable distance run protocol (VDR) with a 15 min interval in a 50 × 50

m court marked with a 5 × 5 m grid. After finishing the VDR (5 min), the athletes executed the Yo-Yo Intermittent Recovery Test level 2 (Yo-Yo IR2) (4, 27) until exhaustion, finishing 190-200 min after the beginning of the exercise protocol; the test duration depended on the athlete. The athletes received a drink containing electrolytes and glucose (Gatorade®) *ad libitum* throughout the study. Each athlete completed the exercise protocol at different times. The exercise test was immediately followed by the collection of blood, which was then used for the laboratory analyses (POST).

Caffeine supplementation

Paragraph Number 10 As previously described, anthropometric, hormonal, hematological, and biochemical evaluations were performed to guarantee homogeneity among the participants enrolled in the study (6). We randomly divided the soccer players into two groups and measured the urinary amino acids (Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, and Val), which were normalized to the creatinine clearance rate. The different supplements were provided in indistinguishable capsules to ensure that the subjects were not aware of their group assignment. Caffeine (Purifarma, China) was orally administered at a dosage of 5 mg·kg⁻¹, whereas the control group received lactose (Via Farma, Brazil). The lactose content (1 g total) in the capsules was not sufficient to provide a significant amount of metabolizable energy (< 4.2 kJ) that could influence the study results.

Blood sampling

Paragraph Number 11 The venous blood samples were collected from an antecubital vein. Immediately after collection, the blood samples were centrifuged to separate the serum, which was quickly frozen and stored at -70 °C. Due to the nature of the study, we used four phlebotomists to ensure that the blood collection occurred within 2 min of the completion of the exercise protocol. As previously described, distinct biochemical and hematological analyses (biomarkers of hepatic and renal function; evaluations of carbohydrate, lipid, and protein metabolism; indicators of oxygen transport efficiency, macronutrient anabolism and catabolism and water and electrolyte

metabolism) were performed to identify any variables that could affect the metabolic interpretation of the results (data not shown) (6).

Serum caffeine measurement

Paragraph Number 12 Caffeine was identified and measured in the serum through gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using β -naphthoic as an internal control, as previously described (25). The caffeine extraction was performed at a basic pH, and the samples were centrifuged and subjected to solid phase extraction. After elution with chloroform, the solvent was evaporated and the residue was resuspended in dichloromethane. The samples were then dried with nitrogen and resuspended in ethyl acetate. The alkaline extraction (1 μ L) was then analyzed by gas chromatography using a mass selective detector with a 5% phenylmethylsiloxane column, VB-5 crosslinking and a 0.25-mm thick, 30-m long film. Due to the nature of the investigation, we used the World Anti-Doping Agency (WADA) guidelines for the analysis: SCAN mode, injector temperature of 280 °C, detector temperature of 295 °C, and initial column temperature of 60 °C. The column temperature was increased at a rate of 22 °C/min to 200 °C, then at a rate of 10 °C/min to 270 °C, then at a rate of 30 °C/min to 305 °C, and maintained at 305 °C for 6 min.

Caffeine absorption and group assignment

Paragraph Number 13 To evaluate the available caffeine concentration during the experiment, we measured the serum levels of caffeine. No differences were detected in the serum caffeine level among any of the groups before the experiment. In addition, the levels of serum caffeine in the non-supplemented group before and after the test (LEx, n = 8) were compared, and no differences were found. The observed increases in the serum caffeine after supplementation followed two significantly different patterns, which were evaluated as described under the statistical analyses section. Therefore, we divided the supplemented athletes into two different groups: CEx (< 900% increase, n = 5) and SCEX (> 10,000% increase, n = 6). (Figure 2).

Serum amino acid determination

Paragraph Number 14 The concentrations of the amino acids were measured through high-performance liquid chromatography, as previously described (23).

Statistical Analyses

Paragraph Number 15 The data were analyzed by ANOVA using the test condition and the time as the repeated measure variables, which were confirmed using Tukey's post hoc test. Differences with a p-value of less than 0.05 were considered to be statistically significant. The data are expressed as the means \pm standard error.

Results

Effect of caffeine effect on performance

Paragraph Number 16 The VDR and Yo-Yo IR2 tests were used to simulate an exercise state similar to that obtained in a soccer match and to induce exhaustion, respectively. Our assumption that these tests generated a similar exercise intensity in the three studied groups was confirmed through the measured cardiac frequency and the blood lactate concentration, which can be used as an indicator of consistent glucose metabolism. All of the athletes in the three groups showed similar results at the end of the Yo-Yo IR2 test. In addition, we were not able to measure any significant caffeine-induced difference in the athletes' performances (Tables 1 and 2).

Effects of caffeine on metabolism

Paragraph Number 17 Exercise increased the serum concentrations of glucose in the LEx group by 26%. In addition, the experimental protocol significantly increased glycemia by 43% in the CEx group and by 53% in the SCEEx group. The insulin concentration followed the rise in glycemia: 54% increase in the control group and 72% and 84% increases in the caffeine-supplemented groups (CEx and SCEEx, respectively). In our protocol, the caffeine supplementation did not affect the exercise-induced increase in the

glucose, insulin and lactate levels (Table 2).

Paragraph Number 18 Exercise produced similar increases in the serum levels of ammonia (5- to 6-fold) in all three groups. No significant difference was measured in the exercise-induced increase in ammonemia between the groups. However, a significant dose-dependent effect was observed with uremia. The amount of urea rose by 10% in the LEx and CEx groups due to exercise, whereas the subjects with the highest serum caffeine concentrations (SCEX) did not exhibit an exercise-induced increase in uremia. The creatinine concentration in the blood increased due to exercise in all three groups; however, caffeine supplementation was not found to have a significant difference in the creatinine concentration (Table 3).

Paragraph Number 19 Urate is an important metabolite that indirectly measures the level of ammoniogenesis due to AMP deamination. In all three groups, the urate concentration in the blood remained unaffected by either exercise or caffeine supplementation (Table 3).

Effects of caffeine on the serum amino acids

Paragraph Number 20 Caffeine and exercise demonstrated different effects on the serum amino acid concentrations.

Paragraph Number 21 The exercise-induced increases in the serum concentrations of Gly (LEX 26%, CEX 28%), Ser (LEX 27%, CEX 27%) and His (LEX 34%, CEX 36%) were inhibited by the high serum caffeine concentration measured in the SCEX group. The serum Pro concentration increased due to exercise, as measured in the LEX group (38%). This increase was inhibited by caffeine because the two groups that received caffeine did not exhibit a significant increase in the concentration of this amino acid (CEX 26%, SCEX 25%). The serum concentrations of Lys, Thr, Tau, Asn, Asp, and Met were not affected by either exercise or caffeine (Table 4).

Paragraph Number 22 Exercise increased the total serum concentration of the branched-chain amino acids (BCAA) by 28%. This increase was inhibited by caffeine, as demonstrated with both caffeine-supplemented groups (CEX 16%; SCEX 4%). The analysis of the serum Val levels showed that this amino acid was the only BCAA that was significantly affected by caffeine. The control group showed an exercise-induced increase in Val of 29%, which was

dose-dependently repressed by caffeine supplementation (CEx 16%; SCEx 0%). No significant differences were measured in the concentrations of either Leu (LEx 29%; CEx 18%; SCEx 19%) or Ile (LEx 27%; CEx 12%; SCEx 0%) in response to exercise, and no differences in these amino acids were detected among the groups.

Paragraph Number 23 The serum concentration of Trp was not affected by either exercise or caffeine. The Tyr concentration increased in the three groups (LEx 78%; CEx 77%; SCEx 35%) in response to exercise, and caffeine supplementation was not found to have a significant effect. In contrast, the exercise-induced increase in the level of Phe was significantly inhibited by high serum concentrations of caffeine (LEx 53%; CEx 36%; SCEx 11%). Gln and Ala are the major amino acid sources for neoglucogenesis. Higher serum caffeine levels abolished the exercise-induced increase in Gln (LEx 27%; CEx 24%; SCEx 0%) but did not significantly affect the exercise-induced increase in the levels of Ala (LEx 118%; CEx 160%; SCEx 110%) and Glu (LEx 61%; CEx 42%; SCEx 51%) (Table 4).

Paragraph Number 24 Caffeine affected the serum concentrations of the three urea cycle intermediates: Arg, Cit, and Orn. The SCEx group showed a significant attenuation of the exercise-induced increases in the serum levels of Cit (LEx 37%; CEx 48%; SCEx 16%) and Orn (LEx 53%; CEx 47%; SCEx 0%). The serum Arg concentrations were also affected by caffeine (LEx 26%; CEx 7%; SCEx 15%) (Table 4).

Paragraph Number 25 The analyses of the exercise-induced increases in the serum amino acids revealed two effects of caffeine. The serum Ile, Trp, Val, and BCAA concentrations were affected in both caffeine-supplemented groups. However, the serum Orn, Gln, Gly, His, Phe, Ser, and Tyr levels were not strongly affected by the lower caffeine concentration that was used (Table 4).

Discussion

Paragraph Number 26 In the present study, we used a previously published protocol (6) that combines intermittent and exhaustion exercise to determine the effects of caffeine on the serum amino acid levels and the ammonia metabolism of elite soccer players. The interest in our study lies in the fact that we analyze a small portion of the population (those who have achieved a world-class sports level as professional soccer players from a major league team affiliated with the Brazilian Soccer Confederation, i.e., the top athletes in Brazilian soccer) and follow the metabolic changes in response to modifications in both training and diet using an in-field sportomics protocol. To the best of our knowledge, this study is the first investigation to examine the effects of caffeine on human amino acid metabolism during exercise. It is important to reinforce that further studies and observations are required to extrapolate our interpretations due to the number of subjects who were analyzed in this study.

Paragraph Number 27 Based on previous data on the pharmacokinetics and dose-dependence of caffeine during rest and physical exercise (6, 14, 19), a 5 mg·kg⁻¹ dose of caffeine was used in the present study. Our assumption that a similar exercise intensity was achieved by the athletes in the three studied groups was confirmed through the lactate concentration changes, which were not different under caffeine supplementation (15), and the measured cardiac frequency. Although athletic performance was not the focus of the study, we did not find a significant difference in performance due to caffeine supplementation. We believe that either the small number of subjects in the study or the different soccer positions that are played by the athletes can explain this result. In addition, the biochemical analyses that we used have a greater sensitivity than the performance measurement tools, which might also account for the lack of the difference in performance found.

Paragraph Number 28 Our protocol was designed based on the previously described caffeine absorption curve, which led to the assumption that the serum caffeine level peaks approximately one hour after oral supplementation (18). Using the gold standard GC/MS technique to measure caffeinemia after caffeine supplementation, we showed that the serum caffeine level increased

in two different patterns. The statistical analysis, which was performed using ANOVA followed by Tukey's post hoc test, showed a ~ 25-fold significant difference ($p < 0.001$) in the blood caffeine concentration between the SCEx and CEx groups (41.19 ± 2.72 versus 1.69 ± 0.02 , median \pm SEM). Based on the two caffeine levels in the blood and the significant difference in the caffeinemia of the subjects, we divided the caffeine-supplemented subjects into two groups according to their serum caffeine levels. This division allowed us to detect distinct amino acid metabolism profiles in response to the different serum caffeine concentrations, which would not have been observed in the absence of the serum caffeine analysis. Further studies should take into account that caffeinemia may differ even between subjects receiving the same doses of caffeine.

Paragraph Number 29 In the present study, we subjected the subjects to a high-intensity exercise session after an intermittent exercise period. Caffeine has been shown to decrease the exercise-induced reduction in glycogen and increase the amount of exercise-induced gluconeogenesis (21). In addition, during recovery, caffeine increases both insulin-independent glucose transport and glycogen resynthesis (31). In our study, the serum concentrations of both glucose and Leu increased in all groups in response to exercise; this finding can be explained by the breakfast, access to a glucose drink *ad libitum* throughout the training the exercise-induced glycogenolysis and gluconeogenesis, or the combination of these factors (13, 16). Also, caffeine ingestion has been shown to impair insulin-mediated glucose disposal, which can be attributed to either β -adrenergic stimulation or adenosine receptor-antagonized elevations of insulin and glucose (35). Therefore, due to the increased concentration of Leu that was observed, we hypothesize that the rise in insulin can be explained by an additive effect of the increases in amino acid levels and glycemia because insulin secretion is primarily stimulated by glucose and amino acids (26).

Paragraph Number 30 BCAAs can be oxidized and used as an alternative source of energy by muscles or to provide tricarboxylic acid cycle intermediates (22). Increases in serum BCAAs during or after exercise may indicate the mobilization of BCAAs from either the liver or muscle (28). The changes observed in our study indicated that the intensity and duration of the

intermittent exercise induced a significant utilization of BCAAs for energy generation. In our protocol, the total BCAA concentration increase due to exercise was diminished by caffeine supplementation. The serum levels of BCAAs (Ile, Leu and Val) exhibited no significant differences between the two caffeine-treated groups (SCEX and CEX). The serum caffeine levels inhibited the Val concentration increase in a dose-dependent manner. A similar effect was observed with Leu and Ile, although this effect appears to be hidden due to subject variations. Moreover, the serum concentrations of the amino acids related to the urea cycle (Arg and Orn) were unaffected by exercise in the SCEX and CEX groups. Furthermore, the serum concentration of citrulline did not change significantly in the SCEX group. The serum concentrations of Cit, Arg and Orn may also be dependent on urea and ammonia metabolism. The other amino acids evaluated in our study (Asp, Asn, Lys, Met, Tau, Thr) did not show any changes due to either exercise or caffeine supplementation. Our data suggest that, in addition to the effects on performance enhancement, caffeine modifies the concentrations of blood amino acids during exercise. However, the translation of these findings to the athletic performance requires further investigation.

Paragraph Number 31 The level of ammonemia increased in all three tested groups in response to exercise. However, even with the approximately 600% increase in ammonemia observed in the SCEX group, no increase in uremia was detected. Muscle and other tissues are widely known to respond to increased levels of ammonia by synthesizing and releasing Gln into the serum. We thus measured increases in the serum concentrations of Gln, Ala, and Glu in response to exercise. These amino acids are metabolized in muscle, thereby providing the amino groups and, most likely, the ammonia required for the synthesis of glutamine and alanine (37). In addition, previous studies have shown that Ala, Gln, and Glu increase the levels of tricarboxylic acid cycle intermediates during exercise and contribute to the increase in glycemia (9). In our study, higher concentrations of serum caffeine prevented the exercise-induced increase in the serum Gln level but did not affect the exercise-induced increases in Ala and Glu. Given that Gln is the major ammonia transporter to the liver, caffeine may decrease urea synthesis via a decrease in the blood Gln concentration.

Paragraph Number 32 The effects of the physiological responses to caffeine supplementation on the urea cycle intermediates in humans are not well understood. High caffeine concentrations (4 mM) do not cause changes in urea synthesis or in the levels of its intermediates (ornithine, citrulline and arginine) in murine hepatocytes (24). Previous studies have shown an inhibitory effect of caffeine on urea synthesis; this effect is demonstrated through the in vitro inhibition of a number of urea cycle enzymes, such as arginase (29, 30). During this experiment, the CEx group exhibited serum urea levels that were 10% higher than those of the LEx group. However, the concentration of urea in the serum of the SEx group was reduced by 16% compared with the non-supplemented group.

Paragraph Number 33 In this study, we measured a caffeine-induced decrease in the blood concentrations of both urea and the urea cycle intermediates (Cit, Orn, and Arg) in response to exercise. Our data suggest that that caffeine might decrease systemic urea by decreasing the concentration of glutamine in the serum, which in turn decreases the amount of ammonia transported to the liver and subsequently decreases urea synthesis.

Paragraph Number 34 There were no conflicts of interest in this study. The results of this study do not constitute an endorsement by the American College of Sports Medicine.

Acknowledgments

The authors declare that they have no financial competing interests and that no funding agencies supported this project.

The authors thank Ricardo Freitas-Dias for his help during the first steps of the study.

Author disclosures: A. Bassini, A.M. Magalhães-Neto, E.W.S. Sweet, A. Bottino, C. Veiga, M.B. Tozzi, M.B. Pickard and L.C. Cameron declare no conflicts of interest.

The results of the present study do not constitute an endorsement by the American College of Sports Medicine.

REFERENCES

1. Adeva MM, Souto G, Blanco N, Donapetry C. Ammonium metabolism in humans. *Metabolism*. 2012;23 [Epub ahead of print].
2. Astorino TA, Terzi MN, Roberson DW, Burnett TR. Effect of two doses of caffeine on muscular function during isokinetic exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(12):2205-10.
3. Baldwin J, Snow RJ, Carey MF, Febbraio MA. Muscle IMP accumulation during fatiguing submaximal exercise in endurance trained and untrained men. *Am J Physiol*. 1999;277:R295-300.
4. Bangsbo J, Iaia FM, Krstrup P. The Yo-Yo intermittent recovery test: a useful tool for evaluation of physical performance in intermittent sports. *Sports Med*. 2008;38(1):37-51.
5. Bassini-Cameron A, Monteiro A, Gomes A, Werneck-de-Castro JP, Cameron L. Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. *Br J Sports Med*. 2008;42(4):260-6.
6. Bassini-Cameron A, Sweet E, Bottino A, Bittar C, Veiga C, Cameron LC. Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions. *Br J Sports Med*. 2007;41(8):523-30.
7. Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, et al. High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med*. 2008;42(11):889-93.
8. Bosoi CR, Rose CF. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis*. 2009;24(1):95-102.
9. Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL, Boobis LH, Williams C, Bowtell JL. Glutamine supplementation promotes anaplerosis but not oxidative energy delivery in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(4):E669-75.
10. Cameron LC. Mass spectrometry imaging: Facts and perspectives from a non-mass spectrometrists point of view. *Methods*. 2012;17 [Epub ahead of print].
11. Carvalho-Peixoto J, Alves RC, Cameron LC. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(6):1186-90.
12. Davis JK, Green JM. Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action. *Sports Med*. 2009;39(10):813-32.
13. Egawa T, Hamada T, Kameda N, et al. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. *Metabolism*. 2009;58(11):1609-17.
14. Evans SM, Griffiths RR. Caffeine withdrawal: a parametric analysis of caffeine dosing conditions. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(1):285-94.
15. Gant N, Ali A, Foskett A. The influence of caffeine and carbohydrate coingestion on simulated soccer performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2010;20(3):191-7.
16. Gibala MJ, MacLean DA, Graham TE, Saltin B. Anaplerotic processes in human skeletal muscle during brief dynamic exercise. *J Physiol*. 1997;502:703-13.

17. Gonçalves LC, Bessa A, Freitas-Dias R, Luzes R, Werneck-de-Castro JP, Bassini A, Cameron L. A sportomics strategy to analyze the ability of arginine to modulate both ammonia and lymphocyte levels in blood after high-intensity exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012;9:30 [Epub ahead of print].
18. Graham TE, Spriet LL. Performance and metabolic responses to a high caffeine dose during prolonged exercise. *J Appl Physiol.* 1991;71(6):2292-8.
19. Graham TE, Spriet LL. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *J Appl Physiol.* 1995;78(3):867-74.
20. Graham TE, Turcotte LP, Kiens B, Richter EA. Effect of endurance training on ammonia and amino acid metabolism in humans. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29(5):646-53.
21. Greenhaff PL, Karagounis LG, Peirce N, et al. Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(3):E595-604.
22. Hackl S, van den Hoven R, Zickl M, Spona J, Zentek J. The effects of short intensive exercise on plasma free amino acids in standardbred trotters. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2009;93(2):165-73.
23. Henrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal Biochem.* 1984;136(1):65-74.
24. Jordá A, Saéz GT, Portolés M, Pallardó FV, Jimenez-Nacher I, Gascoó E. In vitro effect of caffeine on some aspects of nitrogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochimie.* 1988;70(10):1417-21.
25. Kerrigan S, Lindsey T. Fatal caffeine overdose: two case reports. *Forensic Sci Int.* 2005;153(1):67-9.
26. Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol.* 2002;93(3):1168-80.
27. Krstrup P, Mohr M, Nybo L, Jensen JM, Nielsen JJ, Bangsbo J. The Yo-Yo IR2 test: physiological response, reliability, and application to elite soccer. *Med Sci Sports Exerc.* 2006;38(9):1666-73.
28. Matsumoto K, Koba T, Hamada K, Tsujimoto H, Mitsuzono R. Branched-chain amino acid supplementation increases the lactate threshold during an incremental exercise test in trained individuals. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2009;55(1):52-8.
29. Nikolic J, Bjelakovic G, Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Mol Cell Biochem.* 2003;244(1-2):125-8.
30. Ofluoglu E, Pasaoglu H, Pasaoglu A. The effects of caffeine on L-arginine metabolism in the brain of rats. *Neurochem Res.* 2009;34(3):395-9.
31. Pedersen DJ, Lessard SJ, Coffey VG, et al. High rates of muscle glycogen resynthesis after exhaustive exercise when carbohydrate is coingested with caffeine. *J Appl Physiol.* 2008;105(1):7-13.
32. Prado ES, de Rezende Neto JM, de Almeida RD, Dória de Melo MG, Cameron LC. Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions.

- Br J Nutr. 2011;16:1-5.
33. Resende NM, Magalhães Neto AM, Bachini F, Castro LE, Bassini A, Cameron LC. Metabolic changes during a field experiment in a world-class windsurfing athlete: a trial with multivariate analyses. *OMICS*. 2011;15(10):695-704.
 34. Skowrońska M, Albrecht J. Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res*. 2012;21(2):236-44.
 35. Thong FS, Graham TE. Caffeine-induced impairment of glucose tolerance is abolished by beta-adrenergic receptor blockade in humans. *J Appl Physiol*. 2002;92(6):2347-52.
 36. Wagenmakers AJ. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. *Exerc Sport Sci Rev*. 1998;26:287-314.
 37. Wagenmakers AJ. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise. *Diabetes Nutr Metab*. 1999;12(5):316-22.
 38. Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol*. 2010;91(3):200-19.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Experimental design.

Professional soccer players (n = 19) from a first-division team affiliated with the Confederação Brasileira de Futebol (CBF, Brazilian Soccer Confederation) participated in the study. On the day of the experiment, blood was collected from fasting soccer players, i.e., before breakfast (PRE). The subjects were randomly divided into two groups and provided with a specific breakfast supplemented with either caffeine or lactose. The subjects were then driven to the testing location. After warming up, the subjects briefly performed two 45 min sessions of a variable distance run protocol (VDR) with a 15 min interval in a 50 × 50 m court marked with a 5 × 5 m grid. After finishing the VDR (5 min) protocol, the athletes executed the Yo-Yo Intermittent Recovery Test level 2 (Yo-Yo IR2) until exhaustion. Each athlete completed the test at different times. The completion of the test was immediately followed by the collection of blood, which was then used in the laboratory analyses (POST). The athletes received a drink containing electrolytes and glucose *ad libitum* throughout the exercise protocol. The theoretical caffeine absorption peak time is shown for comparison.

Figure 2. Serum caffeine concentration one hour after supplementation.

The supplemented group was administered caffeine at a dosage of 5 mg·kg⁻¹, whereas the control group received lactose, as indicated in the materials and methods. Blood was collected after the exercise protocol and used to determine the caffeine level. The figure shows the individual measurements for each athlete (some data are indistinguishable). *Significant difference between pre- and post-exercise (p < 0.05). Significant differences relative to SCEx for ^aCEx and ^bLEx. ^c Significant differences relative to the CEx vs. LEx.

Figure 1

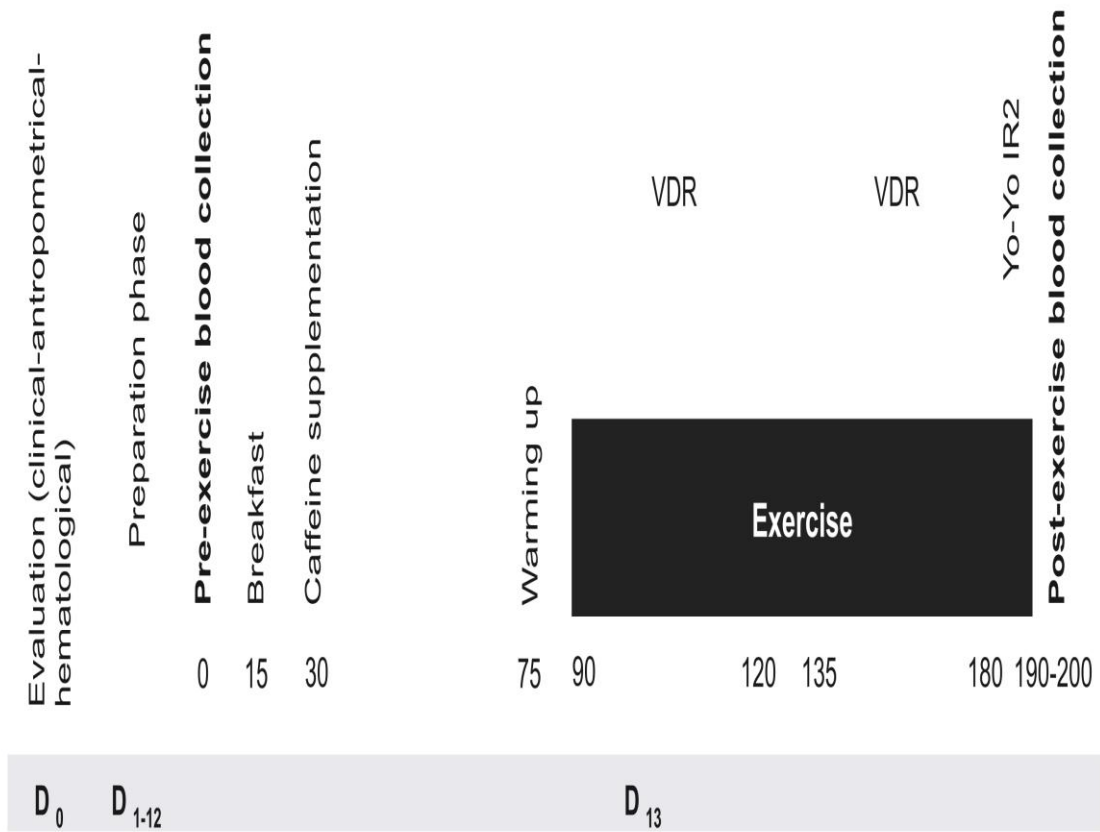


Figure 2

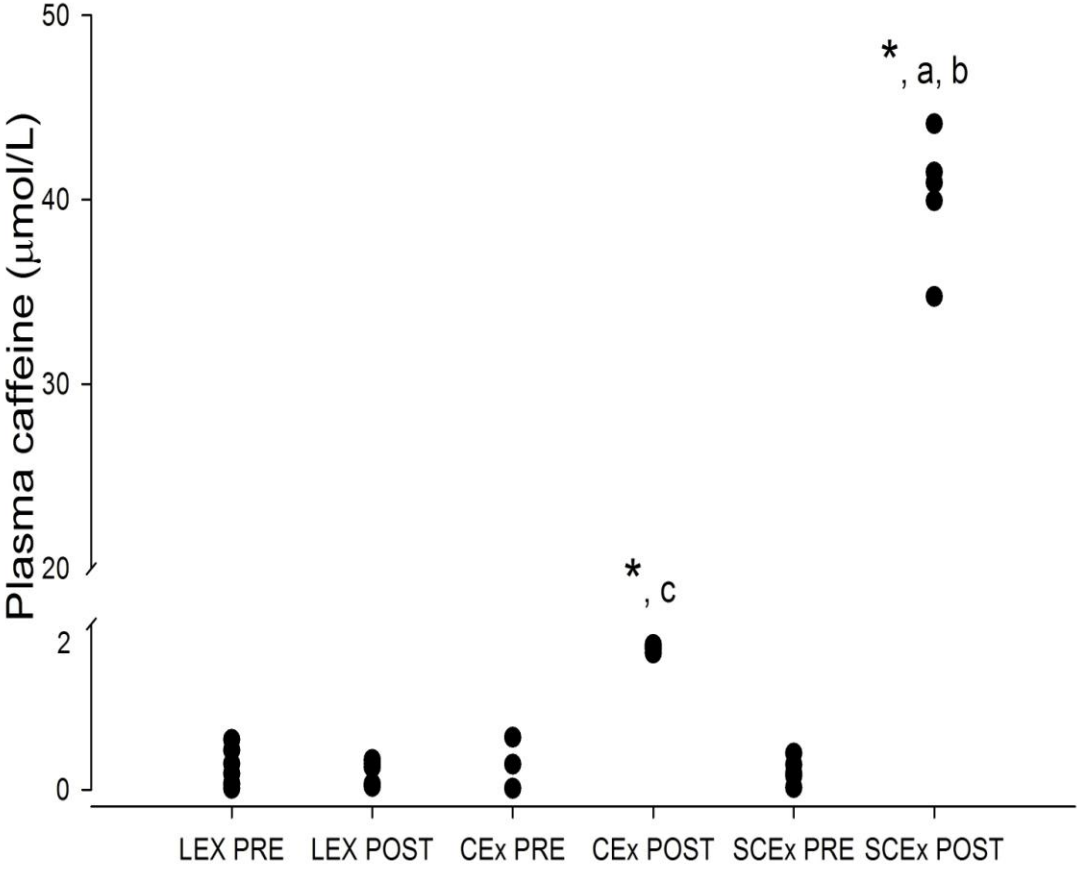


Table 1. Performance indicators and heart rate measurements in the three different studied groups.

	Yo-Yo IR2		Heart Rate	
	Velocity (km/h)	Distance (m)	Average (beats·min ⁻¹)	Peak (beats·min ⁻¹)
SCEX	12.3 ± 0.5	1367 ± 330	169 ± 7	198 ± 8
CEX	12.2 ± 0.5	1540 ± 330	164 ± 8	199 ± 5
LEX	12.3 ± 0.3	1449 ± 378	160 ± 4	197 ± 4

The values represent the mean ± SE. No significant difference was found between the three groups ($p > 0.05$).

Table 2. Changes in serum glucose; insulin and lactate in response to the exercise protocol.

	LEx (n=8)		CEx (n=6)		SCEx (n=5)	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
Glucose (mmol/L)	4.6 ± 0.1	5.8 ± 0.4 *	4.6 ± 0.1	6.6 ± 0.4 *	4.5 ± 0.1	6.9 ± 0.3 *
Insulin (µmolU/L)	5.2 ± 0.2	8.0 ± 0.7 *	5.3 ± 0.1	9.1 ± 0.7 *	5.1 ± 0.2	9.4 ± 0.3 *
Lactate (mmol/L)	1.9 ± 0.2	17.0 ± 1.6 *	1.9 ± 0.2	23.2 ± 3.2 *	2.1 ± 0.4	15.5 ± 3.6 *

Values represent the mean ± SE. *Significant difference after exercise (p < 0.05).

Table 3. Nitrogen metabolites changes in response to caffeine supplementation.

	LE _x (n=8)		CE _x (n=6)		SCE _x (n=5)	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
Ammonia (μmol/L)	10.7 ± 1.6	70.6 ± 24.8 *	10.6 ± 2.3	54.6 ± 16.0 *	14.3 ± 4.5	88.8 ± 30.7 *
Creatinine (μmol/L)	103.9 ± 4.3	118.2 ± 5.0 *	93.7 ± 2.2	140.7 ± 6.8 *	94.3 ± 6.0	116.4 ± 9.0 *
Urate (μmol/L)	426.9 ± 27.0	378.0 ± 23.7	416.9 ± 21.1	489.6 ± 45.1	434.3 ± 35.9	440.0 ± 44.7
Urea (mmol/L)	7.7 ± 0.5	8.4 ± 0.6 ^{a,b}	8.5 ± 0.9	9.5 ± 1.0 ^a	6.5 ± 0.5	6.7 ± 0.5 ^{a,b}

Values represent the mean ± SE. *Significant difference after exercise ($p < 0.05$). Significant differences relative to SCE_x for: ^aCE_x and ^bLE_x. Repeated measures ANOVA were used to compare the changes after exercise for all variables. Multivariate ANOVA was used to compare changes in metabolic measurements according to supplementation condition and time.

Table 4. Summary of serum amino acids levels pre- and post-exercise.

	LEx (n=8)		CEx (n=6)		SCEX (n=5)	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
Ala	287.5 ± 29.8	626.5 ± 43.3 *	262.5 ± 15.3	680.7 ± 74.0 *	308.8 ± 13.1	651.4 ± 47.5 *
Arg	49.8 ± 3.1	62.6 ± 3.9 *, ^c	65.6 ± 6.6	70.2 ± 5.5 *, ^c	54.5 ± 3.7	63.1 ± 5.2 *
Asn	56.3 ± 3.2	75.0 ± 5.1	61.3 ± 6.2	72.2 ± 7.8	68.0 ± 2.6	64.6 ± 3.9
Asp	18.9 ± 0.4	23.6 ± 2.3	21.3 ± 1.8	22.4 ± 1.3	21.6 ± 2.0	19.8 ± 1.2
Cit	24.5 ± 1.9	33.3 ± 2.6 *, ^b	20.6 ± 1.9	31.0 ± 3.7 *	20.8 ± 2.0	24.1 ± 2.9 ^b
Gln	482.6 ± 25.0	616.7 ± 26.3 *	486.1 ± 30.9	602.3 ± 47.2 *	522.2 ± 22.0	508.8 ± 31.4
Glu	64.5 ± 4.2	103.5 ± 6.8 *	58.8 ± 5.5	84.3 ± 10.2 *	63.6 ± 5.2	97.0 ± 7.9 *
Gly	194.0 ± 11.5	244.0 ± 9.9 *	188.5 ± 12.0	240.1 ± 22.3 *	217.4 ± 11.3	207.8 ± 7.6
<i>His</i>	<i>62.3 ± 3.5</i>	<i>83.6 ± 3.1</i> *	<i>64.7 ± 2.3</i>	<i>88.3 ± 7.5</i> *	<i>70.5 ± 2.4</i>	<i>74.7 ± 3.9</i>
Ile	75.3 ± 4.6	95.5 ± 6.3	82.5 ± 6.9	92.7 ± 9.4	95.7 ± 3.6	88.9 ± 10.6
Leu	137.5 ± 8.4	177.0 ± 8.6	153.3 ± 8.2	181.3 ± 20.3	148.8 ± 7.8	178.2 ± 13.7
Lys	161.3 ± 12.9	214.6 ± 12.8	192.3 ± 26.1	238.4 ± 16.3	222.8 ± 15.3	214.1 ± 19.1
Met	27.0 ± 1.7	42.9 ± 2.7	30.5 ± 2.4	41.2 ± 5.3	30.5 ± 1.7	36.6 ± 2.1
Orn	44.7 ± 4.5	68.6 ± 5.8 ^{b,c}	34.8 ± 5.9	51.1 ± 7.8 ^c	43.6 ± 6.6	38.1 ± 4.1 ^b
Phe	61.5 ± 5.3	81.0 ± 4.6 *	59.9 ± 5.1	81.5 ± 6.8 *	65.9 ± 0.9	73.5 ± 5.9
Pro	172.9 ± 15.3	239.7 ± 19.3 *	155.0 ± 8.1	196.0 ± 24.6	156.6 ± 13.0	197.2 ± 26.2
Ser	66.5 ± 3.7	83.9 ± 3.4 *	71.9 ± 4.9	91.5 ± 7.9 *	74.1 ± 2.9	76.8 ± 4.2
Tau	63.3 ± 9.2	82.4 ± 9.5	69.9 ± 8.0	97.3 ± 15.9	82.3 ± 4.0	89.8 ± 10.0
Thr	110.7 ± 9.8	142.0 ± 10.4	118.0 ± 10.8	136.9 ± 13.8	115.6 ± 5.2	114.9 ± 4.1
Trp	36.8 ± 2.8	51.2 ± 3.4	41.2 ± 3.1	41.4 ± 10.2	49.8 ± 3.0	47.3 ± 4.1
Tyr	50.1 ± 2.8	89.0 ± 6.4 *	53.5 ± 3.5	94.2 ± 8.1 *	62.2 ± 1.8	83.7 ± 6.2 *
Val	238.8 ± 15.7	307.4 ± 14.8 *	258.9 ± 15.3	302.0 ± 25.2	289.9 ± 10.8	290.1 ± 29.4
BCAA	451.7 ± 28.6	579.9 ± 29.7 *	494.7 ± 30.4	576.0 ± 54.9	534.3 ± 22.3	557.2 ± 53.7
TAA	2486.8 ± 179.2	3544.1 ± 211.2	2551.2 ± 191.0	3537.1 ± 351.1*	2785.3 ± 141.0	3240.4 ± 251.2

Multivariate ANOVAs were performed according to supplementation condition and time followed by post hoc tests. Values represent the mean

± SE. *Significant difference after exercise ($p < 0.05$); Statistically significant differences in the means of Arg, Cit, and Orn according to the

condition are shown in bold; His (in italics) indicates an interaction with time and condition. Statistically

significant differences relative to SCEX for: ^aCEX; and ^bLEX. ^cDifferences in the means for CEX vs. LEX.

Conclusão Geral

Esta tese teve como foco de estudo, o uso da suplementação de cetoanálogos e cafeína na amonemia induzida pelo exercício físico tanto em modelo de experimentação humano quanto em animal (rato). Nos artigos produzidos neste estudo podemos concluir que:

- A suplementação de cetoanálogos aumenta os níveis de lactato no sangue após o exercício físico em ratos, devido os cetoanálogos ser os fornecedores de glicose pela gliconeogênese para o músculo em exercício.
- A suplementação de cetoanálogos aguda pode ser utilizada para reduzir o aumento da amomenia induzida pelo exercício físico.
- O estudo do metabolismo de atleta olímpico e a análise do metaboloma são particularmente desafiadora devido à dinâmica das respostas dos metabolitos na interação do genoma com sua respectiva expressão gênica e modificações fenotípicas. Desta forma, a esportômica é uma ótima ferramenta para as análises em campo da real resposta metabólica ao exercício físico, para possíveis intervenções nutricionais e de treinamento.
- A suplementação de cafeína diminui as concentrações de ureia, assim como os aminoácidos citrulina, ornitina e argina (intermediários do ciclo da ureia) no sangue em resposta ao exercício físico em humanos.
- A suplementação de cafeína diminui os níveis de glutamina no plasma, que por sua vez, diminui a quantidade de amônia transpostada para o fígado, e desta forma, diminui a síntese de ureia em humanos.

Anexo

Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

ATA DE PARECER CONSUBSTANCIADO

PROTOCOLO CAAE Nº 0053.0.313.000-07 CEP : 117/2007

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Prof. Prof. Luis Cláudio Cameron – Instituto Biomédico

DATA DE ENTRADA NO CEP : 21 de dezembro de 2007

PROJETO: "Metabolismo de aminoácidos e amônia em situações de stress metabólico"

INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA: Instituto de Genética e Biologia Molecular - UNIRIO

SÚMULA DO PROJETO: Uma primeira fase do estudo utilizará animais de laboratório, que servirão para comparações. Esta parte não é motivo desta avaliação. Os seres humanos serão submetidos à avaliação clínica prévia, e estes atletas serão submetidos a diversos protocolos de treinamento físico baseados em suas especificidades de exercício. Serão criados dois grupos de atletas: grupo com treinamento de alta intensidade e curta duração, enquanto o outro será de longa duração e intensidade moderada. Para estes dois grupos será administrada uma suplementação balanceada de nutrientes - aminoácidos, vasodilatadores, lactato e amônia. Cada sub-grupo terá 15 atletas, homens, maiores de 18 anos que obrigatoriamente assinarão o TCLE.

Durante os exercícios de alto impacto serão colhidas amostras de sangue no pré, per e pós-exercício, além de biópsias musculares quando necessárias (dados no sangue). O projeto mostra a série de dosagens que serão feitas. As biópsias serão realizadas em ambiente hospitalar com médico habituado ao exame.

O projeto apresenta cronograma para 3 anos, e os recursos financeiros serão dos pesquisadores envolvidos no projeto

PARECER : O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – CEP-UNIRIO analisou e aprovou ad referendum no dia 13/02/2008, o projeto com protocolo CAAE Nº 0053.0.313.000-07, referente à pesquisa: "Metabolismo de aminoácidos e amônia em situações de stress metabólico" que foi considerado um projeto de grande interesse atrelado a criação de um curso de especialização em Bioquímica do Exercício e que será extremamente importante para o desenvolvimento da pesquisa em nossa Universidade. Além disso trará conhecimentos fundamentais para melhor rendimento dos atletas de competição. O projeto apresenta TCLE Claro e compatível com o perfil cultural dos entrevistados. Obedece a resolução 196 quanto a confidencialidade e os benefícios das informações .

Emitimos, portanto, parecer que classifica o projeto **APROVADO**.

Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2008.




Ricardo Silva Cardoso
Coordenador do CEP-UNIRIO

Comitê de Ética em Pesquisa CEP-UNIRIO
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO
Avenida Pasteur, 296 – Urca – Rio de Janeiro – RJ – Cep: 22290-240.
Telefones: 21- 25427796 E-mail: cep.unirio@gmail.com e cep-unirio@unirio.br

RICARDO CARDOSO
COORDENADOR
CEP – UNIRIO
PROPG - DPC