



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

**Análise metabólica e metabolômica de atleta olímpico:
Uma nova proposta para um *nexus* bioquímico**

Aluna: Nathália Maria Resende

Orientador: Luiz Cláudio Cameron

UBERLÂNDIA – MG

2010



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

**Análise metabólica e metabolômica de atleta olímpico:
Uma nova proposta para um *nexus* bioquímico**

Aluna: Nathália Maria Resende

Orientador: Luiz Cláudio Cameron

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

UBERLÂNDIA – MG

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R433a Resende, Nathália Maria, 1984-
Análise metabólica e metabolômica de atleta olímpico: uma nova proposta para um nexus bioquímico / Nathália Maria Resende. - 2010. 95 f. : il.

Orientador: Luiz Cláudio Cameron.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Metabolismo - Teses. 2. Metabolômica - Teses. 3. Esportes - Teses. I. Cameron, L. C. (Luiz Claudio). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 612.015.3



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

**Análise metabólica e metabolômica de atleta olímpico:
Uma nova proposta para um *nexus* bioquímico**

Aluna: Nathália Maria Resende

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. L. C. Cameron (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Nilson Penha Silva (Titular)
Prof. Dr. Mauro Sola-Penna (Titular)
Prof. Dr. Ana Graci Brito Madurro (Suplente)
Prof. Dr. Adriana Bassini (Suplente)

Data da Defesa: ____/____/____

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

Prof. Dr. Luiz Cláudio Cameron

Lista de Abreviaturas

- AA aminoácidos (amino acids)
AAA aminoácidos aromáticos (aromatic amino acids)
ACTH hormônio adenoctocotrófco
ADP adenosina 5'-difofoato
AGP glicoproteína α -1-ácida (α -1-acid glycoprotein)
ALP fosfatase alcalina (alkaline phosphatase)
ALT alanina aminotransferase (alanine aminotransferase)
AMP adenosina 5'-monofosfato
APCI ionização química à pressão atmosférica (atmospheric pressure chemical ionisation)
APPI fotoionização à pressão atmosférica (atmospheric pressure photoionization)
AST aspartato aminotransferase (aspartate aminotransferase)
ATP adenosina 5'-trifosfato
BCAA aminoácidos de cadeia ramificada (branched-chain amino acids)
CAD dissociação ativada por colisão (collisionally activated dissociation)
CBS cistationina- β -sintase (cystathionine- β -synthase)
CI ionização química (chemical ionisation)
CID dissociação induzida por colisão (collision induced dissociation)
CK fosfocreatina kinase (creatine phosphokinase)
CKMB fração MB fosfocreatina kinase (creatine phosphokinase muscle-brain fraction)
CNS sistema nervoso central (central nervous system)
CRP proteína C reativa (reative-c-protein)
DC corrente-direta (direct-current)
DESI ionização eletrospray e dessorção (desorption electrospray ionisation)
DHT dihidrotestosterona
DNA ácido desoxirribonucléico
E1 estrina

E2 estradiol
E3 estriol
EI ionização por elétrons (electron ionisation)
EM multiplicador de elétron (electron multiplier)
ESI eletrospray
FAB bombardeamento de átomos rápidos (fast atom bombardment)
FSH hormônio estimulante folicular
FT transformada de Fourier (Fourier-transform)
GC cromatografia à gás (gas chromatography)
GH hormônio do crescimento
HDL lipoproteína de alta densidade (high-density lipoprotein)
HPLC cromatografia à líquido de alta performance (high performance liquid chromatography)
ICR ressonância de íon ciclotron (íon cyclotron resonance)
IGF-1 fator do crescimento do tipo insulina 1
IM mobilidade de íons (ion mobility)
IMP inosina 5'-monofosfato
INR razão normalizada internacional
ISAF Federação Internacional de Vela (International Sailing Federation)
IT armadilha de íons (ion trap)
LC cromatografia à líquido (liquid chromatography)
LDH lactato desidrogenase (lactate dehydrogenase)
LDL lipoproteína de baixa densidade (low-density lipoprotein)
LH hormônio luteinizante
LSIMS espectrometria líquida para a massa do íon secundário (liquid secondary ion mass spectrometry)
m/z razão carga/massa
MALDI ionização e dessorção à laser assistida por matriz (matrix-assisted laser desorption/ionisation)
MS espectrometria de massas (mass spectrometry)
MSTFA n-metil-n-trimetilsililtrifluoroacetamida
NIST National Institute of Standards of Technology

PCA principal componente de análise (principal component analysis)
QIT armadilha de íons quadrupólo (quadrupole ion trap)
RF rádio-freqüência
RNAm ácidos ribonucléicos mensageiros
T3 tri-iodotironia
T4 Tirosina
TG triglicerídios (triacylglycerols)
TMCS trimetilclorosilano
TOF tempo de vôo (time of flight)
TSH hormônio estimulante da tireóide
UPLC cromatografia à líquido de alta performance (ultra performance liquid chromatography)
vGT γ -glutamyltransferase (γ -glutamyltransferase)
VLDL lipoproteína de muito baixa densidade (very-low-density lipoprotein)
WBC white blood cells

Sumário

Apresentação	01
Resumo	03
Abstract	04
Capítulo I: Fundamentação Teórica	05
I. Introdução	06
II. Modificações fenotípicas do exercício no metaboloma	08
II.1. Esporte Olímpico – Windsurf	10
III. Técnicas analíticas	12
III.1. Exames laboratoriais	12
III.2. Espectrometria de massas	15
III.2.1. Histórico	15
III.2.2. Instrumentação	17
III.2.3. Quattro Micro GC™ – Waters Corporation	21
IV. Bioinformática	26
V. Mapa Metabólico	27
VI. Referências Bibliográficas	29
Capítulo II: Artigo	35
Abstract	36
Introduction	37
Material and Methods	38
Subject	38
Experimental Design	39
Nutritional interventions	39
Laboratory Analysis	39
Data presentation	41
Results	41
Discussion	44
References	47
Figure Captions	54
Figures	56

Capítulo III: Resultados complementares	65
I. Comitê de Ética em Pesquisa	66
II. Resultados complementares	66
II.1. Resultados dos exames laboratoriais	66
II.2. Resultados da metabolômica	83
Conclusão Geral	89
Anexo 1	90
Anexo 2	92

Apresentação

Nesta primeira década do novo milênio, o Brasil está passando por grandes transformações no âmbito da Educação Física. Essas transformações emanam dos meios políticos, empresarial, social, de comunicação e científico, que foi determinada pelo resultado das eleições tão almejadas do Brasil para a cidade do Rio de Janeiro sediar os Jogos Olímpicos de 2016.

A descoberta de novos talentos esportivos, a formação de atletas e o melhoramento dos atletas profissionais vêm ganhando grande entusiasmo e se disseminando por toda a parte por meio da mídia, de projetos sociais, de eventos políticos, esportivos, culturais e científicos, financiados pelo governo e pela iniciativa privada.

E foi reflexo dessas transformações na Educação Física, que essa dissertação se consolidou, pois nela apresento técnicas analíticas de investigação de estudo do metabolismo de um atleta olímpico.

Essas técnicas analíticas têm por finalidade diagnosticar o estado que encontra o metabolismo do atleta, em repouso, durante o treinamento físico, a prova olímpica, a recuperação e o descanso, para dar possibilidades de intervenções tanto nutricionais quanto de mudança do treino, para assim, transformar o atleta olímpico brasileiro em campeão.

No primeiro capítulo, apresento a proposta desta dissertação, mostrando com a fundamentação teórica, como o metabolismo do atleta funciona durante o exercício físico e quais as suas causas e consequências, além de apresentar as técnicas analíticas utilizadas para investigar o metabolismo do atleta olímpico. A proposta consiste em adotar a plataforma de espectrometria de massas para realizar essas investigações, além das análises laboratoriais clínicas rotineiras.

No segundo capítulo, mostro o resultado da utilização dessas técnicas analíticas em um atleta de Windsurf, descrevendo como o seu metabolismo funcionou diante três experimentos de comparação. Sendo o primeiro para o diagnóstico, o segundo para observação dos resultados das intervenções nutricionais e de treinamento propostas, e o último para confirmação desses resultados das intervenções. Observa-se aqui, que a apresentação desses resultados está em forma de artigo científico.

E por fim, no terceiro capítulo, completo a dissertação apresentando os demais resultados que não foram abordados no artigo, visto a grande quantidade de dados obtidos dos três experimentos. Esses demais resultados ainda estão em fase de estudo e são de grande importância para compreender melhor o metabolismo do atleta olímpico, a fim de publicação e divulgação científica dos benefícios do uso das técnicas analíticas para essa finalidade. E assim, promovendo e dando suporte científico para os nossos atletas olímpicos.

Resumo

A metabolômica é uma área das ciências “ômicas” que caracteriza os fenótipos dos metabólitos bem como a ligação destes com os seus genótipos correspondentes, permitindo identificar o metaboloma de um indivíduo. Essa investigação metabolômica permite visualizar as rápidas respostas dos mecanismos bioquímicos e biológicos do metabolismo analisado em qualquer situação, seja alteração ambiental, patológica, genética ou em resposta ao estresse causado pelo exercício físico. Esse estudo tem como objetivo principal apresentar a espectrometria de massas junto com as análises laboratoriais clínicas como ferramenta de investigação para obtenção do metaboloma de um atleta olímpico de Windsurf classe RS:X. Durante o exercício físico, a demanda energética é aumentada exigindo adaptações no metabolismo, e desta forma o metabolismo apresenta respostas para essas diversas modificações metabólicas. Portanto, as técnicas analíticas, como os exames laboratoriais e a espectrometria de massas, podem ser utilizadas para a avaliação metabólica, permitindo investigar e intervir de maneira científica, na prescrição, controle e acompanhamento dos processos de treinamento desse atleta, auxiliando-o com intervenções para a sua adaptação ao exercício físico na melhoria da sua performance atlética.

Palavras-Chaves: Metabolômica, Esporte Olímpico, Metabolismo.

Abstract

The metabolomics is an area of science "omics" that characterizes the phenotypes of the metabolites and the connection of these with their corresponding genotypes, allowing the identification of the metabolome of an individual. This metabolomics research allows to view the rapid responses of the biochemical and biological analysis of metabolism in any situation, whether environmental change, pathological, genetic or in response to exercise stress. This study aims main to present the mass spectrometry together with the clinical laboratory as a research tool for obtaining the metabolome of an athlete's Olympic Windsurfing Class RS:X. During exercise, the energy demand is increased by requiring changes in metabolism, and thus the metabolism provides answers to these various metabolic modifications. Therefore, analytical techniques, such as laboratory tests and mass spectrometry may be used for the metabolic evaluation, allowing to investigate and intervene in a scientific manner, the exercise prescription, control and monitoring of athlete training, helping with interventions to adaptation of physical exercise in improving their athletic performance.

Key words: Metabolomics, Olympic Sport, Matabolism.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

I. Introdução

A metabolômica é uma área da ciências “omica” que analisa o metaboloma (conjunto de todos os metabólitos que são produzidos e/ou modificados em um organismo) elucidando a função de cada gene e o relacionamento entre os genes. Essa área permite a caracterização dos fenótipos dos metabólitos bem como a ligação destes com os seus genótipos correspondentes. O crescente número de publicações sobre a metabolômica demonstra ser uma importante ferramenta para estudar o fenótipo e suas mudanças causadas por influências ambientais, doença e/ou do genótipo (Dettmer et al, 2007).

Uma investigação completa do metaboloma é dificultada pela sua enorme complexidade e dinâmica. A metabolômica surgiu então, como resposta as alterações nos níveis dos ácidos ribonucléicos mensageiros (RNAm) que nem sempre resultavam em modificação nos níveis de proteínas e também pelas alterações observadas no transcriptoma e no proteoma que nem sempre correspondiam as mudanças fenotípicas (Dettmer et al, 2007; Gehlenborg et al., 2010).

A ciências “omica” funciona como uma cascata integradora da genômica, transcriptômica, proteômica e da metabolômica, para melhor compreender e descrever as respostas dos mecanismos bioquímicos e biológicos do metabolismo de um indivíduo (Boccard et al., 2010), conforme representada na Figura 1.

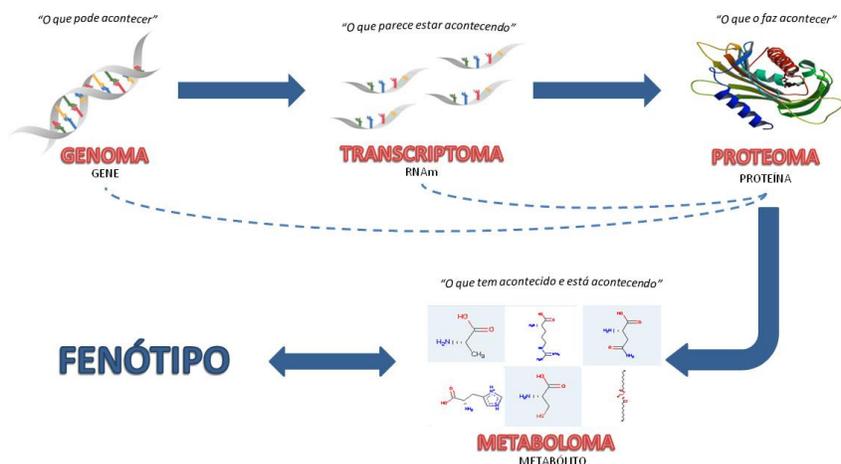


Figura 1. Cascata “omica” e seus pontos de regulação.

Esta figura mostra que a informação codificada no ácido desoxirribonucléico (DNA) é posteriormente transcrita em uma molécula de RNAm. Durante o processo de tradução, esta molécula de RNAm é traduzida em uma proteína, podendo ser uma enzima, que catalisa uma ou mais reações dentro e fora da célula, sendo assim, responsável pela transformação de pequenas moléculas químicas, que são os metabólitos. Estes metabólitos regulam a atividade das proteínas, intervêm nos processos de transcrição e tradução, e são o produto final do metabolismo celular. Além disso, representam a informação que integra a função celular a nível molecular, possibilitando definir o fenótipo de uma célula em resposta as alterações ambientais, de doença ou genéticas (Baran et al., 2009).

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

A análise dos metabólitos envolve uma determinação dos níveis dos compostos fora e/ou dentro das células, pois assim pode-se ter a análise direcionada ou o perfil metabólico de um indivíduo. A análise direcionada é utilizada para a determinação de um grupo de metabólitos pré-definidos e permite o estudo primário de sua alteração genética. Enquanto, o perfil metabólico refere-se ao conjunto de todos os metabólitos ou produtos derivados dos mesmos e permite o estudo da alteração de uma via metabólica. Este pode ser subdividido em *fingerprinting* metabólico (perfil de metabólitos intracelulares) e *footprinting* metabólico (perfil de metabólitos extracelulares) (Wishart, 2010).

A metabolômica não tem um método universal, como as demais áreas da ciências “omica”, sendo necessário associar técnicas de preparações de amostras a diferentes técnicas analíticas, tanto como os exames laboratoriais (hemograma e bioquímica convencional) quanto a espectrometria de massas (*mass spectrometry* – MS). Além de necessitar do auxílio da bioinformática, para sistematização e avaliação das informações detectadas do metaboloma analisado.

Sabendo das diversas aplicações das ciências “ômicas”, nessa dissertação delinea-se o uso da metabolômica para o estudo do metabolismo de um atleta de vela, classe RS:X (Windsurf), durante uma simulação da sua prova olímpica.

II. Modificações fenotípicas do exercício no metaboloma

Durante o exercício físico, a demanda energética é aumentada exigindo adaptações no metabolismo, e desta forma o metabolismo durante o exercício passa a ser uma ferramenta para a compreensão de diversas modificações metabólicas.

Em humanos, a formação da amônia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) ocorre durante a síntese de adenosina 5'-trifosfato (ATP) a partir de adenosina 5'-difosfato (ADP) pela atividade da mioquinase; durante a utilização de aminoácidos (AA) como doadores de esqueletos de carbono (desaminação e/ou transaminação); e pela microflora entérica. Sendo a amônia tóxica para os mamíferos, o fígado responde rapidamente a elevação dos níveis de amônia aumentando a velocidade do ciclo da uréia e sintetizando glutamina a partir de glutamato, sendo o principal órgão de eliminação do metabólito.

Os aminoácidos na célula muscular podem ceder o grupamento amina a um cetoácido ou glutamato produzindo AAs ou glutamina, que são exportadas pela corrente sanguínea e novamente desaminadas no fígado, onde seu esqueleto de carbono pode servir como agente neoglicogênico e seu grupamento amina excretado. Durante a atividade física a amonemia pode aumentar em até 400% acima dos valores considerados normais para o indivíduo sadio em repouso (Wilkinson et al., 2010).

Estudos têm sugerido que a produção de amônia durante o exercício submáximo ocorre pela quebra da adenosina 5'-monofosfato (AMP), em uma das etapas do ciclo das purinas nucleotídeos. Nessa etapa o AMP é desaminado pela AMP deaminase produzindo inosina monofosfato (IMP) e amônia. Em alguns casos o processo anaplerótico pode gerar diretamente amônia e esta é exportada via corrente sanguínea (Hellsten et al., 1999).

A hiperamonemia está associada à alteração na regulação de neurotransmissores podendo ocasionar o desequilíbrio nos sistemas

glutamatérgico, GABAérgico e serotoninérgico que pode ser suficiente para causar excitotoxicidade neural e/ou morte (Aguilar et al., 2000; Erceg et al., 2006; Rodrigo et al., 2010). Tem sido descrito que a alta concentração de amônia induzida pelo exercício físico pode gerar distúrbios momentâneos no funcionamento do sistema nervoso central (CNS) semelhantes àqueles encontrados em fases iniciais de diversas doenças relacionadas a hiperamonemia e/ou doenças neuro-degenerativas (Nybo, 2010; Nybo et al., 2005).

A desintoxicação da amônia é interrompida quando há falência hepática ou em deficiências congênitas nas enzimas do ciclo de uréia. Durante a falência hepática, a hiperamonemia e as funções cerebrais deterioram levando ao aparecimento de encefalopatia hepática (Albrecht e Jones, 2000). Em falências hepáticas agudas há um desenvolvimento mais gradual de deficiência intelectual que pode levar ao coma em pacientes com doenças hepáticas crônicas. A hiperamonemia é considerada o fator principal responsável pelas alterações na função cerebral associada à encefalopatia hepática (Monfort et al., 2000 e 2009, Rodrigo et al., 2010).

Os exercícios físicos prolongados têm efeitos marcantes no balanço de amônia cerebral, suportando a noção de que o acúmulo de amônia no cérebro pode provocar fadiga, especialmente quando indivíduos não treinados praticam exercício por um período prolongado sem suplementação de glicose (Nybo et al., 2005; Nybo e Secher, 2004).

As alterações na performance do atleta devido a diminuição do rendimento muscular podem estar associados ao surgimento da fadiga. Dois mecanismos de resposta relacionados ao aumento das concentrações de amônia têm sido postulados como responsáveis pelo surgimento da fadiga: 1) a elevação da síntese de glutamina como sistema de desintoxicação provocando o desequilíbrio do *pool* de neurotransmissores e 2) a alteração do metabolismo energético do conjunto neurônios pré-sináptico/pós-sináptico-astrocítico, provocando a diminuição da capacidade regenerativa do ATP (Hellsten et al., 1999; Wilkinson et al., 2010; Hilgier et al., 2009). Baseado nestas hipóteses é possível postular que um exercício físico intenso e prolongado seja capaz de induzir um estado tóxico de hiperamonemia agudo e sub-clínico. Este estado pode ser suficientemente severo a regiões críticas do CNS para afetar a continuidade de uma atividade coordenada.

Distintos estudos postulam que o aumento na concentração de amônia pode estar ligado ao déficit de glicogênio. É proposto que, entre outros fatores, o déficit de glicogênio na musculatura provoque perda de eficiência do gestual mecânico levando a perda de eficiência. Durante exercícios de alta intensidade e longa duração, acontece uma interação dos sistemas de manutenção de energia, onde a fosforilação oxidativa e a glicólise são utilizadas para a manutenção da capacidade contrátil da musculatura do indivíduo. Entre outros efeitos metabólicos há um significativo aumento da gênese de amônia (Bassini-Cameron, 2007 e 2008; Garg et al., 2008).

A amônia muscular se difunde para o sangue e pode atravessar a barreira hemato-encefálica. A variabilidade nas respostas mediadas pelo CNS pode ser explicada por diferenças no conteúdo cerebral de amônia, capacidade de desintoxicação e sensibilidade específica nas distintas regiões encefálicas (Rodrigo et al., 2010). É proposto que a produção de amônia relacionada ao exercício físico pode ser um fator responsável pela diminuição da capacidade cognitiva/física em atletas saudáveis e afeta o processo de continuidade do exercício, podendo prejudicar os resultados finais em um esporte olímpico.

II.1. Esporte olímpico – Windsurf

Para entender como funciona o metabolismo do atleta, precisa-se conhecer qual o esporte que o mesmo pratica. Sabendo que nessa dissertação estudaremos o metabolismo de um atleta olímpico de vela, classe RS:X, conhecida como Windsurf, faz-se necessário compreender o seu funcionamento e características.

O Windsurf é um esporte olímpico a vela, que tem por definição planar sobre a água utilizando a força do vento em uma prancha a vela (PWA, 2009). Originou no início da década 20, pela tentativa de modernizar a prancha de surf, equipando-a com a vela (Figura 2), passando por melhorias e aperfeiçoada, é o equipamento principal para a prática do esporte.

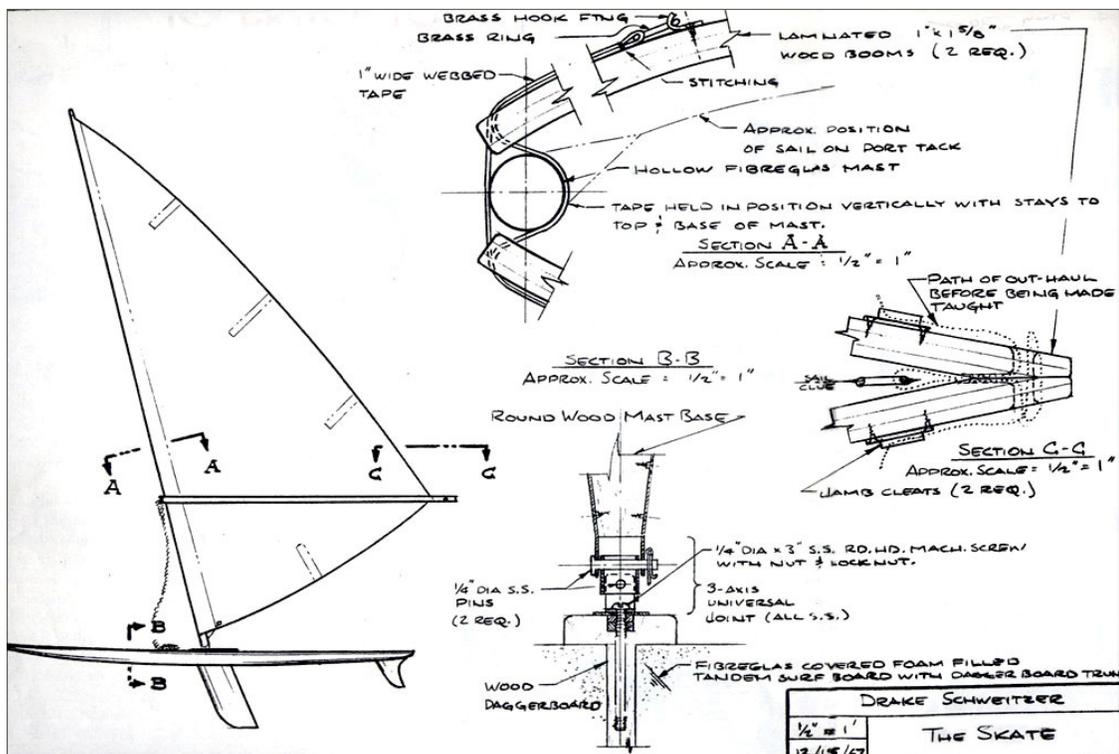


Figura 2. Desenho da primeira prancha de Windsurf. Criada por dois surfistas da Califórnia-EUA, Jim Drake e Hoyle Schweitzer, que inicialmente a denominaram de "The Skate" (o skate).

Estudos sobre atletas desse esporte relatam o alto índice de injúria muscular (Neville e Folland, 2009; Dyson et al., 2006; Hetsroni et al., 2006; Petersen et al., 2003) e incidência de lesões (Ulusarac e Carter, 2004; Nathanson e Reinert, 1999; McCormick e Davis, 1988). Outros estudos já mostram a correlação entre a frequência cardíaca e a performance do atleta (Chamari et al., 2003) e a demanda fisiologia necessária para a execução da prova olímpica de Windsurf, mostrando que durante toda a prova a demanda energética é requerida por todas as vias metabólicas (Vogiatzis et al., 2002; Castagna et al., 2008). Observa-se aqui não foi encontrado nenhum estudo que busca entender o metabolismo do atleta de Windsurf, antes, durante e após a prova olímpica.

A Federação Internacional de Vela (*International Sailing Federation - ISAF*) tem por missão governar o esporte olímpico vela, classificando-o em categorias, classes, oficializando regras e normas do esporte, além de organizar competições e apresentar lista da colocação dos melhores atletas olímpicos (ranking). E é

baseado nessa lista dos melhores atletas olímpicos de vela classe RS:X do mundo que desenvolveu-se esse estudo. Pois foi avaliado o metaboloma de um atleta colocado entre os 10 melhores do mundo nesse esporte (Figura 3).

Windsurfing - Men - RS:X - Wednesday 12 May 2010

Pos ↑ ↓	Name ↑ ↓	Country ↑ ↓	Crew	Events ↑ ↓	Previous ↑ ↓	Best	Points ↑ ↓
1	Julien Bontemps	FRA		7	1	1	4665
2	Nick Dempsey	GBR		7	3	1	4489
3	Ivan Pastor Lafuente	ESP		7	6	1	4472
4	Fabian Heidegger	ITA		7	10	4	4368
5	Shahar Zubari	ISR		7	5	2	4349
6	Dorian Van Rijsselberge	NED		7	7	5	4338
7	João Rodrigues	POR		7	2	1	4253
8	Ricardo Santos	BRA		7	4	2	4249
9	Alexandre Guyader	FRA		7	9	8	4214
10	Piotr Myszka	POL		7	8	2	4193
11	Nimrod Mashich	ISR		7	14	11	4187
12	Andreas Cariolou	CYP		7	12	12	4115
13	Byron Kokalanis	GRE		7	19	10	3923
14	Lukasz Grodzicki	POL		7	13	9	3915
15	King Yin Chan	HKG		7	17	8	3826
16	Maksymilian Wojcik	POL		7	15	12	3818

Figura 3. *Ranking* Oficial Windsurf RS:X (www.sailing.org)

III. Técnicas analíticas

As técnicas analíticas podem utilizadas para a avaliação metabólica, permitindo investigar e intervir de maneira científica, na prescrição, controle e acompanhamento dos processos de treinamento, buscando subsídios para adaptação individualizada de propostas de intervenção para a melhoria da performance de atletas. Considero como técnica analítica, os exames laboratoriais e a espectrometria de massas.

III.1. Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais têm por finalidade compreender o comportamento das vias metabólicas durante o exercício e a recuperação, nos quais, os resultados dos exames permitem avaliar o atleta tanto na prescrição nutricional

(alimentação e suplementação) e quanto no seu treinamento, prevenindo exercícios de *overtraining* (excesso de carga), subtreinamento e utilização inadequada de suplementos. Durante o processo de avaliações dos parâmetros clínicos do atleta, faz-se necessário, estabelecer um protocolo de avaliação metabólica individualizada.

Foi adotado nos experimentos desenvolvidos, um cardápio de exames (Tabela 1) na tentativa de diagnosticar e avaliação do metaboloma do atleta. Esse cardápio foi reproduzido em todos os experimentos.

As análises foram feitas automaticamente, pelo analisador bioquímico ADVIA® 1200 Chemistry System (Siemens – USA) e o hematológico COULTER® STKS™ Hematology Flow Cytometer (Beckman Coulter – USA). O desenho experimental dos pontos de coleta para análise está detalhado no Capítulo II.

Tabela 1. Cardápio de exames laboratoriais e método utilizado.

Metabólitos	Método
Aminoácidos	HPLC
Amônia	Enzimático
Creatinina	Enzimático
Glicose	Enzimático
Hemoglobina Glicada	HPLC
Hemograma	Hematograma
Lactato	Enzimático
Reticulócitos	Azul de cresil brilhante
Urato	Enzimático
Ureia	Enzimático
Minerais	Método
Cálcio	Colorimétrico
Cloro	Colorimétrico
Cobre	Absorção atômica com forno de grafite
Fosfato	Colorimétrico-Enzimático
Magnésio	Colorimétrico
Potássio	Eletrodo seletivo
Sódio	Eletrodo seletivo
Zinco	Absorção atômica com forno de grafite
Coagulação	Método
Tempo de Protrombina com INR	Coagulométrico
Tempo do Paciente	Coagulométrico
Atividade	Coagulométrico

INR	Coagulométrico
Tempo de Tromboplastina Parcial	Coagulométrico
Lipidograma Método	
Colesterol HDL	Charbroll e Charonnat
Colesterol LDL	Charbroll e Charonnat
Colesterol Total	Charbroll e Charonnat
Colesterol VLDL	Charbroll e Charonnat
Fosfolípidios	Charbroll e Charonnat
Lípidios totais	Charbroll e Charonnat
Triglicerídios	Charbroll e Charonnat
Enzima Método	
Fosfatase Alcalina (ALP)	Enzimático
Alanina Aminotransferase (ALT)	Enzimático
Aspartato Aminotransferase (AST)	Enzimático
Fosfocreatina Kinase (CK)	Cinético
Fração MB Fosfocreatina Kinase (CKMB)	Enzimático
Gama Glutamil Transferase (γGT)	Enzimático
Glicoproteína Alfa-1-Ácida (AGP)	Turbimetria
Lactato Desidrogenase (LDH)	Enzimático
Proteína C Reativa (CRP)	Quimioluminescência
Ferro Método	
Ferro Sério	Colorimétrico
Capacidade total de ligação do ferro	Colorimétrico
Saturação da transferrina	Colorimétrico
Ferritina	Quimioluminescência
Proteínas Método	
Albumina	Eletroforese em gel
Alfa 1 Globulina	Eletroforese em gel
Alfa 2 Globulina	Eletroforese em gel
Beta Globulina	Eletroforese em gel
Eletroforese de proteínas	Eletroforese em gel
Eritroproteína	Quimioluminescência
Gama Globulina	Eletroforese em gel
Mioglobina	Quimioluminescência
Proteínas Totais	Eletroforese em gel
Relação A/G	Eletroforese em gel
Hormônios Método	
Cortisol	Quimioluminescência
Dihidrotestosterona (DHT)	Radioimunoensaio com extração
Estradiol (E2)	Quimioluminescência
Estrina (E1)	Radioimunoensaio
Estriol (E3)	Radioimunoensaio
Fator do crescimento do tipo insulina 1 (IGF-1)	Quimioluminescência

Hormônio adenocorticotrófico (ACTH)	Quimiluminescência
Hormônio do crescimento (GH)	Quimiluminescência
Hormônio estimulante da tireóide (TSH)	Quimiluminescência
Hormônio estimulante folicular (FSH)	Quimiluminescência
Hormônio luteinizante (LH)	Quimiluminescência
Insulina	Eletroquimiluminescência
Progesterona	Quimiluminescência
Prolactina	Quimiluminescência
Testosterona Livre	Radioimunoensaio
Testosterona Total	Eletroquimiluminométrico
Tirosina (T4)	Quimiluminescência
Tirosina (T4) livre	Quimiluminescência
Triiodotironia (T3)	Quimiluminescência
Triiodotironia (T3) livre	Quimiluminescência

III.2. Espectrometria de massas

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

III.2.1. Histórico

Em 1896, Joseph John Thomson investigava os raios positivos que constituíam de átomos ionizados e mostrou pela combinação de campos elétricos e magnéticos, a separação de diferentes átomos com base na sua carga e massa. Mostrou que o elemento neônio apresentava dois tipos de átomos, alguns com peso atômico relativo 20 e outros com 22, o que contribuiu para a ciência na

identificação do elétron e sua caracterização como uma partícula subatômica fundamental (Thomson, 1913; Dahj, 1997).

Essa descoberta contou com a colaboração de muitos outros cientistas, mas foi Thomson o primeiro a intuir que os elétrons são corpúsculos dotados de carga elétrica e de massa e, principalmente, que fazem parte de toda matéria. Formulou uma teoria sobre a estrutura do átomo, na qual dizia que o átomo era uma esfera maciça com carga positiva, e os elétrons estariam presos à superfície da esfera e contrabalançariam a carga positiva. Esse modelo ficou conhecido como "pudim de massas", e foi substituído pelo modelo de Rutherford, aluno de Thomson, que dizia que o átomo teria um núcleo positivo, seria muito pequeno em relação ao todo, mas teria grande massa e, ao redor deste, os elétrons para não serem atraídos e caírem sobre o núcleo, ficavam em órbitas helicoidais em altas velocidades, e essa eletrosfera seria cerca de dez mil vezes maior do que o núcleo atômico, e que entre eles haveria um espaço vazio. Posteriormente, o modelo de Rutherford foi corrigido por Niels Bohr, também aluno de Thomson, o qual dizia o átomo possui um núcleo pequeno e carregado positivamente cercado por elétron em órbita circular (Falconer, 1997; Gerward, 1997).

A Figura 4 é um esquema do diagrama de seu aparelho, mostrando como um feixe de elétrons pode ser submetido a diferentes posições. Isto lhe permitiu estimar a massa do elétron de um átomo de hidrogênio. O elétron foi a primeira partícula subatômica a ser descoberta.

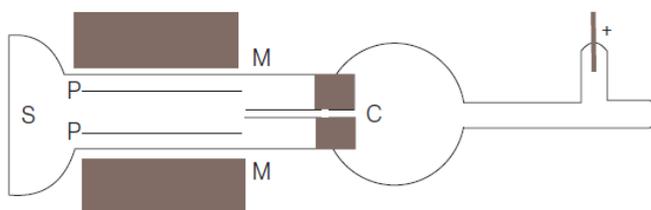


Figura 4. Aparelho criado por Thomson para investigar raios positivos. C é o eletrodo negativo (cátodo). O feixe é defletido pelos pólos MM de um eletroímã e pelas placas paralelo PP conectadas a uma fonte de eletricidade.

Joseph John Thomson foi o primeiro cientista a separar os átomos e moléculas de um gás, de acordo com suas massas, e ganhou o Prêmio Nobel de

Física em 1906, em reconhecimento dos grandes méritos de suas investigações teóricas e experimentais sobre a condução de eletricidade pelos gases.

Em 1913, outro aluno de Thomson, o físico e químico britânico Francis William Aston, conseguiu uma separação parcial de isótopos pelo método de difusão e provou a existência dos isótopos pelos experimentos com o neônio, em 1919. Nesta época, Aston aperfeiçoou o aparelho de Thomson e produziu um novo tipo de aparelho de raios positivos, no qual alcançava maior separação de íons de diferentes massas, cada uma, correspondendo a um número definido de íons, com mesma razão carga/massa (m/z), e assim, por mostrar um espectro de linhas foi chamado de espectrógrafo de massas (Brock, 1972; Aston 1920a,b; 1921). Esse aparelho destinava-se a determinações de massas atômicas e ele descobriu mais de 200 isótopos naturais e definiu esse fenômeno de isotopia, ganhando o Prêmio Nobel de Química em 1922, pelo seu trabalho com o espectrógrafo de massa, pela criação da regra dos números inteiros e por determinar as massas atômicas de todos os elementos da tabela periódica.

Em 1918, durante o desenvolvimento do espectrógrafo de massas por Aston, o físico canadense Arthur Jeffrey Dempster construiu um instrumento, basicamente mais simples e apropriado para medidas quantitativas de isótopos, apesar de não poder ser usado para fazer medidas de massas atômicas. O aparelho de Dempster foi chamado de espectrômetro de massas, uma vez que a corrente de íons era medida eletronicamente (Dempster, 1918) e não registrada numa chapa fotográfica como no de Aston.

Após a construção do espectrômetro de massas, houve várias modificações, aperfeiçoamentos no equipamento, além da combinação de tecnologias para a criação das plataformas de espectrometria de massas. Nota-se a importância do desenvolvimento da técnica, por todos seus criadores terem recebido o Prêmio Nobel.

III.2.2. Instrumentação

A espectrometria de massas pode analisar compostos diretamente no espectrômetro de massas, ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação dos compostos, como a cromatografia à gás (GC) ou a cromatografia à

líquido (LC). Assim, basicamente o espectrômetro de massas é composto por três módulos principais, que são: a fonte de ionização da amostra, os analisadores de massas e os detectores das massas (Yates et al., 2009).

Técnicas de separação dos compostos – GC e LC

A cromatografia é um método de separação física na qual os componentes que serão separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária (fase estacionária), enquanto a outra (fase móvel) se move em uma direção definida (Iupac, 2010).

A cromatografia a gás possui a operação básica de volatilização e transferência dos analitos para uma coluna cromatográfica, através de uma interface aquecida chamada de injetor. A coluna cromatográfica é aquecida de forma controlada podendo criar rampas com temperaturas desejadas, e para movimentar a amostra dentro da coluna usa-se um gás inerte, como hélio ou nitrogênio, que é chamado de gás de arraste, o qual faz o papel da fase móvel (Kitson et al., 1996). A aplicação desta técnica é ampla, contudo sua principal limitação deve-se ao fato de que os analitos devem ser voláteis e estáveis nas condições de análise.

A cromatografia a líquido, a amostra é introduzida na coluna de separação dissolvida em um líquido (solvente). Uma bomba impulsiona o solvente, e conseqüentemente o analito, através da coluna de separação até a transferência de uma parte do efluente da coluna para fonte de ionização. As bombas e as colunas devem estar preparadas para suportar grandes pressões (até 4×10^7 Pa, nos sistemas convencionais, ou maiores, como nos sistemas de *fast-HPLC* ou *UPLC – ultra performance liquid chromatography* – que suportam cerca de 2 a 3 vezes mais pressão). O fluxo pode ser controlado através da bomba, que permite também a realização de sistemas de gradientes de solventes, no qual é possível utilizar vários solventes e controlar seu fluxo individualmente (fase móvel), permitindo alterar suas concentrações durante uma corrida (Ardrey, 2003).

Fontes de ionização

As fontes de ionização devem ser apropriadas de acordo com o composto para sua transformação em íons, sendo então a parte do espectrômetro

responsável pelo processo físico ou químico de conversão de um átomo ou molécula em íon, adicionando ou removendo partículas carregadas como elétrons ou outros íons. Esse processo de transformação das moléculas em íons funciona de maneira diferente dependendo se está produzindo íons de carga positiva ou de carga negativa, pois um íon positivo é produzido quando um elétron ligado a um átomo ou molécula absorve energia suficiente para escapar da barreira elétrica que o limita e é então expelido para fora da eletrosfera. A quantidade de energia necessária para isto é chamada de potencial de ionização. Já um íon negativo é produzido quando um elétron livre choca com um átomo e é então capturado, ficando no interior da barreira do potencial elétrico. Em alguns casos, um próton pode ser adicionado ou subtraído da molécula, produzindo os íons protonados ou desprotonados, respectivamente. Em outros casos, os íons são formados através da interação com adutores, como metais alcalinos, formando íons positivos, ou então com ametais que se ligam a metais formando a ligação iônica (ânions) e produzindo íons negativos (Dass, 2007; Hoffmann e Stroobant, 2007).

Tendo em vista que os processos de ionização são fundamentais para a espectrometria de massas, diversas fontes de ionização foram desenvolvidas, elas são: ionização por elétrons (EI – *electron ionisation*), ionização química (CI – *chemical ionisation*), *eletrospray* (ESI), fotoionização à pressão atmosférica (APPI – *atmospheric pressure photoionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionisation*), ionização *eletrospray* e dessorção (DESI – *desorption electrospray ionisation*), espectrometria líquida para a massa do íon secundário (LSIMS – *liquid secondary ion mass spectrometry*), bombardeamento de átomos rápidos (FAB – *fast atom bombardment*) e ionização e dessorção à laser assistida por matriz (MALDI – *matrix-assisted laser desorption/ionisation*) (Gross, 2004).

Analísadores de massas

Os analisadores de massas são a parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com a m/z , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos. Uma vez que a amostra foi ionizada, ela é transportada a partir da fonte de ionização para o analisador de massas em um

compartimento à vácuo. De acordo com Hoffmann e Stroobant (2007) e Dass (2007), os tipos de analisadores de massas são:

- **Analisadores de setor:** utiliza campo elétrico estático e setor magnético.
- **Quadrupólos:** utiliza campo elétrico oscilante.
- **Armadilha de íons** (IT – *Ion Trap* ou QIT – *Quadrupole Ion Trap*): utiliza campo elétrico que aprisiona os íons.
- **Tempo de Vôo** (TOF – *Time of Flight*): utiliza campo elétrico com potencial constante no qual os íons são acelerados de acordo com sua massa, no qual, para aumentar a precisão do analisar e a distância percorrida pelos íons, refletores são posicionados nos analisadores (TOF-TOF).
- **Analisadores com transformada de Fourier** (FT – *Fourier-transform*): utilizam a transformada de Fourier para converter os sinais de onda prescritos pela órbita dos íons em sinais referentes a *razão m/z*. São utilizados tanto o analisador de ressonância de íon ciclotron (ICR – *ion cyclotron resonance*) quanto analisador tipo Orbitrap™ (Perry et al., 2008).
- **Analisadores de mobilidade de íons** (IM – *Ion Mobility*): utilizam campo elétrico uniforme que conduz os íons para uma câmara específica chamada de *drift chamber* (câmara de deslizamento) a qual é preenchida por um tipo de gás (argônio) oferecendo resistência para o deslocamento dos íons no seu interior. Esses tipos de analisador fazem parte de espectrômetros híbridos, os quais combinam tecnologias diferentes.

Detectores de massas

Os detectores são a parte final de um espectrômetro de massas, responsável pela detecção e amplificação dos feixes de íons em sinais elétricos, oferecendo resultados qualitativamente e/ou quantitativamente, ou traduzidos em imagens (Dass, 2007; Yates et al., 2009). Os tipos de detectores são:

- **Faraday cup:** detecta os íons pela medição direta das cargas através de um eletrodo de condutância.
- **Multiplicadores de elétrons** (EM – *Electron Multiplier*): funcionam pela emissão de elétrons secundários produzidos por *dynodes* quando os íons provenientes dos analisadores chocam-se a eles. Existem dois tipos de multiplicadores de elétrons, os *discrete-dynode*, constituído por 16 a 20

dynodes de cobre e berílio, e o *continuous-dynode* de um eletrodo contínuo na superfície.

- **Multiplicadores de fótons:** converte o feixe de íons, quando atinge o detector construído por fotocatodo, em fótons, e então o sinal é amplificado.

Alguns espectrômetros de massas utilizam a combinação de tecnologias na busca de resultados mais precisos dependendo da amostra, sendo assim conhecidos como híbridos e denominados *Tandem-MS*. Nesse estudo foi utilizado o espectrômetro de massas híbrido Quattro Micro GC™ (Waters Corporation – USA) acoplado ao cromatógrafo à gás HP6890 (Agilent Technologies – USA).

III.2.3. Quattro Micro GC™ – Waters Corporation

O Quattro Micro GC™ (Waters Corporation – USA) é um espectrômetro de massas *Tandem-MS* ou MS/MS ou MSⁿ que possui um modo de análise seqüencial que permite a seleção específica de cada íon desejado com uma seqüência de análise que envolve três estágios, sendo o primeiro estágio a seleção de um íon precursor que formarão outros íons, o segundo estágio a formação de íons fragmentados dos precursores, e o terceiro estágio a análise e detecção desses fragmentos (Hoffmann e Stroobant, 2007; Dass, 2007; Yates et al., 2009) (Figura 5).



Figura 5. Quattro Micro GC™.

A configuração do *Tandem-MS* é um triploquadrupólo, que apresenta três analisador de massas quadrupólo em sequência, sendo dois analisadores separados por uma câmara de fragmentação. Assim, o íon precursor é selecionado no primeiro analisador (chamado de MS1) e então passa pelo segundo quadrupólo, que é uma câmara adaptada para realizar a fragmentação do íon precursor (câmara de colisão). Então, os fragmentos formados serão analisados pelo terceiro quadrupólo (segundo analisador, chamado de MS2) antes de chegar até o detector (Kapp e Schutz, 2007) (Figura 6).

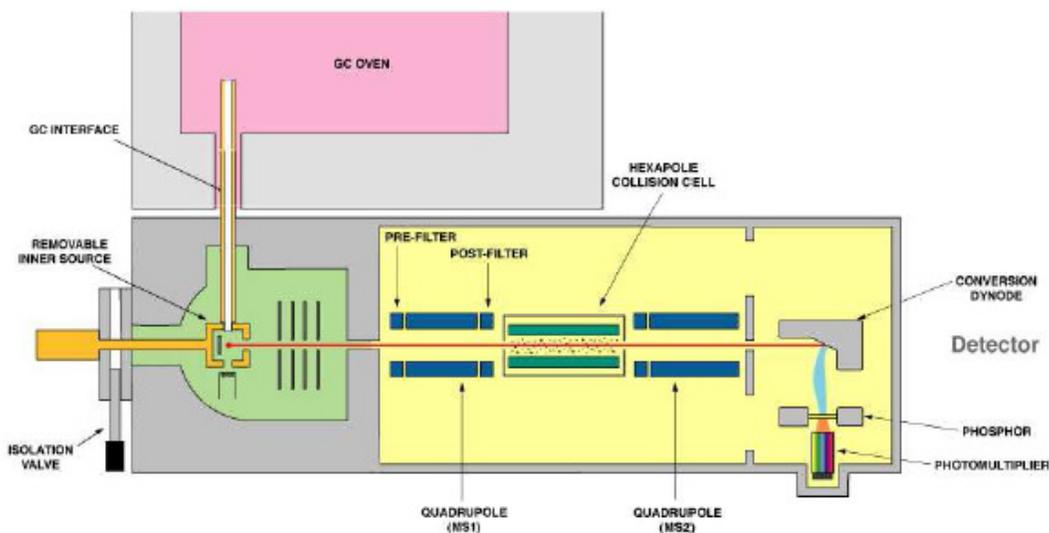


Figura 6. Representação esquemática do Tandem-MS.

A câmara de colisão é um hexapólo que obtém os fragmentos do íon precursor através da dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*), também conhecida como dissociação ativada por colisão (CAD – *collisionally activated dissociation*). Neste processo, a câmara pode ser preenchida com um gás inerte, como hélio ou argônio, e então os íons são acelerados pela aplicação de campos elétricos. Vale ressaltar que duas etapas são importantes neste processo, a ativação por colisão, onde a energia translacional resultante é convertida em energia interna, tornando as moléculas energeticamente excitadas; e a dissociação uni-molecular, processo pelo qual as

moléculas excitadas sofrem a dissociação (Blackburn e Goshe, 2009; Mendoza e Vachet, 2009).

O MS1 e MS2 são analisadores de massas quadrupólo que utilizam campos elétricos oscilantes, gerados por quatro barras metálicas (eletrodos), para estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons, de acordo com seus valores de m/z , durante sua passagem pelo centro do quadrupólo. O campo elétrico oscilante é gerado nos eletrodos pela aplicação de potenciais de corrente-direta (DC – *direct-current*) e rádio-freqüência (RF). Através de variações sistemáticas nos valores de DC e RF, a trajetória dos íons é estabilizada ou desestabilizada, assim o quadrupólo funciona como um filtro. Isso permite que os íons de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector, e desta forma pode ser diferenciados (Hoffmann e Stroobant, 2007; Dass, 2007; Yates EI al., 2009) (Figura 7).

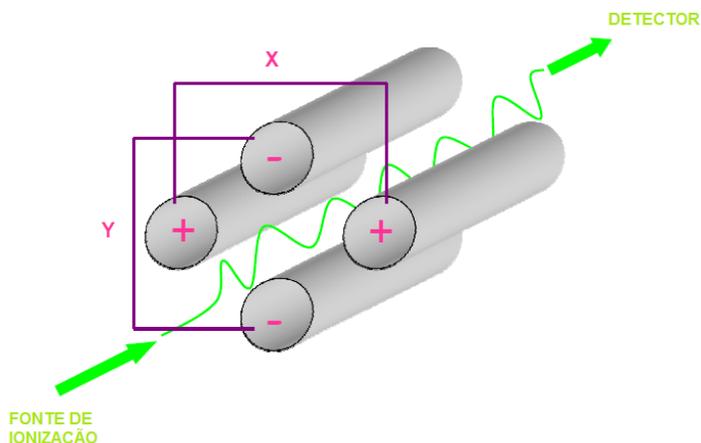


Figura 7. Representação de um quadrupólo.

A fonte de ionização utilizada nesse estudo foi a de ionização por elétrons (EI), a qual é uma das técnicas que tem como pré-requisito básico, que todos os analitos devem estar na sua forma de vapor, e portanto as amostras devem ser voláteis (Eljarrat e Barcelo, 2005).

Na ionização por EI, um feixe de elétrons de 70eV ($1\text{eV} = 1.60217733 \times 10^{-19}\text{J}$) é produzido por um filamento (Figura 8). Os elétrons são então acelerados por um ânodo, e acabam interagindo e energizando as moléculas do analito na fase gasosa. Como consequência desta energização, cerca de 20eV

são transferidos para as moléculas e como a energia de ionização típica de moléculas orgânicas é de 1eV, ocorre a ionização destas moléculas pela remoção de um elétron, produzindo um íon com elétrons desemparelhados, portanto um íon radical. A utilização de 70eV são necessários para que a energia dos elétrons apresentem comprimento de onda similar à energia das ligações em moléculas orgânicas ($\sim 0,14\text{nm}$), assim a transferência de energia é maximizada. Contudo, esta ionização gera íons com estado energético excedente em 5-10eV, como as energias de ligação típicas em moléculas orgânicas é entre 4-5eV, este processo de ionização é seguido por sucessivas clivagens e rearranjos moleculares. Este processo de clivagem é conhecido como fragmentação, e geralmente resulta em um espectro de massas contendo apenas fragmentos iônicos, formados a partir da molécula original (Kitson et al., 1996; Ardrey, 2003) (Figura 9).

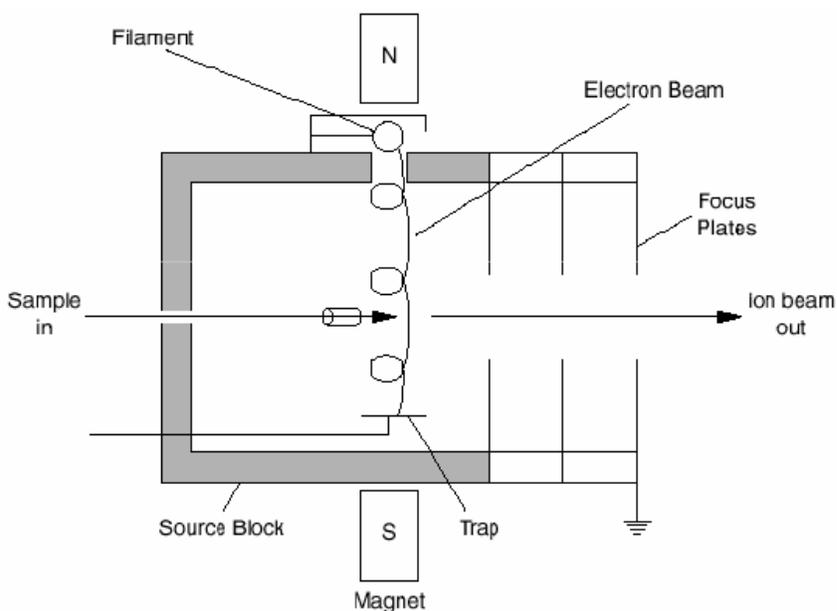


Figura 8. Fonte de Ionização por Elétrons. Representação do bloco de entrada da amostra, as fendas para a passagem de elétrons e o feixe de íons formado pela fonte EI. O feixe é produzido a partir do filamento que quando aquecido emite elétrons e atraídos pela placa iônica que está mantida a um potencial positivo em relação ao filamento.

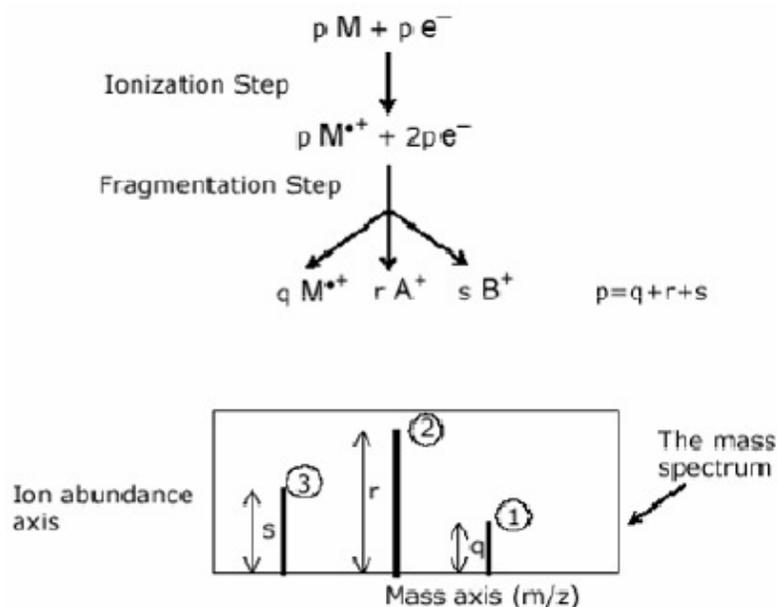


Figura 9. Fragmentação na formação de um espectro de massas pela ionização por elétrons para um número (p) de moléculas (M) interagidas com elétrons (e^-). O pico 1 (M^+) representa o íon molecular, que é o íon de maior massa (q). Os picos 2 e 3 representam, A^+ e B^+ respectivamente, representam dois fragmentos de íons (r e s). O pico 2 é o pico base por ser o maior pico.

O multiplicador de elétrons é o detector adotado no *Tandem-MS*. A sua tecnologia permite que a fonte de EI possa ter a sua energia regulável, permitindo a obtenção de íons moleculares através da redução de energia aplicada (Hoffmann e Stroobant, 2007; Dass, 2007).

Em síntese, a plataforma de espectrometria de massas utilizada nesse estudo foi um Tandem-MS (triploquadrupólo) acoplado ao cromatógrafo à gás HP6890 (Agilent Technologies – USA), com fonte de ionização por elétrons e detector de multiplicador de elétrons. Na qual, a amostra é volatilizada no GC, passando para a fonte EI, onde os íons formados são transferidos para os analisadores de massas que analisa os fragmentos de acordo com sua massa e então detectados a massa no detector (Figura 10). Após essa detecção faz-se necessário a identificação dos espectros gerados, e a ferramenta utilizada nessa identificação é a bioinformática.

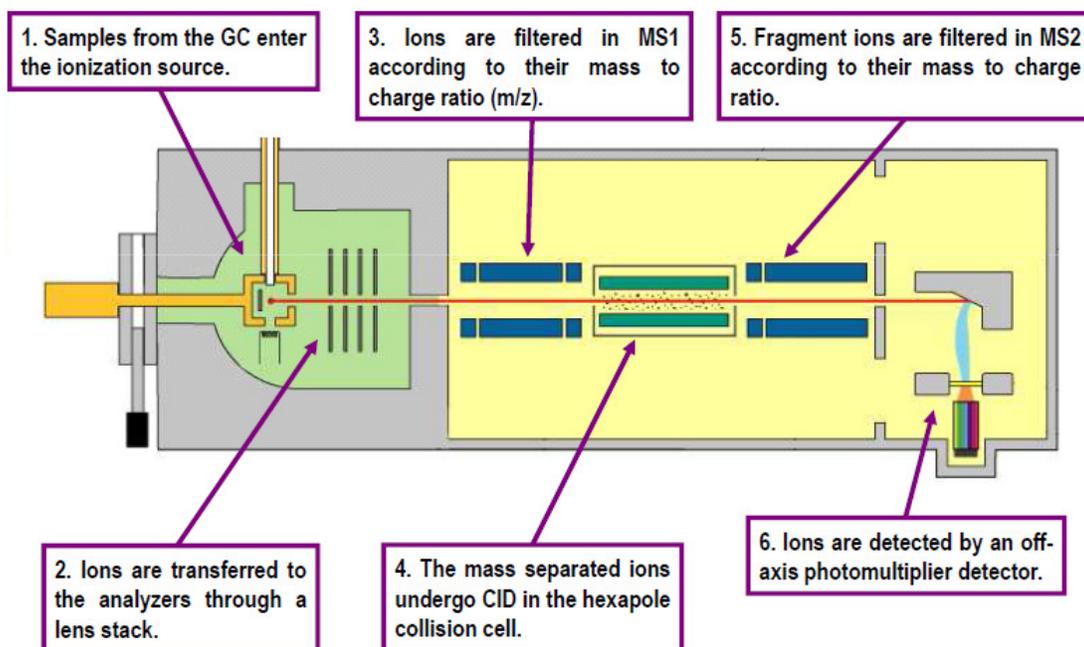


Figura 10. Esquematização do funcionamento do Quattro Micro GC™.

IV. Bioinformática

A bioinformática é uma ferramenta utilizada para identificar os compostos do metaboloma analisado de acordo com uma base de dados, geralmente a biblioteca NIST (*National Institute of Standards of Technology*), além de encontrar as diferenças, aplicando testes estatísticos para avaliação significativa e construindo uma matrix contendo a massa molecular, o tempo de retenção e a intensidade do composto.

Para compreender os dados obtidos com a análise metabolômica das amostras, a ferramenta mais importante é a bioinformática. Utilizou-se nesse estudo dois softwares de bioinformática, o MarkerLynx e o ChromaLynx (Waters Corporation – USA).

O MarkerLynx é utilizado para encontrar as diferenças entre as amostras, aplicando testes estatísticos para avaliação significativa dessas diferenças. Esse software constrói uma matrix contendo a massa do composto, o tempo de retenção de cada composto e a intensidade. Depois disso os dados são estatisticamente analisados, os testes estatísticos mais utilizados são o PCA (*Principal Component Analysis*), o *Trend Plot* e o *S-Plot* (Werth et al., 2010).

O PCA é um procedimento matemático que transforma uma série de variáveis correlacionadas em um número menor de variáveis não correlacionadas chamadas componentes principais. No PCA é incluído dois *scores*, que são média ponderadas dos dados, e analisados semelhantes aos índices do Dow Jones e Nasdaq que resumem uma tabela de pontos do tempo (linhas) x ações (colunas). Os *scores* são importantes índices dos dados, que possibilita a verificação da probabilidade de semelhanças e diferenças. O *Trend-Plot* é um gráfico de duas ou mais variáveis *versus* o tempo. Esse gráfico possibilita a identificação de diferenças linear dos *plots*, ou seja, em amostras em triplicatas, o *Trend-Plot* identifica a repetição que não se assemelha com as demais (Werth et al., 2010). E o *S-Plot* é um gráfico de correlação de duas amostras em relação ao tempo, representado em forma de S. Nesse gráfico, as extremidades se diferenciam e o centro se assemelha (Steuer et al., 2007; Werth et al., 2010).

Já o ChromaLynx, é utilizado para localizar os picos cromatográficos de todos os cromatogramas, identificando os espectros de massas de acordo com a uma base de dado (Biblioteca NIST). Esse software tem a capacidade de detectar e identificar todos os componentes de uma solução complexa.

Com o auxílio da bioinformática pode-se obter todos os componentes presentes no metaboloma humano e assim, quantificá-los para entender como cada via metabólica está funcionando, seja em repouso, ou em diferentes situações, como estresse físico ou estado patológico. Com esse resultado pode-se representar cada composto no mapa metabólico e suas interações.

V. Mapa Metabólico

O mapa metabólico é a representação integrada do metaboloma humano. Nesse está representado os resultados individualizados de um metaboloma estudado e analisado pela plataforma de MS, onde cada composto é esquematizado nas vias metabólicas tanto a sua síntese quanto a sua metabolização. Assim, essa esquematização integrada das vias metabólicas auxilia na visualização e facilita a compreensão da análise de cada composto em questão, resultando posteriormente na compreensão integral do metaboloma (Figura 11).

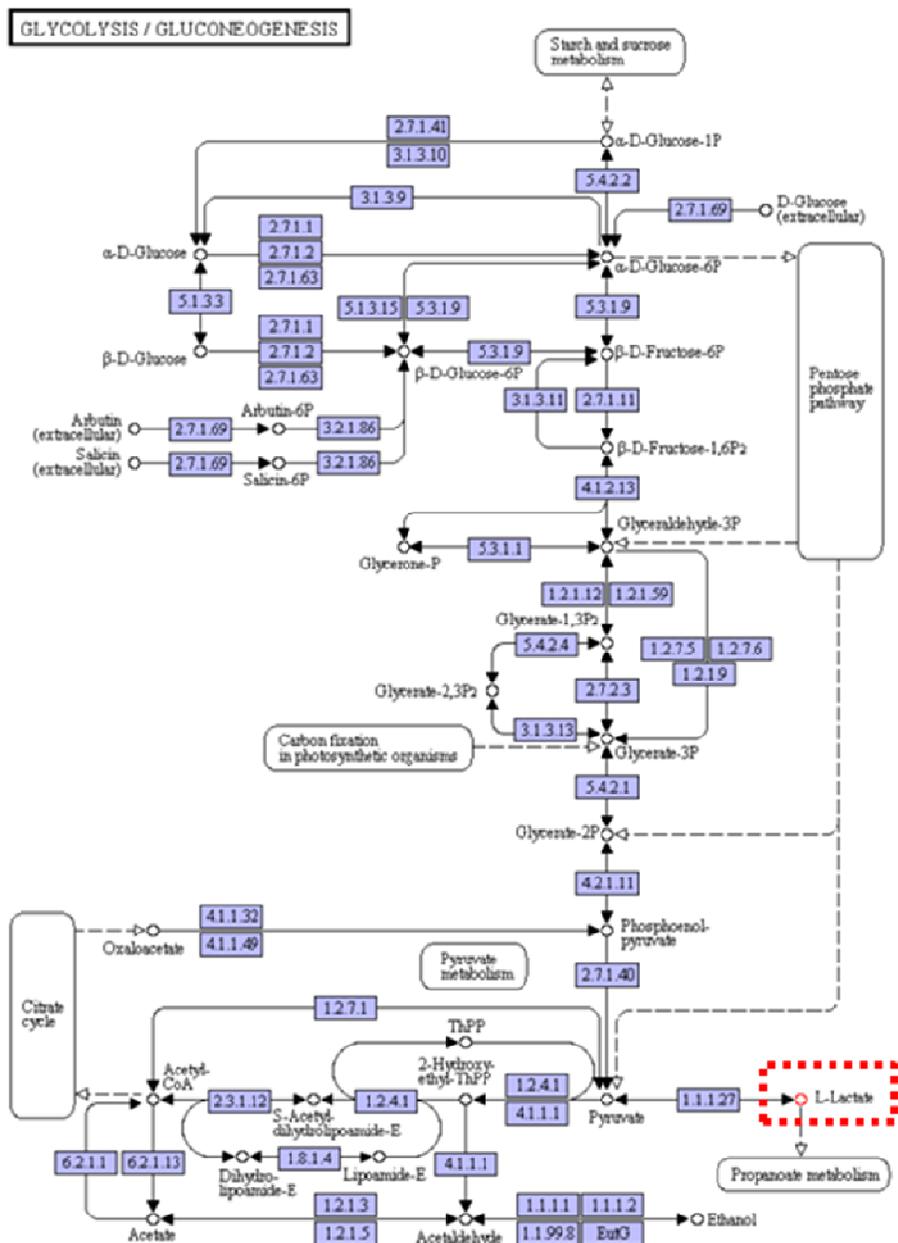


Figura 11. Mapa metabólico do composto Lactato para exemplifica a via metabólica desse composto.

Já é disponível *online* em sites de banco de dados, ferramentas para construção de um mapa metabólico de uma via metabólica ou da interação de várias vias metabólicas. Assim, o mapa metabólico é resultado de um metaboloma e representa as relações entre as funções dos compostos e as suas reações bioquímicas envolvidas.

VI. Referências Bibliográficas

Aguilar MA, Miñarro J, Felipo V. Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp Neurol*. 2000 Feb;161(2):704-13.

Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci*. 1999 Nov 30;170(2):138-46.

Ardrey RE. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2003.

Aston FW. Isotopes and atomic weights. *Nature*, v107, p. 334–338, 1921.

Aston FW. The constitution of atmospheric neon. *Phil Mag*. v39, p. 449-455, 1920a.

Aston FW. The mass-spectra of chemical elements. *Phil Mag*. v39, p. 611-625, 1920b.

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

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

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

Blackburn K, Goshe MB. Challenges and strategies for targeted phosphorylation site identification and quantification using mass spectrometry analysis. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2009 Mar;8(2):90-103.

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

Brock W. Aston, isotopes and the mass spectrograph. In: Brock W, Chapple M and Hewson M (orgs). *Studies in physics*. Leicester: Hulton Editorial, 1972.

Castagna O, Brisswalter J, Lacour JR, Vogiatzis I. Physiological demands of different sailing techniques of the new Olympic windsurfing class. *Eur J Appl Physiol*. 2008 Dec;104(6):1061-7.

Chamari K, Moussa-Chamari I, Galy O, Chaouachi M, Koubaa D, Hassen CB, Hue O. Correlation between heart rate and performance during Olympic windsurfing competition. *Eur J Appl Physiol*. 2003 May;89(3-4):387-92.

Dahl PF. *Flash of the Cathode Rays: A History of J. J. Thomson's Electron*. Philadelphia: Institute of Physics Pub. 1997.

Dass C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.

Dempster A J. A new method of positive ray analysis. *Phys. Rev*. 1918. Vol 11 (4): 316–325.

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

Dyson R, Buchanan M, Hale T. Incidence of sports injuries in elite competitive and recreational windsurfers. *Br J Sports Med*. 2006 Apr;40(4):346-50.

Eljarrat E, Barcelo D. Electron Impact and Chemical Ionization. In: Worsfold, PJ, Townshend A, Poole CF. (Eds) Encyclopedia of Analytical Science, 2nd Ed. Elsevier, Oxford, v. 5, p. 359-366, 2005.

Erceg S, Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Llansola M, Piedrafita B, Felipo V. Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure. Therapeutic implications. *Neurochem Int.* 2006 May-Jun;48(6-7):441-6.

Falconer, I (1997). "J. J. Thomson and the Discovery of the Electron." *Physics Education.* 1997 :32(4): 226–231.

Garg SK, Banerjee R, Kipnis J. Neuroprotective immunity: T cell-derived glutamate endows astrocytes with a neuroprotective phenotype. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):3866-73.

Gehlenborg N, O'Donoghue SI, Baliga NS, Goesmann A, Hibbs MA, Kitano H, Kohlbacher O, Neuweger H, Schneider R, Tenenbaum D, Gavin AC. Visualization of omics data for systems biology. *Nat Methods.* 2010 Mar;7(3 Suppl):S56-68.

Gerward, L. "The Discovery of the Electron." *Physics Education* 32(4): 219–225. 1997.

Gross JH. Mass spectrometry: a textbook. Heidelberg: Springer Verlag, 518 p. 2004.

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.

Hetsroni I, Mann G, Ayalon M, Frankl U, Nyska M. Extensor digitorum longus tendonitis in windsurfing due to footstrap fixation. *Clin J Sport Med.* 2006 Jan;16(1):74-5.

Hilgier W, Freško I, Klemenska E, Beresewicz A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J, Zielińska M. Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis. *Neurobiol Dis.* 2009 Jul;35(1):75-81.

Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications.* John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition 2007.

Iupac. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught AD, Wilkinson A. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2010-) updates compiled by A. Jenkins.

Kapp E, Schütz F. Overview of tandem mass spectrometry (MS/MS) database search algorithms. *Curr Protoc Protein Sci.* 2007 Aug;Chapter 25:Unit25.2.

Kitson FG, Larsen BS, McEwen CN. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide.* Academic Press, San Diego, CA. 1996.

McCormick DP, Davis AL. Injuries in sailboard enthusiasts. *Br J Sports Med.* 1988 Sep;22(3):95-7.

Mendoza VL, Vachet RW. Probing protein structure by amino acid-specific covalent labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2009 Sep-Oct;28(5):785-815.

Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Rodrigo R, Llansola M, Piedrafita B, El Mili N, Boix J, Agustí A, Felipo V. Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: therapeutical implications. *Neurochem Int.* 2009 Jul-Aug;55(1-3):106-12.

Monfort P, Montoliu C, Hermenegildo C, Muñoz M, Felipo V. Differential effects of acute and chronic hyperammonemia on signal transduction pathways associated to NMDA receptors. *Neurochem Int.* 2000 Aug-Sep;37(2-3):249-53.

Nathanson AT, Reinert SE. Windsurfing injuries: results of a paper- and Internet-based survey. *Wilderness Environ Med.* 1999 Winter;10(4):218-25.

Neville V, Folland JP. The epidemiology and aetiology of injuries in sailing. *Sports Med.* 2009;39(2):129-45.

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

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

Nybo L. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010 Jan 1;2:779-92.

Perry RH, Cooks RG, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev.* 2008 Nov-Dec;27(6):661-99.

Petersen W, Rau J, Hansen U, Zantop T, Stein V. Mechanisms and prevention of windsurfing injuries. *Sportverletz Sportschaden.* 2003 Sep;17(3):118-22.

Professional Windsurfers Association: < <http://www.pwaworldtour.com> > 2010.

Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipo V. Hyperammonemia Induces Neuroinflammation that Contributes to Cognitive Impairment in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology.* 2010 Mar 17.

Steuer R, Morgenthal K, Weckwerth W, Selbig J. A gentle guide to the analysis of metabolomic data. *Methods Mol Biol.* 2007;358:105-26.

Thomson JJ. On the appearance of helium and neon in vacuum tubes. *Science.* 1913 Mar 7;37(949):360-364.

Ulusarac O, Carter E. Varied clinical presentations of *Vibrio vulnificus* infections: a report of four unusual cases and review of the literature. *South Med J.* 2004 Feb;97(2):163-8.

Vogiatzis I, De Vito G, Rodio A, Madaffari A, Marchetti M. The physiological demands of sail pumping in Olympic level windsurfers. *Eur J Appl Physiol.* 2002 Mar;86(5):450-4.

Werth MT, Halouska S, Shortridge MD, Zhang B, Powers R. Analysis of metabolomic PCA data using tree diagrams. *Anal Biochem.* 2010 Apr 1;399(1):58-63.

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

Wishart DS. Computational approaches to metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2010. 593:283-313.

Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:49-79.

Capítulo II

Artigo

Metabolical changes during in field experiment with elite athlete of Windsurfing

Authors: Nathália Maria Resende^{1,2}
Anibal Monteiro de Magalhães Neto^{1,2}
Flávio Bachini²
Luis Eduardo Viveiros de Castro^{2,3}
Adriana Bassini^{2,3}
Luiz-Cláudio Cameron^{1,2,3}

¹Genetics and Biochemistry Institute – Federal University of Uberlândia.

²Laboratory of Protein Biochemistry – Federal University of State of Rio de Janeiro.

³Olympic Laboratory – Brazilian Olympic Committee.

Abstract

Physical exercise affects hematological equilibrium and metabolism. During different exercise cellular needs create distinct metabolic responses and blood metabolites have been used to understand exercise intensity and muscle injury. This study evaluated the biochemical and hematological analyses of a man which is a sailing Olympic athlete ranked among the top ten athletes on the official ISAF ranking list from the discipline Windsurfing class RS:X. The results showed the metabolic adaptation to an elite athlete in response of exercise in two training moments: the first one when the athlete was using the usual training and dietary protocol and a second one after the careful analysis of his diet and in field metabolic changes measured in a simulated competition. This results allowed comprehend how the metabolical adaptation of the Olympic athlete and show the importance of an in field metabolical analysis to the understanding and supporting of training in elite athletes.

Introduction

Physical exercise affects hematological equilibrium and metabolism (Ament and Verkerke, 2009; Rose and Richter, 2009). During exercise, muscle metabolism increases the transduction of chemical energy depleting the body energy stocks (Burd et al., 2009). When energy demand increases muscle glycogen, free amino acids and fat are used as substrates to keep muscle contraction (Westerterp, 2010).

Blood metabolites have been used to understand exercise intensity and muscle injury (Bassini-Cameron et al., 2007; Bassini-Cameron et al., 2008). During different exercise cellular needs create distinct metabolic responses (Nader, 2006; Flueck and Eilers, 2010). In addition of the release of molecules that can be used as metabolic parameters, muscle injury release metabolites and proteins accumulated within these cells (Rasmussen and Richter, 2009). Both the amount and kinetics of blood apparition of these biomarkers and molecules are correlated with the damage caused by physical exercise (Bessa et al., 2008; Burd et al., 2009). Indeed, these responses together can be used as a tool to manage training, increasing metabolic adaptation to exercise stress (Coffey and Hawley, 2007).

In the past years some theories suggested that the metabolism of amino acids play an important role producing central fatigue (for an elegant review see Wilkinson et al., 2010). In fact exercise is being used to understand the metabolites role in fatigue development. In the end of the 80's, Newsholme and colleagues (1988) proposed in a series of papers that central fatigue could be related to the plasma concentrations of aromatic (AAA) and branched-chain amino acids (BCAA) ratio and its relationship with tryptophan availability and serotonin production. In an opposite direction some data showed that tryptophan supplementation could extend exercise (Segura and Ventura, 1988; Javierre et al., 2010). In the 90's Banister et al. (Banister and Cameron, 1990) proposed that during exercise the increase in ammonia could lead to central fatigue. Since that hyperammonemia has been linked to several Central Nervous System (CNS) impairment conditions, probably linked to the glutamatergic system (Cauli et al.,

2008). In fact it seems that we still far away from consensus regarding the use of amino acid supplementation during exercise (Williams, 1999). It is very likely to suppose that the adequate training and diet could improve cellular machinery that expanding chemical energy accumulation and transduction. In this case, these improvements can lead to a better energetic metabolism decreasing deleterious effects of metabolites and increasing both physical and mental performance.

Windsurfing is a water sport mixing surfing and sailing (Sedlaczek, 2009). Its practicing depends on three basic conditions: athlete, environment and equipment. Due to its nature, windsurfing requires a mixture of force and resistance training. Little is known about metabolism of this sport, since that most of papers are focused in physiological parameters (Vogiatzis et al., 2002; Chamari et al., 2003; Melis et al., 2003; Campillo et al., 2007; Castagna et al., 2007; Castagna et al., 2008; Pérez-Turpin et al., 2009) and injuries (McCormick and Davis, 1988; Nathanson and Reinert, 1999; Orchard et al. 2002; Petersen et al., 2003; Nickel et al., 2004; Hetsroni et al., 2006; Dyson et al., 2006; Nathanson et al., 2008; Neville and Folland, 2009).

Due to the tactical and strategy decisions needs during windsurf competition, in this study we evaluated of a world champion windsurfer that is ranked among the top ten athletes on the official International Sailing Federation (ISAF) ranking list. We investigated the metabolic changes in response to a competition simulation in an in field investigation and its response to a nutritional and training intervention.

Material and Methods

Subject

This study evaluated a man which is a sailing Olympic athlete from the discipline Windsurfing class RS:X. The athlete was well instructed about the procedures and signed a written informed consent. The study was approved by the Ethics Committee for Human Research of the Federal University of Estado do Rio de Janeiro and conformed to the requirements and guidance for carrying out research in human subjects (Health National Council, Brazil, 2010).

Experimental Design

We simulated a typical Olympic regatta for the sport. The athlete performed a race, rested for 30 minutes, and restated another race. Each race lasted 30 minutes. Blood samples were collected both before and after the races (T1 to T4). Another sample was collected after 120 minutes rest (T5). Note that the experimental design give us information about the athlete metabolic condition pre and post the first exercise bout (T1-T2); rest effects in the metabolism (T2-T3); pre and post the second exercise bout (T3-T4) and metabolic recuperation (T4-T5).

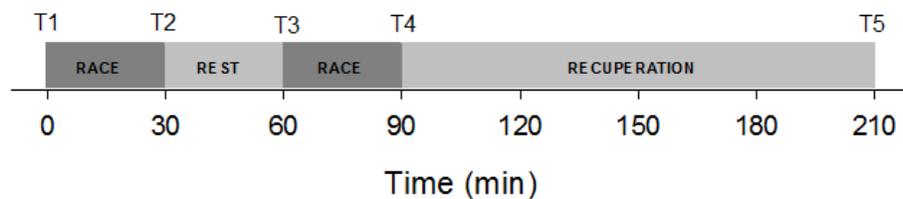


Illustration 1. Experimental Design. Blood was collected following in field conditions. The experimental timeline and blood collection moments (T1-T5) were shown.

Two experiments (A and B) were conducted in similar environmental conditions ($^{\circ}\text{C}$; % relative humidity; wind velocity of km/h). The first experiment was done using the regular training and athlete diet. After the analyses of the results diet and training were modified and the second experiment was conducted.

Nutritional interventions

The nutritional changes suggested were to increase nutrients intake to 16MJ (20% from proteins; 60% from carbohydrates and fat) to promote the anabolism. We distribute carbohydrates pre, per and pos the training and protein pos the training. We also prescribe an intake of multivitamins and multiminerals to reload them micronutrients immediately. We suggest that the athlete keep his regular dietary habits during the trials.

Laboratory Analysis

Venipuncture was made in the antecubital vein by a certified phlebotomist. Samples for biochemical assay were collected in 3 different tubes, which each one

containing coagulation enhancer, splitting gel or heparin (Vacuette, Greiner Bio-One – Germany) and centrifuged (3,000 x g; 10 minutes). All the blood sampling procedures, centrifugation and blood storage were carried out immediately after collection to avoid the loss of volatile compounds. Either serum or plasma was aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later analysis.

Biochemical analyses were done in an automatic analyser (ADVIA® 1200 Chemistry System, Siemens – USA). Alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), creatine phosphokinase muscle-brain fraction (CKMB), lactate dehydrogenase (LDH), γ -glutamyltransferase (γ GT), creatinine, glucose, urate and urea were measured by enzymatic method. The chloride, phosphate, serum iron, transferrin saturation and total iron-binding capacity were quantified by colorimetric method. Sodium and potassium were measured by ion selective electrode method. The creatine phosphokinase (CK) was measured by kinetic method and the α -1-acid glycoprotein (AGP) measured by turbidimetric method. Albumin and total protein were evaluated by electrophoretic method. The HPLC method was used to measure amino acids and the radioimmunoassay method quantify to free testosterone. Both total testosterone and insulin were assessment by electrochemiluminescence. The chemiluminescence method was used to measure erythropoietin, ferritin and myoglobin. Total cholesterol, phospholipids, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), very-low-density lipoprotein (VLDL), total lipids and triacylglycerols (TG) were measured by Charbroll & Charonnat method.

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

Data presentation

To facilitate visualization and comparing some data were normalized to the T1 measurement of each experiment (absolute values were refereed in each figure). The other is absolute values.

Results

Branched chain amino acids

The plasma branched chain amino acids (BCAA) were assessed because they play important roles in protein synthesis and are primarily used as energy source by muscle. Our results showed that during the A experiment isoleucine decreased 23% after the first exercise, without alteration during rest. The amino acid plasma concentration reached 32% of the original level after the second exercise and remained in this value until after the recuperation. The plasma concentration of valine decreased 21% after the first race without changes before the second race in which decreased more 41% (62% total). We were not able to measure a recovery in its concentration after the recuperation. A similar relative curve was measured to leucine. Nutritional and training intervention produced a change in BCAA plasma availability. During B experiment isoleucine decreased 42% during the first exercise and maintains the same concentration until the end of the second exercise. After the recuperation, the amino acid plasma concentration returned almost to the T1 value. The same happened with both valine and leucine concentration in plasma (Figure 1).

Aromatic amino acids

The aromatic amino acids (AAA) are ketoglucogenic and can directly be used by hepatocytes for gluconeogenesis. During A experiment, our results shown that the AAA decreased near of 15% after the first exercise, without change during rest, decreasing more aproximately 40% after the second exercise. We were did not measure an increase in the amino acid plasmatic pool after recuperation. After intervention plasma tyrosine concentration remains constant during the regatta. Both plasma tryptophan and phenylalanine fluctuate almost 15-20% during the

races never dropping from 100%. Their concentration increased to levels ~30% bigger than pre-regatta condition (Figure 2).

Glutamine, Glutamate and Alanine

The measurement of glutamine, glutamate and alanine concentrations in plasma is important due to their role in energy production in metabolism. Both glutamine and alanine plasma concentration fell more than 50% during the regatta, without recovery induced by recuperation. Glutamate in plasma had a more discrete fluctuation. During trial B no changes were observed in plasmatic glutamine and alanine. On the other hand glutamate had an opposite plasma concentration kinetic when compare to trial A (Figure 3).

Metabolic Pathways

Ammonia is a waste product from the metabolism of amino acids and other nitrogenous compounds. In trial A, ammonemia increased 20-30% more in response to exercise than the increase measured during trial B. In both trials exercise promotes approximately a sixfold rise after races returning to initial levels at rest (Figure 4).

Urate is the final catabolite from purines and an indicator of IMP production velocity. In order to indirectly evaluate the contribution from myokinase to ATP production, we measure plasma urate concentration. Urate rose near of 20% more during trial A compared with trial B. During the trial A the metabolite rose up to 35% during the regatta, reaching a 60% increase when compared with the pre-race value. During the regatta at experiment A urea consistently rose ~20%, with a slower increase velocity during recuperation reaching a final rise of 25%. After Intervention the average raise of urea during the whole experiment was 5% (Figure 5).

Neoglucogenesis is one of the destinations of amino acids metabolism. To understand the effect of windsurf exercise amino acid metabolism we measured the changes of both serum glucose and insulin. At trial A the glycemia rose ~70% after the first race, returning decreasing after the 30 minutes rest. In the second race glycemia rose again reaching 43% more than the pre-race values. During experiment B, the plasma glucose did not change in response to the first race and

had a delayed increase compared to trial A. Glucose reached the pre-experiment values in both trials. Insulin decreased in both trials in response to the two races. At the first race of trial A insulin decreased to a 35% concentration when compared with pre-exercise levels. During the second race insulin dropped to 55% compared with T1. Insulin reached the initial concentration after recuperation. During trial B a similar pattern curve was observed with a smaller variation when compared with experiment A. The area under the curve from the first trial was 16,5% compared with the experiment B (Figure 6).

Muscle Stress biomarkers

Creatininemia an indicator of exercise muscle injury increased in both trials in response to the experiment. During trial A basal plasma creatinine concentration was 10% smaller than trial B reaching values ~15-30% greater during the trial. AST increased 15-20% during the first trial with a small fluctuation on the second one. On the other hand ALT plasma concentrations fluctuate with a 5-10% change in both trials. Other hepatic injury biomarkers as ALP, γ GT and AGP did not change during both trials (data not shown).

The classic muscle injury marker CK increased approximately 150% during the first trial. During the second trial basal CK was almost seven fold compared with experiment A, however the plasma concentration of this enzyme showed a 30% fluctuation during trial B. CKMB a much specific muscle injury marker acutely responded to exercise in both trials with a much greater response in trial B.

LDH a well know delayed muscle injury marker increased up to 40%. In the second trial even with bigger basal concentrations in CK and LDH we did observe a much lesser increase in these three markers than the observed in the first experiment (Figure 7, 8).

During the experiment A blood leukocytes rose ~300% after the regatta without alteration after recuperation. The neutrophils count had the biggest contribution to this increase. Lymphocytes in blood increased in response to exercise, decreasing after resting (Figure 9).

Hydro-electrolytic status

During all the time course of both trials no changes either in erythrocytes counts or hematocrit were found (data not shown). Even without signals of dehydration tropical windsurf athletes can lose water and electrolytes due to sweating and low rehydration. To evaluate the athlete blood minerals composition we measured the main inorganic electrolytes. During both trials of experiments we did not measure changes in either sodium or chlorine (data not shown). In the first trial phosphate increased 50-70% in response to exercise, dropping down after rest, without reaching the basal level after recuperation. This effect was softened by the intervention. Kalemia decreases during the first trial to levels up to 3.3 mmol/L with a slow recuperation do not reaching basal levels during experimental time. These changes were abolished by the intervention (Figure 10).

Discussion

Windsurfing competition mixes the needs of physical preparation, tactical and strategy decisions. Due to the needs of short time evaluation by the Central Nervous System (CNS) it is important to diminish metabolites that can be deleterious to short time either judgment or cognition. In this way a metabolic evaluation can lead to interventions that decrease exercise induced stress that can conduct to a better physical and mental performance. Here we describe a series of metabolic evaluations performed in a world class windsurf athlete ranked among the top ten athletes on the official ISAF ranking list.

In fact, the evaluation of blood metabolites and biomarkers can give important information about exercise intensity and training adaptation. Exercise intensity can be evaluated by the increase in the plasmatic levels of CK, CKMB and LDH (Shave et al., 2002; Rodrigues et al., 2010; Matsumoto et al., 2009). It is clearly perceived that acute metabolic stress was much greater in trial A than in trial B. In addition basal levels of both CK and LDH are greater in trial B. These results suggest that an adaption is occurring due to exercise induced muscle injury during training, resulting in a muscle adjustment to exercise linked stress. In fact during our studies both AST plasma levels were much more pronounced than ALT. It has been show previously by our lab that AST and ALT biomarkers are

also related with hepatic injury, can be used to understand muscle stress when compared with the augment of γ GT and alkaline phosphatase (Bassini-Cameron et al., 2007).

White blood cells release in response to exercise is a well-documented fact and neutrophils release is linked to exercise intensity and duration (Bessa et al., 2008). This effect seems to be regulated by differential cytokines release (Li and Gleeson, 2004; Giraldo et al, 2009). In our study leukocytes rise almost 300% in response to trial A, an effect mostly due to neutrophils increase (> 400%). After intervention this response decreased to approximately 200 and 250% respectively. In both leukocytes and neutrophils rises, we did not measure their restore to basal levels.

White blood cells (WBC) response to exercise seems to depend on both cytokines and myokines regulation (Pedersen et al., 2007; Mathur et al., 2008; Haugen et al., 2010). In this study we measured an acute increase of lymphocytes in response to each exercise bout, returning to basal level after exercise stress. Metabolic stress is correlated to WBC response to exercise. In fact the increase in carbohydrate availability and cortisol response have been used as a link in integrated WBC and metabolic pathways (Peake et al., 2004). Some of our results could suggest an increase in metabolic reserves after intervention, measured by the way of decrease in neoglucogenesis.

Alanine, glutamine and BCAA in blood were severely depleted during the first trial. In fact even after recuperation their levels remained low. BCAA have different oxidation rates in liver and muscle (for a review see Harper et al., 1984). Isoleucine seemed to be a little more affected than valine and leucine. Which can be explained by the fact of isoleucine can be a precursor of glutamine and alanine the most important neoglycogenic amino acids. Similarly aromatic amino acids (AAA) that are generally metabolized in hepatocytes were less consumed during the first bout of trial A, decreasing fast after the second bout of exercise. Phenylalanine and BCAA were similarly consumed in both experiments, with a different pattern regarding recuperation. However the plasma concentration of the Tyr and Trp did not change after the intervention. These data fit with the current understanding of interorgan metabolism of branched-chain amino acids, glutamine and arginine proposed by Wu's group (Li et al., 2007; Wu, 2009). In fact it is

reasonable to suppose that since the amino acids concentration in blood will affect its ratio in brain (Crowell et al., 1990), it is very important to establish training goal that lead to keep plasmatic amino acids level.

At the first race of trial A even with an ~70% increase in glucemia, insulin decreased to a 35% concentration when compared with pre-exercise levels. That is a well-described metabolic effect during exercise in the presence of catecholamines (Bangsbo et al., 2007; Kraemer and Ratamess, 2005). In fact in the first trial glucose rises during exercise in a typical neoglucogenic response. After intervention BCAA still being consumed during exercise reacting better to the recuperation step, in addition alanine, glutamine and AAA plasma concentration was almost unaffected. These data suggest that in the first trial amino acids were been used by muscle as an energetic source and by liver to produce glucose. A similar effect showing that carbohydrate availability and insulin secretion is attached to training conditions was recently reported (Mikulski et al., 2010). These data reinforce the idea of a bigger metabolic stress in the first trial compared with the second.

A diversity of studies showed that different diet adequacy and supplementation could decrease ammonia production in response to exercise (Carvalho-Peixoto et al., 2008; Bassini-Cameron et al., 2008). The ammonemia decrease is mainly due to the decrease of myokinase demands due to an increase in ATP production from other metabolic sources (Almeida et al., 2010). Due to the connection between blood ammonia and cystathionine- β -synthase (CBS) activity, we tried to understand the intervention in nitrogen excretion. In both trials, ammonia increased after exercise bouts returning to basal levels during rest and recuperation. To reinforce this analyses we were able to show that urea increased in the first trial, with a small increase in the second one. Urate levels also shown a smaller increase in trial B, compared with trial A. Since that is the final metabolite from ammonia and urate is the final metabolite to purine metabolism, it is reasonable to propose that the intervention promote a metabolic adaptation that decrease the amount of ATP generated by myokinase and by the use of amino acids.

In this study we showed the metabolic adaptation to an elite athlete world champion windsurfer that is ranked among the top ten athletes on the official ISAF

ranking list. Here we demonstrate the metabolic response of exercise in two training moments: the first one when the athlete was using the usual training and dietary protocol and a second one after the careful analysis of his diet and in field metabolic changes measured in a simulated competition. Due to the uniqueness of this experiment it is feasible to understand our careful in extrapolate these results to other windsurfers, but lead us the opportunity to comprehend how the metabolical adaptation in this athlete. We also show the importance of an in field metabolical analysis to the understanding and supporting of training in elite athletes.

References

Almeida TS, Cabral BJ. Ab initio approach to the electronic properties of sodium-ammonia clusters: comparison with ammonia clusters. *J Chem Phys.* 2010 Mar 7;132(9):094307.

Ament W, Verkerke GJ. Exercise and fatigue. *Sports Med.* 2009;39(5):389-422.

Bangsbo J, Iaia FM, Krstrup P. Metabolic response and fatigue in soccer. *Int J Sports Physiol Perform.* 2007 Jun;2(2):111-27.

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

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

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

Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, Gandra PG, Nunes LS, Bassini-Cameron A, Werneck-de-Castro JP, de Macedo DV, Cameron LC. High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med.* 2008 Nov;42(11):589-93.

Blomstrand E, Celsing F, Newsholme EA. Changes in plasma concentrations of aromatic and branched-chain amino acids during sustained exercise in man and their possible role in fatigue. *Acta Physiol Scand.* 1988 May;133(1):115-21.

Burd NA, Tang JE, Moore DR, Phillips SM. Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J Appl Physiol.* 2009 May;106(5):1692-701.

Campillo P, Leszczynski B, Marthe C, Hespel JM. Electromyographic analysis on a windsurfing simulator. *J Sports Sci Med.* 2007 Jun;(6):135-141.

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.

Castagna O, Brisswalter J, Lacour JR, Vogiatzis I. Physiological demands of different sailing techniques of the new Olympic windsurfing class. *Eur J Appl Physiol.* 2008 Dec;104(6):1061-7.

Castagna O, Vaz Pardal C, Brisswalter J. The assessment of energy demand in the new Olympic windsurf board: Neilpryde RS:X. *Eur J Appl Physiol.* 2007 May;100(2):247-52.

Cauli O, Rodrigo R, Boix J, Piedrafita B, Agusti A, Felipe V. Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 Sep;295(3):G503-11.

Chamari K, Moussa-Chamari I, Galy O, Chaouachi M, Koubaa D, Hassen CB, Hue O. Correlation between heart rate and performance during Olympic windsurfing competition. *Eur J Appl Physiol.* 2003 May;89(3-4):387-92.

Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 2007;37(9):737-63.

Crowell PL, Block KP, Repa JJ, Torres N, Nawabi MD, Buse MG, Harper AE. High branched-chain alpha-keto acid intake, branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity, and plasma and brain amino acid and plasma keto acid concentrations in rats. *Am J Clin Nutr.* 1990 Aug;52(2):313-9.

Dyson R, Buchanan M, Hale T. Incidence of sports injuries in elite competitive and recreational windsurfers. *Br J Sports Med.* 2006 Apr;40(4):346-50.

Flueck M, Eilers W. Training modalities: impact on endurance capacity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Mar;39(1):183-200.

Giraldo E, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. Exercise intensity-dependent changes in the inflammatory response in sedentary women: role of neuroendocrine parameters in the neutrophil phagocytic process and the pro-/anti-inflammatory cytokine balance. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(4):237-44.

Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1984;4:409-54.

Haugen F, Norheim F, Lian H, Wensaas AJ, Dueland S, Berg O, Funderud A, Skalhegg BS, Raastad T, Drevon CA. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Apr;298(4):C807-16.

Hetsroni I, Mann G, Ayalon M, Frankl U, Nyska M. Extensor digitorum longus tendonitis in windsurfing due to footstrap fixation. *Clin J Sport Med.* 2006 Jan;16(1):74-5.

Javierre C, Segura R, Ventura JL, Suárez A, Rosés JM. L-tryptophan supplementation can decrease fatigue perception during an aerobic exercise with supramaximal intercalated anaerobic bouts in young healthy men. *Int J Neurosci*. 2010 May;120(5):319-27.

Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med*. 2005;35(4):339-61.

Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr*. 2007 Aug;98(2):237-52.

Li TL, Gleeson M. The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling on leukocyte redistribution, neutrophil degranulation, IL-6, and plasma stress hormone responses. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2004 Oct;14(5):501-16.

Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:109502.

Matsumoto K, Koba T, Hamada K, Sakurai M, Higuchi T, Miyata H. Branched-chain amino acid supplementation attenuates muscle soreness, muscle damage and inflammation during an intensive training program. *J Sports Med Phys Fitness*. 2009 Dec;49(4):424-31.

McCormick DP, Davis AL. Injuries in sailboard enthusiasts. *Br J Sports Med*. 1988 Sep;22(3):95-7.

Melis F, Crisafulli A, Rocchitta A, Tocco F, Concu A. Does reduction of blood prolactin levels reveal the activation of central dopaminergic pathways conveying reward in top athletes? *Med Hypotheses*. 2003 Jul;61(1):133-5.

Mikulski T, Ziemba A, Nazar K. Metabolic and hormonal responses to body carbohydrate store depletion followed by high or low carbohydrate meal in

sedentary and physically active subjects. *J Physiol Pharmacol.* 2010 Apr;61(2):193-200.

Nader GA. Concurrent strength and endurance training: from molecules to man. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Nov;38(11):1965-70.

Nathanson AT, Fischer EG, Mello MJ, Baird J. Injury and illness at the Newport-Bermuda race 1998- 2006. *Wilderness Environ Med.* 2008 Summer;19(2):129-32.

Nathanson AT, Reinert SE. Windsurfing injuries: results of a paper- and Internet-based survey. *Wilderness Environ Med.* 1999 Winter;10(4):218-25.

Neville V, Folland JP. The epidemiology and aetiology of injuries in sailing. *Sports Med.* 2009;39(2):129-45.

Nickel C, Zernial O, Musahl V, Hansen U, Zantop T, Petersen W. A prospective study of kitesurfing injuries. *Am J Sports Med.* 2004 Jun;32(4):921-7.

Orchard J, James T, Alcott E, Carter S, Farhart P. Injuries in Australian cricket at first class level 1995/1996 to 2000/2001. *Br J Sports Med.* 2002 Aug;36(4):270-5.

Peake J, Wilson G, Mackinnon L, Coombes JS. Carbohydrate supplementation and alterations in neutrophils, and plasma cortisol and myoglobin concentration after intense exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2005 Mar;93(5-6):672-8.

Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol.* 2007 Sep;103(3):1093-8.

Pérez-Turpin JA, Cortell-Tormo JM, Suárez-Llorca C, Andreu-Cabrera E, Llana-Belloch S, Pérez-Soriano P. Relationship between anthropometric parameters, physiological responses, routes and competition results in formula windsurfing. *Acta Kinesiol Univ Tartuensis.* 2009. (14):95-110.

Petersen W, Rau J, Hansen U, Zantop T, Stein V. Mechanisms and prevention of windsurfing injuries. *Sportverletz Sportschaden*. 2003 Sep;17(3):118-22.

Rasmussen BB, Richter EA. The balancing act between the cellular processes of protein synthesis and breakdown: exercise as a model to understand the molecular mechanisms regulating muscle mass. *J Appl Physiol*. 2009 Apr;106(4):1365-6.

Rodrigues BM, Dantas E, de Salles BF, Miranda H, Koch AJ, Willardson JM, Simão R. Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Responses After Upper-Body Resistance Exercise With Different Rest Intervals. *J Strength Cond Res*. 2010 Jun;24(6):1657-1662.

Rose AJ, Richter EA. Regulatory mechanisms of skeletal muscle protein turnover during exercise. *J Appl Physiol*. 2009 May;106(5):1702-11.

Sedlaczek P. History, cultural context and terminology of Windsurfing. *Studies Phys Cult Tour*. 2009;16(1):115-23.

Segura R, Ventura JL. Effect of L-tryptophan supplementation on exercise performance. *Int J Sports Med*. 1988 Oct;9(5):301-5.

Shave R, Dawson E, Whyte G, George K, Ball D, Collinson P, Gaze D. The cardiospecificity of the third-generation cTnT assay after exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc*. 2002 Apr;34(4):651-4.

Vogiatzis I, De Vito G, Rodio A, Madaffari A, Marchetti M. The physiological demands of sail pumping in Olympic level windsurfers. *Eur J Appl Physiol*. 2002 Mar;86(5):450-4.

Westerterp KR. Physical activity, food intake, and body weight regulation: insights from doubly labeled water studies. *Nutr Rev*. 2010 Mar;68(3):148-54.

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

Williams MH. Facts and fallacies of purported ergogenic amino acid supplements. *Clin Sports Med.* 1999 Jul;18(3):633-49.

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

Figure Captions

Figure 1. Branched chain amino acids during the trial. The isoleucine, valine and leucine are shown in the two experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 2. Aromatics amino acids during the trial. The phenylalanine, tyrosine and tryptophan are shown in the two experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 3. Glutamine-Glutamate-Alanine cycle during the trial. The glutamine, glutamate and alanine are shown in the two experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 4. Ammonia. The ammonia is shown in the two experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 5. Urea and Urate. The urea and urate are shown in the two experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 6. Insulin and Glucose. The insulin and glucose are shown in the two experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 7. Inflammation biomarkers. The creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) are shown in the experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 8. Biomarkers of muscle damage. The creatine phosphokinase (CK), creatine phosphokinase muscle-brain fraction (CKMB) and latic acid dehydrogenase (LDH) are shown in the experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 9. White blood cells. The leukocytes, neutrophils and lymphocytes are shown in the experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figure 10. Minerals. The phosphate (P) and potassium (K) are shown in the experiments (A and B). The values were normalized (%) to T1 measurement. The graphics legends are presented the T1 absolute values. T1: pre-regatta 1; T2: post-regatta 1 and pre-rest; T3: post-rest and pre-regatta 2; T4: post-regatta 2 and pre-recuperation; T5: post-recuperation.

Figures

Figure 1. Branched chain amino acids during the trial.

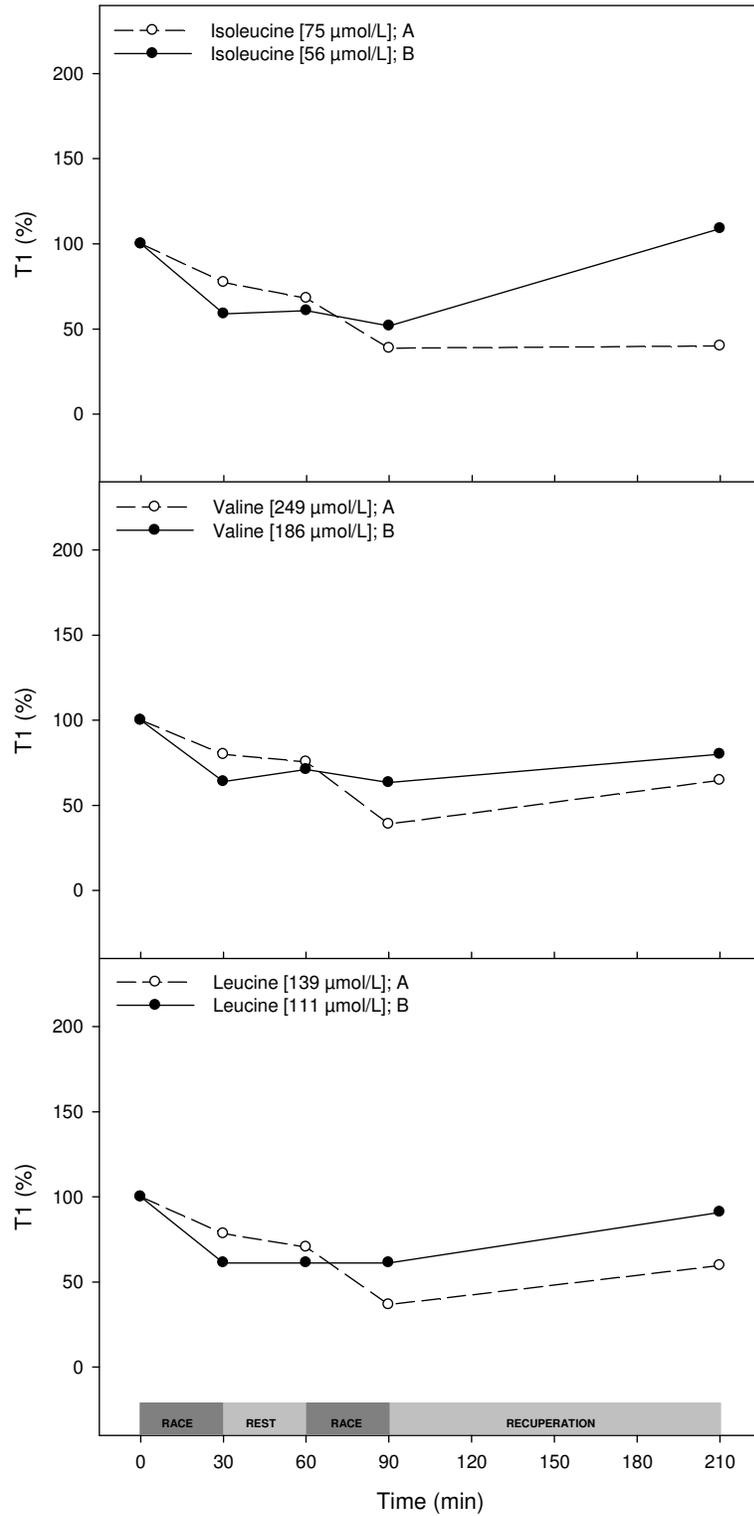


Figure 2. Aromatics amino acids during the trial.

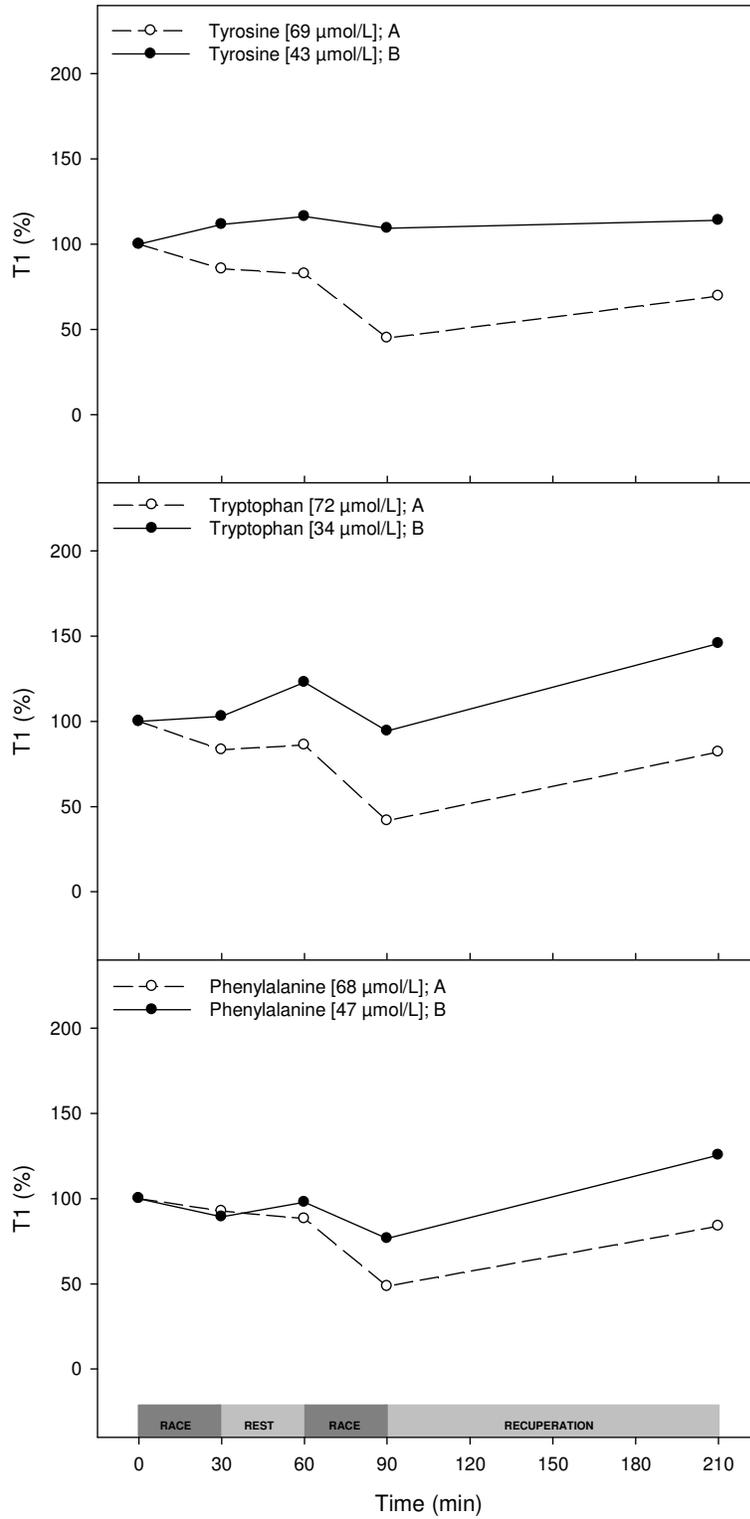


Figure 3. Glutamine-Glutamate-Alanine cycle during the trial.

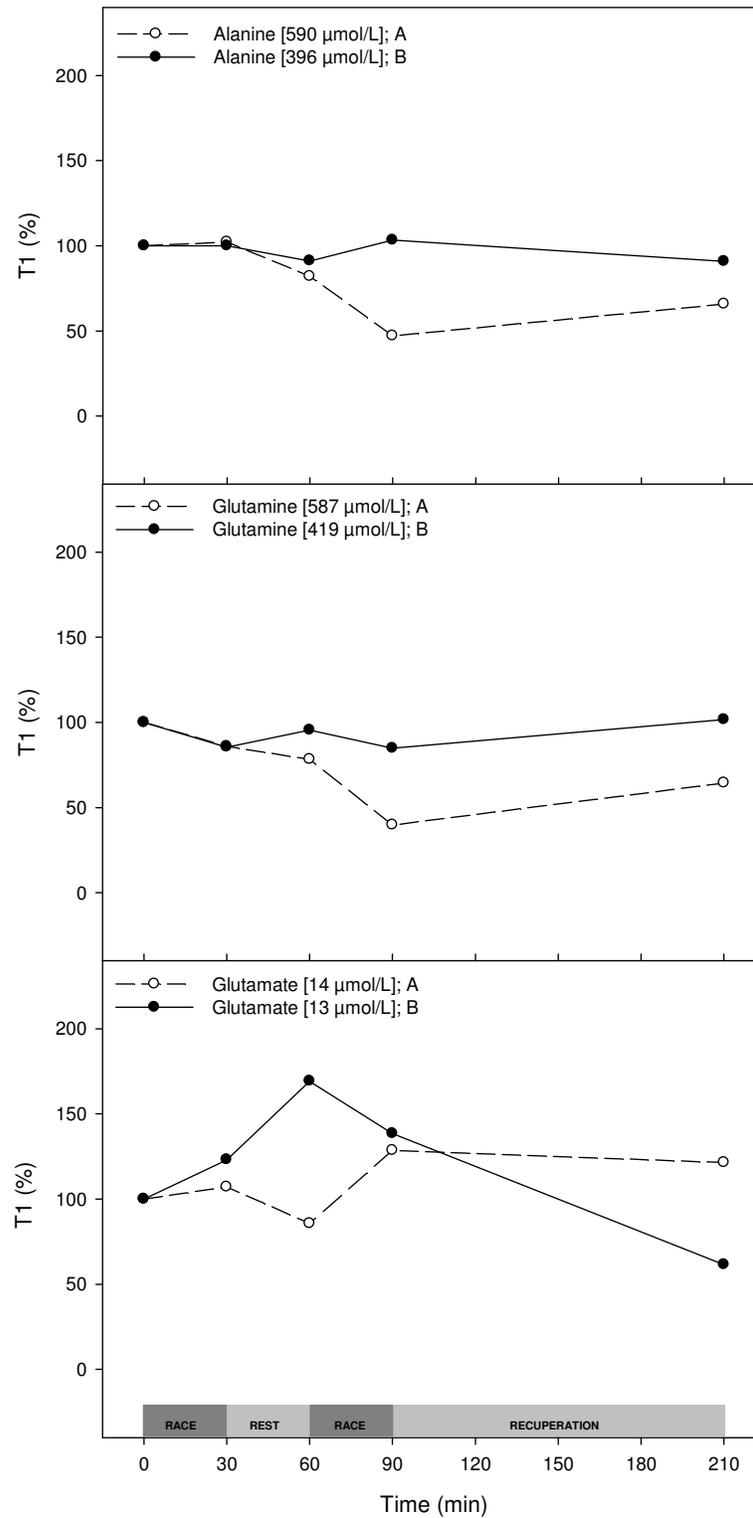


Figure 4. Ammonia.

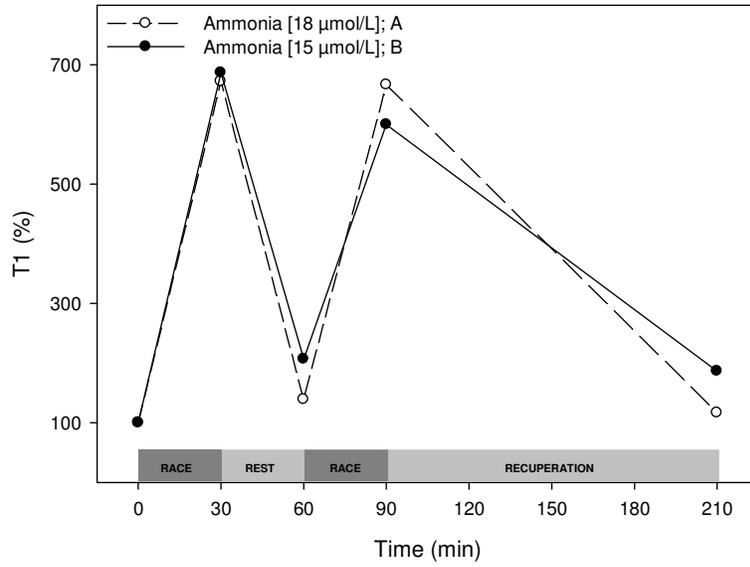


Figure 5. Urea and Urate.

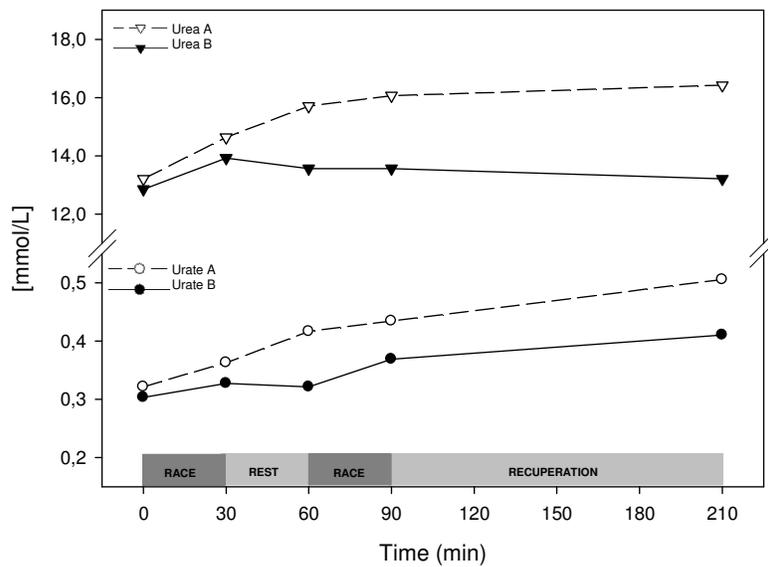


Figure 6. Insulin and Glucose.

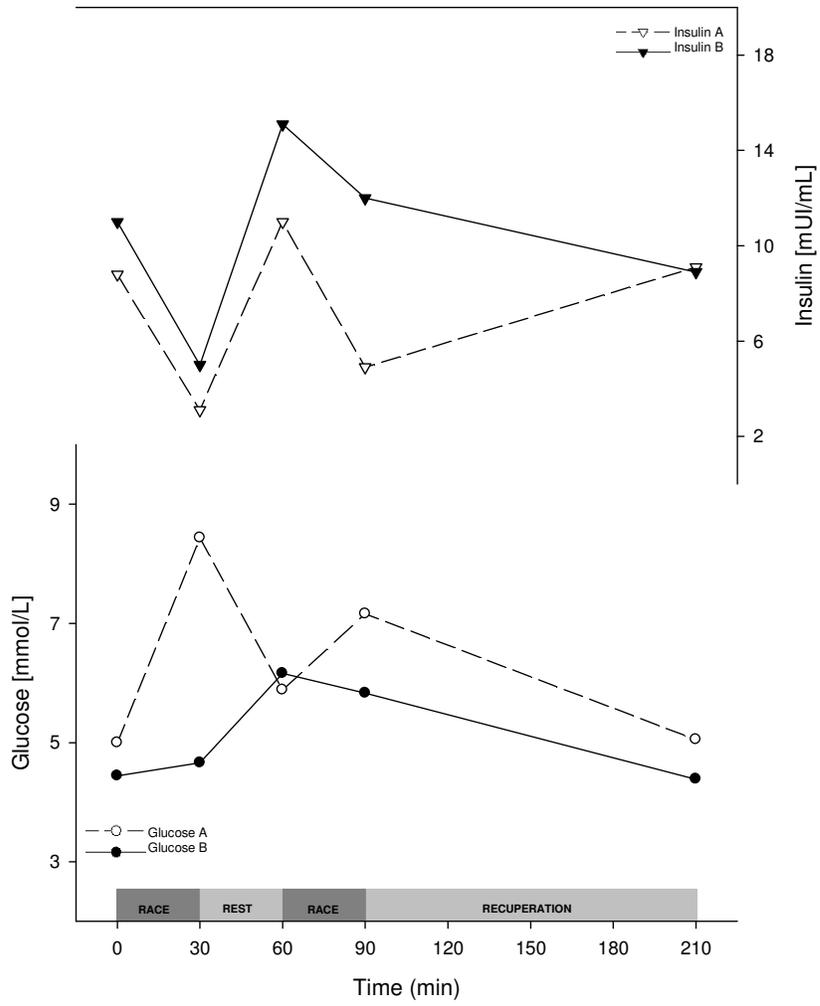


Figure 7. Inflammation biomarkers.

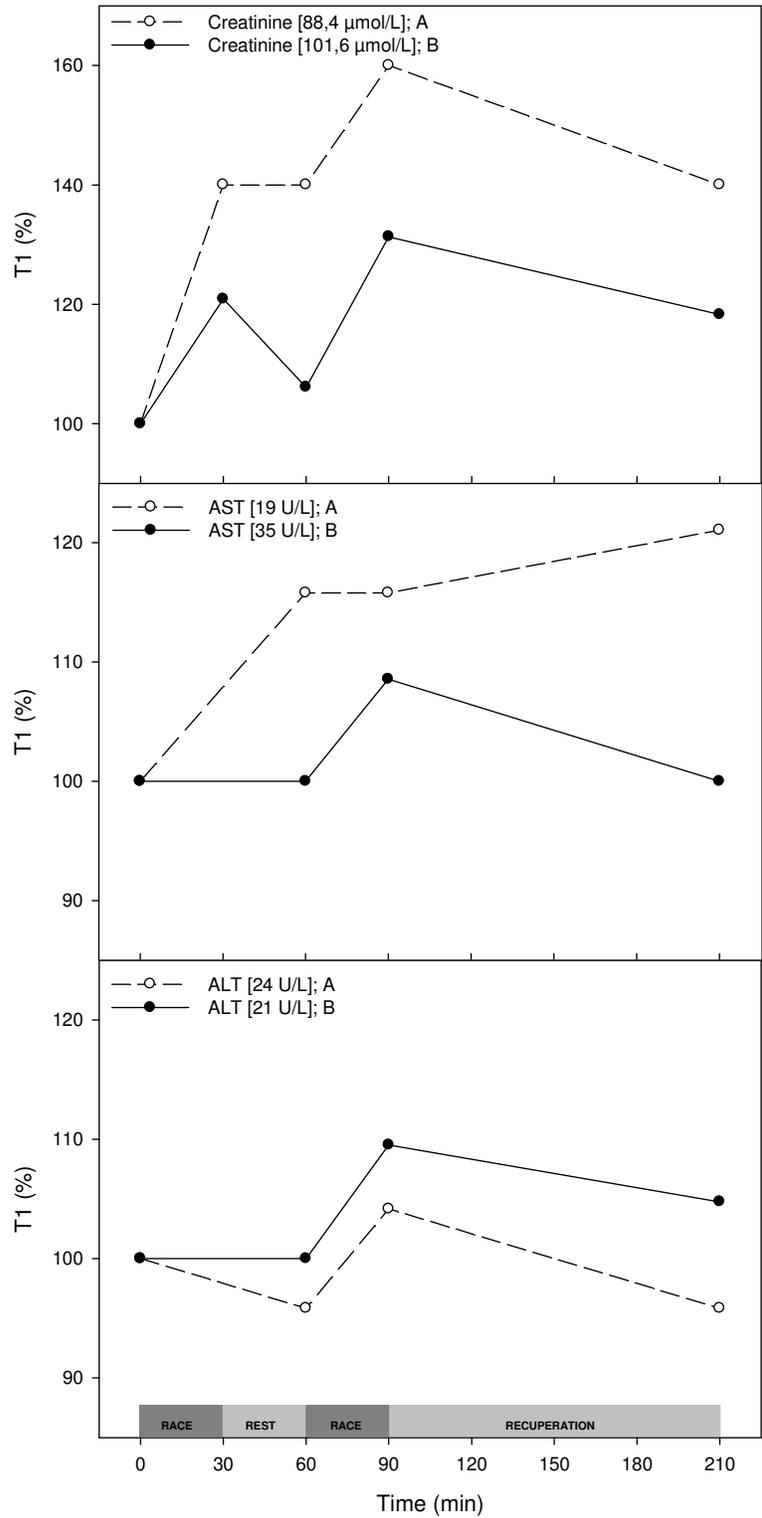


Figure 8. Biomarkers of muscle damage.

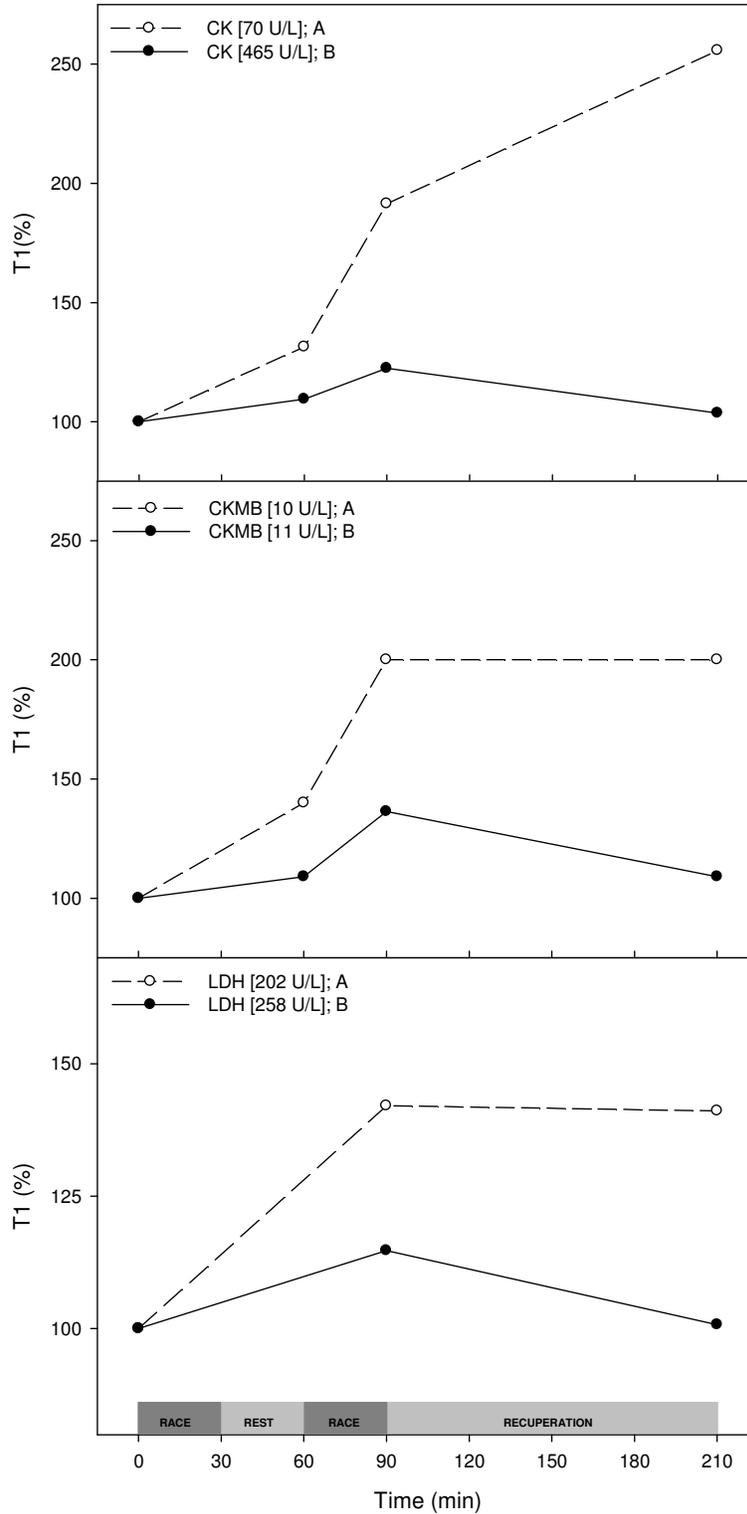


Figure 9. White blood cells.

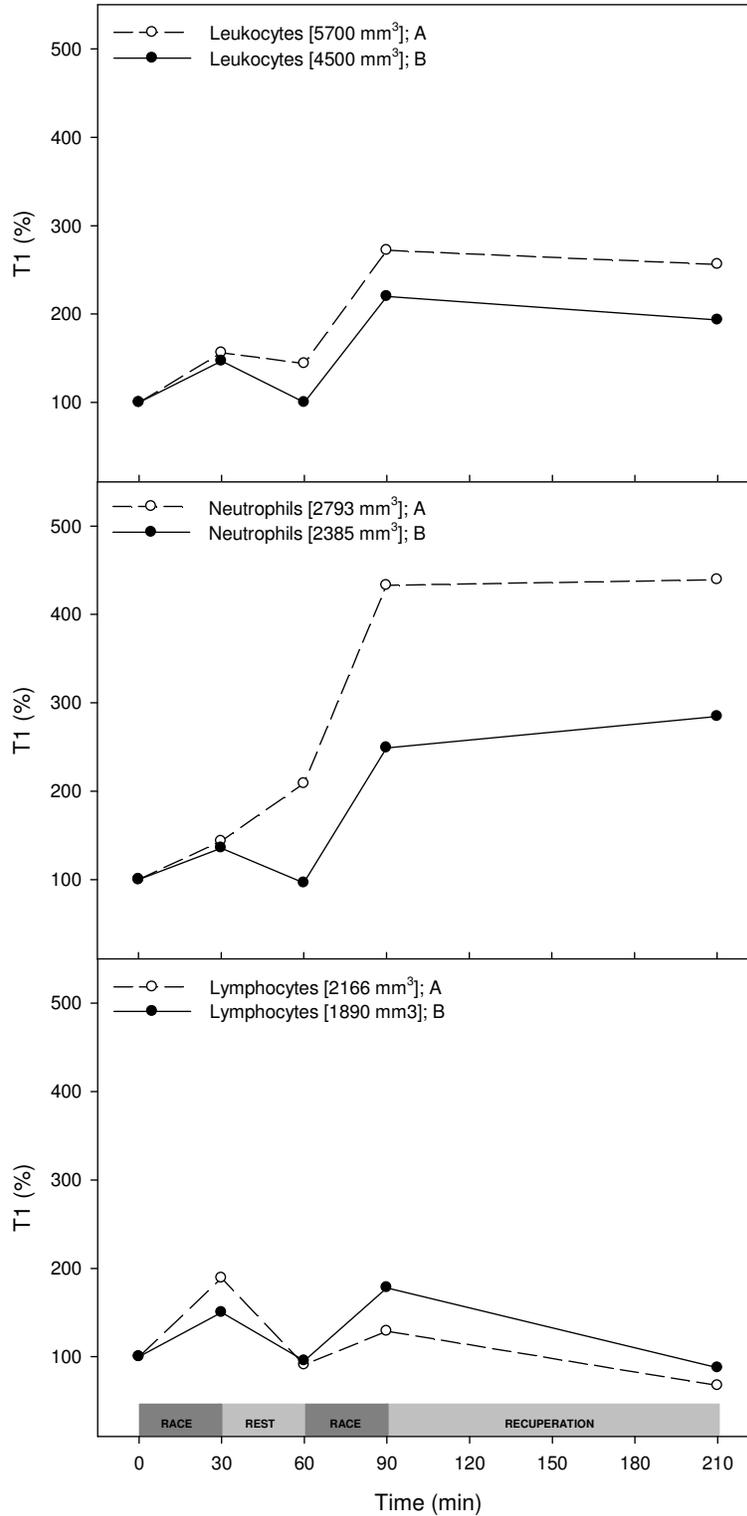
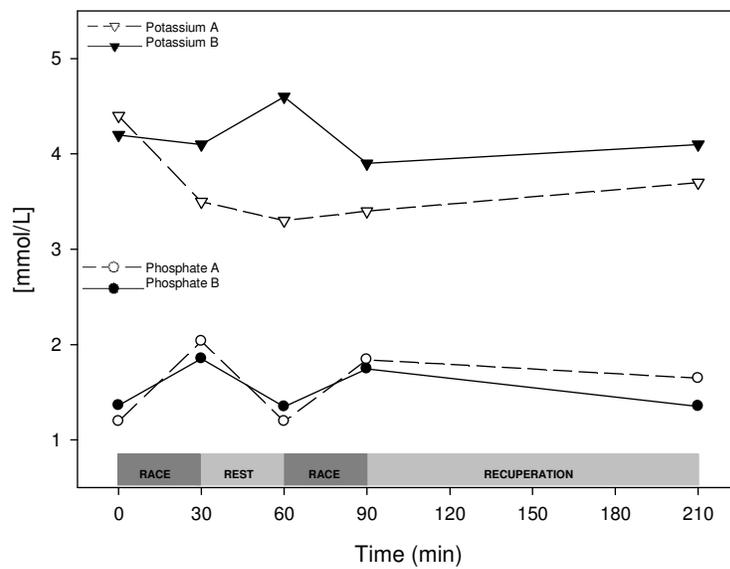


Figure 10. Minerals.



Capítulo III

Resultados complementares

I. Comitê de Ética em Pesquisa

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro sob parecer 117/2007 obedecendo aos preceitos da resolução do Ministério da Saúde 196 de 1996 (Anexo 1).

II. Resultados complementares

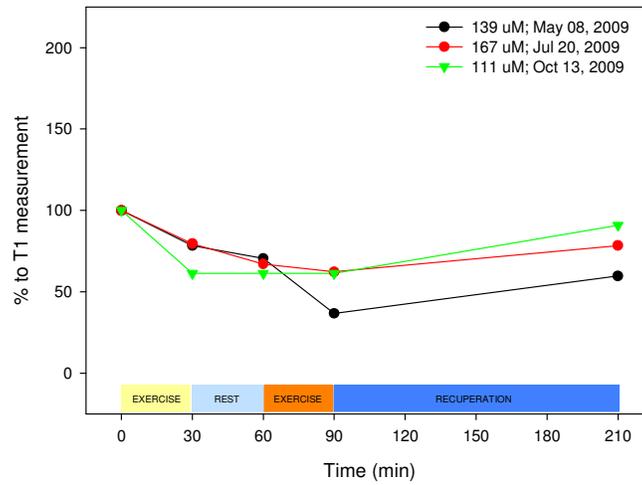
Como descrito no Capítulo I e II, o atleta foi avaliado metabolicamente em três experimentos. Cada experimento com cinco tempos de coleta cada (T1 a T5), e com intervalo de 2 meses entre os experimentos, sendo o primeiro experimento em 08 de Maio de 2009 (May 08, 2009), o segundo experimento em 20 de julho de 2009 (Jul 20, 2009) e o terceiro e último experimento em 13 de outubro de 2009 (Oct 13, 2009). As análises metabólicas do atleta foram avaliadas somente nos cinco tempos do terceiro experimento, devido que somente nesse experimento foi que surgiu a proposta e oportunidade da tecnologia da espectrometria de massas, mais especificamente, da utilização do GCMS para avaliar as mudanças metabólicas de atletas de elite em diferentes situações. Assim, segue abaixo os demais resultados das avaliações bioquímicas e hematológicas para o conhecimento das mudanças ocorridas das intervenções (nutricional e do treinamento) durante os experimentos, e os resultados obtidos pelo GCMS, os quais ainda se encontram em fase de tratamento e estudo.

II.1. Resultados dos exames laboratoriais

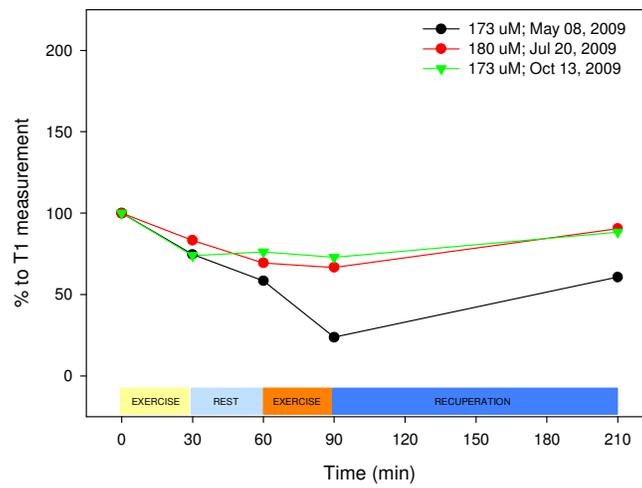
Os resultados seguem a mesma sequência do desenho experimental do artigo, porém agora com os resultados dos três experimentos, pois no artigo, abordamos somente o primeiro experimento (avaliação inicial do atleta) e o terceiro experimento (avaliação final das intervenções).

Os gráficos dos resultados dos aminoácidos são:

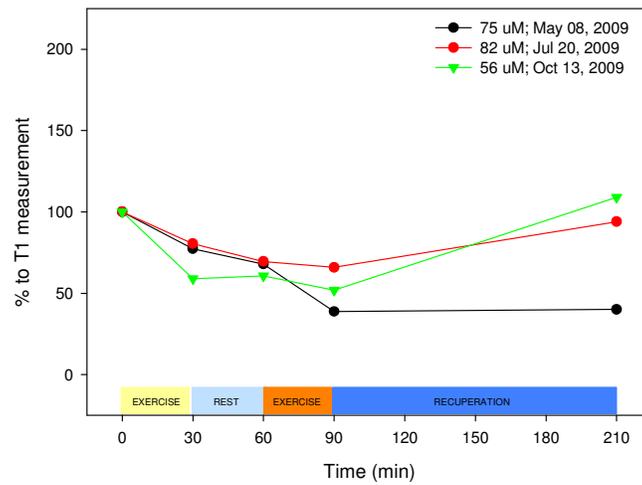
Ketogenic Amino Acid: LEUCINE



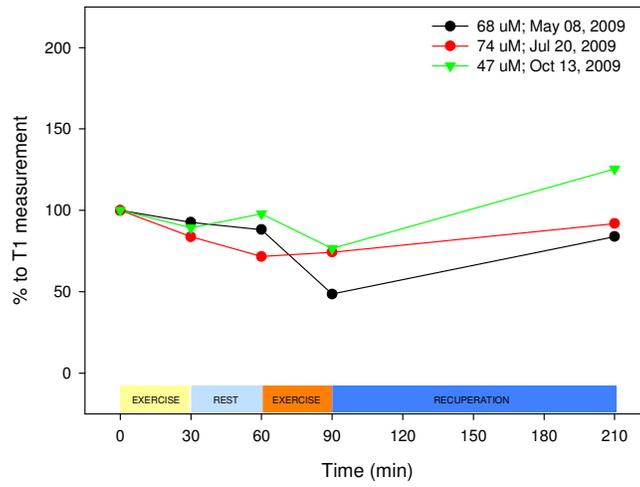
Ketogenic Amino Acid: LYSINE



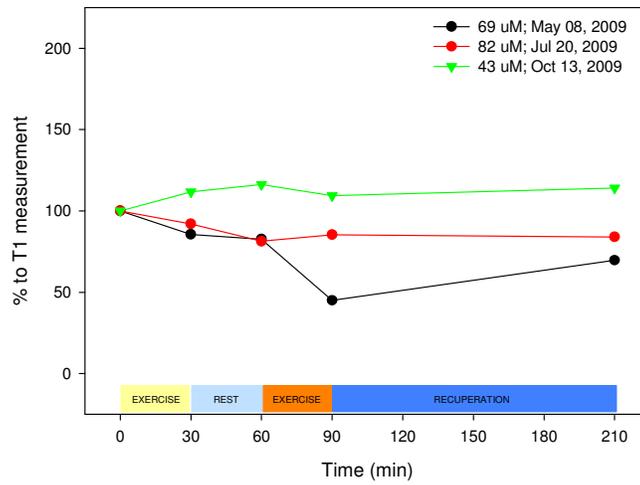
Ketoglycogenic Amino Acid: ISOLEUCINE



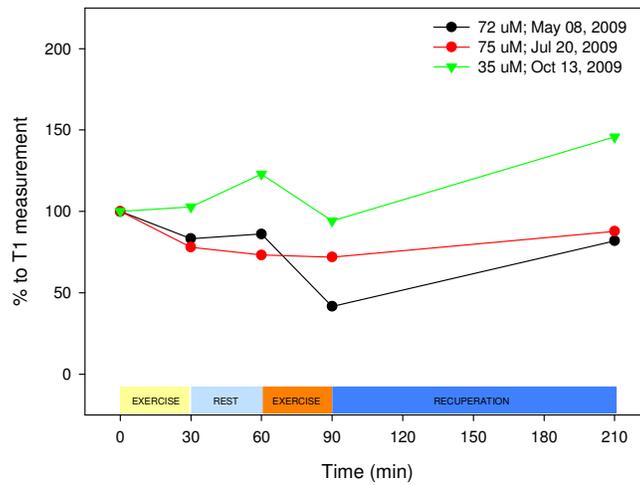
Ketoglycogenic Amino Acid: PHENYLALANINE



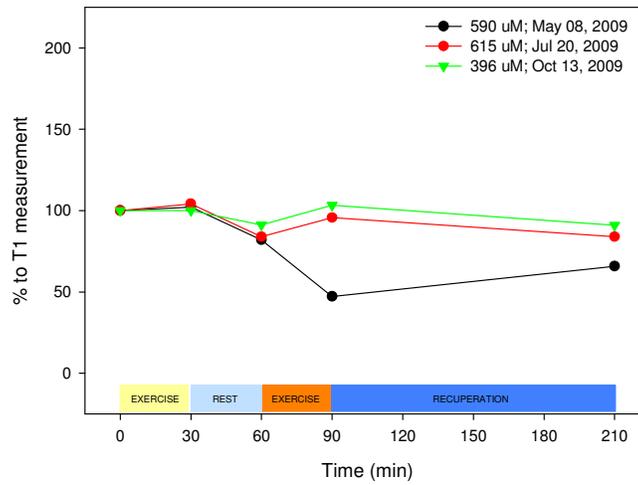
Ketoglycogenic Amino Acid: TYROSINE



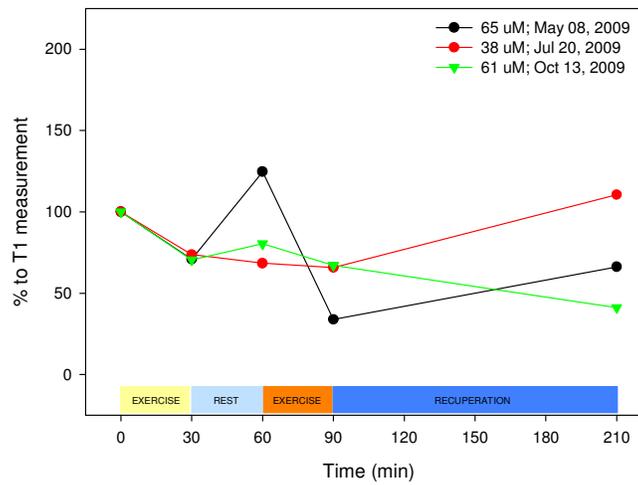
Ketoglycogenic Amino Acid: TRYPTOPHAN



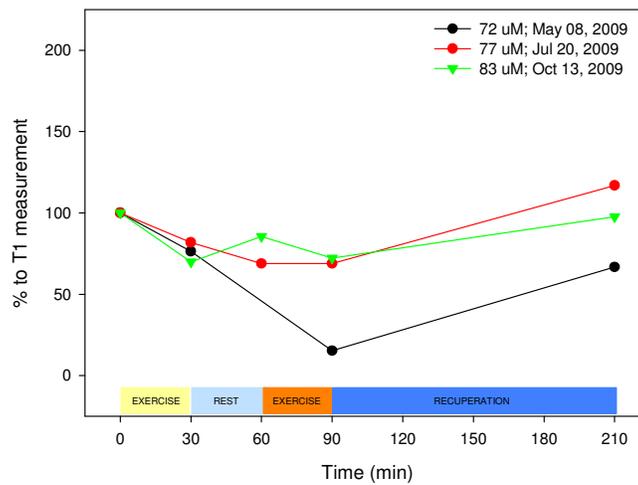
Glycogenic Amino Acid: ALANINE



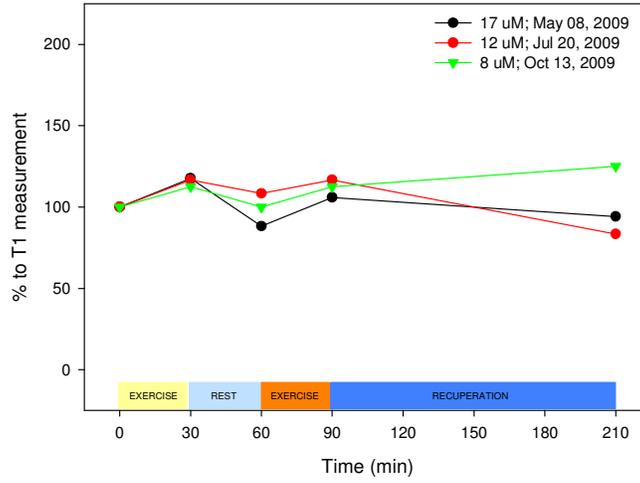
Glycogenic Amino Acid: ASPARAGINE



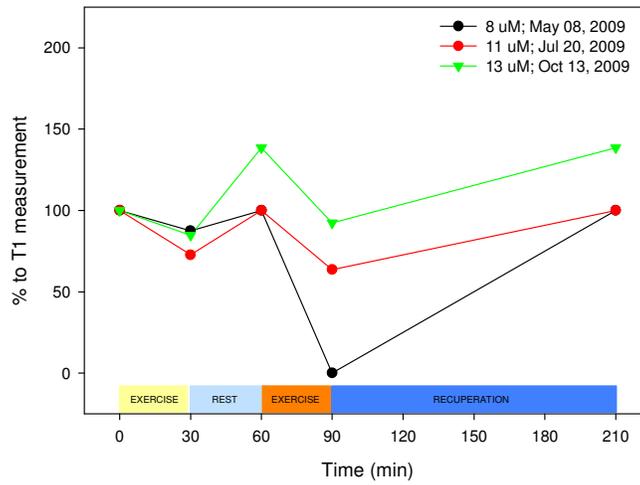
Glycogenic Amino Acid: ARGININE



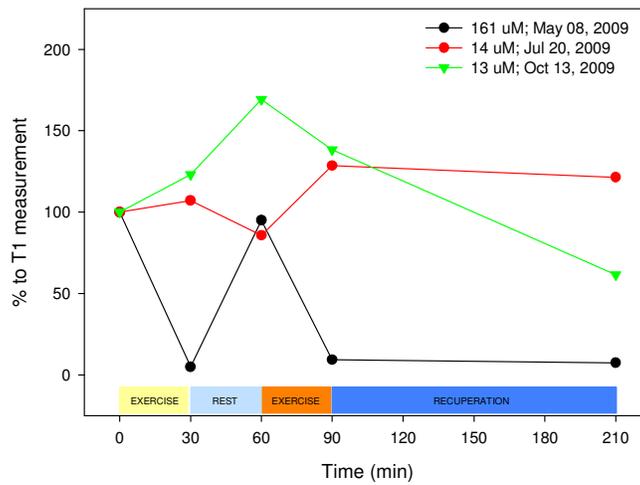
Glycogenic Amino Acid: ASPARTATE



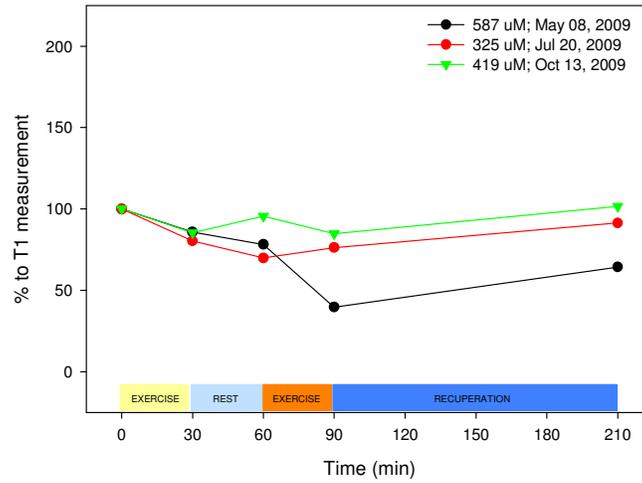
Glycogenic Amino Acid: CYSTEINE



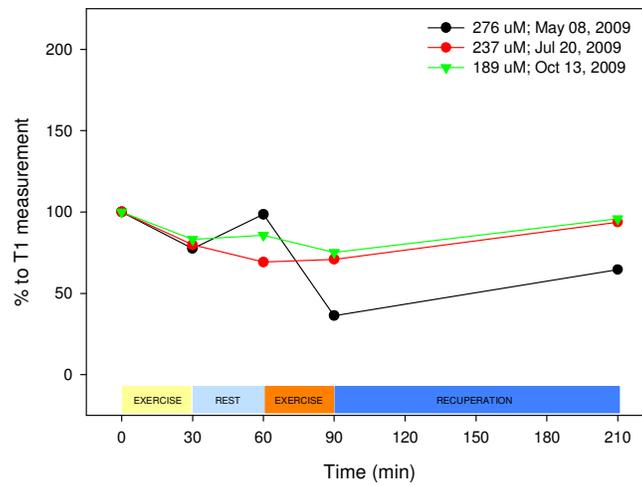
Glycogenic Amino Acid: GLUTAMATE



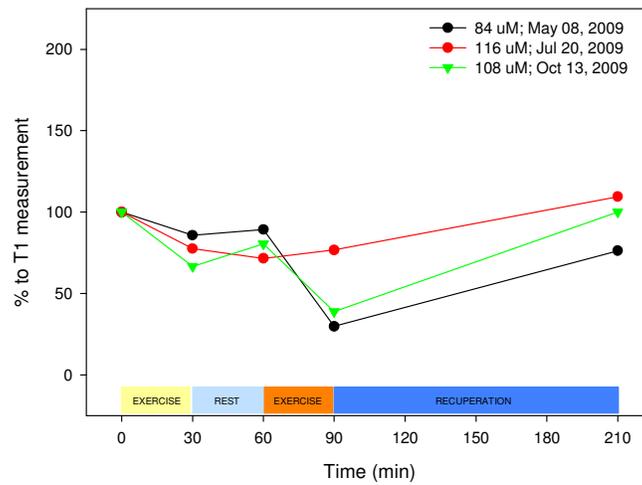
Glycogenic Amino Acid: GLUTAMINE



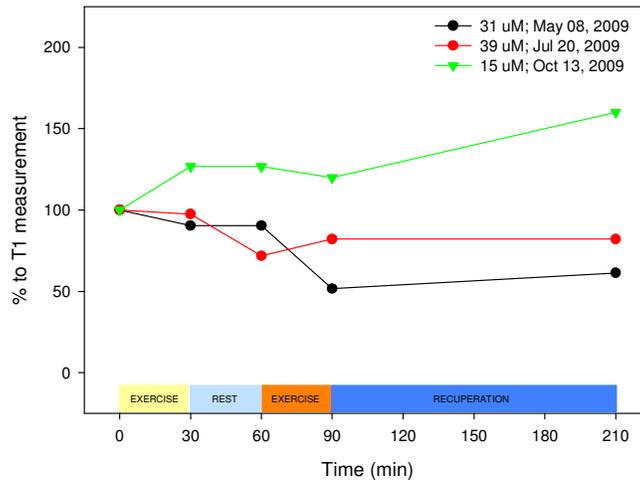
Glycogenic Amino Acid: GLYCINE



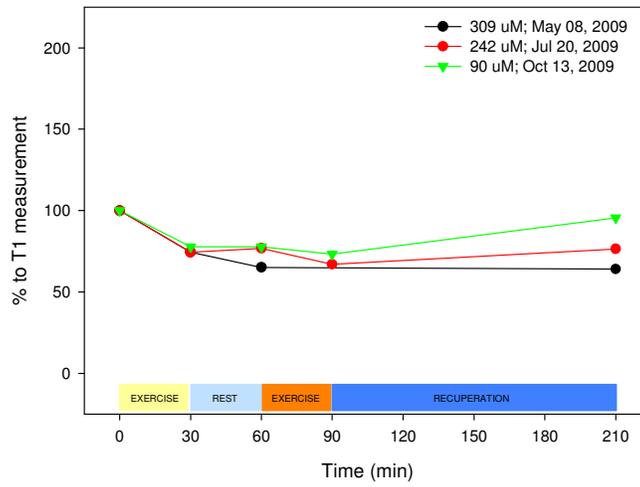
Glycogenic Amino Acid: HISTIDINE



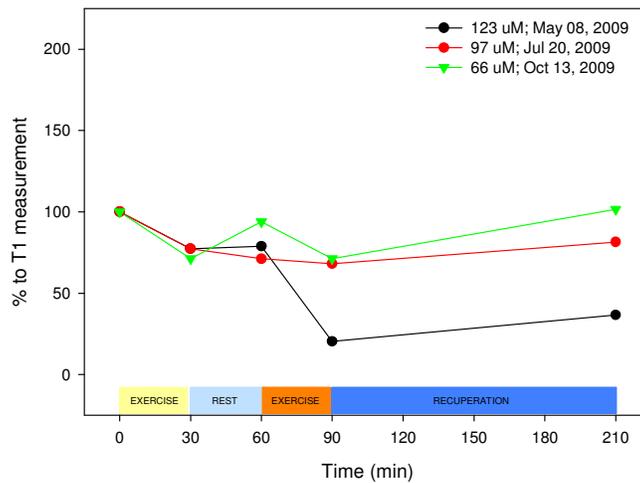
Glycogenic Amino Acid: METHIONINE



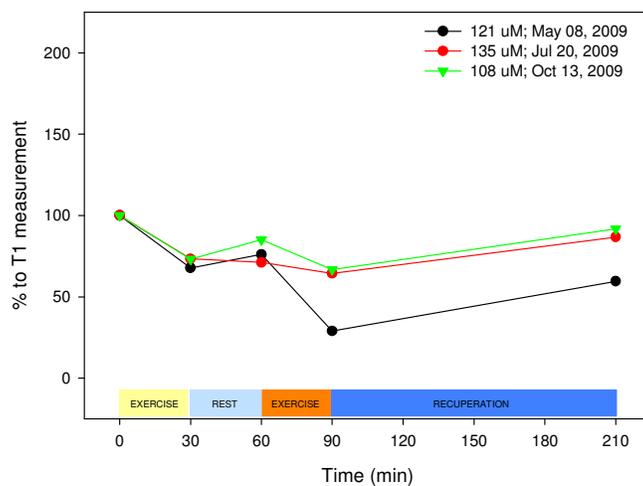
Glycogenic Amino Acid: PROLINE



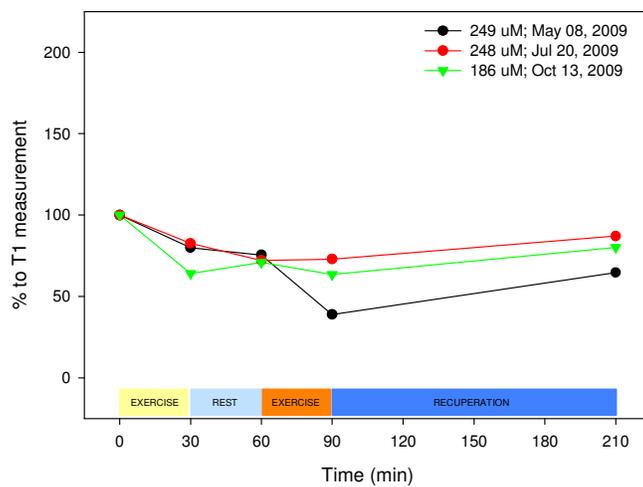
Glycogenic Amino Acid: SERINE



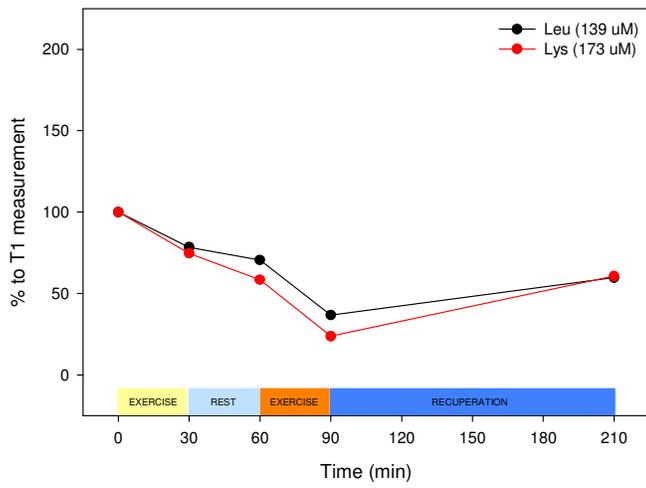
Glycogenic Amino Acid: THREONINE



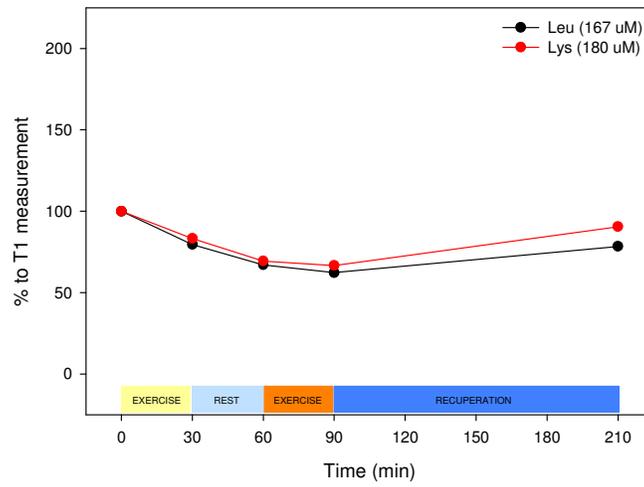
Glycogenic Amino Acid: VALINE



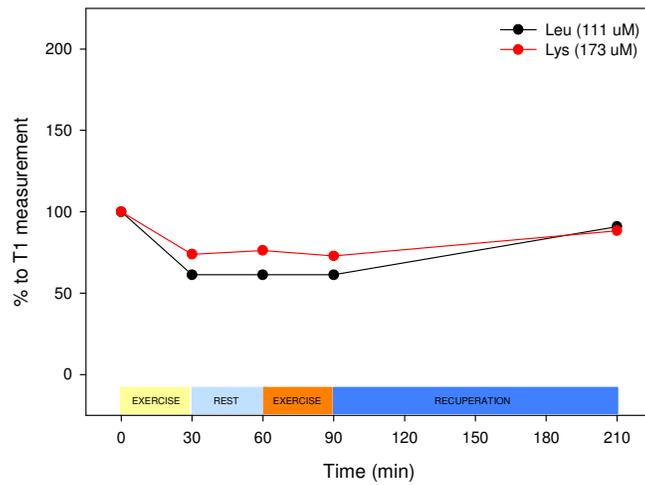
Ketogenic Amino Acids - May 08 2009



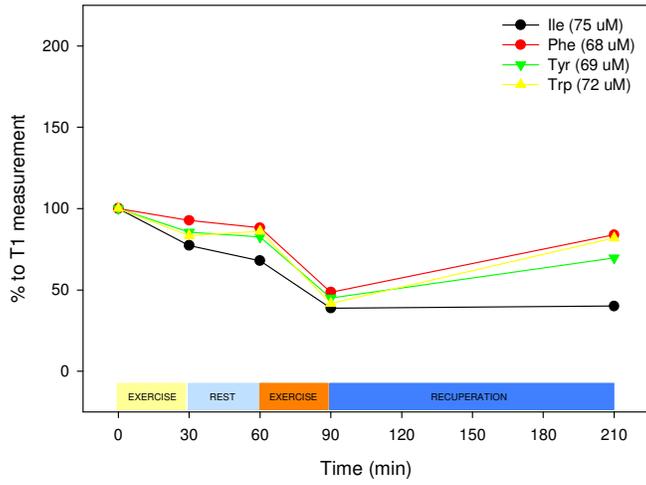
Ketogenic Amino Acids - Jul 20 2009



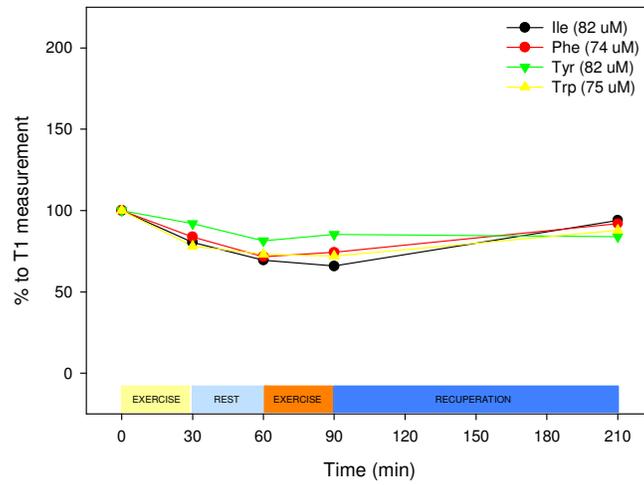
Ketogenic Amino Acids - Oct 13 2009



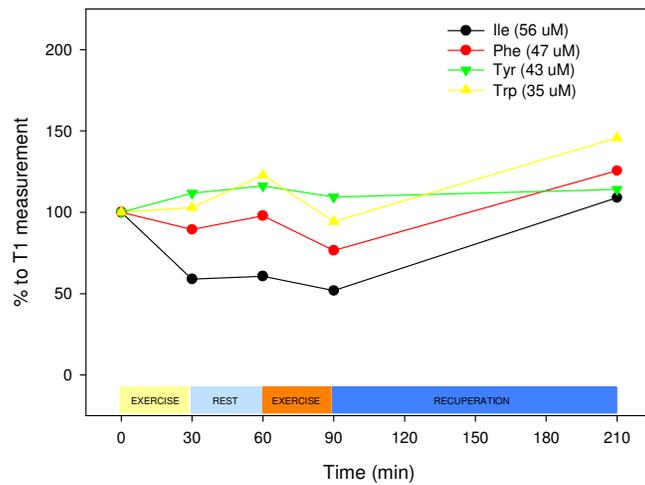
Ketoglycogenic Amino Acids - May 08 2009



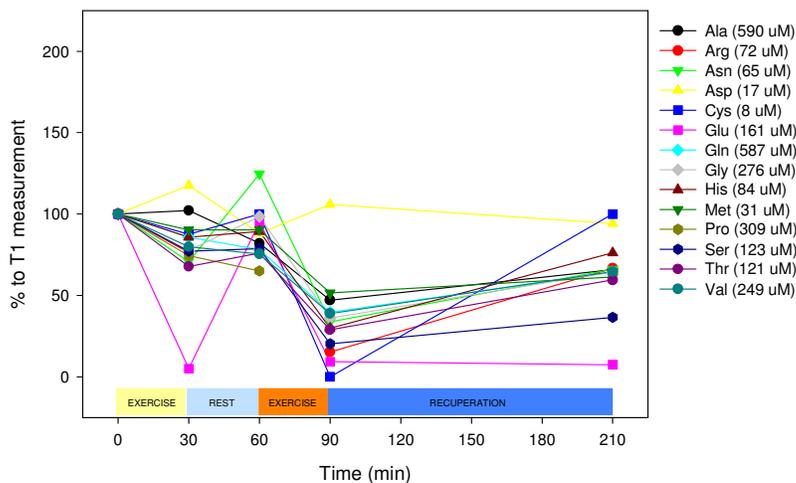
Ketoglycogenic Amino Acids - Jul 20 2009



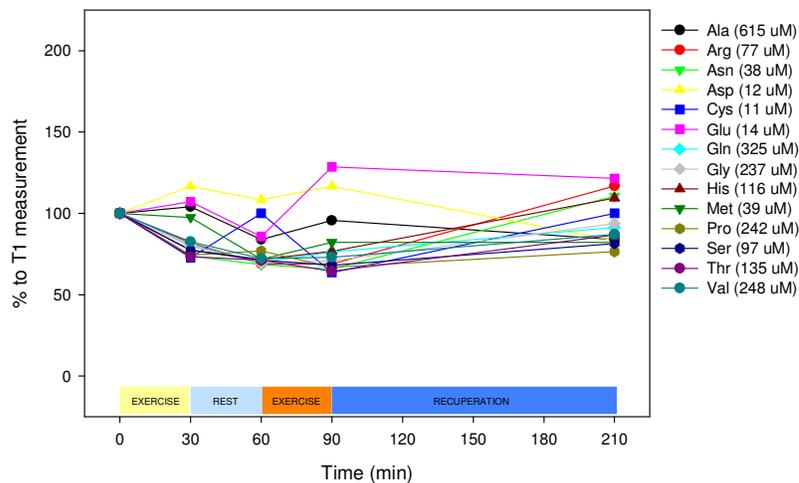
Ketoglycogenic Amino Acids - Oct 13 2009



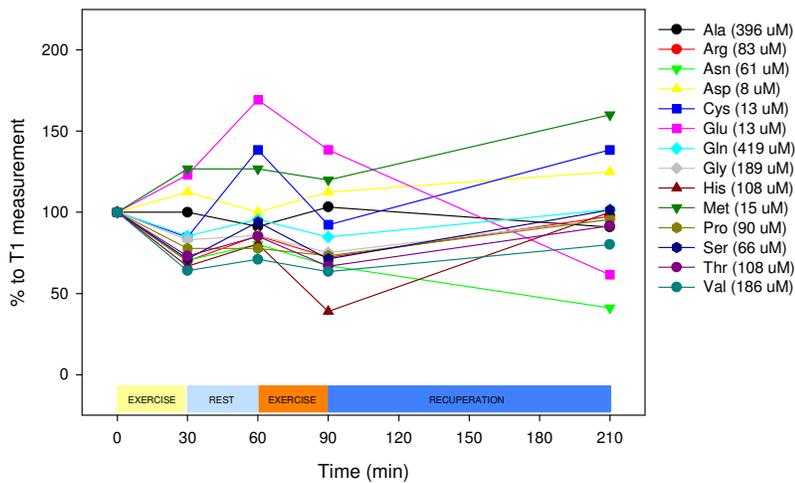
Glycogenic Amino Acids - May 08 2009



Glycogenic Amino Acids - Jul 20 2009

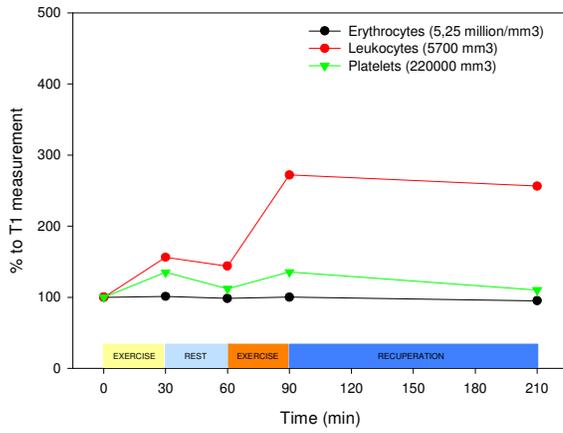


Glycogenic Amino Acids - Oct 13 2009

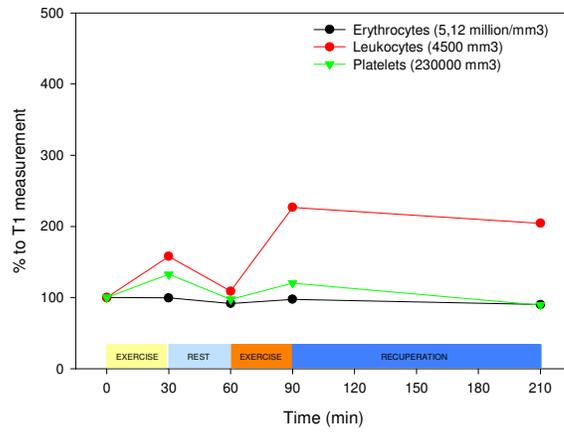


Os outros principais gráficos dos resultados metabólicos são:

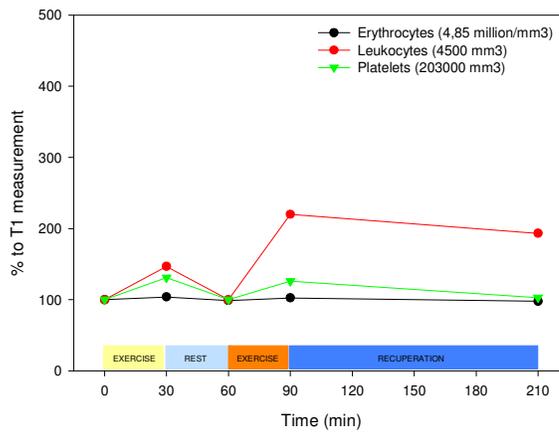
BLOOD CELLS - May 08 2009



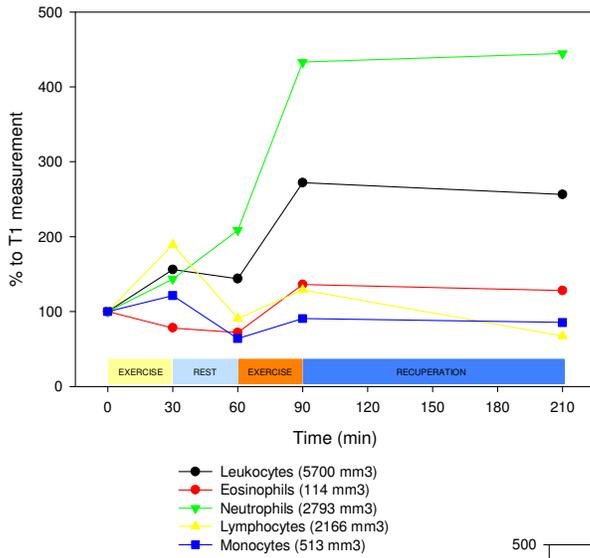
BLOOD CELLS - Jul 20 2008



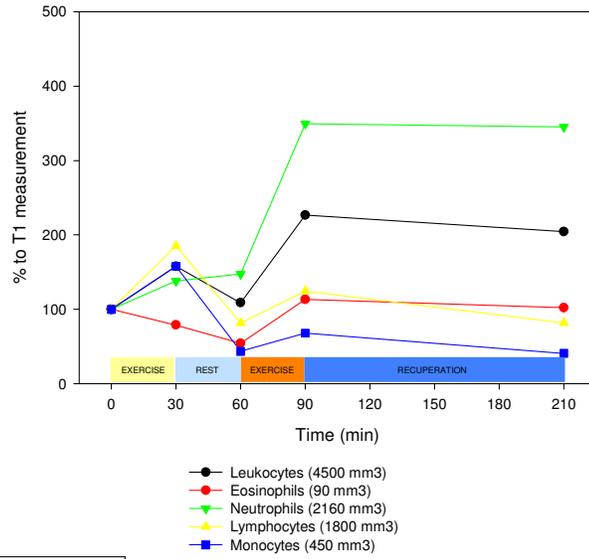
BLOOD CELLS - Oct 13 2008



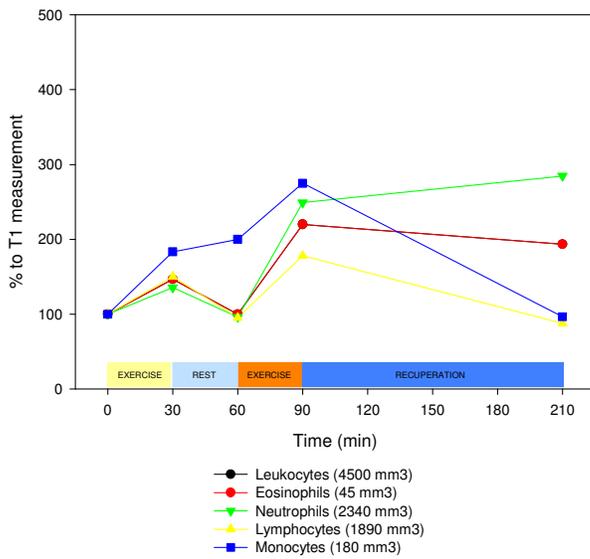
WHITE CELLS - May 08 2009



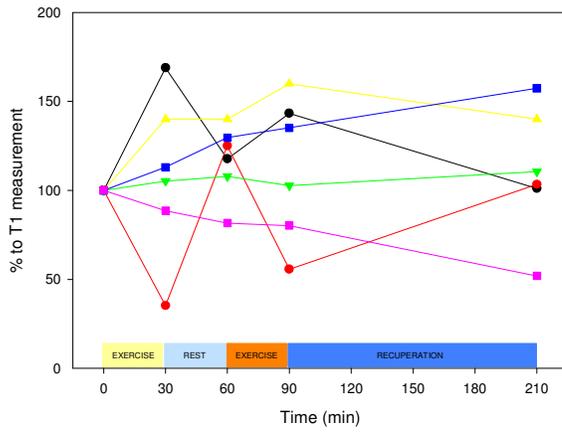
WHITE CELLS - Jul 20 2009



WHITE CELLS - Oct 13 2009

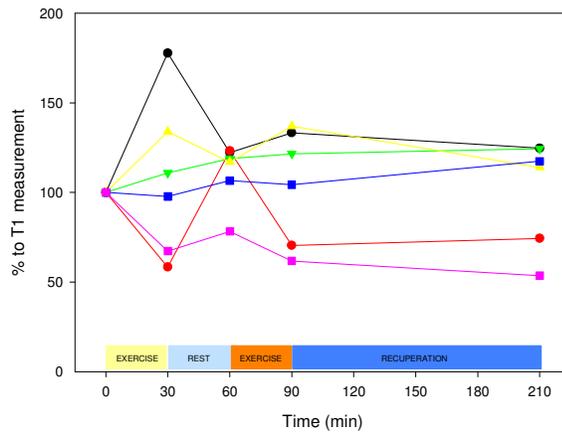


METABOLIC PATHWAYS - May 08 2009



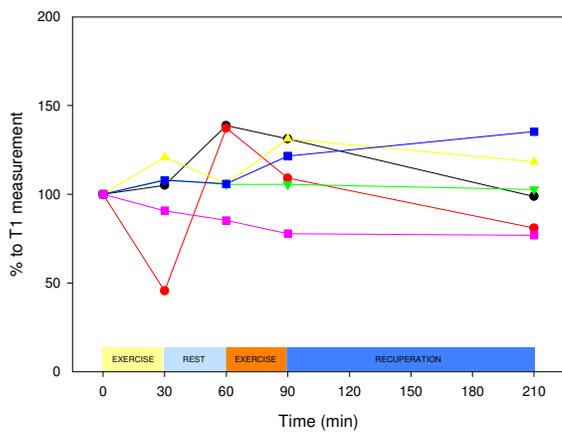
- Glucose (4,9 mM)
- Insulin (8,8 mUI/mL)
- ▼ Urea (13,5 mM)
- ▲ Creatinine (88,4 uM)
- Urate (0,3 mM)
- Lactate (6,0 mM)

METABOLIC PATHWAYS - Jul 20 2009



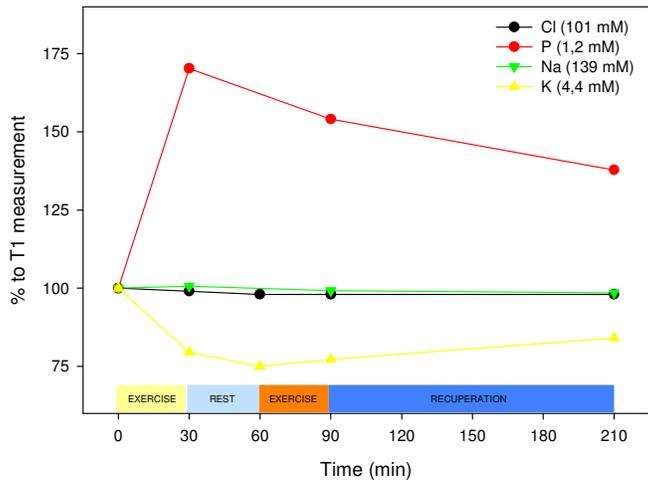
- Glucose (4,4 mM)
- Insulin (12,5 mUI/mL)
- ▼ Urea (13,2 mM)
- ▲ Creatinine (88,4 uM)
- Urate (0,2 mM)
- Lactate (6,2 mM)

METABOLIC PATHWAYS - Oct 13 2009

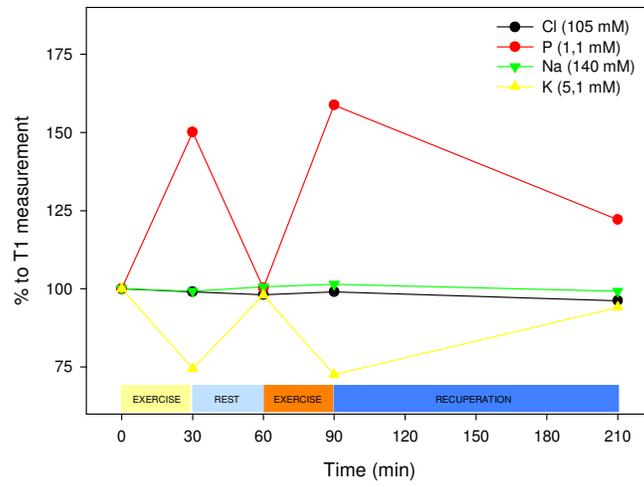


- Glucose (4,4 mM)
- Insulin (1,1 mUI/mL)
- ▼ Urea (12,8 mM)
- ▲ Creatinine (101,6 uM)
- Urate (0,3 mM)
- Lactate (2,3 mM)

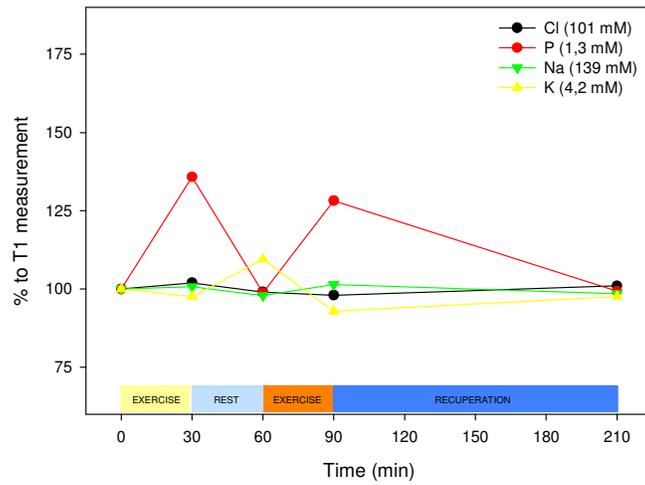
MINERALS - May 08 2009



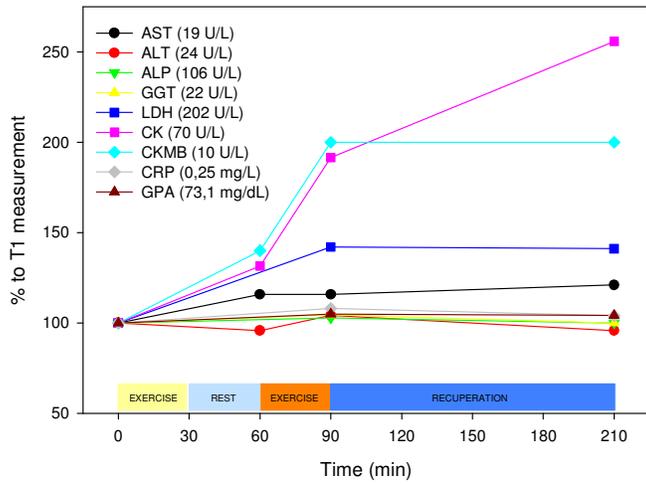
MINERALS - Jul 20 2009



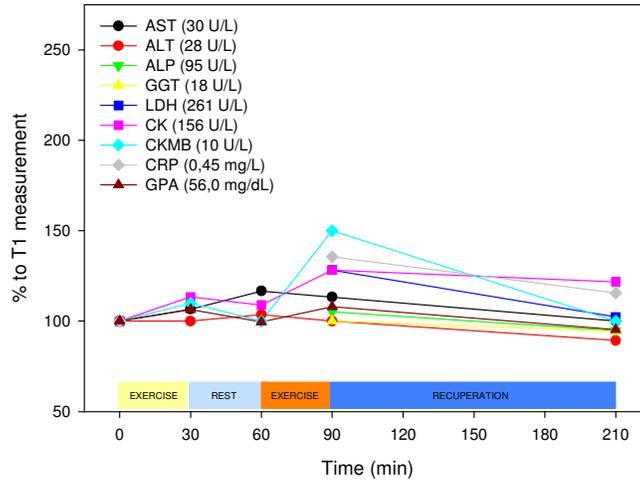
MINERALS - Oct 13 2009



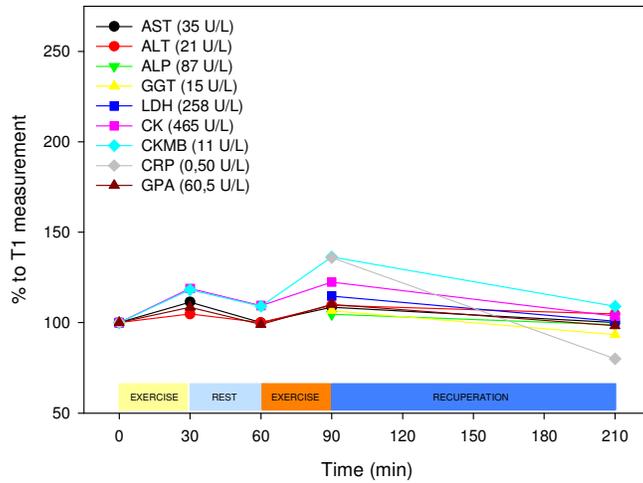
INFLAMATION - May 08 2009



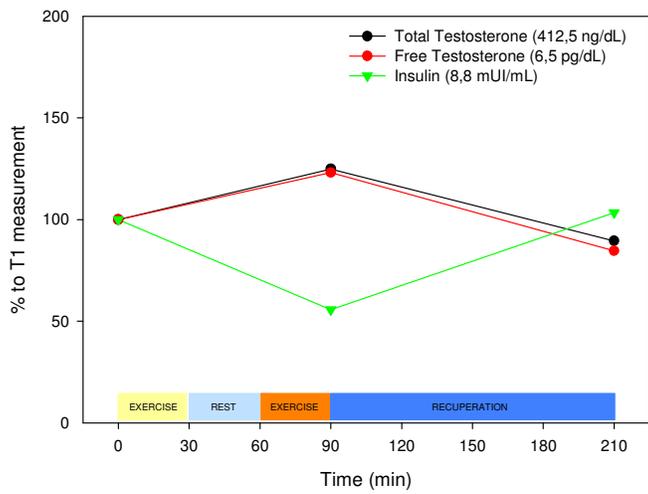
INFLAMATION - Jul 20 2009



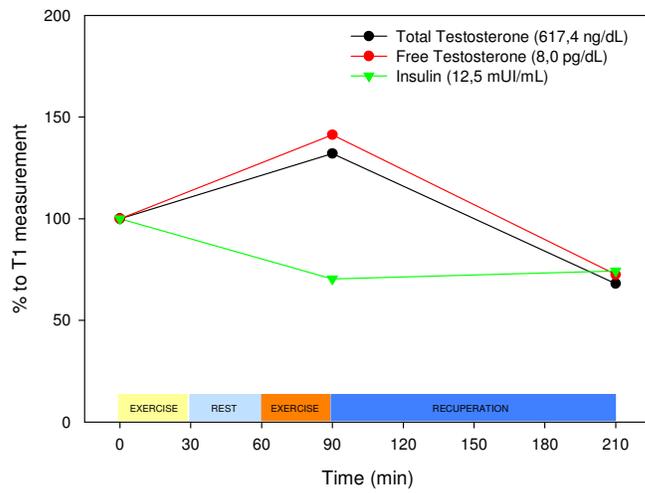
INFLAMATION - Oct 13 2009



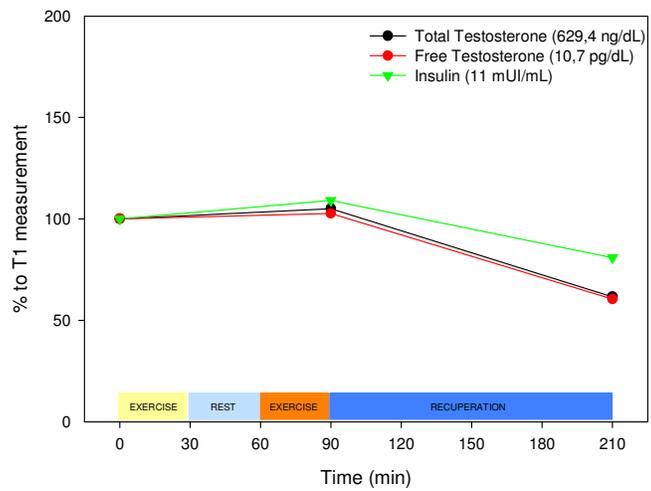
HORMONES - May 08 2009



HORMONES - Jul 20 2009



HORMONES - Oct 13 2009



II.2. Resultados da metabolômica

Os resultados da espectrometria de massas também seguem a mesma sequência do desenho experimental do artigo, porém foi realizada a análise somente no experimento de 13 outubro de 2009 (Oct 13, 3009), nos mesmos tempo de coleta (T1 a T5), na tentativa de identificar o perfil metabólico do atleta durante a realização do exercício físico.

A metabolômica estuda o perfil metabólico, o qual é um método analítico para a quantificação relativa de um número selecionado de metabólitos em amostras biológicas, ou seja, os compostos específicos e/ou suas classes de compostos. Esse método analítico se difere de outros procedimentos analíticos, por determinar a maioria dos compostos presentes na amostra, em uma única plataforma de avaliação, a qual identifica e quantificam os compostos em relação às amostras de comparação com uma base de dados ou como os controles positivos e negativos.

Preparação das amostras

A preparação das amostras (plasma sanguíneo) é o principal passo para a MS, assim as amostras foram derivatizadas para a análise no GCMS. Após a derivatização, as amostras foram injetadas (1 μ L de amostra) em modo *splitless*, sendo a temperatura do injetor 250°C. Foi utilizado como gás de arraste, o hélio, com fluxo de 1mL/min. A temperatura inicial (60°C) foi mantida por 1 minuto, e após isso, a temperatura foi aumentada com taxa de 10°C/min até 325°C. Os espectros de MS foram adquiridos com fonte de ionização por elétrons (modo positivo), com energia dos elétrons de 70eV, faixa de *m/z* 50-600 e com *scan time* de 0,12 segundos.

Derivatização das amostras

Na derivatização das amostras, 30 μ L de plasma sanguíneo de cada tempo de coleta (T1 a T5) foi extraído usando 1mL de uma mistura monofásica de isopropanol:acetonitrila:água (3:3:2, v/v) a 20°C por 5 min. Após a centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi aliqotado em um tubo, e então completamente seco em um concentrador centrífugo SpeedVac® (Thermo Scientific – USA).

O tubo foi posteriormente derivatizados em duas etapas. Em primeiro lugar, os grupos funcionais carbonila foram protegidos por metoximação usando 10µL de solução de cloridrato de metoxiamina em piridina para 40mg/mL, a 30°C por 90 min. Em seguida, para aumentar a volatilidade dos compostos, as amostras foram derivatizados utilizando 90µL de n-metil-n-trimetilsililtrifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (MSTFA + 1% TMCS) a 37°C por 30 min. Este procedimento resultou na detecção de dois picos de aldeídos e cetonas derivatizados: *syn* e *anti*-formas, como glucose1 e glucose2.

A coluna DB5MS de 29 metros com 10 metros de pré-coluna Deragard foi utilizado com 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura no cromatógrafo à gás HP HP6890 (Agilent Technologies – USA).

O GCMS (Quattro Micro GCTM – Waters Corporation – USA) foi utilizado para a aquisição de dados a cada 0,1 segundos, com a linha de transferência definida para 290 °C, sendo programada para o solvente com tempo de *delay* de 6 min, digitalização de 50-600u. A temperatura da fonte de ionização foi de 230 °C.

Com os dados obtidos, a identificação dos diversos compostos foi realizada utilizando-se o banco de dados da biblioteca NIST dos softwares, MarkerLynx e o ChromaLynx, acoplado ao sistema CGMS. Foram considerados identificados aqueles constituintes que obtiveram uma semelhança maior igual a 90%.

Para melhor entendimento de como os dados foram identificados, na figura 1, está representado um exemplo do workflow de uma análise metabolômica. Com esse workflow, pode-se observar que a identificação dos compostos de todas as amostras seria impossível sem a bioinformática. Essa análise possibilita detectar, identificar e quantificar milhares de compostos em uma corrida cromatográfica, o que seria inviável a olho nu.

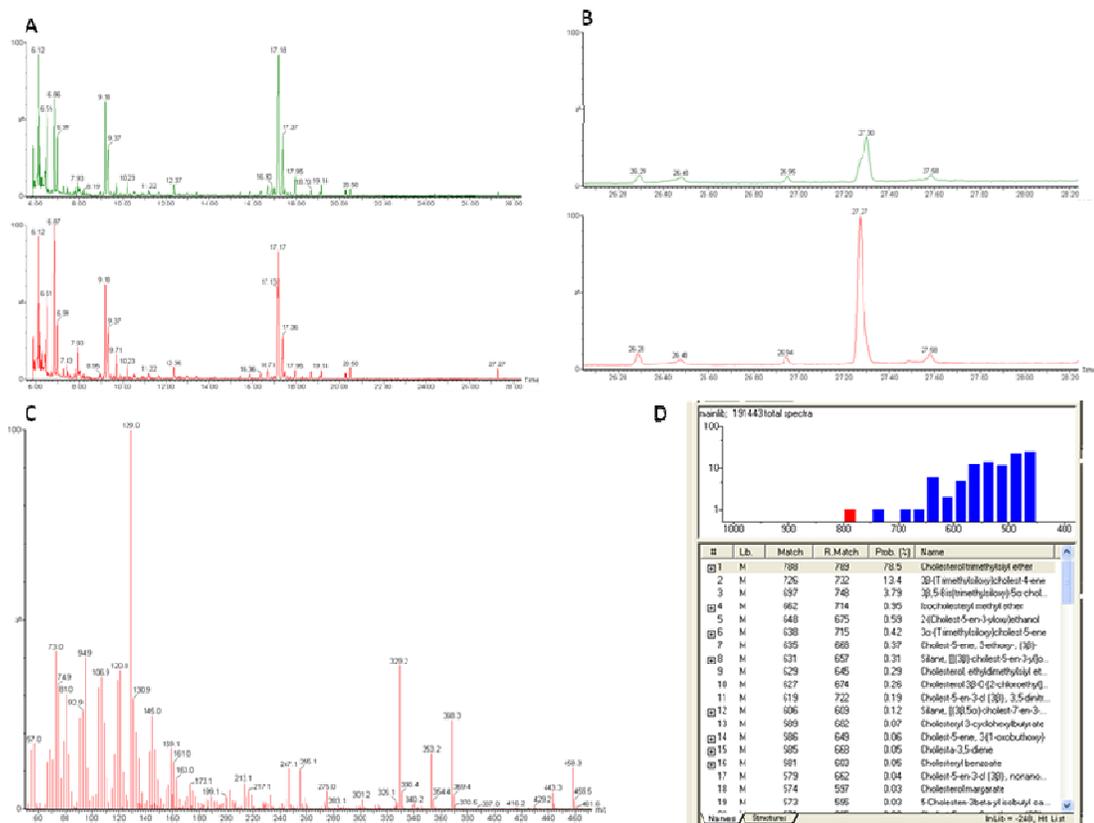


Figura 1. Workflow de uma análise metabolômica. Em 1A, estão selecionados os cromatogramas aleatórios de T1 e T3, que representa as amostras do atleta em diferentes condições (T1: início do exercício 1 e T3: início do exercício 2). Em 1B, uma determinada região do cromatograma está ampliada para mostrar detalhadamente as diferenças. Em 1C, um espectro dessa determinada região está selecionado. E em 1D, está a identificação do composto desse espectro na biblioteca NIST.

Na bioinformática, a primeira ferramenta utilizada do MarkerLynx foi o PCA. A Figura 2 é o PCA das amostras em triplicatas. Os *scores* t[1] e t[2] são os dois índices mais importantes na síntese do conjunto de dados. Os pontos no gráfico são as observações dos dados. As observações próximas são provavelmente similares, e as observações distantes são diferentes. O gráfico mostra a possível presença de observações atípicas (fora dos limites do círculo), grupos, semelhanças, tendências e outros padrões de observações nos dados.

Conforme esperado, o branco (*blank*) está diferente das demais amostras, comprovando a similaridade entre as triplicatas. As amostras de T2 e T4 estão agrupadas próximas, visto que elas representam a mesma condição de pós-exercício do atleta.

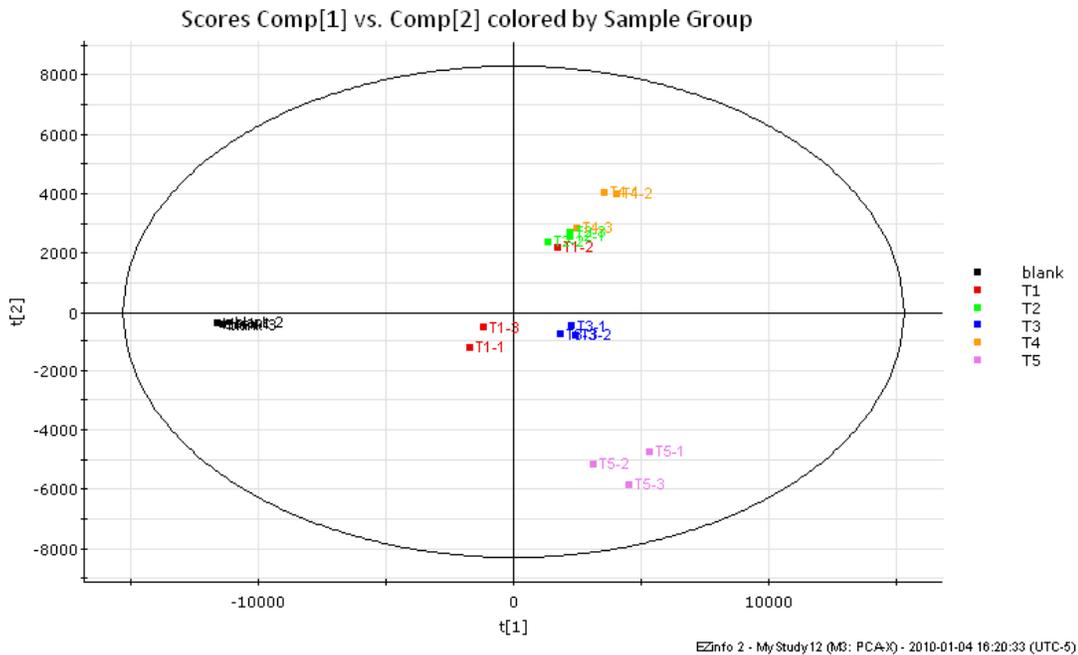


Figura 2. *Principal Component Analysis* (PCA) das amostras (T1 a T5).

Dentre as triplicatas, a amostra T1 possui uma das suas repetições (T1-2) distante das demais (T1-1 e T1-3). Isso mostra a importância de utilizar outras ferramentas estatísticas mais avançadas dentro do MarkerLynx, como por exemplo, o *Trend Plot*.

O *Trend Plot* é um gráfico que mostra a variação do selecionado, seja a variável x, a variável Y ou o *score* de todas as observações (Figura 3).

Nessa figura pode-se observar que se não tivéssemos adquirido os dados em triplicatas, teríamos uma relação de concentração do composto diferente da real, entretanto utilizando o *Trend Plot* podemos observar claramente que o T1-2 é um *outlier*.

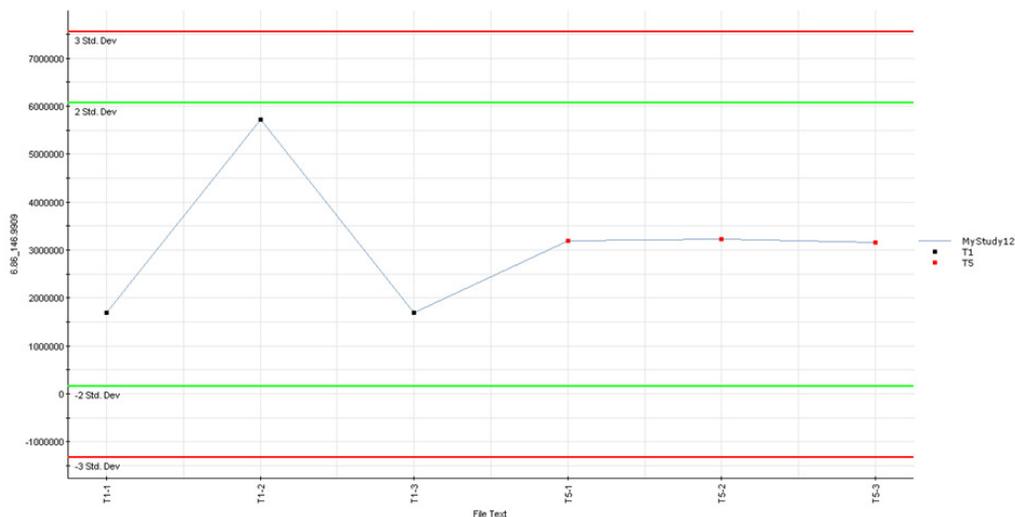


Figura 3. Trend Plot de T1 e T5 para visualização do outlier.

Com o PCA conseguimos diferenciar cada conjunto de amostra. Entretanto, essa ferramenta é insuficiente para saber o que diferencia cada conjunto dos demais. Assim, utilizamos outra ferramenta do MarkerLynx, o *S-Plot* para comparar um a um dos conjuntos. A Figura 4 mostra o *S-Plot* de T4 e T5. Esse gráfico apresenta as observações que têm no valor absoluto da correlação $(p(\text{corr})[1]P)$ com valor absoluto dos coeficientes.

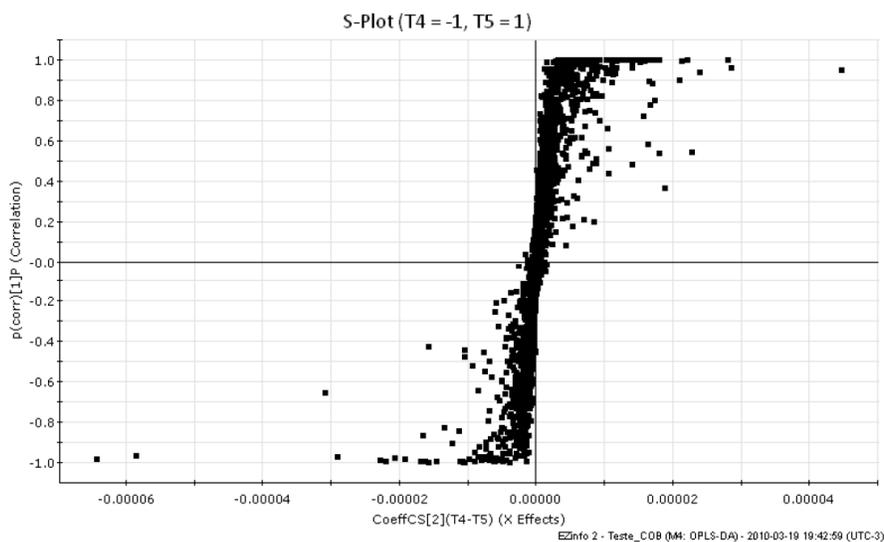


Figura 4. S-Plot de T4 e T5 para visualização das diferenças.

Após a separação e classificação dos compostos das amostras foi feita a identificação dos mesmos, pelo ChromaLynx. A Figura 5 mostra a localização cromatográfica, a detecção de pico cromatográfica de todos os componentes presentes nas amostras, e a busca automática de todos esses espectros de massas na biblioteca NIST.

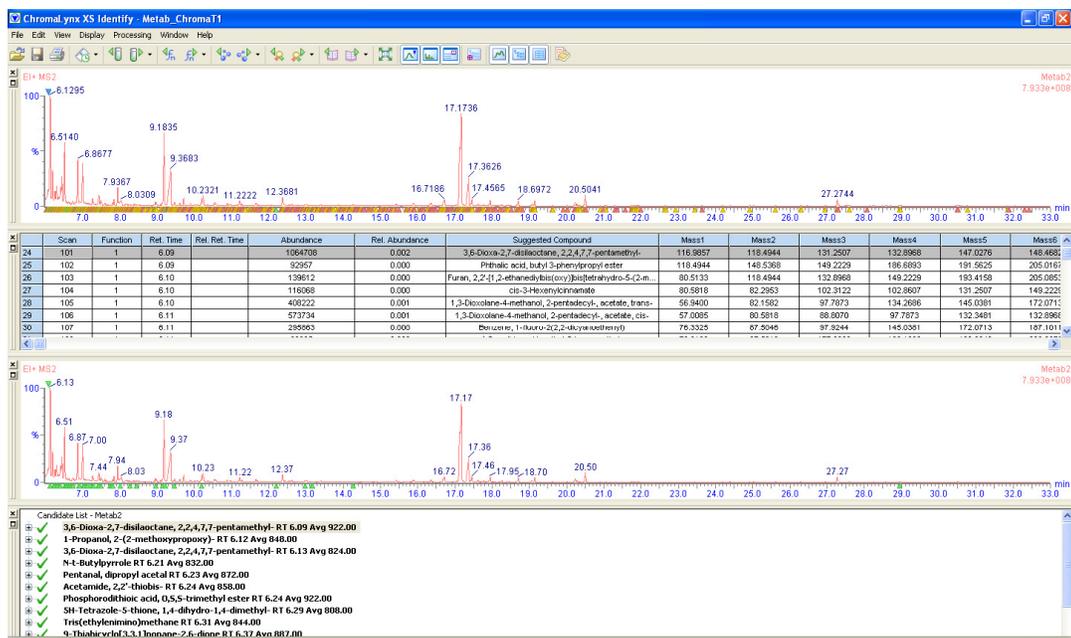


Figura 5. Interface do ChromaLynx.

Um dos grandes desafios na análise metabolômica tem sido a identificação e quantificação de novos biomarcadores utilizados para compreender a complexidade e a diversidade do metaboloma humano. Neste estudo, um biomarcador seria uma substância encontrada no sangue que é freqüentemente detectado em diferentes quantidades no sangue do atleta nas diferentes situações do exercício físico.

No Anexo 2 estão os gráficos de todos os resultados da identificação dos espectros de massas na biblioteca NIST de todos os cinco tempos da coleta no experimento Oct 13, 2009. Esses resultados ainda estão em fase de estudo devido a vasta quantidade de compostos identificados, pois um completo entendimento do metaboloma do atleta só é possível através da integração de dados adquiridos com a base teórica sobre o seu funcionamento.

Conclusão Geral

A metabolômica apresentada nessa dissertação demonstra o perfil metabólico de um atleta olímpico, sendo diferenciada especificamente como ciências “ômicas” aplicada ao esporte. Ciências essa, empregada para a compreensão das respostas dos mecanismos bioquímicos e biológicos do metabolismo dos atletas antes, durante e após o exercício físico realizado.

A metabolômica utiliza a espectrometria de massas como uma técnica analítica instrumental na identificação dos compostos desconhecidos, na quantificação de compostos conhecidos e na caracterização da estrutura e propriedades químicas dos metabólitos presentes nos fluídos corporais do atleta.

A utilização tanto da espectrometria de massas quanto das análises clínicas laboratoriais faz-se necessário para a investigação do metaboloma de atletas olímpicos em resposta ao exercício físico visando auxiliar na melhora da sua performance com intervenções nutricionais e no treinamento.

A espectrometria de massas mostrou ser mais eficiente para a caracterização do metaboloma, pois utilizou um volume de sangue do atleta de somente 30 μL para cada tempo, enquanto para os exames laboratoriais foi utilizado um volume de aproximadamente 10 vezes maior em cada tempo de coleta do experimento. A espectrometria de massas também foi capaz de identificar uma quantidade de compostos muito superior (~200 vezes) comparados com os obtidos pelos exames laboratoriais.

Assim, a metabolômica é uma ótima ferramenta para o estudo do metabolismo de atleta olímpico e a análise do metaboloma é particularmente desafiadora devido à dinâmica das respostas dos metabolites, como resultado da interação do genoma com sua respectiva expressão gênica e modificações fenotípicas.

Anexo 1

Comitê de Ética em Pesquisa



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

ATA DE PARECER CONSUBSTANCIADO

PROTOCOLO CAAE Nº 0053.0.313.000-07 CEP : 117/2007

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

DATA DE ENTRADA NO CEP : 21 de dezembro de 2007

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

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

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

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

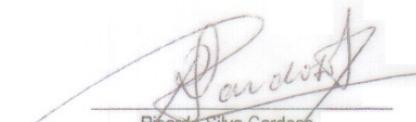
O projeto apresenta cronograma para 3 anos, e os recursos financeiros serão dos pesquisadores envolvidos no projeto

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

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

Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2008.




Ricardo Silva Cardoso
Coordenador do CEP-UNIRIO

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

RICARDO CARDOSO
COORDENADOR
CEP – UNIRIO
PROPG - DPO

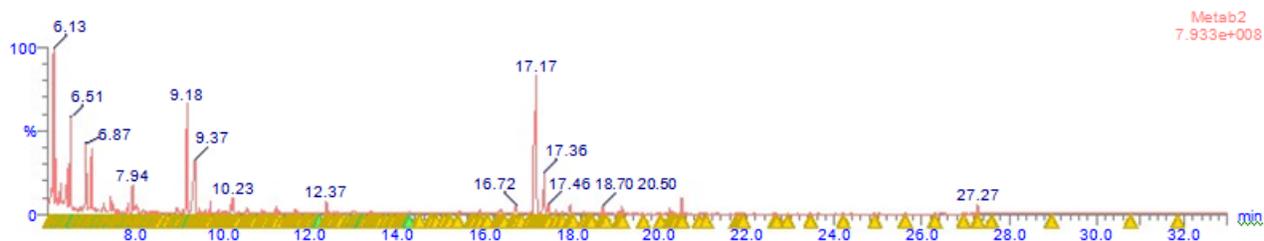
Anexo 2

Metabolômica

Dataset: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMetab_ChromaT1.ids
Last Altered: Thursday, November 19, 2009 11:02:34
Printed: Friday, January 08, 2010 09:11:16

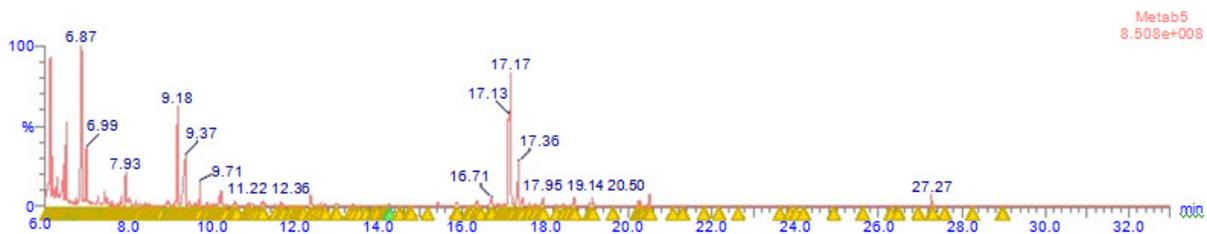
Method: C:\MLProjects\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMETHDB\Metab_Identify.idm

Sample Name: Metab2



Dataset: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMetab_ChromaT2.ids
Last Altered: Sunday, February 21, 2010 21:00:43
Printed: Sunday, February 21, 2010 21:03:41

Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMETHDB\Metab_Identify.idm
Library Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMethDB\Metab_Librar
Sample Name: Metab5



Dataset: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMetab_ChromaT3.ids

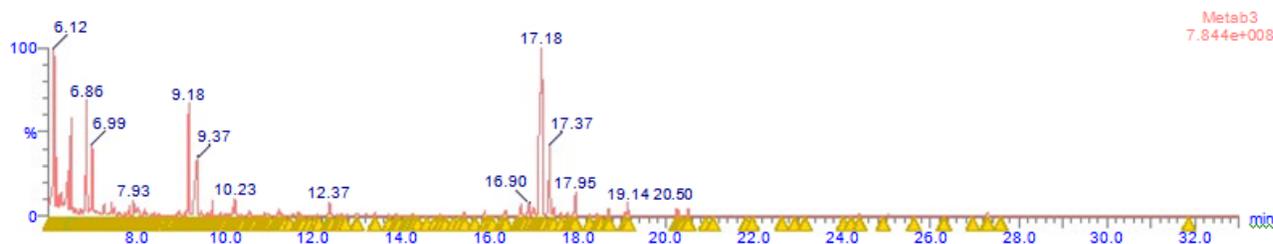
Last Altered: Sunday, February 21, 2010 21:09:15

Printed: Sunday, February 21, 2010 21:10:36

Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMETHDB\Metab_Identify.idm

Library Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMethDB\Metab_Librar

Sample Name: Metab3



Dataset: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMetab_ChromaT4.ids

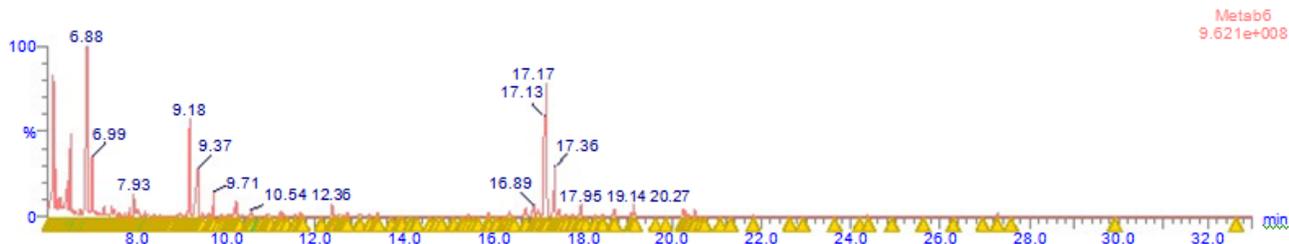
Last Altered: Sunday, February 21, 2010 21:16:41

Printed: Sunday, February 21, 2010 21:17:15

Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMETHDB\Metab_Identify.idm

Library Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMethDB\Metab_Librar

Sample Name: Metab6



Dataset: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMetab_Chroma **T5**.ids

Last Altered: Sunday, February 21, 2010 21:22:52

Printed: Sunday, February 21, 2010 21:23:05

Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMETHDB\Metab_Identify.idm

Library Method: D:\My Documents\Waters\Cientes\COB\COB_GCMS_data\BOC_RAB046_SKL_111709.PROMethDB\Metab_Librar

Sample Name: Metab4

