

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RAFAELA CARVALHO PEREIRA LIMA

***EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E
CETOANÁLOGOS SOBRE A AMONEMIA, ENZIMAS
BIOMARCADORAS DE DANO MUSCULAR E CONTAGEM DE
CÉLULAS BRANCAS EM CICLISTAS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
FÍSICO COM BAIXO ESTRESSE AO CALOR***

**MACEIÓ- AL
2015**

RAFAELA CARVALHO PEREIRA LIMA

***EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E
CETOANÁLOGOS SOBRE A AMONEMIA, ENZIMAS
BIOMARCADORAS DE DANO MUSCULAR E CONTAGEM DE
CÉLULAS BRANCAS EM CICLISTAS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
FÍSICO COM BAIXO ESTRESSE AO CALOR***

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Alagoas como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador(a): **Prof^a. Dr^a. Adriana Ximenes da Silva**
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Universidade Federal de Alagoas

Co-Orientador(a): **Prof. Dr. Eduardo Seixas Prado**
Programa de Pós-Graduação em Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

MACEIÓ – AL

2015

**Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas**

Biblioteca Central

Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

L732e Lima, Rafaela Carvalho Pereira.

Efeito agudo da suplementação de aminoácidos e cetoanálogos sobre a amonemia, enzimas biomarcadoras de dano muscular e contagem de células brancas em ciclistas submetidos a exercício físico com baixo estresse ao calor / Rafaela Carvalho Pereira Lima. – 2015.

82 f. : il.

Orientadora: Adriana Ximenes da Silva.

Coorientador: Eduardo Seixas Prado.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2015.

Inclui bibliografia.

Apêndices: f. 77-80.

Anexos: f. 81-82.

1. Hiperamonemia. 2. Exercício físico - Fadiga. 3. Creatina kinase.
I. Título.

CDU:

612.398.194



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Rafaela Carvalho Pereira, intitulada: “Efeito agudo da suplementação de aminoácidos e cetoanálogos sobre a amonemia, enzimas biomarcadoras de dano muscular e contagem de células brancas em ciclistas submetidos a exercício físico com baixo estresse ao calor”, orientada pela Profª. Drª. Adriana Ximenes da Silva, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 13 de julho de 2015.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata APROVADA.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira – (IQB/UFAL)

Eurica A. N. Ribeiro
Prof. Dr. Eurica Adélia Nogueira Ribeiro - (ESENFAR/UFAL)
Estélio H. M. Dantas
Prof. Dr. Estélio Henrique Martin Dantas – (UNIT - SE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, aquele que permitiu e tornou possível a concretização deste trabalho, pelo amor incondicional. Aos meus pais, meus eternos orientadores, que me apoiaram nos momentos mais decisivos. Ao meu marido e companheiro, pela força diária e pelo amor nas etapas de maior dificuldade, à minha avó e irmão, pelo carinho constante, e a todos os familiares e amigos que de maneira indireta me deram força quando estive entusiasmada ou mesmo abatida.

Ao Professor Dr. Eduardo Seixas Prado por despertar em mim o desejo à pesquisa, por todos os questionamentos que me levou a ter e pela orientação durante todo o estudo, inclusive nos momentos únicos de coleta, e difíceis de escrita, por todas as críticas e apoio.

À professora Drª Adriana Ximenes da Silva, por acreditar em mim, me incentivar a buscar o novo com seu dom de ensinar, e por me proporcionar experiências peculiares na área acadêmica.

Ao Grupo de Estudo e Pesquisa em Exercício Físico e Metabolismo (GEPEFIM), pela disposição em ajudar nas coletas de dados, por todos os artigos discutidos, artigos publicados, apresentações em congressos e por buscarmos juntos as repostas para nossas perguntas. Em especial, os amigos Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino, Thássia Casado Lima França e Natally Monteiro de Oliveira, pelo companheirismo.

Ao Professor. MSc. Marcos Guilherme de Sousa Gouveia, Daniela Souza Araújo Rodrigues e José Cleiton da Conceição Alves pela contribuição na coleta e análise dos dados sanguíneos.

Aos ciclistas e amigos que se dispuseram a participar como voluntários do estudo, sem vocês, esta produção não seria possível.

RESUMO

A amônia é um metabólito tóxico para o organismo, e uma hiperamonemia induzida pelo exercício associada à dieta com baixas proporções de carboidratos resulta em efeitos deletérios para o Sistema Nervoso Central e Periférico, podendo provocar danos à saúde e ao desempenho. Além disso, o estresse térmico parece contribuir para o aumento da amonemia durante o exercício, além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, influenciando a formação de enzimas biomarcadoras de dano muscular e o sistema imune. Assim, recursos que possam atenuar as altas concentrações da amonemia devem ser utilizados para a obtenção de benefícios ao desempenho esportivo. O objetivo do estudo foi verificar o efeito agudo da suplementação de aminoácidos e cetoanálogos (KAAA) sobre a amonemia, enzimas biomarcadoras de dano muscular e contagem de células brancas em ciclistas submetidos a exercício físico com baixo estresse ao calor. Essa dissertação é composta por uma introdução ampliada e dois artigos de resultados. O primeiro artigo “ketoanalogue and amino acid supplementation affects the enzymes biomarkers of muscle damage response during high intensity exercise under low heat stress environment” avaliou o efeito da suplementação aguda de KAAA no metabolismo da amônia e enzimas biomarcadoras de dano muscular após exercício de alta intensidade e baixo estresse ao calor. Foi demonstrado que a suplementação aguda foi capaz de reduzir as concentrações sanguíneas de amônia e consequentemente de enzimas biomarcadoras de dano muscular. O segundo artigo “ketoanalogue and aminoacid supplementation affects White blood cells counts during high intensity exercise under low heat stress environment” avaliou o efeito da suplementação aguda de KAAA no conteúdo total e diferencial de células brancas após exercício de alta intensidade sob condições de baixo estresse térmico. Foi demonstrado que a suplementação atenuou alguns parâmetros característicos de imunossupressão em células brancas do sangue.

Palavras-chave: Hiperamonemia. Exercício. Fadiga. Creatina Quinase. Cortisol. Neutrófilos.

ABSTRACT

Ammonia is a toxic metabolite, and exercise-induced hyperammonemia associated with low carbohydrates diet, results in deleterious effects in Central Nervous System and Peripheral causing possible damage to health and performance. Furthermore, the thermal stress seems to contribute to the increase in blood ammonia during exercise, in addition to increasing the production of reactive oxygen species, influencing the formation of enzymes biomarkers of muscle damage and immune system. Thus, resources that can alleviate high blood ammonia concentrations should be used to obtain benefits to athletic performance. The aim of the study was to verify the effect acute of keto analogues and amino acid supplementation(KAAA) on blood ammonia, enzymes biomarkers of muscle damage and white blood cell count in cyclists during high intensity exercise under low heat stress environment. This study is composed of an introduction and two original articles. The first article "keto analogue and amino acid supplementation affects the enzymes biomarkers of muscle damage response during high intensity exercise under low heat stress environment" evaluated the effect of acute supplementation of KAAA in ammonia metabolism and enzymes biomarkers of damage muscle after high-intensity exercise under low heat stress environment. It has been demonstrated that acute supplementation was able of reducing blood ammonia concentrations and consequently enzymes biomarkers of muscle damage. The second article "keto analogue and amino acid supplementation affects white blood cells counts during high intensity exercise under low heat stress environment" evaluated the effect of acute supplementation of KAAA in total and differential content white blood cells after high-intensity exercise under low heat stress environment. It was demonstrated that supplementation attenuated some characteristic parameters of immunosuppression in white blood cells.

Keywords: Hyperammonemia. Exercise. Fatigue. Creatine kinase. Cortisol. Neutrophil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Metabolismo de BCAA na mitocôndria da célula musculoesquelética.....	17
Figura 2 Processo de desaminação da AMP e produção de amônia.....	19
Figura 3 Processo de transaminação entre aminoácidos e cetoanálogos.....	24

1º artigo:

Figure 1 Environmental conditions and intensity of exercise throughout the cycling session	50
Figure 2 Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the ammonia, urate and glucose, but not lactate metabolism.....	51
Figure 3 Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the lactate dehydrogenase (LDH), creatinine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) levels, but not alanine aminotransferase (ALT) levels.....	52

2º artigo:

Figure1 Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the cortisol and glucose levels.....	69
Figure 2 Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the leukocytes count.....	70
Figure3 Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the neutrophils count, but not basophils and eosinophils count.....	71
Figure4 Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the lymphocytes count, but not monocytes count	73

LISTA DE TABELAS

Table 1 Environmental conditions and intensity of exercise throughout the cycling session from groups KEX and PEX, before (Pre) and after (Post) cycling session.....	68
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

AMP - Adenosina Monofosfáto

AMPD - AMP Deaminase

ATP – Adenosina Trifosfáto

BCAA – Aminácidos de Cadeia Ramificada

BCKA - Cetoácidos de Aminoácidos de Cadeia Ramificada

GABA - ácido gama-aminobutírico

GDH - Glutamato Desidrogenase

GS – Glutamina Sintetase

IMP – InosinaMonofosfáto

KAAA – Aminoácidos e cetoanálogos

NMDA - N-Metil D-Aspartato

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1 Amônia	14
1.2 Produção de amônia durante o exercício	15
1.2.1 Desaminação de BCAA	16
1.2.2 Desaminação de AMP	18
1.2.2.1Desaminação de AMP e formação de enzimas biomarcadoras de dano muscular.....	20
1.3 Amônia e SNC.....	21
1.4 Dieta Cetogênica.....	22
1.5 Estresse Térmico	23
1.6 Suplementação de KAAA	24
Referências	26
2OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	32
3.11° artigo: artigo de resultados	33
3.2 2º artigo: artigo de resultados.....	53
4CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
APÊNDICES.....	76
ANEXOS.....	80



1 INTRODUÇÃO GERAL

A amônia é um metabólito tóxico para o organismo e o aumento das suas concentrações plasmáticas tem efeitos deletérios no Sistema Nervoso Central e Periférico, podendo provocar danos à saúde e ao desempenho(NYBO *et al.*, 2005; MOHR *et al.*, 2006). Condições patológicas ou desregulações nos sistemas de detoxificação podem aumentar as concentrações plasmáticas de amônia(SAVICA *et al.*, 2005). Além disso, estudos apontam que a amonemia aumenta durante e após a prática de vários tipos de exercício (MOHR *et al.*, 2006; CARVALHO-PEIXOTO, ALVES e CAMERON, 2007; MOUADIL *et al.*, 2012) e que tais concentrações estão associadas com a fadiga, podendo desencadear letargia, ataxia e estupor, que ocorrem durante e após o exercício em atletas (BANISTER e CAMERON, 1990). Nessas condições de exercício ou em condições patológicas, uma hiperamonemia pode levar a distúrbios metabólicos e de neurotransmissores (TAKUMA *et al.*, 2010).

Durante o exercício, as duas principais vias de produção da amônia são desaminação de adenosina monofosfato (AMP) e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), processos que são ativados em uma maneira dependente da intensidade e duração do exercício (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010; BACHINI *et al.*, 2009). Essa produção pode ser exacerbada quando o exercício é associado a uma dieta cetogênica, podendo levar a redução de glicogênio muscular e subsequente aumento da utilização de aminoácidos para formação de adenosina trifosfato (ATP) ou para a gliconeogênese, aumentando a concentração de amônia livre, possibilitando redução do desempenho esportivo (CZARNOWISKI *et al.*, 1995; GREENHAFF *et al.*, 1991; WINNICK *et al.*, 2005).

Nesse contexto, o exercício pode promover mudanças no perfil bioquímico e hematológico que são influenciadas pelo calor (ALLEN, LAMB e WESTERBLAD, 2008). O estresse térmico parece contribuir para o aumento da amonemia durante o exercício (CARVALHO-PEIXOTO, ALVES e CAMERON, 2007; TAKUMA *et al.*, 2010) além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, influenciando a formação de enzimas biomarcadoras de dano muscular e o sistema imune (MESTRE-ALFARO *et al.*, 2012). Durante o processo de desaminação de AMP ocorre um estresse oxidativo, aumentando o dano celular, com consequente extravasamento de enzimas biomarcadoras de dano muscular para o sangue, contribuindo, dessa forma para o quadro de fadiga e prejuízos no desempenho (ALLEN, LAMB e WESTERBLAD, 2008). Após exercício

intenso, embora transitoriamente, sugere-se que ocorra uma supressão do sistema imunológico(imunossupressão) aumentando o risco de infecção, principalmente em atletas(NIEMAN, 1997; NIEMAN,2000).

Assim, durante o exercício físico, mecanismos de detoxificação devem ser utilizados para a obtenção de benefícios ao desempenho esportivo. Recentemente, o uso de aminoácidos cetoanálogos (KAAA) proporcionou uma redução da hiperamonemia em atletas submetidos a dieta cetogênica durante exercício físico (PRADO *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado o uso de várias substâncias, no sentido de reduzir a hiperamonemia induzida pelo exercício, seja em ratos ou seres humanos (BASSINI *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013). Talvez, a mais promissora seja a manipulação através do uso agudo de cetoanálogos, os quais interferem no metabolismo da amônia que consequentemente pode aumentar a tolerância ao treinamento e reduzir seus efeitos de fadiga (DE ALMEIDA *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Diante da ausência de evidências científicas sobre a relação entre hiperamonemia causada pelo exercício físico, dieta, concentração de enzimas biomarcadoras de dano muscular, e sistema imune,o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito agudo da suplementação de KAAA no metabolismo da amônia,na produção de enzimas biomarcadoras de dano muscular e no conteúdo total e diferencial de células brancas após exercício de alta intensidade sob condições de baixo estresse térmico.Hipotetizamos que quando o exercício é realizado em ambiente termoneutro, a suplementação de KAAA diminui a amônia produzida pelo exercício, e consequentemente (I) reduz o extravasamento de enzimas e biomarcadoras de lesão muscular para o sangue e (II) aumenta o fornecimento de intermediários para o ciclo de Krebs reduzindo a liberação de cortisol e seu efeito imunossupressor.

1.1 Amônia

A amônia trata-se de um composto gasoso, NH₃, que, ao ser dissolvido em água, sofre ionização, NH₄⁺. Em água o NH₄⁺ é formado a partir da NH₃ na reação de equilíbrio NH₃ + H⁺ (BOSOI e ROSE, 2009). Nos fluidos corporais a NH₃, se difunde facilmente pelas membranas, enquanto que o NH₄⁺ não, requerendo

mecanismos de transportes mediados (COOPER e PLUM, 1987; COOPER, 2001). O funcionamento de diversas estruturas orgânicas como intestino, músculo, rins e cérebro são responsáveis pela produção de amônia (OLDE *et al.*, 2002). A amônia é considerada um subproduto do metabolismo de aminoácidos e outros compostos nitrogenados e devido a sua alta toxicidade, precisa de mecanismos de remoção para o funcionamento normal do organismo (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010; BACHINI *et al.*, 2009).

Em condições fisiológicas normais, a maioria da amônia sistêmica é liberada pelo intestino ou trato gastrointestinal, onde compostos nitrogenados e restos bacterianos, são quebrados por uma combinação de atividades enzimáticas, proporcionando a formação de grandes quantidades de amônia, posteriormente transportadas para a circulação portal hepática. Esta por sua vez, fornece amônia para o fígado, na mitocôndria hepática, onde pode ser incorporada no ciclo da uréia para formação de uréia, ou glutaminano hepatócito periportal, via glutamina sintetase (GS). Assim, uréia e glutamina 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 (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010; OLDE *et al.*, 2002; CÓRDOBA e MÍNGUEZ, 2008).

Esse compartimentalizado sistema de desintoxicação é eficiente para remoção de amônia da circulação sistêmica em adultos saudáveis em repouso, ainda quando não há grandes alterações no estado nutricional. No entanto, outros tecidos e órgãos, tais como o cérebro e o músculo esquelético também contribuem para o metabolismo e regulação da amônia (OLDE *et al.*, 2002).

1.2 Produção de amônia durante o exercício.

Durante o exercício intenso os níveis de circulação de amônia sanguínea podem ser elevados. A amônia é altamente tóxica para o sistema nervoso e seus níveis elevados, podem causar efeitos prejudiciais na neurotransmissão e induzir fadiga central e/ou periférica (NYBO *et al.*, 2005; MOHR *et al.*, 2006) . A musculatura esquelética ocupa cerca de 40% da massa corporal total e possui uma ampla capacidade de produção, captação e metabolismo da amônia. Estudos

demonstram que o exercício promove um aumento da amonemia (GREENHAFF *et al.*, 1991; BROBERG e SAHLIN, 1988). Em 15 corredores de longa distância, foi verificado um aumento significativo da amonemia, a partir de uma hora de exercício, atingindo um valor de 70 % acima das condições de repouso (CARVALHO-PEIXOTO, ALVES e CAMERON, 2007).

A produção de amônia durante o exercício ocorre através da combinação de duas fontes predominantes, desaminação de BCAAe de AMP, processos que são ativados em uma maneira dependente da intensidade e duração do exercício (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010; MOHR *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2012).

1.2.1 Desaminação de BCAA

Apesar de o 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, metabolizados extra-hepaticamente, principalmente nos tecidos musculares, adiposo, renal e cerebral (LEMON e NAGLE, 1981).

Nesse processo, na maior parte na mitocôndria de músculos esqueléticos, os BCAAs são quebrados em duas vias de reação: BCAA aminotransferase (BCAT) e α -cetoácido de BCAA desidrogenase (BCKDH) formando intermediários do ciclo de Krebs e contribuindo para a síntese de ATP (HOLECEK *et al.*, 2002). Inicialmente o aminoácido sofre ação da BCAT onde o grupo amino do BCAA é transferido para o α -cetoglutarato para formar glutamato. Este glutamato pode então formar glutamina via GS ou alanina através da reação com piruvato. Na redução dos níveis de piruvato, tal como na depleção dos estoques de glicogênio muscular, o glutamato reage com o co-fator NAD+, via glutamato desidrogenase (GDH), produzindo elevadas concentrações de NADH e amônia. Assim, a produção sistêmica de amônia, originada do catabolismo de BCAA, está relacionada à disponibilidade reduzida de piruvato em consequência da depleção dos estoques de glicogênio (WAGENMAKERS, COAKLEY e EDWARDS, 1990; WAGENMAKERS, 1998). A utilização de uma dieta com baixo consumo de carboidratos (dieta cetogênica) associada com o exercício físico pode reduzir os

estoques de glicogênio antes do exercício e exacerbar a produção de amônia (LANGFORT *et al.*, 2004) (Figura 1A).

A segunda reação é uma etapa limitante da taxa de catabolismo do BCAA que é controlada pelo complexo enzimático BCKDH, para formação de radicais Co-A, como succinilCo-A e acetilCo-A, para serem utilizados no ciclo de Krebs para produção de energia oxidativa. À medida que o exercício se prolonga, há um maior catabolismo de BCAA pelo músculo, via BCAT, desencadeando um aumento dos níveis decetoanálogos de BCAA(BCKA) muscular. Níveis elevados de BCKA favorecem a inibição da BCKDH quinase (significa que há menor conversão para a sua forma fosforilada e inativa). Tal ação contribuirá para aumento da ativação do complexo enzimático BCKDH, que por sua vez, leva a um aumento no fluxo da via BCAT, aumentando assim, a disponibilidade de substrato para a produção elevada de amônia via GDH (WAGENMAKERS, COAKLEY e EDWARDS *et al.*, 1990; WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010) (Figura 1B).

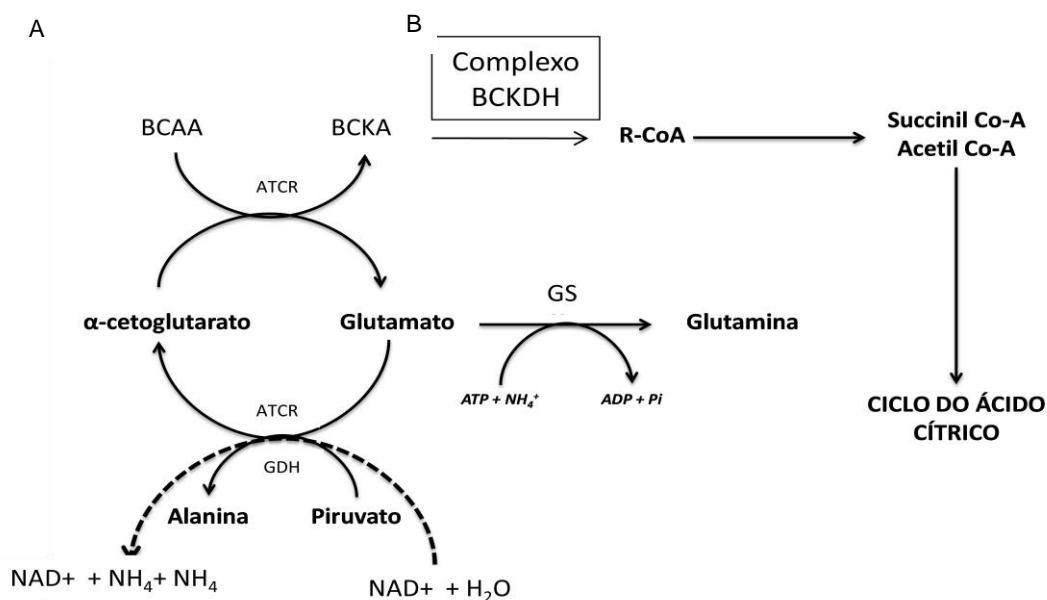


Figura 1. Metabolismo de BCAA dentro da mitocôndria da célula músculoesquelética. Os BCAAs durante o exercício submáximo e prolongado podem ser utilizados como substratos energéticos adicionais, que tem como produto intermediários do ciclo do ácido cítrico para o metabolismo energético celular. Mas, também fornece substratos para a produção de amônia em sua forma livre dentro do músculo.

Estudos demonstram que durante exercício submáximo e prolongado (75 % - 85% FC_{Max}) parece que uma desaminação de aminoácidos pode contribuir para o aumento da amonemia (GREENHAFF *et al.*, 1991; WINNICK *et al.*, 2005). E que esse processo é exacerbado com uma redução do glicogênio muscular durante o exercício (BISSCHOP *et al.*, 2003). Langfort *et al.* (2004), relataram que durante exercício intenso de carga progressiva, associado ao uso de uma dieta com baixas proporções de carboidrato, as concentrações de amônia se elevaram gradualmente a cada carga imposta e esse efeito pode ter ocorrido pelo aumento do catabolismo de aminoácidos. Assim, durante o exercício, a redução da disponibilidade de carboidratos aumenta a oxidação de aminoácidos no músculo a fim de manter a produção de energia para a contração muscular por um maior período de tempo, principalmente em atletas (SAHLIN; TONKONOGLI; SÖDERLUND, 1998).

1.2.2Desaminação de AMP

Estudos apontam que há uma forte correlação entre formação de amônia no músculo, exercício anaeróbio, ou seja, exercício de alta intensidade e curta duração, e desaminação de AMP. (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010). Durante esse tipo de exercício, a razão ATP:ADP diminui no músculo, então uma reação é adicionada, ATP à partir de adenosina difosfato (ADP), a fim de aumentar as concentrações energéticas e manter as contrações musculares sob condições estressantes. Esse acúmulo de ADP estimula a enzima AMP deaminase (AMPD), que por sua vez, através do processo de hidrólise, deamina a AMP, levando ao aumento das concentrações intracelulares de inosinamnofosfato (IMP) e amônia (SAHLIN, TONKONOGLI e SÖDERLUND, 1998). Essa reação faz parte do processo do ciclo das purinas nucleotídeas que envolve mais três reações interligadas e controladas pelas enzimas AMPD, adenilsuccinatosintetasee adenilsuccinatoliase(LOWENSTEIN, 1990).

Por outro lado, a AMP também pode ser desfosforilada a adenosina através da enzima 5' nucleotidase, que é deaminada a inosina pela ação da adenosina deaminase, assim como a IMP, que também pode formar inosina. Devido à incapacidade de o músculo reverter a síntese de inosina, esta é

transformada em hipoxantina, xantina e deixa o músculo para ser metabolizada nos hepatócitos formando urato (HELLSTEN *et al.*, 1999). Em condições fisiológicas normais o ciclo das purinas nucleotídeas também possui função de reabastecimento dos intermediários do ciclo de Krebs, como o fumarato, capazes de produzir energia celular e sintetizar ATP (SAHLIN, TONKONOGLI e SÖDERLUND, 1998) (Figura 2).

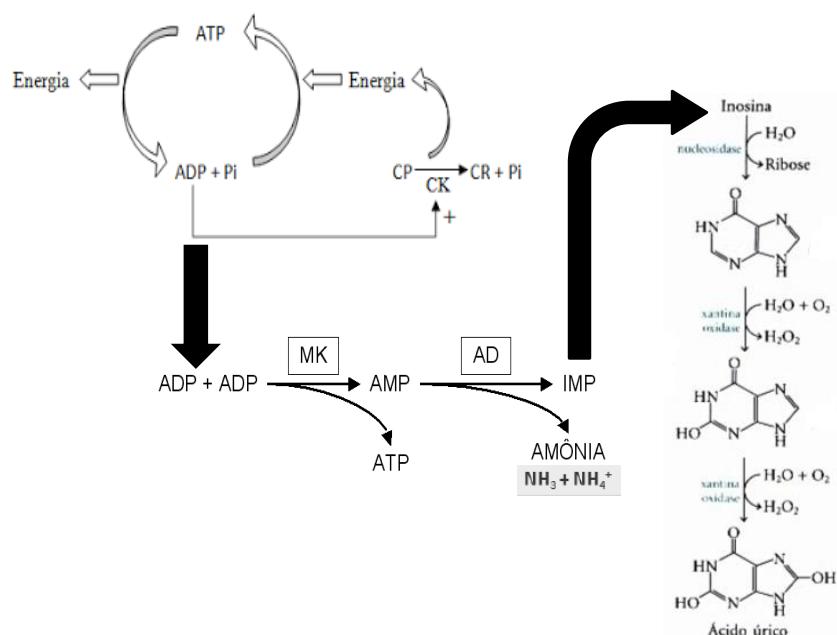


Figura 2. Processo de desaminação da AMP e produção de amônia. Quando há hidrólise de ATP o ADP produzido sofre uma ação de uma miokinase, sintetizando ATP e produzindo AMP. Depois, o AMP sofre o processo de desaminação produzindo amônia e IMP que consequentemente é metabolizado em ácido úrico (urato).

Ainda, a desaminação de AMP depende da taxa de AMPD, a qual varia de acordo com a capacidade oxidativa do músculo. O controle da desaminação de AMP no músculo é complexo, além de ser uma consequência da tentativa de manter a contração muscular durante o exercício intenso (MEYER, DUDLEY e TERJUNG, 1980).

Para garantir que as fontes de energia sejam adequadas para a contração muscular, altos níveis de AMP devem ser desaminados e grandes quantidades de

amôniase serão produzidas (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010). Langfort et al (2004), sugerem que a formação de amônia durante o exercício submáximo pode ser resultado do aumento do ciclo das purinas nucleotídeas, pois ocorre o recrutamento progressivo de fibras musculares com baixa capacidade oxidativa que possuem maior atividade de AMPD. O exercício será interrompido devido à fadiga, o que coincide com os altos níveis de amônia reduzidos durante o exercício (GREENHAFF et al., 1991).

1.2.2.1 Desaminação da AMP e formação de enzimas biomarcadoras de dano muscular

O Exercício intenso pode causar danos no tecido muscular em consequência de fatores metabólicos e mecânicos, que são caracterizados por dor, tensão muscular, mobilidade limitada, prejuízo no desempenho e presença de enzimas no sangue (MARTÍNEZ-AMAT et al., 2010). Durante a desaminação da AMP, o catabolismo de ATP em hipoxantina é aumentado, em virtude da enzima xantina oxidase, e futuramente convertido em urato. Nesse processo, espécies reativas de oxigênio, incluindo anion superóxido e radicais hidroxilas são produzidos e causam dano a célula muscular, com consequente extravasamento de enzimas biomarcadoras de dano muscular e hepático no sangue (CHEVION et al., 2003). A magnitude desse aumento é dependente da intensidade e duração do esforço (BRANCACCIO et al., 2010).

O tipo de contrações musculares produzidas no exercício também influencia a severidade e extensão do dano. Repetidas contrações excêntricas (contração enquanto o músculo alonga) podem causar dor difusa persistente. Exercícios dinâmicos também incluem a fase excêntrica do movimento e são um fator de risco para dano muscular (MARTÍNEZ-AMAT et al., 2010).

O monitoramento de enzimas como a creatina quinase, lactato desidrogenase, aspartatoaminotransferase e alanina aminotransferase, constitui um método de avaliação bioquímica que pode ser usado para conhecer o estado de treinamento de atletas (BRANCACCIO et al., 2008).

1.3 Amônia e SNC

A amônia em níveis elevados pode levar a distúrbios no funcionamento do SNC, como letargia, ataxia (perda de coordenação motora), estupor, dificuldade de reações motoras, causando coma, ou até morte (NYBO *et al.*, 2005; MOHR *et al.*, 2006). O ciclo da uréia, presente apenas no fígado, funciona como um mecanismo de desintoxicação da amônia, transformando-a em uréia. Distúrbios nesses mecanismos resultam em amonemia elevada, proporcionando a exposição de órgãos vitais à toxicidade desse metabólito, e podem ser vistos em indivíduos acometidos com encefalopatia hepática, que pela incapacidade de desintoxicação da amônia, apresentam os mesmos sintomas de desordens neurotransmissoras e neuromusculares que podem prejudicar a coordenação motora e alterações nos padrões de sono e cognição (PERAZZO *et al.*, 2012).

O exercício físico também pode promover uma elevação da amonemia, aumentando a toxicidade cerebral e muscular, induzindo fadiga central e periférica (BANISTER e CAMERON, 1990; WILKINSON, SMEETON E WATT, 2010). Como o tecido neuronal não tem ciclo da uréia, as altas concentrações sanguíneas de amônia ultrapassam facilmente a barreira hematoencefálica, seja por difusão facilitada, por canais de K⁺ ou transportadores (Rhesus não eritróide glicoproteina B e Rhesus não eritróide glicoproteina C), esse processo ocorre primeiramente nos astrócitos e depende da formação de glutamina a partir do glutamato como processo de remoção (FELIPO e BUTTERWORTH, 2002).

A amônia tem um papel importante na neurotransmissão, pois através de sua incorporação à glutamina pela GS, ela se constitui como o único precursor para a biossíntese de aminoácidos neurotransmissores excitatórios e inibitórios, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) respectivamente (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010). Um maior desequilíbrio desses neurotransmissores pode ser visto quando há hiperamonemia através da formação glutamina presente nos astrócitos (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010). Altas concentrações de amônia aumentam a produção e liberação de glutamato na fenda sináptica, causando uma hiper estimulação de neurônios receptores N-Metil D-Aspartato (NMDA), e a formação de GMPc que induz a produção de espécies reativas de oxigênio e prejuízos na manipulação das concentrações de glutamato

extracelular pelos transportadores e excitotoxicidade de glutamato (KOSENKO *et al.*, 1999).

Em adição, uma pequena proporção de amônia pode ser envolvida na manutenção do metabolismo energético neuronal, onde a amônia pode ser utilizada com o piruvato, proveniente de metabolismo da glicose no astrócito, para formar alanina através da reação da alanina aminotransferase. A alanina, assim como a glutamina, é uma forma não tóxica de transportar amônia, podendo sair do astrócito para o neurônio, e então liberar o piruvato para metabolismo oxidativo neuronal e a amônia retorna para o astrócito e pode ser utilizada novamente (WILKINSON, SMEETON e WATT, 2010).

1.4 Dieta cetogênica

Consiste em uma dieta com baixas concentrações de carboidratos e altas em gorduras, que proporciona aumento da presença de cetonas na urina, por isso é denominada dieta cetogênica (BISSCHOP *et al.*, 2003; WESTMAN *et al.*, 2007). Apesar de a literatura não ter consenso claro quanto à quantidade de carboidratos por dia, estudos apontam que essas concentrações devem estar abaixo de 20g por dia (FREEDMAN, KING e KENNEDY, 2001; SHARMAN *et al.*, 2002).

Os carboidratos são os principais substratos para síntese de ATP nos músculos ativos, com a proteína em menor utilização, exceto em casos extremos tais como a redução dos estoques de glicogênio. A utilização desses substratos energéticos durante um exercício físico é geralmente determinada pelo tipo e intensidade de exercício, estado de aptidão física e estado nutricional (COYLE, 2000). A adoção de uma dieta cetogênica, em de forma aguda ou crônica, reduz significativamente os estoques hepáticos e musculares de glicogênio, podendo induzir uma elevação da amonemia mais rapidamente (CARVALHO-PEIXOTO, ALVES e CAMERON, 2007). Tal modificação metabólica gera incrementos nas concentrações de IMP e de intermediários do ciclo de Krebs (BROBERG e SAHLIN, 1988). Três dias de dieta cetogênica contendo 50% de gordura, 5% de carboidratos e 45% de proteína, em oito homens destreinados, submetidos a um teste até a exaustão em cicloergômetro, acelerou a produção de amônia (LANGFORT *et al.*, 2004).

1.5 Estresse térmico

O aquecimento global, resultado do aumento da frequência e intensidade das ondas de calor em todo o mundo, parece ter aumentado a magnitude das mortes relacionadas ao calor na população humana, atingindo níveis alarmantes. A hipertermia severa induz a disfunção no SNC, assim como delírio, convulsão, coma e até morte. O equilíbrio entre neurotransmissores inibitórios e excitatórios é necessário para função cerebral. No entanto, durante a hipertermia, o aumento na excitotoxicidade e diminuição nos neurotransmissores inibitórios estão associados a patologias cerebrais e prejuízos cognitivos (SHARMA, 2007). Tais sintomas assemelham-se aos relatados em situações de hiperamonemia (NYBO, 2010).

A condição ambiental parece afetar as concentrações de amônia durante o exercício (NYBO, 2010). MOHR *et al.* (2006) encontraram um aumento exacerbado da amonemia em indivíduos submetidos a exercício prolongado no calor (40 ° C) comparado a mesma situação a 20 ° C. Vale salientar que estudos indicam que em uma situação de hipertermia, disfunções do SNC parecem induzir o mesmo desequilíbrio de neurotransmissores, associados à prejuízos cognitivos observados durante um estado de hiperamonemia (NYBO, 2010; SHARMA, 2007).

Porém, não só as alterações metabólicas estão associadas ao exercício em ambiente quente. Além da hiperamonemia, o estresse ambiental pode também afetar a produção de enzimas biomarcadoras (BRANCACCIO *et al.*, 2008). Estudos apontam o aumento desses marcadores quando indivíduos são exercitados no calor (FEBBRAIO, 2001; LINNANE *et al.*, 2004; CAPACCHIONE e MULDOON, 2009).

Sabe-se que muitos componentes hematológicos, especialmente o conteúdo de células brancas, como contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos, parecem ser afetados pelo exercício (WALSH e WHITHAM, 2006), embora transitoriamente, sugere-se que haja uma imunossupressão comprometendo mecanismos protetores e aumentando o risco de infecção, principalmente em atletas, e prejudicando o desempenho (NIEMAN, 1997; NIEMAN, 2000; MACKINNON, 2000). A restrição de carboidratos, como ocorre em dietas

cetogênicas, assim como ambientes quentes, favorecem esse quadro de prejuízos no sistema imune (NIEMAN, 2007) estimulando uma resposta ao estresse que envolve a contagem de leucócitos e aumento de cortisol (MESTRE-ALFARO *et al.*, 2012).

1.6 Suplementação de KAAA

Por anos têm sido relatado que o uso de cetoanálogos é capaz de reduzir a nefrotoxicidade atrasando a necessidade para diálises em pacientes com nefropatias (SAVICA *et al.*, 2005). O aumento dos níveis de amônia no sangue em resposta ao exercício pode ser manipulado através do uso de aminoácidos e cetoanálogos que interferem no metabolismo da amônia (CARVALHO-PEIXOTO, ALVES e CAMERON, 2007). Durante a produção de energia através de aminoácidos como substrato, ocorrem desaminações ou trasaminações para formar cetoanálogos e liberar o grupo amino para ser metabolizado (FURST, 1989). Essas reações são reversíveis e o uso de cetoanálogos pode reduzir as concentrações de amôniano sangue resultando na produção de aminoácidos (WALSER, 1975) (figura 3).

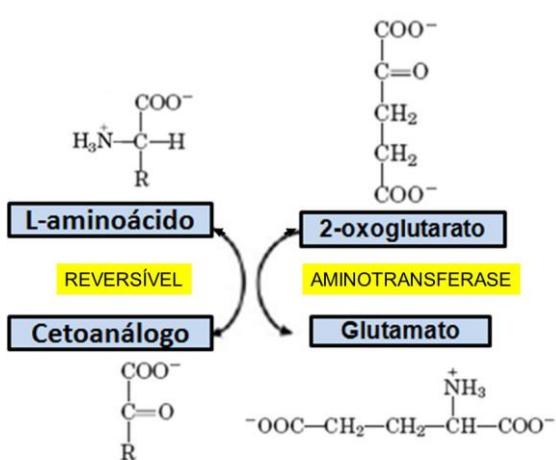


Figura 3. Processo de transaminação entre aminoácidos e cetoanálogos. Um L-aminoácido pode doar o grupo amino para um cetoanálogo ou cetoácido presente, originando um novo L-aminoácido e um cetoanálogo. Esse processo é reversível. O L-aminoácido produzido pode doar o grupo amino para o cetoanálogo e produzir novamente o L-aminoácido e cetoanálogo anterior.

A literatura dispõe de poucos artigos envolvendo exercíciofísico e uso de KAAA. No entanto, três estudos publicados recentemente relatam que a utilização de cetoanálogos em humanos e animais tem efeitos metabólicos positivos (Prado, *et al.*, de Almeida *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). De Almeida *et al.* (2010), em um estudo com ratos adultos submetidos ao exercício de resistência e suplementação aguda de KAAA, relatou que a suplementação aguda de KAAA foi capaz de reduzir a hiperamonemia causada pelo exercício resistido. Além disso, a suplementação foi capaz de aumentar em 10% os níveis de glicose comparados com o grupo controle, através da gliconeogênese originada por reações anapleróticas no ciclo de Krebs.

Em um estudo feito por Prado *et al.* (2011) ciclistas foram submetidos a duas horas de exercício prolongado e dieta cetogênica para induzir a elevação dos níveis de amônia. A amonemia induzida pelo exercício aumentou em 35% no grupo controle, mas a suplementação com aminoácidos e cetoanálogos foi capaz de reduzir as altas concentrações de amônia produzidas durante o exercício. Liu *et al.* (2012), submeteram 33 adultos saudáveis e não treinados a quatro semanas de treinamento e suplementação de cetoanálogos para investigar os efeitos dessa suplementação na tolerância ao treinamento. Neste estudo, a suplementação aumentou potência máxima e torque muscular. No entanto os resultados obtidos podem ter sido influenciados pelo efeito do treinamento.

De acordo com os estudos supracitados, a suplementação de KAAA pode reduzir esse acúmulo de amôniano sangue possibilitando proteger a homeostase neurotransmissora e o desempenho físico e cognitivo de atletas. Dessa forma, a utilização de cetoanálogos e aminoácidos, através, de vias anapleróticas, como o fornecimento de intermediários do ciclo de krebs e fornecimento de substratos energéticos para o exercício, devem ser consideradas como recurso de proteção para atletas submetidos ao exercício extenuante. No entanto, estudos associando diretamente a suplementação de cetoanálogos à produção de marcadores bioquímicos de dano muscular e hematológicos, podem fornecer informações importantes para garantir a saúde e melhorar o desempenho de atletas.

REFERÊNCIAS

- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008;88:287-332.
- Bachini F, Werneck-de-Castro JPS, Moretzsohn LC, Bassini-Cameron A, Cameron L-C. Moderate-intensity exercise associated with ketogenic diet. A model for the study of ammonia metabolism? *Fit Perf J.* 2009;9(3):226-32.
- Banister EW, Cameron BJ. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med.* 1990 May;11 Suppl 2:S129-42.
- Bassini A, Magalhaes-Neto AM, Sweet E, Bottino A, Veiga C, Tozzi MB, et al. Caffeine decreases systemic urea in elite soccer players during intermittent exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2013 Apr;45(4):683-90.
- Bisschop PH, De Sain-Van Der Velden MG, Stellaard F, Kuipers F, Meijer AJ, Sauerwein HP, Romijn JA. Dietary carbohydrate deprivation increases 24-hour nitrogen excretion without affecting postabsorptive hepatic or whole body protein metabolism in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3801-5.
- Bosoi CR, Rose CF. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis.* 2009;24(1):95-102.
- Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:757-67.
- Brancaccio P, Maffulli N, Buonauro R, Limongelli FM. Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med.* 2008;27:1-18.
- Broberg S, Sahlin K. Hyperammonemia during prolonged exercise: an effect of glycogen depletion? *J Appl Physiol (1985).* 1988 Dec;65(6):2475-7.
- Capacchione JF, Muldoon SM. The relationship between exertional heat illness, exertional rhabdomyolysis, and malignant hyperthermia. *Anesth Analg.* 2009 Oct;109(4):1065-9.
- Carvalho-Peixoto J, Alves RC, Cameron LC. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *J Appl Physiol Nutr Metab.* 2007 Dec;32(6):1186-90.
- Coyle EF. Physical activity as a metabolic stressor. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2 Suppl):512S-20S.
- Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:5119-23.
- Cooper AJ, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev.* 1987;67(2):440-519.
- 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;28(1):70-80.

Czarnowski D, Langfort J, Pilis W, Gorski J. Effect of a low-carbohydrate diet on plasma and sweat ammonia concentrations during prolonged nonexhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995;70(1):70-4

de Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, Magalhaes-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.

Febbraio MA. Alterations in energy metabolism during exercise and heat stress. *Sports Med.* 2001;31(1):47-59.

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

Freedman MR, King J, Kennedy E. Popular diets: a scientific review. *Obes Res.* 2001;9 Suppl 1:1S-40S.

Furst P. Amino acid metabolism in uremia. *J Am Coll Nutr.* 1989 Aug;8(4):310-23.

Greenhaff PL, Leiper JB, Ball D, Maughan RJ. The influence of dietary manipulation on plasma ammonia accumulation during incremental exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1991;63:338-44.

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;520(Pt 3):909-20.

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

Johnston CS, Tjonn SL, Swan PD, White A, Hutchins H, Sears B. Ketogenic/low-carbohydrate diets have no metabolic advantage over nonketogenic low-carbohydrate diets. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(5):1055-61.

Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med.* 1999 Jun;26(11-12):1369-74.

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

Lemon PW, Nagle FJ. Effects of exercise on protein and amino acid metabolism. *Med Sci Sports Exerc.* 1981;13(3):141-9.

Linnane DM, Bracken RM, Brooks S, Cox VM, Ball D. Effects of hyperthermia on the metabolic responses to repeated high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2004 Oct;93(1-2):159-66.

Liu Y, Lange R, Langanky J, Hamma T, Yang B, Steinacker JM. Improved training tolerance by supplementation with alpha-Keto acids in untrained young adults: a

randomized, double blind, placebo-controlled trial. *J IntSoc Sports Nutr.* 2012;9(1):37.

Lowenstein JM. The purine nucleotide cycle revisited [corrected]. *Int J Sports Med.* 1990 May;11 Suppl 2:S37-46.

MacKinnon LT. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol.* 2000 Oct;78(5):502-9.

Martinez-Amat A, Boulaiz H, Prados J, Marchal JA, PadialPuche P, Caba O, et al. Release of alpha-actin into serum after skeletal muscle damage. *Br J Sports Med.* 2005 Nov;39(11):830-4.

Mestre-Alfaro A, Ferrer MD, Banquells M, Riera J, Drobnic F, Sureda A, et al. Body temperature modulates the antioxidant and acute immune responses to exercise. *Free Radic Res.* 2012 Jun;46(6):799-808.

Meyer RA, Dudley GA, Terjung RL. Ammonia and IMP in different skeletal muscle fibers after exercise in rats. *J ApplPhysiolRespir Environ Exerc Physiol.* 1980 Dec;49(6):1037-41.

Mohr M, Rasmussen P, Drust B, Nielsen B, Nybo L. Environmental heat stress, hyperammonemia and nucleotide metabolism during intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2006 May;97(1):89-95.

Mouadil A, Debout C, Read MH, Morello R, Allouche S, Chapon F. Blood metabolite data in response to maximal exercise in healthy subjects. *ClinPhysiolFunct Imaging.* 2012 Jul;32(4):274-81.

Nieman DC. Immune response to heavy exertion. *J ApplPhysiol* (1985). 1997 May;82(5):1385-94.

Nieman DC. Marathon training and immune function. *Sports Med.* 2007;37(4-5):412-5.

Nieman DC. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on systemic immunity. *Immunol Cell Biol.* 2000 Oct;78(5):496-501.

Nybo L. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010;2:779-92.

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

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

Perazzo JC, Tallis S, Delfante A, Souto PA, Lemberg A, Eizayaga FX, et al. Hepatic encephalopathy: An approach to its multiple pathophysiological features. *World J Hepatol.* 2012 Mar 27;4(3):50-65.

- Prado ES, de Rezende Neto JM, de Almeida RD, Doria de Melo MG, Cameron LC. Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammonaemia response during exercise under ketogenic conditions. *Br J Nutr.* 2011 Feb;16:1-5.
- Sahlin K, Tonkonogi M, Söderlund K. Energy supply and muscle fatigue in humans. *ActaPhysiol Scand.* 1998;162(3):261-6.
- Savica V, Santoro D, Ciolino F, Mallamace A, Calvani M, Savica R, et al. Nutritional therapy in chronic kidney disease. *NutrClin Care.* 2005 Apr-Jun;8(2):70-6.
- Sharma HS. Interaction between amino acid neurotransmitters and opioid receptors in hyperthermia-induced brain pathology. *Prog Brain Res.* 2007;162:295-317.
- Sharman MJ, Kraemer WJ, Love DM, Avery NG, Gómez AL, Scheett TP, Volek JS. A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. *J Nutr.* 2002;132(7):1879-85.
- Takuma Y, Nouso K, Makino Y, Hayashi M, Takahashi H. Clinical trial: oral zinc in hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Nov;32(9):1080-90.
- Wagenmakers AJ, Coakley JH, Edwards RH. Metabolism of branched-chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. *Int J Sports Med.* 1990 May;11Suppl 2:S101-13.
- 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.
- Walser M. Nutritional effects of nitrogen-free analogues of essential amino acids. *Life Sci.* 1975 Oct 10;17(7):1011-20.
- Walsh NP, Whitham M. Exercising in environmental extremes : a greater threat to immune function? *Sports Med.* 2006;36(11):941-76.
- Westman EC, Feinman RD, Mavropoulos JC, Vernon MC, Volek JS, Wortman JA, et al. Low-carbohydrate nutrition and metabolism. *Am J ClinNutr.* 2007;86:276-84.
- Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *ProgNeurobiol.* 2010 Jul;91(3):200-19.
- Winnick JJ, Davis JM, Welsh RS, Carmichael MD, Murphy EA, Blackmon JA. Carbohydrate feedings during team sport exercise preserve physical and CNS function. *Med Sci Sports Exerc.* 2005 Feb;37(2):306-15.
- Wu RE, Huang WC, Liao CC, Chang YK, Kan NW, Huang CC. Resveratrol protects against physical fatigue and improves exercise performance in mice. *Molecules.* 2013;18(4):4689-702.



2 OBJETIVOS

2. 1. OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito agudo da suplementação de aminoácidos e cetoanálogos sobre a amonemia, enzimas biomarcadoras de dano muscular e contagem de células brancas em ciclistas submetidos a exercício físico com baixo estresse ao calor

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar as alterações de variáveis bioquímicas (amônia, urato, glicose e lactato) em atletas após exercício de alta intensidade sob condições de baixo estresse térmico;

Verificar o aparecimento de microlesões musculares induzidas pelo aumento das concentrações de amônia e uso de cetoácidos, por meio da quantificação das variáveis bioquímicas (creatina Kinase, lactato desidrogenase, aspartatoaminotransferase e alanina aminotransferase);

Verificar o efeito da suplementação aguda de KAAA no conteúdo total e diferencial de células brancas após exercício de alta intensidade sob condições de baixo estresse térmico.



3 COLETÂNEA DE ARTIGOS

1º artigo: artigo de resultados

(LIMA, RCP; CAMERINO, SRAS; RODRIGUES, DAS; GOUVEIA, MGS; XIMENES DA SILVA, A; PRADO, ES). KETO ANALOGUE AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION AFFECTS THE ENZYMES BIOMARKERS OF MUSCLE DAMAGE RESPONSE DURING HIGH INTENSITY EXERCISE UNDER LOW HEAT STRESS ENVIRONMENT

Artigo escrito para a revista: Nutrition&Metabolism

KETO ANALOGUE AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION AFFECTS THE ENZYMES BIOMARKERS OF MUSCLE DAMAGE RESPONSE DURING HIGH INTENSITY EXERCISE UNDER LOW HEAT STRESS ENVIRONMENT

^{1,5}Rafaela Carvalho Pereira Lima

^{2,5}Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino

⁴Daniela Souza Araújo Rodrigues

^{3,5}Marcos Guilherme de Sousa Gouveia

¹Adriana Ximenes da Silva

^{2,5}Eduardo Seixas Prado

¹Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

²Graduate Program in Nutrition, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

³Faculty of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil.

⁴ Health Hospital Foundation; biomedical; Aracaju, Sergipe, Brazil.

⁵ Research Group Exercise and Metabolism.

Journal's section: Original article, full paper.

Corresponding author: Prof. Eduardo Seixas Prado
Laboratory of Biochemistry and Physiology of Exercise, Exercise and Metabolism
Research Group, Federal University of Alagoas.
Campus A.C. Simões; Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió-
AL, CEP: 57.072-970. Telephone: +55 82 32141032.
eduseipra@gmail.com

Financial support: Foundation of Alagoas Search
Notice No. 001/2013; process number 20130603-002-0040-0046.

ABSTRACT

Background: Strenuous exercise promotes metabolic changes and can contribute to the onset of fatigue and impaired performance. Hyperammonaemia in response to exercise can be reduced through supplementation with either amino acids or combined keto analogues and amino acids (KAAA). In the present study, we evaluated KAAA supplementation on ammonia production and enzymes biomarkers muscle damage during strenuous exercise under low heat stress environment. Methods: Sixteen cyclists were divided in two identical groups: KAAA (KA) or placebo (PL) supplements. Results: Athletes did a ketogenic diet for 2 d and performed 2 h of cycling session and a maximum incremental test (MIT), blood samples were obtained during the exercise. All groups had similar environmental conditions and intensity of exercise. PL group showed significant increase on ammonia concentration at exhaustion (Exh) compared with all moments; KA group was not increased. Non-supplemented group showed a significant increase in urate compared to KA group in Exh moment. KA group showed a significant increase in glucose at Exh from 0 min and 120 min. No difference between groups was also demonstrated in blood lactate levels. The PL group had increased blood levels of as creatine kinase, lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase. Only LDH showed significant differences after 120 minutes between groups. ALT levels on both group no showed significant increased at any time within the groups. Conclusion: We suggested that KAAA supplementation decreased ammonia concentration and enzymes biomarkers muscle damage after high intensity exercise, under low heat stress environment.

Key words: hyperammonemia. Urea.Creatine kinase.Exercise.

Background

Exercise promotes changes in the biochemical profile and can increase the chances of muscle damage, contribute to the onset of fatigue and impaired performance^[1-3]. In fact, biochemical analysis provide metabolic informations and may be useful to better assess and quantify muscle stress following exercise^[4,5].

During a low-energetic state, such as high intensity exercise, the adenosine triphosphate (ATP): adenosine diphosphate (ADP) ratio decreases in muscle, and myokinase is activated to synthesise ATP. This process leads to an increase in both adenosine monophosphate (AMP) deamination and urate synthesis rate with simultaneous ammonia production^[3,6,7]. It has been suggested that increased ammonemia during exercise cause both central and peripheral fatigue^[4]. Furthermore, ammonemia concentration during exercise depends on carbohydrate availability^[8]. Consumption of low-carbohydrate diet (ketogenic diet) combined with exercise has been shown to reduce the glycogen stores and induce hyperammonemia^[9,10].

During AMP deamination exacerbated, an increase of oxidative stress can occur, with consequent associated muscle damage and leakage of enzymes biomarkers for blood, such as creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)^[11-13].

It is also acknowledged that hyperammonemia and enzymes biomarkers of muscle damage may be affected by hot environmental condition^[11,14-16]. Previous studies has been demonstrated that using amino acids and ketoanalogues (KAAA) can reduces blood ammonia and urate concentration and suggest that acute KAAA during exercise is not primarily due to ammonia removal via the synthesis of urea but rather to the carbon bodies used to produce ATP^[17,18]. Such conditions could reduce oxidative stress and consequent muscle damage and leakage of enzymes biomarkers for blood.

However, to our knowledge, there is no information available concerning the influence of effect of short-term KAAA supplementation on the ammonia metabolism and enzymes biomarkers of muscle damage after high intensity exercise under low heat stress conditions in acclimatized athletes. This information may be helpful in better understanding the effect of KAAA on ammonia metabolism and athletic performance.

We hypothesized that when exercising in low heat stress conditions, KAAA supplementation reduces ammonia and leakage of enzymes biomarkers of muscle damage for blood. In the present study, we evaluated the acute effect of KAAA on ammonia production and enzymes biomarkers of muscle damage in cyclists undergoing strenuous exercise under low heat stress environment.

Material and methods

Sixteen male endurance-trained cyclists, were divided into two groups of eight athletes each: experimental group – KA, n = 8 (32.5 ± 2.3 years; 68.03 ± 2.54 kg; and 1.71 ± 0.28 m); and placebo group – PL, n = 8 (32.7 ± 2.1 years; 67.20 ± 3.22 kg; 1.71 ± 0.27 m) with similar levels of the maximal oxygen consumption ($\text{VO}_{2\text{max}}$) (KA group $58.89 \pm 2.38 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and PL group $59.51 \pm 2.23 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) and acclimatized to training in the heat, participated in the study voluntarily. All subjects had a mean of at least three years of training often participating in competitions. They did not have any kind of disease or use of ergogenic resources that could interfere in the search results. All participants were informed early of the study procedures and written informed consent was obtained. This study was performed according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects were approved by the Ethics Committee for Human Research at the Federal University of Alagoas, number: 017640/2011-61.

One week before the start of the experiment, the athletes went to the laboratory and anthropometric variables were recorded as the weight and height. Moreover, was performed familiarization with the cycle ergometer and the determination of the $\text{VO}_{2\text{max}}$ through an maximum incremental test (MIT). The MIT consisted of a three minute warm up with initial power output of 25 W with free cadence. Immediately after the warm up, the power output was set to 50 W, cadence increased to 80 rpm and every last minute of test was made increments of $25 \text{ W} \cdot \text{min}^{-1}$. Exhaustion was defined when the subject reported exhaustion and inability to keep pace established for more than five consecutive seconds. $\text{VO}_{2\text{max}}$ was determined by automatic gas analyzer (Cosmed Quark CPET's, Rome, Italy) and VO_2 increased greater than $2.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ by increasing the intensity was used to represent the $\text{VO}_{2\text{max}}^{[19]}$. Still one week before the start of the

experimente, athletes received an individualisedketogenic diet: 35% of the recommended energy intake from protein; 55% from lipids; and 10% from carbohydrates^[20]. Subjects were asked to maintain their normal training schedule (~ 60 km.d⁻¹) up to 48 h before the day of the experiment and to follow the fluid intake (~ 3 L.d⁻¹, without the use of beverages caffeinated) and ketogenic diet for 2 d before the experiment and during the day of the experimente (normal training and a ketogenic diet were used to reduce muscle glycogen stores and to induce a higher increase in ammonemia).

On the day of the experimental period, the subjects reported to the laboratory in a fasting state and received breakfast ketogenic with ~ 200 mL of water. After 1 h of breakfast, the KA group received five tablets of a KAAA mixture (Ketosteril®; Fresenius, Bad Homburg, Germany), and PL group five 200 mg tablets of lactose, which served as a placebo (Farmaderm®, Maceió, Alagoas, Brazil) in a randomised double-blind manner. The composition of the KAAA mixture/tablet was as follows: α-keto analogues of isoleucine (335 mg), leucine (505 mg), phenylalanine (430 mg) and valine (340 mg); α-hydroxy analogue of methionine (295 mg); L-lysine acetate (75 mg L-lysine); L-threonine (265 mg); Ltryptophan (115 mg); L-histidine (190 mg); L-tyrosine (150 mg). Both supplements were provided in indistinguishable capsules with ~ 300 mL of water that promoted the homogeneity of the hydration status of athletes.

After 1 h of supplementation, the athletes performed stretching followed by a warm up 10 min at 50 % maximum heart rate. Athletes started 2 h of cycling session at 80 rpm, following an power output between 75% to 85% of the estimated maximum heart rate. Heart rate was recorded throughout the exercise protocol using a heat rate monitor (Polar® FT1, Kempele, Finland). Immediately after cycling session for 2 h, athletes were again submitted to a MIT to induce exhaustion (Exh) in both groups and to evaluate ammonia and enzymes biomarkers muscle damage.

A catheter was placed into the median cubital vein. At 1 h after the supplementation, blood samples were obtained at rest (0 min) and at 60 min intervals throughout the exercise period (60 and 120 min). Finally, blood samples were collected after MIT (at Exh). Athletes did not received fluids during the trial.Blood samples were analysed in duplicate after collection. To avoid the loss of volatile compounds, blood samples were immediately centrifuged, and the serum

was separated and stored at 4° C for subsequent biochemical analysis in a 24 h period (ammonia was measured immediately after centrifugation to prevent their volatility). Biochemical determination of glucose, lactate, urate, CK, LDH, AST and ALT concentrations was performed in serum using commercially available spectrophotometric assays (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Ammonia concentrations were measured using an enzymatic UV method (Randox, Crumlin UK) on a Dade Model Dimension RXL Automated Chemistry Analyzer (Dade Behring, Eschborn, Germany). Urine samples also were used to ketonuria analysis by reagent strips for urinalysis (Biocolor/Bioeasy®, Belo Horizonte, MinasGerais) and to determine ketosis status.

Throughout the experiment, were also measures ambient temperature (in degrees centigrade, ° C) and relative humidity (in percentage %) by thermometer (Instrutemp®, São Paulo, São Paulo, Brazil) as environmental conditions. During at all times of collection was also recorded perceived exertion scale (scale values range from 6 to 20) of the athletes^[21]. Heart rate and perceived exertion scale were used as intensity of exercise markers.

Data are shown as mean ± standard error. After testing for normality (Kolmogorov–Smirnov) and equality test variance (Levene median), the changes in the variables environmental conditions, intensity of exercise and biochemistry, between time points were analysed by a one-way ANOVA (treatments), and the group changes were evaluated by a two way ANOVA (treatments x time) for repeated measures. Significances ($P < 0.05$) were confirmed using the Tukey test as a *post hoc* analysis. The area under the curve (AUC) for blood ammonia data for each individual in each treatment was determined using the following equation:

$$\text{AUC} = A_i(T_i + 1 - T_i) + 0.5(A_i + 1 - A_i)(T_i + 1 - T_i)$$

Assuming that the ammonia level at baseline corresponds to the resting ammonia level and where AUC is the area under the curve, A is ammonia (μmol/L) and T is time (min). When the sample showed a non-normal distribution, nonparametric tests correspondents, were used.

Results

We used a 120 min cycling session followed by a MIT to drive the athletes to exhaustion and to evaluate the acute effect of KAAA supplementation on ammonia production and enzymes biomarkers muscle damage. Both groups were under positive ketosis status before cycling session.

The thermal stress by ambient temperature and relative humidity indicated a low heat stress conditions, in both group, throughout cycling session. Ambient temperature at Exh values were: KA 23.6 ± 0.2 °C and PL 23.7 ± 0.3 °C; Relative humidity at Exh values were: KA 56.2 ± 1.3 % and PL 55.9 ± 1.2 %. There was no significant difference between groups. However, ambient temperature and relative humidity increased above baseline levels in response to exercise in the KA and PL groups from 60 min, 120 min, until the end of the experiment ($P < 0.05$) (Figures 1A e 1B). The data obtained from the heart rate (figure 1C) and perceived exertion scale (Figure 1D) also showed no significant difference between groups. On the other hand, heart rate and perceived exertion scale significantly increased from 60 min within the groups, mainly at exhaustion ($P < 0.05$).

Figure 1. Environmental conditions and intensity of exercise throughout the cycling session.

The effect of KAAA on blood ammonia and urate levels were also measured. The data of blood ammonia concentrations showed no significant difference between groups ($P > 0.05$) (Figure 2A). On the other hand, there was significant increase at Exh on PL group compared with resting values, 60 min and 120 min within the group ($P < 0.05$). In contrast, ammonia concentration was not increased in the KA group at any time within the group ($P > 0.05$). The area under the curve of ammonia of the KA group was ~ 20 % lower than the PL group.

The uratelevels produced by AMP deamination was measured. The urate levels also showed similar significant increase at Exh on PL group compared with resting values, 60 min and 120 min within the group ($P < 0.05$), while KA group was not increased at any time within the group ($P > 0.05$). Moreover, blood

urateconcentrations showed significant difference between groups at Exh ($P > 0,05$) (Figure 2B).

To understand the role of KAAA in gluconeogenesis, we measured the blood glucose level. No significant difference in blood glucose levels was found during the trial time between the groups. However, KA group showed a significant increase at Exh from 0 min and 120 min ($P < 0.05$) (Figure 2C). In addition, we evaluated the blood lactate levels, an indicator of consistent glucose metabolism during exercise. No difference between groups ($P > 0,05$) was also demonstrated in blood lactate levels. But, there was an significant increase at Exh moment ($P < 0,05$) in both groups, compared with all exercise moments (2D).

Figure 2.Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the ammonia, urate and glucose, but not lactate metabolism.

The effect of KAAA on enzymes biomarkers muscle damage was measured. The data of blood CK concentrations showed no significant difference between groups ($P > 0,05$) (Figure 3A). However, there was significant increase at Exh and 120 min on PL group compared with resting values, within the group ($P < 0.05$). In contrast, CK concentration was not increased in the KA group at any time within the group ($P > 0.05$). The LDH levels also showed significant increase at Exh on PL group compared with resting values, 60 min and 120 min within the group ($P < 0.05$), Furthermore, blood LDH concentrations showed significant difference between groups at 120 min ($P > 0,05$) (figure 3B). On the other hand, KA group was not increased at any time within the group ($P > 0.05$).

No significant difference in blood AST and ALT levels was found during the trial time between the groups. However, AST levels on PL group showed a significant increase at Exh from 0 min within the group ($P < 0.05$) (Figure 3C). But, ALT levels on both group no showed significant increased at any time within the groups ($P > 0.05$).

Figure 3.Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the lactate dehydrogenase (LDH), creatinine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) levels, but not alanine aminotransferase (ALT) levels.

Discussion

The aim of this study was to evaluate the acute effect of KAAA on ammonia production and enzymes biomarkers of muscle damage during strenuous exercise under low heat stress environment. It is known that monitoring these changes in sports is important because can reveal the state of the muscle and its biochemical adaptation to physical load during training and/or competition and aid athletic performance^[1,4]. The acute use of a mixture of KAAA supplementation decreased the increase in ammonemia and enzymes biomarkers muscle damage levels caused by high intensity exercise.

The KAAA supplementation is frequently used in patients with liver damage, like the hepatic encephalopathy (HE), which due to a failure of the detoxification systems, blood ammonia levels start to increase leading to different cerebral and neurological disorders^[22,23]. Recent studies involving physical exercise, reported that acute supplementation KAAA has been proposed as a glycolytic substrate, promoting anaplerosis by different Krebs Cycle intermediates and lowering increased blood ammonia and metabolites associated^[17,18].

Among the changes imposed on the metabolism by exercise, stands out the increase in blood ammonia production (hyperammonemia). Ammonia is highly toxic to the nervous system and its high levels can cause adverse effects on neurotransmission and induce central and / or peripheral fatigue^[24-28].

The ammonia production in muscle may be due to the deamination of both AMP and amino acids, which are activated in an intensity and duration dependent manner^[3]. During high-intensity exercise, the active skeletal muscle becomes a major source of ammonia by deamination of AMP to inosine monophosphate (IMP)^[4].

Furthermore, high intensity exercise combined a low-carbohydrate diet, increases the production of ammonia. It is known that a decreased availability of carbohydrates in the muscle affect energy metabolism and to leads to an increase in deamination of AMP resulting in enhancement of muscle ammonia production^[8]. In this study, prolonged exercise and ketogenic diet were used before the high-intensity exercise to lead the athletes to exhaustion, to decrease the availability of glycogen in the liver and muscle and to increase the amounts of ammonia blood.

The athletes increased their blood ammonia concentrations after the Exh only in the unsupplemented group. Several studies show increased blood ammonia in high intensity exercise^[29, 30]. Ten healthy young adults has increased ammonia after perform five sets of the same maximal cycling intermittent exercise^[31]. Esbjornsson et al^[32], reported an increase in the plasma ammonia over the period of the three 30-s cycle sprints (Wingate test), performed by healthy females (n 58) and males (n 56). The supplementation of KAAA affect the concentrations of ammonia, as in our study, the supplemented group has not shown significant changes, i e, attenuated the increase in blood ammonia. Besides, the thermal stress seems to contribute to the increase in blood ammonia during exercise^[15, 25, 27].

The urate concentrations were significantly higher in the PL group after Exh. Our data suggest that hyperammonemia presented in pl group is mainly due to the deamination of AMP, one of the metabolic pathways of ammonia production, especially in muscle glycogen deficit and exercises of high intensity, whose final metabolic product is urate^[3]. The urate production was reduced by the administration of KAAA in the KA group. The blood glucose was increased in the Ka group only after Exh moment, suggesting that KAAA providing glucose for exercise through gluconeogenesis. Lactate levels increased in both groups after Exh, suggesting a change in the predominant energy path^[28]. Prado et al^[18] also found an increase in ammonia concentrations, although with maintenance of glucose and lactate concentrations after using KAAA in cyclists undergoing long duration exercise.

It is notorious that during the urate formation process, there is production of reactive oxygen species causing muscle cell damage, allowing leakage of enzymes marker of muscle damage to the blood^[12]. When intensity exercise is within the normal range of metabolism, are no significant changes in membrane permeability. However, when intensity exercise exceeds this range permeability changes and enzymes appear in the circulation^[33], in other words, it is clear that exercise is a powerful inducer of muscle injury^[5].

Moreover, it has been proposed that resting values of these enzymes in ultraendurance athletes are high due to chronic liver damage following long-term strenuous exercise^[34]. In the present study, we observed increased amounts of blood CK, LDH and AST. These increases could be due to muscle and liver

damage from increasing ammonia concentrations, especially after the Exh. The elevation of these enzymes are generally observed when measured hours or days after exercise^[35]. However, in this study, these enzymes, increased during exercise, from 120 min to CK and after Exh for LDH and AST, only in the group not supplemented. Elevated pre-match levels indicate a possible fatigue accumulation due to intense daily exercise^[33]. Nevertheless, our athletes started the exercise with values within the reference values for nonathletes^[36].

Under these circumstances, our study postulates that acute KAAA supplementation was able to provide glycolytic energy substrates, saving the use of deamination of AMP, and consequently reducing the formation of ammonia, urate and therefore, causing less oxidative stress to form markers skeletal muscle damage and muscle fatigue. Studies report that this condition may be exacerbated when the exercise is performed under climatic conditions of environmental heat^[5,11]. In excessive heat production, jointly with insufficient heat dissipation, occurs central nervous system abnormalities. Rhabdomyolysis is a frequent complication of heat illness, but can happen in the absence of high heat environmental in response to strenuous exercise when mechanical and/or metabolic stress damages skeletal muscle, causing elevated serum enzymes biomarkers of muscle damage and potentially muscle pain and fatigue^[16].

Conclusion

According to our knowledge, this study is the first investigation to evaluate the acute effect of KAAA supplementation on ammonia metabolism after high intensity exercise and enzymes biomarkers of muscle damage levels under low heat stress conditions. Our data suggest that KAAA supplementation might decrease ammonemia after high intensity exercise, as well as, leakage of enzymes biomarkers of muscle damage for blood under these conditions. Maybe, the exercise protocol and the absence of a significant increase in body temperature of athletes, because the low heat stress environment, were insufficient to evidence increased concentration of ammonia and the attenuation of KAAA supplementation in hyperammonemia.

Referências

1. Brancaccio P, Limongelli FM, Maffulli N. Monitoring of serum enzymes in sport. *Br J Sports Med.* 2006 Feb;40(2):96-7.
2. Lazarim FL, Antunes-Neto JM, da Silva FO, Nunes LA, Bassini-Cameron A, Cameron LC, et al. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. *J Sci Med Sport.* 2009 Jan;12(1):85-90.
3. Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol.* 2010 Jul;91(3):200-19.
4. Banister EW, Cameron BJ. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med.* 1990 May;11 Suppl 2:S129-42.
5. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med.* 2010 Jun;48(6):757-67.
6. Sahlin K, Tonkonogi M, Soderlund K. Plasma hypoxanthine and ammonia in humans during prolonged exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999 Oct;80(5):417-22.
7. 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.
8. Czarnowski D, Langfort J, Pilis W, Gorski J. Effect of a low-carbohydrate diet on plasma and sweat ammonia concentrations during prolonged nonexhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995;70(1):70-4.
9. Langfort J, Czarnowski D, Zendzian-Piotrowska M, Zarzecny R, Gorski J. Short-term low-carbohydrate diet dissociates lactate and ammonia thresholds in men. *J Strength Cond Res.* 2004 May;18(2):260-5.
10. Snow RJ, Carey MF, Stathis CG, Febbraio MA, Hargreaves M. Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2000 May;88(5):1576-80.
11. Brancaccio P, Maffulli N, Buonauro R, Limongelli FM. Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med.* 2008 Jan;27(1):1-18, vii.
12. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5119-23.
13. Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology.* 2005 Feb;41(2):380-2.
14. Febbraio MA. Alterations in energy metabolism during exercise and heat stress. *Sports Med.* 2001;31(1):47-59.
15. Linnane DM, Bracken RM, Brooks S, Cox VM, Ball D. Effects of hyperthermia on the metabolic responses to repeated high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2004 Oct;93(1-2):159-66.
16. Capacchione JF, Muldoon SM. The relationship between exertional heat illness, exertional rhabdomyolysis, and malignant hyperthermia. *Anesth Analg.* 2009 Oct;109(4):1065-9.
17. de Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, Magalhaes-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.
18. Prado ES, de Rezende Neto JM, de Almeida RD, Doria de Melo MG, Cameron LC. Keto analogue and amino acid supplementation affects the

- ammonaemia response during exercise under ketogenic conditions. *Br J Nutr.* 2011 Jun 28;105(12):1729-33.
19. Howley ET, Bassett DRJ, Welch HG. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 1995;27(9):1292-301.
 20. Westman EC, Feinman RD, Mavropoulos JC, Vernon MC, Volek JS, Wortman JA, et al. Low-carbohydrate nutrition and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:276-84.
 21. Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc.* 1982;14(5):377-81.
 22. Felipo V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Dec;14(12):851-8.
 23. Savica V, Santoro D, Ciolino F, Mallamace A, Calvani M, Savica R, et al. Nutritional therapy in chronic kidney disease. *Nutr Clin Care.* 2005 Apr-Jun;8(2):70-6.
 24. Bassini A, Cameron LC. Sportomics: building a new concept in metabolic studies and exercise science. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Mar 21;445(4):708-16.
 25. Mohr M, Rasmussen P, Drust B, Nielsen B, Nybo L. Environmental heat stress, hyperammonemia and nucleotide metabolism during intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2006 May;97(1):89-95.
 26. Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Rodrigo R, Llansola M, Piedrafita B, et al. Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: therapeutic implications. *Neurochem Int.* 2009 Jul-Aug;55(1-3):106-12.
 27. Nybo L. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010;2:779-92.
 28. Nybo L, Dalsgaard MK, Steensberg A, Moller K, Secher NH. Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *J Physiol.* 2005 Feb 15;563(Pt 1):285-90.
 29. Broberg S, Sahlin K. Hyperammoniemia during prolonged exercise: an effect of glycogen depletion? *J Appl Physiol (1985).* 1988 Dec;65(6):2475-7.
 30. Goncalves LC, Bessa A, Freitas-Dias R, Luzes R, Werneck-de-Castro JP, Bassini A, et al. 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(1):30.
 31. Demura S, Morishita K, Yamada T, Yamaji S, Komatsu M. Effect of L-ornithine hydrochloride ingestion on intermittent maximal anaerobic cycle ergometer performance and fatigue recovery after exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2011 Nov;111(11):2837-43.
 32. Esbjornsson M, Rooyackers O, Norman B, Rundqvist HC, Nowak J, Bulow J, et al. Reduction in plasma leucine after sprint exercise is greater in males than in females. *Scand J Med Sci Sports.* 2012 Jun;22(3):399-409.
 33. Martinez-Amat A, Boulaiz H, Prados J, Marchal JA, Padial Puche P, Caba O, et al. Release of alpha-actin into serum after skeletal muscle damage. *Br J Sports Med.* 2005 Nov;39(11):830-4.
 34. Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, Gandra PG, Nunes LS, Bassini-Cameron A, et al. High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med.* 2008 Nov;42(11):889-93.

35. Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic markers in sports medicine. *Adv Clin Chem.* 2012;56:1-54.
36. Kratz A, Lewandrowski KB. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Normal reference laboratory values. *N Engl J Med.* 1998 Oct 8;339(15):1063-72.

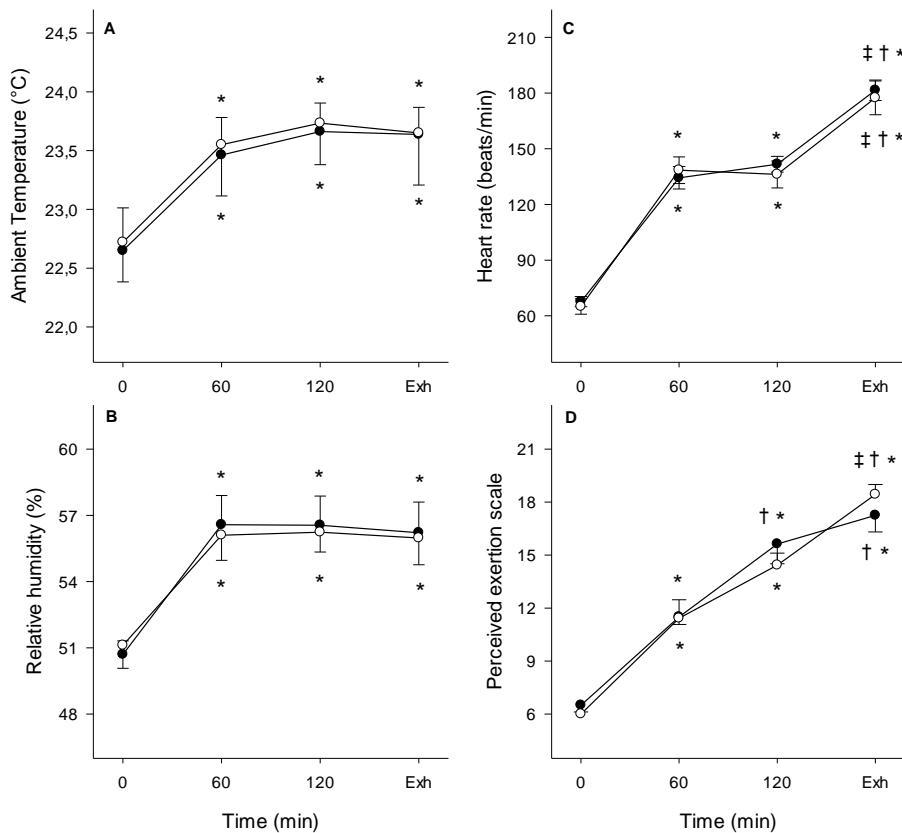


Figure 1. Environmental conditions and intensity of exercise throughout the cycling session. All groups had similar environmental conditions and intensity of exercise. Athletes exercised for 2 h followed by a progressive maximum test to drive the athletes to exhaustion, after KAAA supplementation (experimental group - KA, ●) or control supplementation (PL, ○). Values are means and standard errors (SEM). (A) Ambient temperature: resting values were KA 22.6 ± 0.3 °C and PL 22.7 ± 0.3 °C; (B) Relative humidity: resting values were KA 50.7 ± 0.6 % and PL 51.1 ± 1.0 %; (C) Heart rate: resting values were KA 67.6 ± 2.7 beats/min and PL 65.0 ± 4.1 beats/min; (D) Perceived exertion scale: resting values were KA 6.5 ± 0.3 and PL 6.3 ± 0.3 . * Mean values were significantly different from 0 min within the group. † Mean values were significantly different from 60 min within the group. ‡ Mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). Values did not differ significantly between treatments ($P > 0.05$).

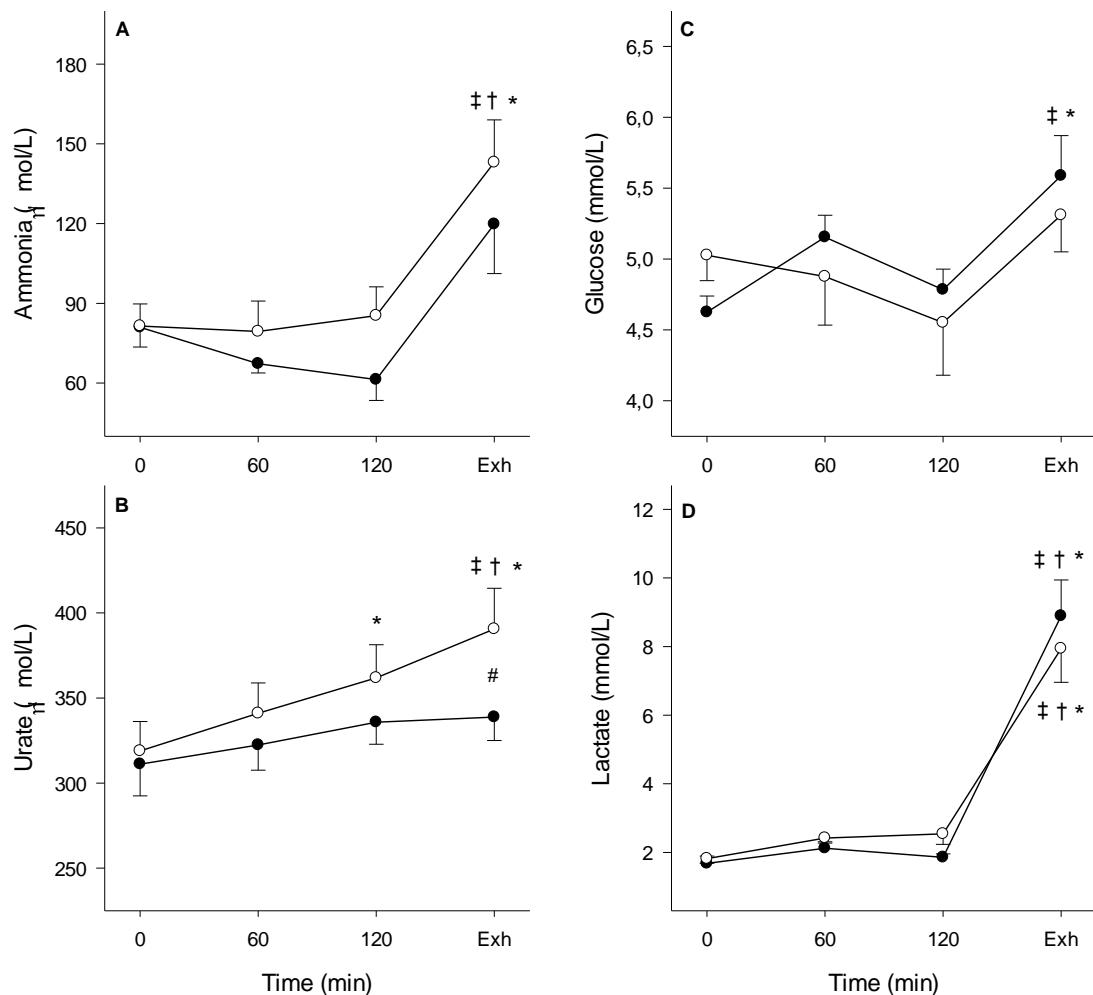


Figure 2. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the ammonia, urate and glucose, but not lactate metabolism. Athletes exercised for 2 h followed by a progressive maximum test to drive the athletes to exhaustion, after KAAA supplementation (experimental group - KA, ●) or control supplementation (PL, ○). Values are means and standard errors (SEM). (A) Ammonia: resting values were KA $83.66 \pm 3.94 \mu\text{mol/L}$ and PL $81.49 \pm 8.25 \mu\text{mol/L}$; (B) Urate: resting values were KA $281.26 \pm 34.02 \mu\text{mol/L}$ and PL $288.04 \pm 34.30 \mu\text{mol/L}$; (C) Glucose: resting values were KA $4.62 \pm 0.11 \text{ mmol/L}$ and PL $5.02 \pm 0.17 \text{ mmol/L}$; (D) Lactate: resting values were KA $1.68 \pm 0.21 \text{ mmol/L}$ and PL $1.81 \pm 0.13 \text{ mmol/L}$; * Mean values were significantly different from 0 min within the group. † Mean values were significantly different from 60 min within the group. ‡ Mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). # Mean values were significantly different between treatments ($P < 0.05$).

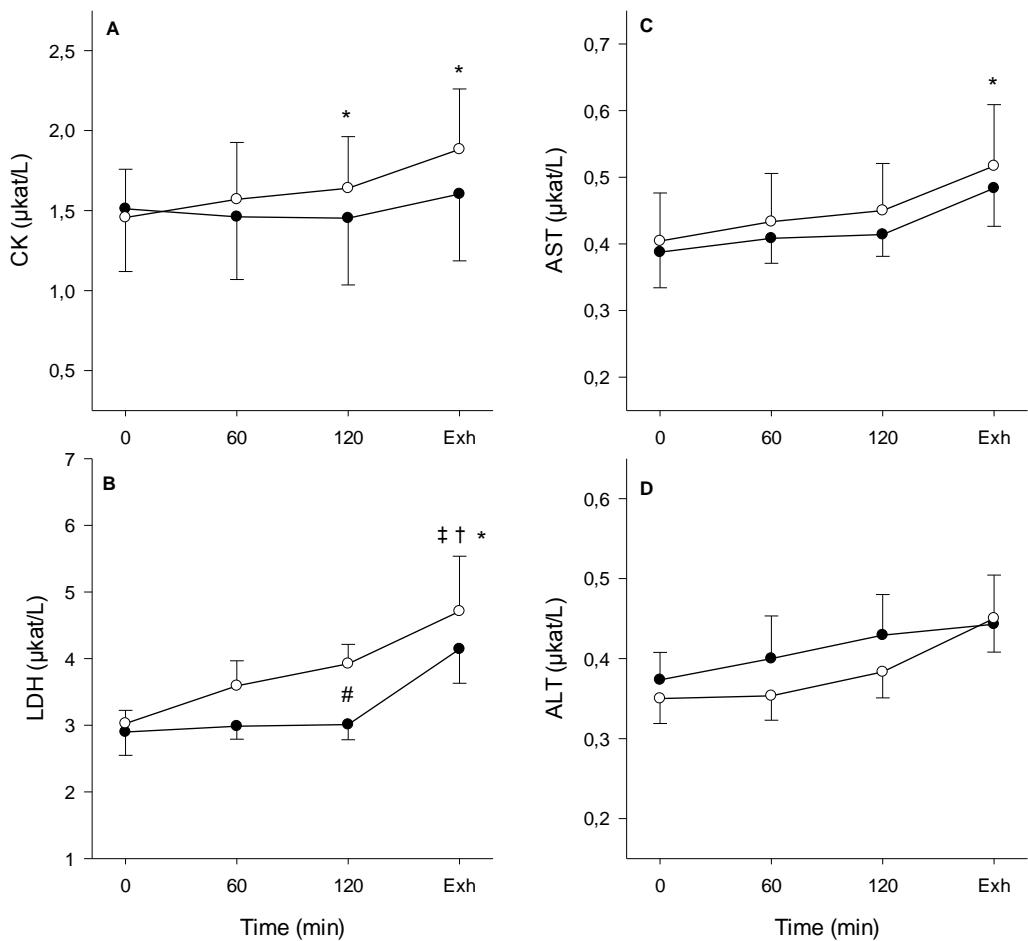


Figure 3. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the lactate dehydrogenase (LDH), creatinine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) levels, but not alanine aminotransferase (ALT) levels. Athletes exercised for 2 h followed by a progressive maximum test to drive the athletes to exhaustion, after KAAA supplementation (experimental group - KA, ●) or control supplementation (PL, ○). Values are means and standard errors (SEM). (A) CK: resting values were KA $1.81 \pm 0.26 \mu\text{kat/L}$ and PL $1.45 \pm 0.30 \mu\text{kat/L}$; (B) LDH: resting values were KA $2.89 \pm 0.34 \mu\text{kat/L}$ and PL $3.02 \pm 0.19 \mu\text{kat/L}$. (C) AST: resting values were KA $0.38 \pm 0.05 \mu\text{kat/L}$ and PL $0.40 \pm 0.07 \mu\text{kat/L}$; (D) ALT: resting values were KA $0.37 \pm 0.03 \mu\text{kat/L}$ and PL $0.48 \pm 0.08 \mu\text{kat/L}$; * Mean values were significantly different from 0 min within the group. † Mean values were significantly different from 60 min within the group. ‡ Mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). # Mean values were significantly different between treatments ($P < 0.05$).

2º artigo: artigo de resultados

(LIMA, RCP; CAMERINO, SRAS; RODRIGUES, DAS; GOUVEIA, MGS; XIMENES DA SILVA, A; PRADO, ES) KETO ANALOGUE AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION AFFECTS WHITE BLOOD CELLS COUNTS DURING HIGH INTENSITY EXERCISE UNDER LOW HEAT STRESS ENVIRONMENT

Artigo escrito para a revista: Journal of the International Society of Sports Nutrition

KETO ANALOGUE AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION AFFECTS WHITE BLOOD CELLS COUNTS DURING HIGH INTENSITY EXERCISE UNDER LOW HEAT STRESS ENVIRONMENT

^{1,5}Rafaela Carvalho Pereira Lima

^{2,5}Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino

⁴Daniela Souza Araújo Rodrigues

^{3,5}Marcos Guilherme de Sousa Gouveia

¹Adriana Ximenes da Silva

^{2,5}Eduardo Seixas Prado

¹Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

²Graduate Program in Nutrition, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

³Faculty of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil.

⁴ Health Hospital Foundation; biomedical; Aracaju, Sergipe, Brazil.

⁵ Research Group Exercise and Metabolism.

Journal's section: Original article, full paper.

Corresponding author: Prof. Eduardo Seixas Prado
Laboratory of Biochemistry and Physiology of Exercise, Exercise and Metabolism
Research Group, Federal University of Alagoas.
Campus A.C. Simões; Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió-
AL, CEP: 57.072-970. Telephone: +55 82 32141032.
eduseipra@gmail.com

Financial support: Foundation of Alagoas Search
Notice No. 001/2013; process number 20130603-002-0040-0046.

ABSTRACT

Exercise induces an acute immune response. The poor nutritional status of some athletes may predispose them to immunosuppression. The supplementation with either amino acids or combined keto analogues and amino acids (KAAA) it seems providing glucose for exercise through gluconeogenesis. In the present study, we evaluated KAAA supplementation on white blood cells counts during strenuous exercise under low heat stress environment. Sixteen cyclists were divided in two groups: KAAA (KA) or placebo (PL) supplements. We used a ketogenic diet for 2 d and 120 min cycling session followed by a maximum incremental test, blood samples were obtained during the exercise. There was increase significant on ambient temperature post exercise compared with pre moment for both groups. Cortisol showed no significant difference between groups but was significant increase at Exh on PL group. KA group showed a significant increase in blood glucose levels at Exh from 0 min and 120 min. Leukocyte and neutrophils concentrations were significant increase on KA group within the group but no significant differences between groups. No difference between groups and moments were demonstrated in blood Basophils, eosinophils and monocytes levels. We suggested that KAAA supplementation did attenuate the immunosuppression condition in white blood cells after high intensity exercise, under low heat stress environment.

Key words: Exercise. Immunity. Cortisol. Neutrophils. Leukocytes.

Introduction

It is widely known that white blood cells count, such as blood leukocytes, lymphocytes and neutrophils counts, may be affected by exercise^[1,2]. Though transiently, it is suggested that the immune system is suppressed (immunosuppression) and stressed, after prolonged intense endurance exercise, supporting the viewpoint that protection is compromised and infection risk may be increased, particularly in athletes, with impairment of performance^[3-5].

In addition to the intensity and duration of exercise, others stress factors are known to influence the immune response to exercise, including: carbohydrate availability, blood cortisol levels and heat stress^[2]. It is also well documented that carbohydrate ingestion before, during, and after prolonged intense endurance exercise, with higher blood glucose levels, may help to lessen the stress on the immune system^[6]. On the other hand, cortisol has been implicated in immunosuppression and carbohydrate ingestion reduces the cortisol response to exercise^[1,6,7]. Exercise in a hot environment also stimulates a stress response that involves the increased both cortisol and leukocyte counts^[8].

Since amino acids and ketoanalogues (KAAA) supplementation is a mixture of ketogenic and glucogenicketo analogues and amino acids, it has been suggested that (KAAA) providing glucose for exercise through gluconeogenesis, during moderate prolonged exercise^[9,10]. Such carbohydrate availability could attenuate immunosuppression. However, to our knowledge, there is no information available concerning the influence of effect of short-term KAAA supplementation on the white blood cells counts after high intensity exercise under low heat stress conditions in acclimatized athletes. This information may be helpful in better understanding the effect of KAAA on immune response to exercise and athletic performance.

It is also proven that carbohydrate ingestion before, during, and after prolonged intense endurance exercise, with higher blood glucose levels, may help to lessen the stress on the immune system^[6]. On the other hand, cortisol has been implicated in immunosuppression and carbohydrate ingestion reduces the cortisol response to exercise^[1,3,7]. Exercise in a hot environment also stimulates a stress response that involves the increased both cortisol and leukocyte counts^[8].

We hypothesized that when exercising in low heat stress conditions, KAAA supplementation can increase gluconeogenesis by reducing the release of cortisol and its immunosuppressive effect. Therefore, we evaluated the acute effect of KAAA on total and differential white blood cells counts in cyclists undergoing strenuous exercise under low heat stress environment.

Material and methods

Sixteen male endurance-trained cyclists, were divided into two groups of eight athletes each: experimental group – KA, n = 8 (32.5 ± 2.3 years; 68.03 ± 2.54 kg; and 1.71 ± 0.28 m); and placebo group – PL, n = 8 (32.7 ± 2.1 years; 67.20 ± 3.22 kg; 1.71 ± 0.27 m) with similar levels of the maximal oxygen consumption (VO_2max) (KA group $58.89 \pm 2.38 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and PL group $59.51 \pm 2.23 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) and acclimatized to training in the heat, participated in the study voluntarily. All individuals used in the studies had at least three years of training and participating in competitions often. They did not have any kind of disease or use of ergogenic resources that could interfere in the search results. Earlier, all participants were informed about the study procedures and accepted the conditions imposed. This study was conducted in accordance with the guidelines set out in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects were approved by the Ethics Committee for Human Research at the Federal University of Alagoas, number: 017640/2011-61.

One week before the start of the experiment, the athletes went to the laboratory and anthropometric variables were recorded as the weight and height. Moreover, was performed familiarization with the cycle ergometer and the determination of the VO_2max through a maximum incremental test (MIT). The MIT consisted of a three minute warm up with initial power output of 25 W with free cadence. Immediately after the warm up, the power output was set to 50 W, cadence increased to 80 rpm and every last minute of test was made increments of $25 \text{ W} \cdot \text{min}^{-1}$. Exhaustion was defined when the subject reported exhaustion and inability to keep pace established for more than five consecutive seconds. VO_2max was determined by automatic gas analyzer (CosmedQuarkCPET's, Rome, Italy) and VO_2 increased greater than $2.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ by increasing the intensity was used to represent the VO_2max ^[11]. Still one week before the start of the

experiment, athletes received an individualized ketogenic diet: 35% of the recommended energy intake from protein; 55% from lipids; and 10% from carbohydrates^[12]. Subjects were asked to maintain their normal training schedule (~ 60 km.d⁻¹) up to 48 h before the day of the experiment and to follow the fluid intake (~ 3 L.d⁻¹, without the use of beverages caffeinated) and ketogenic diet for 2 d before the experiment and during the day of the experiment (normal training and a ketogenic diet were used to reduce muscle glycogen stores and to induce a higher increase in cortisol and white blood cells counts).

On the day of the experimental period, the subjects reported to the laboratory in a fasting state and received breakfast ketogenic with ~ 200 mL of water. After 1 h of breakfast, the KA group received five tablets of a KAAA mixture (Ketosteril®; Fresenius, Bad Homburg, Germany), and PL group five 200 mg tablets of lactose, which served as a placebo (Farmaderm®, Maceió, Alagoas, Brazil) in a randomized double-blind manner. The composition of the KAAA mixture/tablet was as follows: α -keto analogues of isoleucine (335 mg), leucine (505 mg), phenylalanine (430 mg) and valine (340 mg); α -hydroxy analogue of methionine (295 mg); L-lysine acetate (75 mg L-lysine); L-threonine (265 mg); Ltryptophan (115 mg); L-histidine (190 mg); L-tyrosine (150 mg). Both supplements were provided in indistinguishable capsules with ~ 300 mL of water that promoted the homogeneity of the hydration status of athletes.

After 1 h of supplementation, the athletes performed stretching followed by a warm up 10 min at 50 % maximum heart rate. Athletes started 2 h of cycling session at 80 rpm, following a power output between 75% to 85% of the estimated maximum heart rate. Heart rate was recorded throughout the exercise protocol using a heat rate monitor (Polar® FT1, Kempele, Finland). Heart hate was used as intensity of exercise marker. Immediately after cycling session for 2 h, athletes were again submitted to a MIT to induce exhaustion (Exh) in both groups and to evaluate white blood cells counts. Throughout the experiment, were also measures ambient temperature (in degrees centigrade, ° C) and relative humidity (in percentage%) by thermometer (Instrutemp®, São Paulo, São Paulo, Brazil) as environmental conditions.

A catheter was placed into the median cubital vein. At 1 h after the supplementation, blood samples were obtained at rest (0 min) and at 60 min

intervals throughout the exercise period (60 and 120 min). Finally, blood samples were collected after MIT (at Exh). Athletes did not receive fluids during the trial.

Blood samples were analyzed in duplicate after collection. To avoid the loss of volatile compounds, blood samples were immediately centrifuged, and the plasma and serum were separated and stored at 4° C for subsequent hormonal and biochemical analysis in a 24 h period. Biochemical determination of glucose was performed in serum using commercially available spectrophotometric assays (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Cortisol concentrations were quantified using a standard, commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Assay Designs, Inc, Ann Arbor, MI). Coefficient of variation for analysis was 6.4%.

On the other hand, total (blood leukocyte) and differential (blood neutrophils, basophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes) white blood cells counts was performed by automated analysis (Human®, Wiesbaden, Hessen, Alemania) from blood collected into tubes containing EDTA and also stored at 4° C for subsequent analysis in a 24 h period. Urine samples also were used to ketonuria analysis by reagent strips for urinalysis (Biocolor/Bioeasy®, Belo Horizonte, MinasGerais) and to determine ketosis status.

Data are shown as mean ± standard error. Environmental conditions and heart rate were analyzed by unpaired and paired Student's t test, and significant differences were set at $p < 0.05$. After testing for normality (Kolmogorov-Smirnov) and equality test variance (Levene median), the changes in cortisol, glucose and white blood cells counts, between time points were analyzed by a one-way ANOVA (treatments), and the group changes were evaluated by a two way ANOVA (treatments x time) for repeated measures. Significances ($P < 0.05$) were confirmed using the Tukey test as a *post hoc* analysis. When the sample showed a non-normal distribution, nonparametric tests correspondents, were used.

Results

We used a 120 min cycling session followed by a MIT to drive the athletes to exhaustion and to evaluate the acute effect of KAAA supplementation on total and differential white blood cells counts. There was significant difference between groups in environmental conditions parameters and intensity of exercise when

comparing the pre and post cycling session. There was significant increase on ambient temperature post exercise compared with pre moment for both groups ($P < 0.05$). Also, the exercise was able to increase significantly the heart beats in both groups ($P < 0.05$). The only significant difference not observed was on humidity relative post exercise on PL group compared with pre moment (Table 1). Therefore, both groups had similar environmental conditions by ambient temperature and relative humidity indicated a low heat stress conditions, in both group, throughout cycling session. Both groups also had similar effort by heart rate.

Table 1. Environmental conditions and intensity of exercise throughout the cycling session from groups KEX and PEX, before (Pre) and after (Post) cycling session.

The effect of KAAA on blood cortisol and glucose levels were also measured. The data of blood cortisol showed no significant difference between groups ($P > 0.05$) (figure 1A). On the other hand, there was significant increase at Exh ($P < 0.05$) on PL group compared with resting values within the group. In contrast, blood cortisol was not increased in the KA group at any time within the group ($P > 0.05$). In addition, when measured by the percentage change, were no observed increase (or delay) from 120 min and Exh (~ 30 % and 22 %, respectively) in blood cortisol in the KA group when compared with baseline values within the group. While PL group showed an increase of blood cortisol at 120 min and Exh (~ 98 % and 70 %, respectively), compared with baseline values within the group (Inset of figure 1A).

To understand the role of KAAA in gluconeogenesis, we measured the blood glucose level during cycling session and MIT. No significant difference in blood glucose levels was found during the trial time between the groups. However, KA group showed a significant increase at Exh from 0 min and 120 min (Figure 1B). This is according to data from ketonuria after cycling. There was only increase in the ketonuria post cycling session (60%) on PL group compared with KA group (0 %).

Figure 1. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the cortisol and glucose levels.

To understand the role of KAAA in white blood cells, we measured the total (blood leukocyte) and differential (blood neutrophils, basophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes), during cycling session and MIT. The data of blood leukocytes counts showed no significant difference between groups ($P > 0.05$). On the other hand, there was significant increase at Exh on KA group compared with resting values, 60 min and 120 min within the group ($P < 0.05$). In contrast, there was only significant increase at Exh on PL group compared with resting values and 60 min within the group ($P < 0.05$) (Figure 2). Therefore, the immunosuppression condition was prevented in the KA group after MIT.

Figure 2. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the leukocytes count.

The effect of KAAA on blood neutrophils, basophils, eosinophils counts was also measured. Blood neutrophils counts had similar changes such as leukocyte counts in both groups. The data of blood neutrophils counts showed no significant difference between groups ($P > 0.05$). On the other hand, there was significant increase at Exh on KA group compared with resting values, 60 min and 120 min within the group ($P < 0.05$). In contrast, there was only significant increase at Exh on PL group compared with resting values and 60 min within the group ($P < 0.05$) (Figure 3A). Still, we were not able to measure any significant KAAA-induced difference in the basophils and eosinophils counts (Figures 3B and 3C).

Figure 3. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the neutrophils count, but not basophils and eosinophils count.

The data of blood lymphocytes counts showed no significant difference between groups ($P > 0.05$). However, there was significant increase at Exh on KA group compared with resting values and 60 min within the group ($P < 0.05$). In contrast, there was only significant increase at 120 min on PL group compared with resting values within the group ($P < 0.05$) (Figure 4A). We were not able to measure any significant KAAA-induced difference in the monocytes counts (Figure 4B).

Figure 4.Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the lymphocytes count, but not monocytes count.

Discussion

The aim of this study was to evaluate the acute effect of KAAA supplementation on total and differential white blood cells counts in cyclists undergoing strenuous exercise under low heat stress environment. The acute use of a mixture of KAAA supplementation avoided immunosuppression with decreased cortisol and increase blood glucose levels after high intensity exercise in such conditions.

Exercise induces an acute phase immune response similar to infection or to trauma, with a systemic inflammatory response and oxidative stress^[13]. The immunosuppression in athletes involved in heavy training is undoubtedly multifactorial in origin, such as, intensity and duration of exercise, poor nutritional status, increased amounts cortisol and hot environments^[8,14,15]. Training and competitive surroundings may increase the athlete's exposure to pathogens and provide optimal conditions for pathogen transmission, increasing the risk of infection and possible losses to performance^[8].

Nutrient availability has the potential to affect almost all aspects of the immune system. Previous studies indicate that diets with low amounts of carbohydrates, results in increased of stress oxidative and this metabolic stress imposed by the low CHO availability resulted in increased release of cortisol, which in turn induced the greater neutrophilia^[13, 16].

Either, the carbohydrate ingestion may help to lessen the stress on the immune system and reduces the cortisol response to exercise^[6,7]. The combination of keto analogues with amino acids (KAAA) has been used to treat patients with chronic kidney disease (CKD), portal systemic encephalopathy and hyperammonaemia^[17]. In an opposite manner, the use of KAAA has been proposed as a glycolytic substrate. The KAAA supplement is a mixture of glucogenic and ketogenic amino acids, and may promote anaplerosis via different Krebs cycle intermediates, providing power^[9,10].

Our study protocol was able to increase the immunity by exercise responses in addition to the low concentrations of carbohydrate. Cortisol has been related to many of the immunosuppressive and cell trafficking changes experienced during recovery^[3,18]. In This study cortisol concentrations were increased. However, especially after the Exh, supplementation, KAAA was able to inhibit this increase. Plasma cortisol correlated negatively with the amounts of glucose, and correlated strongly with the post-exercise leukocytosis^[13]. Therefore, an increase in glucose concentrations after Exh in the supplemented group, suggesting that KAAA played a role glucogenic or the existing spared carbohydrate, through the provision of amino acids.

During metabolism, amino acids are deaminated or transaminated to form keto acids via release of the amino group. These reactions are reversible, and the use of keto analogues could results in the production of aminoacids^[10]. The supply keto acids, such as glutamate, can form glutamine. Thus, the glutamine increases the krebs cycle intermediates pool during exercise, probably because of the entry of glutamine carbons at the level of 2-oxoglutarate. Therefore, glutamine is regarded in the important anapleroticandgluconeogenicsubstrate^[19]. It is also acknowledged that glutamine serves as a primary substrate for many leukocytes. However, glucose is also recognized as an important substrate for leukocytes. Thus, carbohydrate supplementation may enhance immune function during and in response to exercise by conserving glutamine and by maintaining glucose availability for leukocytes^[1]. In this study, KAAA supplementation increased blood glucose during high intensity exercise.

Our experiment showed similar changes in other works. In regard to number of leukocytes, which increased during exercise, the transient leukocytosis by neutrophilia, that is, the increase was mainly due to an increase of neutrophils in both groups, especially in the Ka group compared to PI group after the 120 and exh^[20,21].

The exercise, itself, appears to increase the leukocyte count, mainly by increasing the number of neutrophils, due to the demargination caused by hemodynamic changes, associated with catecholamine action^[22]. Which corroborates previous research^[23,24], it is suggested that leukocytosis is modulated by the effects of stress, catecholamine secretion, and consequently, the increase in cell demargination, may be related to a gradual increase in the intensity of

exercise^[25]. No changes were observed in the values basophils, eosinophils and monocytes in both groups. On the work stand out the use of these blood parameters aimed at better evaluation of the physical condition of the athlete, ensuring sufficient energy supply for athletic performance, reducing the immunosuppressive effect.

Conclusion

According to our knowledge, this study is the first investigation to evaluated the acute effect of KAAA on total and differential white blood cells counts in cyclists undergoing strenuous exercise under low heat stress environment. This study demonstrated that KAAA supplementation after high intensity exercise, under low heat stress environments, did attenuate some characteristic parameters of immunosuppression in white blood cells. Maybe, exposure to stress environment could lead to greater expression of the immune system.

References

1. Braun WA, Von Duvillard SP. Influence of carbohydrate delivery on the immune response during exercise and recovery from exercise. *Nutrition*. 2004 Jul-Aug;20(7-8):645-50.
2. Walsh NP, Whitham M. Exercising in environmental extremes : a greater threat to immune function? *Sports Med*. 2006;36(11):941-76.
3. Nieman DC. Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol* (1985). 1997 May;82(5):1385-94.
4. Nieman DC. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on systemic immunity. *Immunol Cell Biol*. 2000 Oct;78(5):496-501.
5. MacKinnon LT. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol*. 2000 Oct;78(5):502-9.
6. Nieman DC. Marathon training and immune function. *Sports Med*. 2007;37(4-5):412-5.
7. Steinacker JM, Lormes W, Reissnecker S, Liu Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur J Appl Physiol*. 2004 Apr;91(4):382-91.
8. Mestre-Alfaro A, Ferrer MD, Banquells M, Riera J, Drobnic F, Sureda A, et al. Body temperature modulates the antioxidant and acute immune responses to exercise. *Free Radic Res*. 2012 Jun;46(6):799-808.
9. de Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, Magalhaes-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.
10. Prado ES, de Rezende Neto JM, de Almeida RD, Doria de Melo MG, Cameron LC. Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammonaemia response during exercise under ketogenic conditions. *Br J Nutr*. 2011 Jun 28;105(12):1729-33.
11. Howley ET, Bassett DRJ, Welch HG. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 1995;27(9):1292-301.
12. Westman EC, Feinman RD, Mavropoulos JC, Vernon MC, Volek JS, Wortman JA, et al. Low-carbohydrate nutrition and metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:276-84.
13. Gleeson M, Bishop NC. Elite athlete immunology: importance of nutrition. *Int J Sports Med*. 2000 May;21 Suppl 1:S44-50.
14. Nybo L. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:779-92.
15. Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Aug;103(2):693-9.
16. Moyna NM, Acker GR, Weber KM, Fulton JR, Goss FL, Robertson RJ, et al. The effects of incremental submaximal exercise on circulating leukocytes in physically active and sedentary males and females. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1996;74(3):211-8.
17. Felipo V, Ordone JF, Urios A, El Mlili N, Gimenez-Garzo C, Aguado C, et al. Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity

- correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology*. 2012 Feb;55(2):530-9.
18. Laing SJ, Blackwell J, Gwynne D, Walters R, Walsh NP. Neutrophil degranulation response to 2 hours of exercise in a 30 degrees C environment. *Aviat Space Environ Med*. 2005 Nov;76(11):1068-73.
 19. 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.
 20. Passaglia DG, Emed LG, Barberato SH, Guerios ST, Moser AI, Silva MM, et al. Acute effects of prolonged physical exercise: evaluation after a twenty-four-hour ultramarathon. *Arq Bras Cardiol*. 2013 Jan;100(1):21-8.
 21. Terra R SS, Pinto VS, DutraPML. Effect of exercise on the immune system: response, adaptation and cell signaling. *Rev Bras Med Esporte*. 2012;18:208-14.
 22. Rosa LFPBC VM. Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte*. 2002;8:167-72.
 23. Rønsen O, Pedersen BK, Ørntsland TR, Bahr R, Kjeldsen-Kragh J. Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J Appl Physiol*. 2001;91(1):425-34.
 24. Bøyum A, Rønsen O, Tennfjord VA, Tollefsen S, Haugen AH, Opstad PK, Bahr R. Chemiluminescence response of granulocytes from elite athletes during recovery from one or two intense bouts of exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2002;88(1-2):20-8.
 25. Natale VM, Brenner IK, Moldoveanu AI, Vasiliou P, Shek P, Shephard RJ. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *Sao Paulo Med J*. 2003 Jan 2;121(1):9-14.

Table 1. Environmental conditions and intensity of exercise throughout the cycling session from groups KEX and PEX, before (Pre) and after (Post) cycling session.

Groups/ Moments	Ambient temperature (°C)	Relative humidity (%)	Heart rate (beats/min)
Pre	23.0 ± 0.3	51.1 ± 0.6	67.6 ± 2.7
KA			
Post	23.6 ± 0.2*	56.2 ± 1.4*	181.5 ± 5.5*
PL	Pre	23.1 ± 0.4	50.6 ± 1.3
Post	23.7 ± 0.4*	55.7 ± 1.1	177.4 ± 9.0*

* Mean values were significantly different from pre moment within the group.

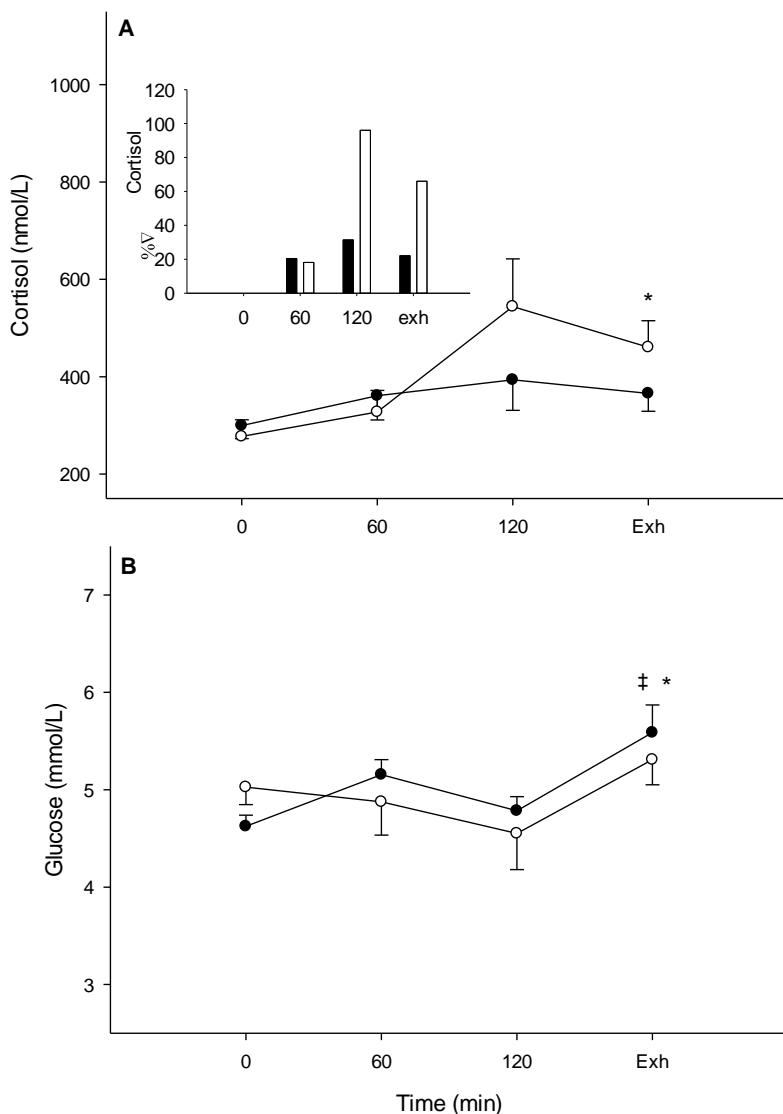


Figure 1. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the cortisol and glucose levels. Athletes exercised for 2 h followed by a progressive maximum test to drive the athletes to exhaustion, after KAAA supplementation (experimental group - KEX, ●) or control supplementation (PEX, ○). Values are means and standard errors. (A) Cortisol: resting values were KA 299.62 ± 26.71 nmol/L and PL 277.55 ± 34.13 nmol/L; (B) Glucose: resting values were KA 4.62 ± 0.11 mmol/L and PL 5.02 ± 0.17 mmol/L. * Mean values were significantly different from 0 min within the group; ‡ Mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). Values did not differ significantly between treatments ($P > 0.05$). Inset of Figure 1(A) shows the decrease in cortisol levels in KA when normalized ($\Delta\%$) against rest values, but not in PL.

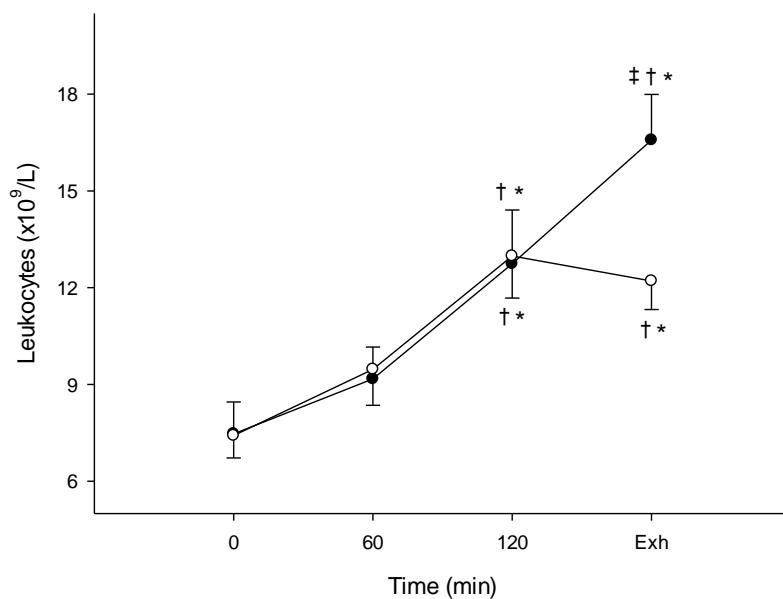


Figure 2. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the leukocytes count. Athletes exercised for 2 h followed by a progressive maximum test to drive the athletes to exhaustion, after KAAA supplementation (experimental group - KA, ●) or control supplementation (PL, ○). Values are means and standard errors. Leukocytes: resting values were KA $7.46 \pm 0.98 \times 10^9/L$ and PL $7.41 \pm 0.69 \times 10^9/L$. * Mean values were significantly different from 0 min within the group; † Mean values were significantly different from 60 min within the group; ‡ Mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). Values did not differ significantly between treatments ($P > 0.05$).

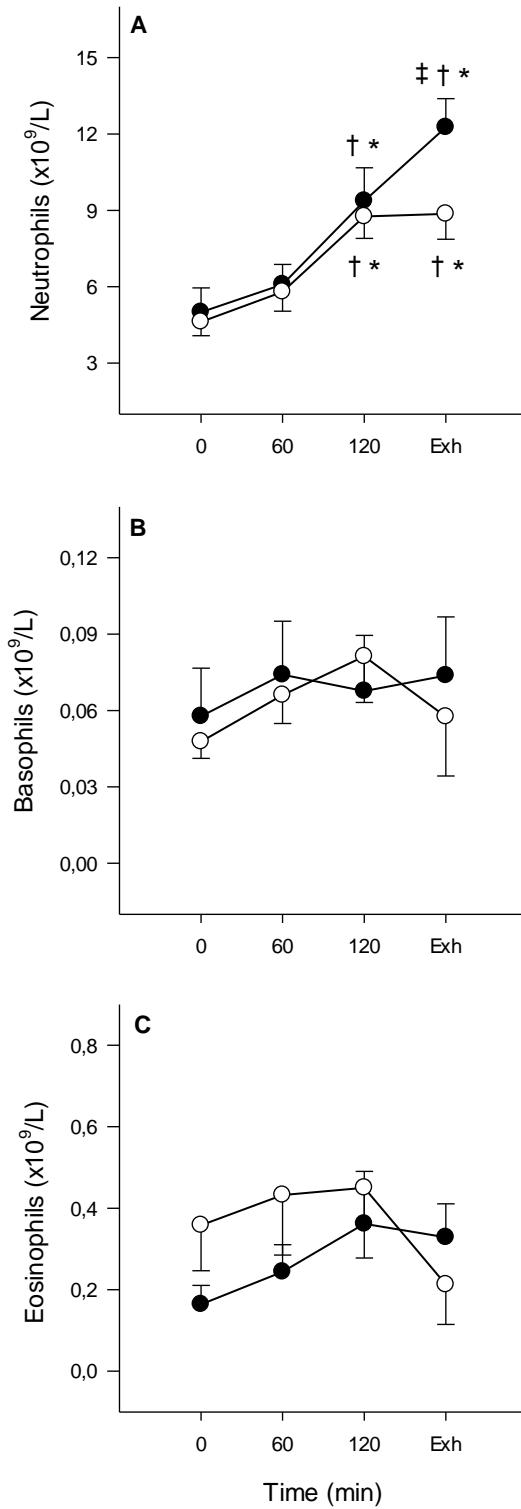


Figure 3. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the neutrophils count, but not basophils and eosinophils count. Athletes exercised for 2 h followed by a progressive maximum test to drive the athletes to exhaustion, after KAAA supplementation (experimental group - KA, ●) or control supplementation (PL, ○). Values are means and standard errors. Neutrophils:

resting values were KA $4.99 \pm 0.95 \times 10^9/L$ and PL $4.61 \pm 0.54 \times 10^9/L$. Basophils: resting values were KA $0.05 \pm 0.01 \times 10^9/L$ and PL $0.04 \pm 0.09 \times 10^9/L$. Eosinophils: resting values were KA $0.16 \pm 0.04 \times 10^9/L$ and PL $0.35 \pm 0.11 \times 10^9/L$. * Mean values were significantly different from 0 min within the group; † Mean values were significantly different from 60 min within the group; ‡ Mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). Values did not differ significantly between treatments ($P > 0.05$).

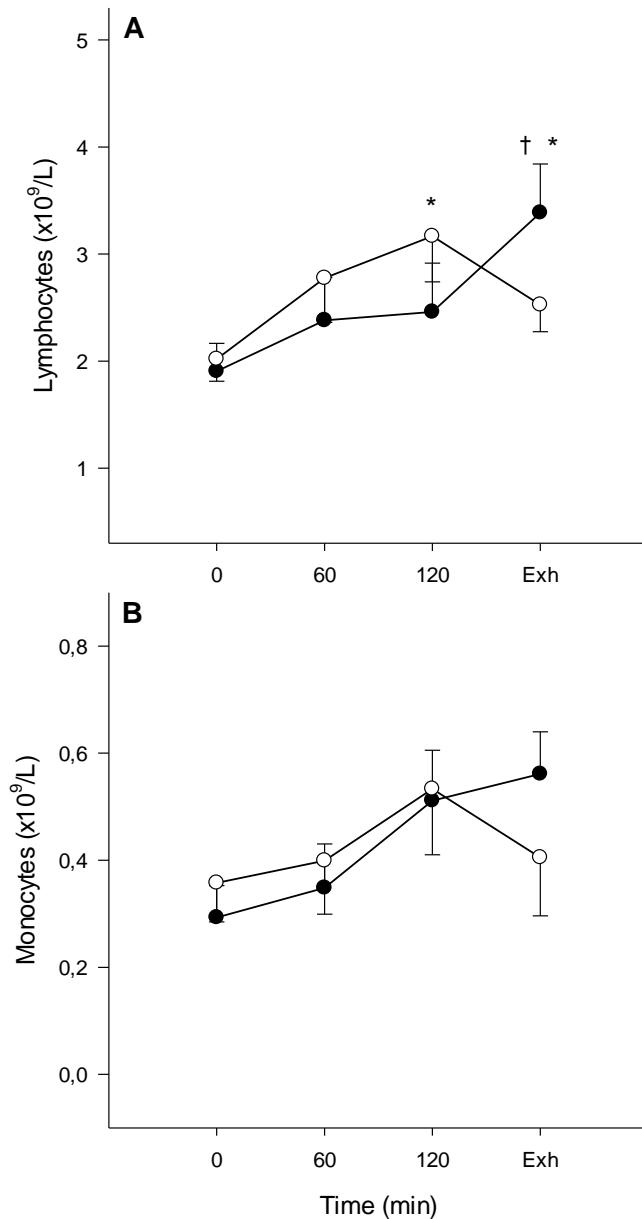


Figure 4. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the lymphocytes count, but not monocytes count. Athletes exercised for 2 h followed by a progressive maximum test to drive the athletes to exhaustion, after KAAA supplementation (experimental group - KA, ●) or control supplementation (PL, ○). Values are means and standard errors. Lymphocytes: resting values were KA $1.90 \pm 0.26 \times 10^9/L$ and PL $2.02 \pm 0.20 \times 10^9/L$. Monocytes: resting values were KA $0.29 \pm 0.05 \times 10^9/L$ and PL $0.35 \pm 0.07 \times 10^9/L$. * Mean values were significantly different from 0 min within the group; † Mean values were significantly different from 60 min within the group; ‡ Mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). Values did not differ significantly between treatments ($P > 0.05$).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo, para nosso conhecimento, foi o primeiro a avaliar o efeito da suplementação de KAAA no metabolismo da amônia, níveis de enzimas biomarcadoras de dano muscular e o conteúdo total e diferencial de células brancas após exercício de alta intensidade sob condições de baixo estresse térmico. Nossos dados sugerem que a suplementação KAAA foi capaz de reduzir amonemia após exercício de alta intensidade, assim como, o extravasamento de enzimas biomarcadoras de lesão muscular para o sangue sob estas condições. Além de atenuar alguns parâmetros característicos de imunossupressão em células brancas do sangue.

Sugerimos que, esse resultado ocorreu pela capacidade do KAAA fornecer intermediários para o ciclo de Krebs, funcionando como via anaplerotica para gliconeogênese. E já que o estresse térmico está intimamente relacionado com esses parâmetros bioquímicos e hematológicos, talvez, ausência de um aumento significativo na temperatura corporal dos atletas e o protocolo de exercício, tenham sido insuficientes para evidenciar o aumento das concentrações de amônia e enzimas biomarcadoras de dano muscular, assim como uma maior expressão do sistema imunitário e atenuação oferecida pela suplementação de KAAA.



5 APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em duas vias, firmado por cada participante-voluntário(a) da pesquisa e pelo responsável)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuênci à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu,

____ tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo AVALIAÇÃO E INTERVENÇÃO NUTRICIONAL-METABÓLICA EM ATLETAS ALAGOANOS DE DIFERENTES MODALIDADES ESPORTIVAS, recebi do(a) Sr.(a) PROFESSOR DOUTOR EDUARDO SEIXAS PRADO, do DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- * Que atletas considerados de menor (idade inferior a 18 anos), terão que apresentar uma autorização dos pais ou responsáveis para participação na pesquisa.
- * Que o estudo se destina a obter dados experimentais para avaliação do desempenho, da cognição, do metabolismo e da atividade cardíaca de atletas alagoanos de diferentes modalidades esportivas, através de procedimentos nutricionais e metabólicos, supervisionada por profissionais capacitados.
- * Que a importância deste estudo é demonstrar sua contribuição social, no sentido de melhorar o desempenho na prática esportiva de atletas locais, esclarecendo seu estado nutricional e metabólico e ao mesmo tempo, oferecendo oportunidade para uma melhor orientação em como se alimentar e hidratar, no sentido dos atletas se cuidarem mais eficientemente, beneficiando seu desempenho.
- * Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: espera-se que a dieta e o estado de hidratação, além do perfil bioquímico e hematológico dos atletas alagoanos, obtidos na primeira etapa do estudo, estejam irregulares. Através do plano de intervenção (orientação), todos os aspectos nutricionais e metabólicos, reavaliados na segunda etapa, serão melhorados, permitindo assim, um melhor desempenho físico destes. Na terceira etapa da pesquisa, espera-se que haja uma melhora do desempenho físico, do metabolismo (devido a redução da anemia), do estado cognitivo e da resposta cardíaca, tanto em temperatura ambiente quanto no calor, com o uso de algumas substâncias e/ou procedimentos.
- * Que esse estudo começará no terceiro trimestre (em julho) de 2012 e terminará no segundo trimestre (em junho) de 2016.
- * Que o estudo será feito da seguinte maneira: vinte e oito atletas de modalidades esportivas diferentes serão estudados em três etapas diferentes. A primeira etapa terá como objetivo traçar um perfil da dieta e do metabolismo e também realizar um plano de orientação nesse aspecto. A segunda etapa terá como objetivo realizar uma reavaliação nutricional e metabólica após seis meses da intervenção e comparar com o perfil traçado na primeira etapa. Todos os atletas participarão da primeira e

segunda etapas, mas apenas alguns atletas, através de sorteio, participarão da terceira etapa. Nas duas primeiras etapas, serão utilizados inquéritos alimentares e avaliações do estado de hidratação como avaliação nutricional, enquanto que análises sanguíneas (bioquímica e hematológica) servirão como avaliação metabólica. Na terceira etapa serão realizados experimentos para verificar seu efeito agudo no desempenho físico, no estado cognitivo, nas alterações cardíacas e no metabolismo. Para tal, alguns atletas serão divididos em dois grupos: experimental (atletas que receberão uma substância ou sofrerá ação de um procedimento fisiológico) e controle (atletas que não vão ingerir substâncias ou sofrer ação de procedimentos fisiológicos). Os grupos serão constituídos a partir de aspectos do modelo experimental adotado, como: simulação de exercício físico específico da modalidade esportiva; esquemas alimentares; uso de substâncias; e condições de temperatura diferenciadas. Sangue será obtido no experimento. Frequência Cardíaca (FC), Percepção Subjetiva de Esforço (PSE), testes cognitivos (coordenação motora e tempo de reação) e tempo de exaustão, também serão obtidos.

- * Que eu participarei das seguintes etapas: primeira e segunda. Após sorteio, existe a possibilidade de participar da terceira etapa.
- * Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: talvez, algum desconforto possa ocorrer nos atletas na execução da coleta sanguínea (que será feita na veia, com material esterilizado e descartável) e na realização de exercícios físicos no calor. Caso isto ocorra, o voluntário será assistido por profissional competente e os pesquisadores no mesmo local, podendo desistir do estudo. A coleta de sangue poderá resultar em um pequeno hematoma no local (mancha roxa e dolorosa), contudo todos os cuidados serão tomados para que isto não ocorra.
- * Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: este estudo não apresenta riscos, de nenhuma natureza, para os envolvidos (voluntários e pesquisadores), seja como consequência imediata ou tardia da participação na pesquisa.
- * Que deverei contar com a seguinte assistência: de todos os pesquisadores, sendo responsável(is) por ela: Professor Eduardo Seixas Prado, residente na Rua José Soares Sobrinho, 136, Jatiúca, Maceió, AL, tel: 9105-5301.
- * Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: receber melhor orientação nutricional para melhor desempenho físico.
- * Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: haverá acompanhamento integral de alunos, pesquisadores e colaboradores capacitados no momento do experimento.
- * Que, sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- * Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- * Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- * Que eu não terei despesas com a minha participação nesse estudo.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do(a) participante-voluntário(a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto)

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Endereço dos(as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Endereço: CAMPUS A.C. SIMÕES; AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N

Bloco: /Nº: /Complemento: DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA

Bairro: /CEP/Cidade: TABULEIRO DO MARTINS; 57.072-970; MACEIÓ.

Telefones p/contato: 9105-5301

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:

Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária

Telefone: 3214-1041

Maceió,

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

6 ANEXOS

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 15/08/2012

Senhor(a) Pesquisador(a), Eduardo Seixas Prado, Emiliano de Oliveira Barreto, Divanise Surugay Correia, Sandra Mary Lima Vasconcelos, Bruna Merten Padilha, Catherine Cavalcanti Padilha, Jamille Nunes de Souza Ferro, Rafael Vital dos Santos, Cibelle Rodrigues Calheiros, Rafaela Carvalho Pereira Lima, Saulo Rodrigues Alves e Silva Camerino.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 14/08/2012 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 017640/2011-61 sob o título, **AVALIAÇÃO E INTERVENÇÃO NUTRICIONAL-METABÓLICA EM ATLETAS ALAGOANOS DE DIFERENTES MODALIDADES ESPORTIVAS**, vem por meio deste instrumento comunicar a renovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o (a) pesquisador (a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Resolução CNS 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra-referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojeto oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais

Válido até: Agosto de 2016

Foto Dr. Deise Silvana França
Coordenadora do Comitê de
Ética em Pesquisa -UFAL

atv. dg; p.br/bi aapt al.lectr. s4,jst s4 1º 76/12

21