



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

SUPLEMENTAÇÃO DE CETOANÁLOGOS COMO QUELANTES NAS
CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS ELEVADAS DE AMÔNIA DURANTE
EXERCÍCIO PROLONGADO E DIETA CETOGENICA

Eduardo Seixas Prado

UBERLÂNDIA – MG
2010



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

SUPLEMENTAÇÃO DE CETOANÁLOGOS COMO QUELANTES NAS
CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS ELEVADAS DE AMÔNIA DURANTE
EXERCÍCIO PROLONGADO E DIETA CETOGENICA

Eduardo Seixas Prado

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Cameron

UBERLÂNDIA – MG
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- P896s Prado, Eduardo Seixas, 1971-
 Suplementação de cetoanálogos como quelante nas concentra-
 ções sanguíneas elevadas de amônia durante exercício prolongado e
 dieta cetogênica / Eduardo Seixas Prado. - 2010.
 101 f. : il.
- Orientador: L. C. Cameron.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
 de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. 2. Cetoácidos -
 Teses. 3. Amônia - Teses. I. Cameron, L. C. (Luis Claudio). II. Uni-
 versidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 612.766.1

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



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

SUPLEMENTAÇÃO DE CETOANÁLOGOS COMO QUELANTES NAS
CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS ELEVADAS DE AMÔNIA DURANTE
EXERCÍCIO PROLONGADO E DIETA CETOGÊNICA

Aluno: Eduardo Seixas Prado

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Claudio Cameron

Examinadores:

Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini

Prof. Dr. Mauro Sola-Penna

Prof. Dr. Nilson Penha Silva

Prof. Dr. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Data da Defesa: 31 de maio de 2010.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foi contemplada

Prof. Dr. Luiz Claudio Cameron

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, principalmente aos meus pais, Erilo e Marlene, que confiaram e contribuíram na minha formação profissional e pessoal, bem como, a minha esposa Rosemeire e a minha filha Maria Eduarda, pelo total incentivo, preocupação e reconhecimento ao estudo.

Agradecimentos

Aos meus pais Erilo e Marlene, que sempre transmitiram força, preocupação, carinho e exemplo em todos os momentos difíceis da jornada que é a vida. Essa vitória é nossa;

À minha esposa Rose, pela compreensão, paciência, exemplo de coragem e incentivo aos estudos, obrigado;

À minha filha Maria Eduarda, minha “bateria” para recarregar a motivação nos estudos e fonte de eliminação do estresse. Te amo, lindinha!

A minha irmã Nadja pela sua preocupação e carinho nas horas difíceis;

Ao meu amigo Prof. Dr. Estélio Dantas, o grande “culpado”, que me fez seguir a trajetória de pesquisador e que me auxiliou nos momentos complicados;

Ao meu orientador Prof. Dr. L. C. Cameron, que me fez amadurecer como pesquisador e proporcionou momentos de aprendizagem que serão fundamentais na minha vida pessoal e profissional;

Aos colegas do doutorado, especialmente aos amigos do LBP, Nathália, Anibal, Rafael e Ricardinho, pela camaradagem e acolhimento;

Aos amigos da Universidade Tiradentes, especialmente a turma do biotério “Seu” João, Gladston e Max; os professores Sheila, Kid e Ricardo, e os ex-alunos Sheilla e Wendell, pela paciência e companheirismo nos momentos de coleta e análise dos dados. E a todos que de uma maneira ou outra, contribuíram para este momento;

A Federação Sergipana de Ciclismo na figura do seu presidente Gilvan Costa e a todos os atletas ciclistas que, literalmente, doaram seu sangue para a realização deste estudo. E, também, aos ratos que foram sacrificados para elaboração de estudos paralelos a tese;

A Deus... somente ele poderia proporcionar este momento.

Sumário

Apresentação	1
CAPÍTULO I: Fundamentação teórica.....	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
I.I. Amônia.....	6
a.Síntese da amônia	6
b. Aspectos gerais do catabolismo de aminoácidos e formação da amônia	8
c. Ciclo das purinas nucleotídeos.....	20
d. Cafeína como auxílio ergogênico e modificador no estudo do metabolismo nitrogenado	22
e.Amônia e toxicidade	23
f.Concentrações plasmáticas da amônia	27
I.II. Exercício físico e amônia	28
g.Exercício físico de curta duração e alta intensidade e amônia.....	29
h.Exercício físico prolongado e amônia	33
I.III. Dieta cetogênica	37
i.Definição	37
j.Relação da dieta cetogênica com a depleção de glicogênio e alterações de grupos nitrogenados	38
I.IV. Cetoanálogos	40
k.Cetoanálogos e sua relação com a remoção de grupos nitrogenados.....	40
Referências	42
CAPÍTULO II: Keto analogues and amino acids supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions.	59
CAPÍTULO III: Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise.....	65
CAPÍTULO IV: Caffeine affects the ammoniaemia response in athletes during prolonged exercise under ketogenic conditions.....	70

Conclusão geral	91
ANEXO: Resultados complementares	92
Introdução	93
IV.I. Número de leucócitos e suas subpopulações	93
Referências	100

Lista de figuras

Figura 1. Gênese da amônia: órgãos e tecidos responsáveis pela formação, utilização e circulação sanguínea de amônia e de compostos nitrogenados. $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$: amônia.....	7
Figura 2. Catabolismo de aminoácidos no fígado de vertebrados. Grupo amino na cor rosa..	9
Figura 3. Reação de transaminação.	10
Figura 4. Ciclo da uréia. A uréia é produzida da amônia em cinco passos enzimáticos (Dois no interior da mitocôndria do hepatócito e três no citosol. Números indicam os passos. Grupos nitrogenados sombreados em azul contribuem para formação da uréia). GD: glutamato desidrogenase; CPS I: carbamoil fosfato sintetase I; OCT: ornitina transcarbamilase; AS: argininosuccinato sintase; AL: argininosuccinato lias	11
Figura 5. Destino catabólico dos aminoácidos via anaplerose. TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico..	13
Figura 6. A glutamina transporta a amônia na corrente sanguínea.....	14
Figura 7. Ciclo alanina-glicose..	15
Figura 8. Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	16
Figura 9. Ação da aminoácido cadeia ramificada aminotransferase (BCAT) no catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada; BCKA: cetoanálogos dos aminoácidos de cadeia ramificada; BCAT: aminoácido cadeia ramificada aminotransferase; AAT: alanina aminotransferase;	

GDH: glutamato desidrogenase; GS: glutamina sintetase; NAD^+ : nicotinamida adenina de nucleotídeo; NADH: hidrato de nicotinamida adenina de nucleotídeo.....17

Figura 10. Ação do complexo α -cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase (BCKDH) sobre os cetoanálogos dos aminoácidos de cadeia ramificada. BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada; BCKA: cetoanálogos dos aminoácidos de cadeia ramificada; BCAT: aminoácido cadeia ramificada aminotransferase; BCKDH: complexo α -cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase CoA-SH: coenzima A na forma reduzida; R-CoA: Acil coenzima A. 19

Figura 11. Intermediários metabólicos na gênese de amônia e urato. O ciclo das purinas nucleotídeos é demonstrado pelas setas pretas. 21

Figura 12. Efeito direto da amônia leva a efeitos secundários.. 25

Figura 13. Efeitos cerebrais devido à toxicidade da amônia 26

Figura 14. Vias da perda de adenina nucleotídeo no músculo esquelético em contração intensa, com formação de amônia e urato..... 31

Figura 15. Possíveis vias do catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e seu grupo amino no músculo esquelético. BCOA: α -cetoácido análogo dos BCAA; TCA: Ciclo do Ácido Tricarboxílico; PNC: Ciclo das Purinas Nucleotídeos; NAD e NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada e reduzida, respectivamente; Glu: glutamato; Gln: glutamina; Ala: alanina; e, Asp: aspartato 34

Figura 16: Contagem de leucócitos durante exercício e recuperação. Grupo placebo ● (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; ‡ diferença significativa de 150 dentro do grupo; || diferença significativa entre os grupos. 95

Figura 17: Contagem de linfócitos durante exercício e recuperação. Grupo placebo ● (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; ** diferença significativa de 60 dentro do grupo; ‡ diferença significativa de 150 dentro do grupo; § diferença significativa de 180 dentro do grupo. 96

Figura 18: Contagem de neutrófilos durante exercício e recuperação. Grupo placebo ● (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; †† diferença significativa de 90 dentro do grupo; || diferença significativa entre os grupos. 97

Figura 19: Contagem de eosinófilos durante exercício e recuperação. Grupo placebo ● (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; || diferença significativa entre os grupos. 98

Figura 20: Contagem de basófilos durante exercício e recuperação. Grupo placebo ● (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; § diferença significativa de 180 dentro do grupo. 99

Lista de tabelas

Tabela 1. Concentração de amônia e pH em fluidos e tecidos corporais em condição basal.....	27
Tabela 2. Concentração de amônia em doenças hepáticas.....	27
Tabela 3. Concentração de amônia em fluidos e tecidos corporais em diferentes intensidades de exercício físico.....	28

Lista de abreviações

1RM – uma repetição máxima
AAT (ALT) – alanina aminotransferase
ADP- adenosina difosfato
AL- arginosuccinato liase
Ala- alanina
AMP- adenosina monofosfato
AS - argininosuccinato sintase
Asp- aspartato
ATP- adenosina trifosfato
BCAA- aminoácidos de cadeia ramificada
BCAT – BCAA aminotransferase
BCKA – cetoanálogos dos aminoácidos de cadeia ramificada
BCKDH – complexo enzimático α -cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase
BCOA- α -cetoácido análogo dos aminoácidos de cadeia ramificada
CNS- sistema nervoso central
CoA – SH – coenzima A na forma reduzida
CPS I - carbamoil fosfato sintetase I
EH – encefalopatia hepática
GABA - ácido gama amino-butírico
GD ou GDH - glutamato desidrogenase
Gln- glutamina
Glu- glutamato
GLUT-1 - transportador de glicose 1
GS – glutamina sintetase
GTP- guanosina trifosfato
 H^+ - íon hidrogênio
 HR_{Max} – frequência cardíaca máxima
IMP- inosina monofosfato

KAAA – cetoanálogos e aminoácidos
km – quilômetros
 N_2 – nitrogênio da atmosfera
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
 $NH_3 + NH_4^+$ - amônia
 NH_3 - amônia
 NH_4^+ - íon amônio
NMDA- receptor para *N*-metil-*D*-aspartato
OCT- ornitina transcarbamilase
PC- creatina fosfato
PFK- fosfofrutoquinase
Pi – fosfato inorgânico
PLP- piridoxal fosfato
PNC- ciclo das purinas nucleotídeos
R-CoA – Acil coenzima A
TCA- ciclo do ácido tricarboxílico
 VO_2 máx – consumo máximo de oxigênio
 α -KGDH - α -cetoglutarato desidrogenase

Apresentação

Nos últimos anos, o Laboratório de Bioquímica de Proteínas (LBP) tem se dedicado ao uso do exercício físico como modelo para induzir uma elevação da amonemia e estudar seu metabolismo. Entre outros resultados, observamos que tanto a glutamina (Gln) como carboidratos protegem contra um aumento nos níveis sanguíneos de amônia. Nesse trabalho, visamos estudar a suplementação de cetoadálogos e sua provável proteção contra elevação da amonemia.

Uma concentração elevada de amônia no organismo é tóxica e está relacionada a problemas como os distúrbios neurológicos, a insuficiência hepática e queda do desempenho físico. Sabe-se também que os aminoácidos livres são substratos para síntese protéica, para a anaplerose e gliconeogênese. Durante o metabolismo, são desaminados ou transaminados em reações que podem resultar na formação de cetoadálogos e amônia. Como essas reações podem ser reversíveis, o uso de cetoadálogos tem sido proposto para captar compostos nitrogenados da circulação sanguínea, transformando-se em aminoácidos correspondentes, em geral essenciais tais como os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA). Assim, estudar suas modificações a partir da suplementação de cetoadálogos pode proporcionar novos alvos terapêuticos, além de indicar caminhos para melhorar o desempenho atlético. Para melhor compreensão, o trabalho foi dividido em cinco capítulos:

No capítulo um trouxemos a fundamentação teórica deste trabalho com um apanhado geral sobre a amônia, destacando sua síntese e toxicidade; sua relação com o exercício físico em diferentes volumes e intensidades; dieta cetogênica e depleção de glicogênio; e para finalizar, uma discussão sobre o uso dos cetoadálogos e seus efeitos em compostos nitrogenados.

O capítulo dois tem por finalidade demonstrar os efeitos da suplementação de cetoadálogos associados com aminoácidos sobre a amonemia durante o exercício prolongado em ciclistas.

Já o capítulo três procura demonstrar outros modelos, tal como exercícios de força em ratos, para investigar o metabolismo de amônia, levando-nos a comparar os resultados entre humanos e outros animais.

O capítulo quatro descreve a ação da cafeína como modificadora do metabolismo de amônia em ciclistas submetidos a exercício prolongado e dieta cetogênica.

Finalmente, o capítulo cinco apresenta resultados complementares desse trabalho. Como utilizamos uma dieta cetogênica em indivíduos submetidos a exercício físico prolongado, mensuramos os níveis sanguíneos de glicose e lactato. Além disso, o capítulo também demonstra a variação no número de leucócitos e suas subpopulações.

CAPÍTULO I: Fundamentação teórica

Resumo

Amônia (nesse trabalho descrito como sinônimo de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) é tóxica e promove efeitos deletérios no sistema nervoso central. O exercício físico pode ser usado como um modelo para estudar o metabolismo da amônia e o aumento de sua concentração nos tecidos. Os distúrbios temporários no sistema nervoso central causado pelo exercício são similares aos observados na doença hepática e desordens neurodegenerativas.

Aumento da adenosina monofosfato (AMP) durante exercício prolongado leva a produção de inosina monofosfato (IMP). Além disso, aminoácidos são usados como doadores de carbono no ciclo do ácido tricarboxílico para manter a concentração de adenosina trifosfato (ATP) na célula. Ambas as vias metabólicas levam a um aumento da concentração de amônia no sangue e na célula. Nessas condições, a amonemia pode aumentar 400% em relação aos níveis de repouso.

Mudança nos níveis de amônia em resposta ao exercício pode ser manipulada, pelo uso de aminoácidos ou carboidratos, que interferem no metabolismo da amônia. Dieta pobre em carboidrato (aqui denominada como dieta cetogênica) combinada com exercício físico pode reduzir os estoques de glicogênio, induzindo uma elevação da amonemia antecipada. Nós exploramos essa habilidade da dieta cetogênica para exacerbar o efeito do exercício na produção de amônia. Contudo, cetoanálogos podem servir como um suplemento nutricional para proporcionar aminoácidos de alto valor biológico, assim como, um recurso para sequestrar amônia sanguínea.

Nesse estudo, nós usamos o exercício para investigar o metabolismo da amônia. Nós usamos uma dieta cetogênica e exercício como um modelo para elevar a amônia sanguínea e compreender o papel da associação da suplementação de cetoanálogos e aminoácidos no metabolismo de amônia.

Palavras-chave: amônia, dieta cetogênica, cetoanálogos, exercício.

Abstract

Ammonia (here used as a synonym for $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) is a toxic metabolite with deleterious effects on the central nervous system. Exercise can be used as a model to study ammonia metabolism and hyperammonemia. The temporary disturbances in the central nerve system caused by exercise are similar to the observed in hepatic disease and neurodegenerative disorders.

Increase of adenosine monophosphate (AMP) during prolonged exercise leads to an production of inosine monophosphate (IMP). Furthermore, amino acids are used as carbon donors for the tricarboxylic acid cycle to maintain the ATP concentration in the cell. Both metabolic pathways lead to an increase in intracellular and ammonemia concentration. In these events, the blood ammonia concentration can raise up to 400% the resting levels.

Changes in ammonia levels in response to exercise can be managed through the use of amino acids or carbohydrates that interfere with the metabolism of ammonia. Low carbohydrates diet (called here as ketogenic diet) combined with physical exercise can reduce glycogen stores, inducing early states of hyperammonemia. We explored the ability of a ketogenic diet to enhance the effect of exercise on ammonia production. Though, keto analogues can serve as a nutritional supplement to provide amino acids of high biological value, as well as a tool for ammonia sequestering.

In the present study, we used exercise stress to investigate ammonia metabolism. We studied a low-carbohydrate ketogenic diet and exercise as a hyperammonemia model in order to understand the role of the association of keto analogues and amino acid (KAAA) supplementation in ammonia metabolism.

Keywords: ammonia, ketogenic diet, keto analogues, exercise.

Introdução

I.I. Amônia

a.Síntese da amônia

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

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

A síntese de amônia também ocorre pela ação de bactérias decompositoras encontradas no solo terrestre e pela degradação de aminoácidos e nucleotídeos feita por animais, que a excretam posteriormente na própria forma de amônia (amoniotélicos) ou de urato (uricotélicos), ou ainda, na forma de uréia (ureotélicos) (NELSON; COX, 2005).

Nos fluidos e líquidos corporais de mamíferos a NH_3 , é lipofílica, proporcionando uma difusão simples pelas células através das membranas, enquanto que o NH_4^+ não se difunde facilmente pelas membranas, requerendo mecanismos de transportes mediados (COOPER; PLUM, 1987; COOPER, 2001). No humano, como a pKa da amônia é de 9,15 a 37°C, consequentemente, ~ 98% da amônia se encontra na forma ionizada ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002b).

Vários mecanismos são responsáveis pela produção de amônia através de diversas estruturas orgânicas, tais como: o Sistema Nervoso Central (SNC), intestino, fígado, rim e músculo (CÓRDOBA; MÍNGUEZ, 2008) (Figura 1).

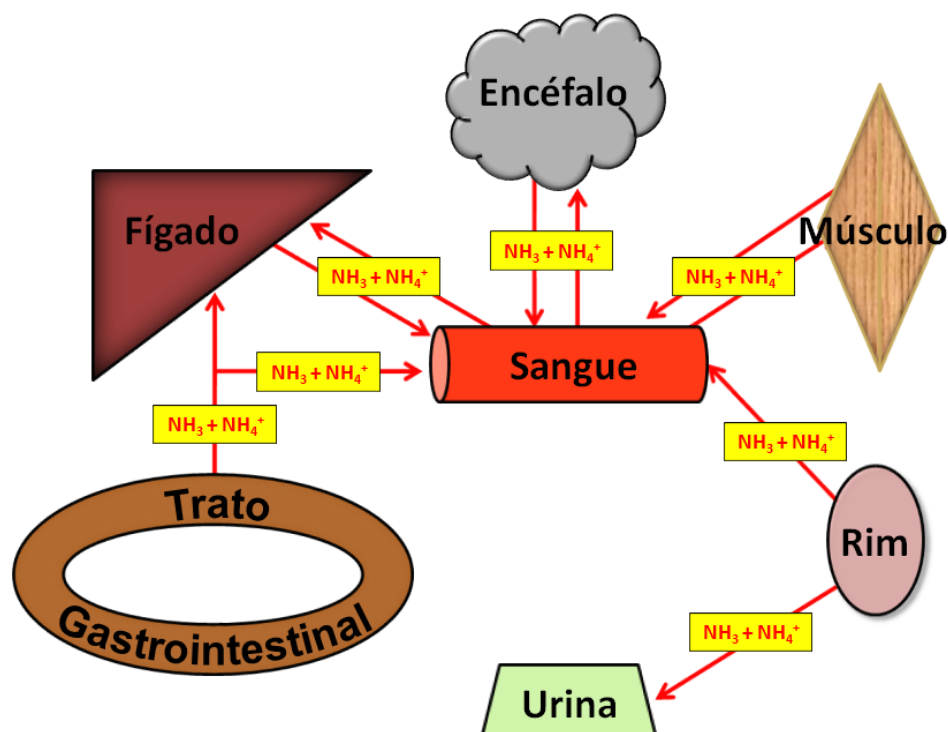


Figura 1. Gênese da amônia: órgãos e tecidos responsáveis pela formação, utilização e circulação sanguínea de amônia e de compostos nitrogenados. $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$: amônia. Extraído e adaptado de Banister e Cameron, 1990.

Sob condições fisiológicas normais, a maioria da amônia sistêmica é liberada pelo intestino ou trato gastrointestinal, onde compostos nitrogenados, principalmente Gln e uréia, além de restos bacterianos, são quebrados por uma combinação de atividades enzimáticas, tal como a glutaminase, cuja atividade no trato gastrointestinal é muito alta, proporcionando a formação de grandes quantidades de amônia, que é posteriormente, transportada para a circulação portal hepática. Esta por sua vez, fornece amônia para o fígado, onde podem sofrer ações do ciclo da uréia para formar uréia ou da glutamina sintetase (GS) para formar Gln. Uma vez formados, uréia e Gln reentram na circulação e através de um sistema de

intercâmbio entre órgãos, ou são eliminados do organismo pela urina, ou utilizados para manter o equilíbrio ácido-básico e nitrogenado (OLDE DAMINK et al, 2002; VAN DE POLL et al, 2004; CÓRDOBA; MÍNGUEZ, 2008).

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

Especificamente, as principais fontes geradoras de amônia, são provenientes: da ação putrefativa das bactérias sobre compostos nitrogenados do conteúdo intestinal; processos de desaminação oxidativa e transaminação dos aminoácidos da dieta e dos tecidos; e pelo ciclo das purinas nucleotídeos, via desaminação da AMP (MUTCH; BANISTER, 1983; HUIZENGA; TANGERMAN; GIPS, 1994).

Nesta tese, a amônia será descrita sob a forma ionizada e sua síntese será discutida a partir do catabolismo dos aminoácidos e reações do ciclo das purinas nucleotídeos.

b. Aspectos gerais do catabolismo de aminoácidos e formação da amônia

Apesar do metabolismo de aminoácidos e amônia ser realizado de maneira inter-órgãos (rins, intestino, músculo), o fígado apresenta um papel central nesse processo visto que é o único órgão que tem todas as enzimas necessárias para converter amônia em uréia (VAN DE POLL et al, 2004; WALKER, 2009).

Após degradação das proteínas ingeridas na alimentação em seus aminoácidos constituintes no trato gastrointestinal, os aminoácidos livres entram nos capilares sanguíneos e são transportados até o fígado. Nos hepatócitos, a maior parte dos aminoácidos é metabolizada, especialmente, o glutamato (Glu), Gln e alanina (Ala) (WAGENMAKERS, 1998a; NELSON; COX, 2005) (Figura 2).

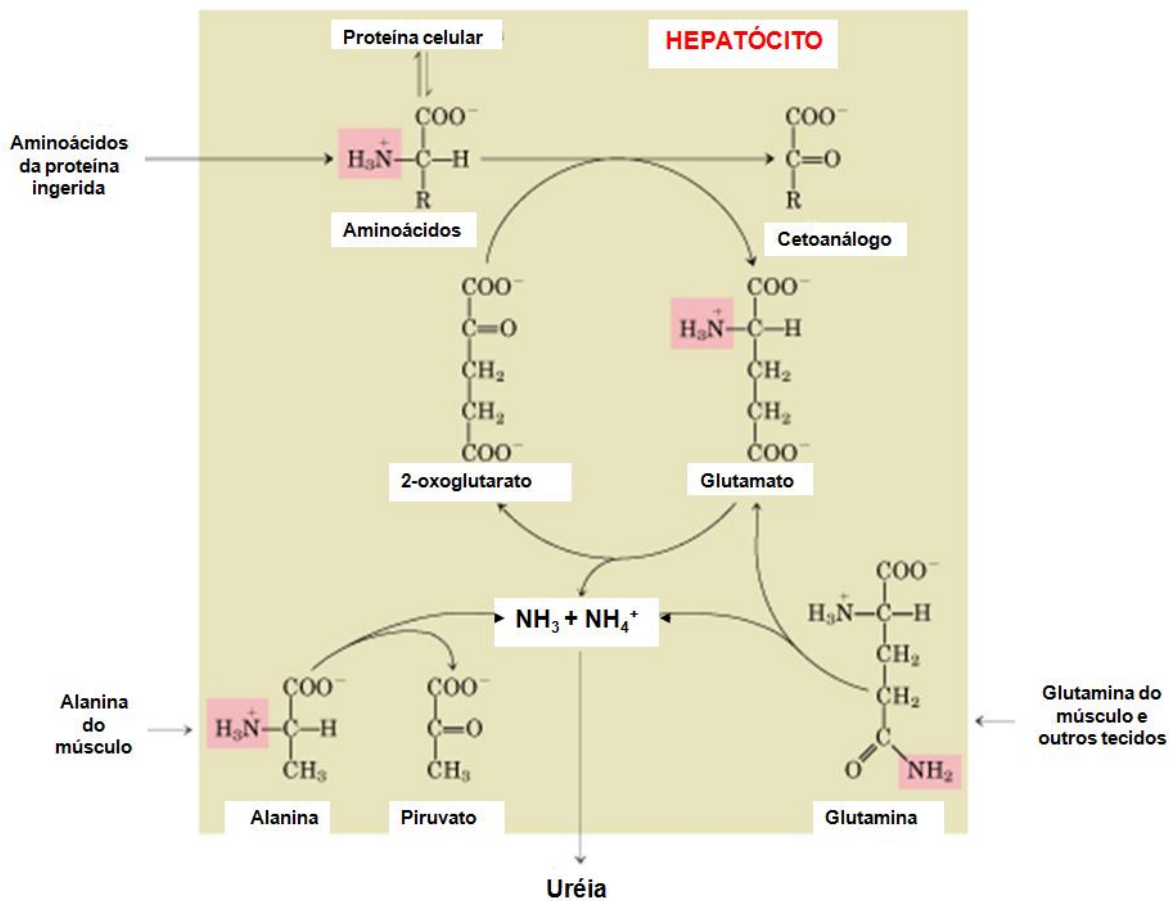


Figura 2. Catabolismo de aminoácidos no fígado de vertebrados. Grupo amino na cor rosa. Extraído e adaptado de Nelson e Cox, 2005.

Na verdade, quando os aminoácidos chegam ao citosol hepático, o primeiro passo no seu catabolismo é a remoção do grupo amino promovida pelas aminotransferases (também denominadas transaminases). Nessas reações de transaminação, o grupo amino é transferido para o carbono do 2-oxoglutarato, produzindo o respectivo α -cetoácido análogo (cetoanálogo) do aminoácido e Glu. O efeito das reações de transaminação é coletar o grupo amino de muitos aminoácidos diferentes na forma de apenas um, o Glu. Tais reações são reversíveis e podem ser usadas para sintetizar aminoácidos a partir do cetoanálogo (WAGENMAKERS, 1998b; NELSON; COX, 2005) (Figura 3). O uso dos cetoanálogos para tal finalidade é o centro de interesse nesse estudo e será melhor discutido no tópico I.IV.

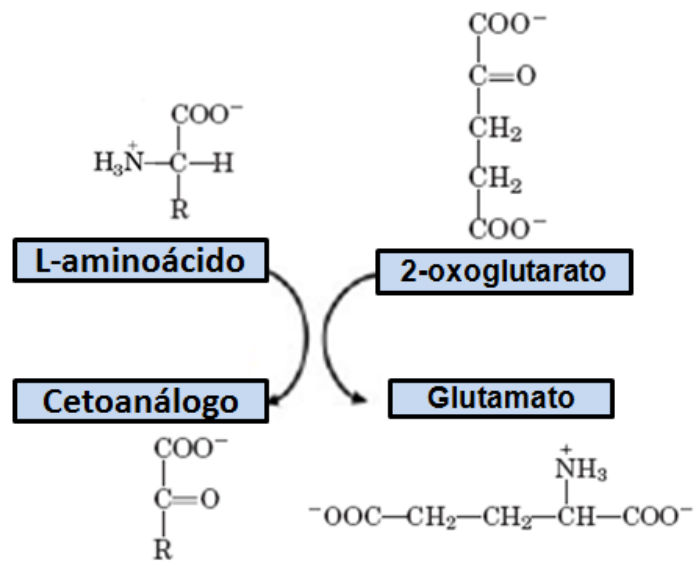


Figura 3. Reação de transaminação.

Nos hepatócitos, o Glu é transportado do citosol para o interior das mitocôndrias, onde sofre desaminação oxidativa pela glutamato desidrogenase (GDH) (presente apenas na matriz mitocondrial) e o resultado é a formação 2-oxoglutarato e amônia (NISSIM, 1999). A amônia é destinada a formação de uréia nas mitocôndrias dos hepatócitos, por meio do ciclo da uréia (SHAMBAUGH, 1977; WU, 2009) (Figura 4).

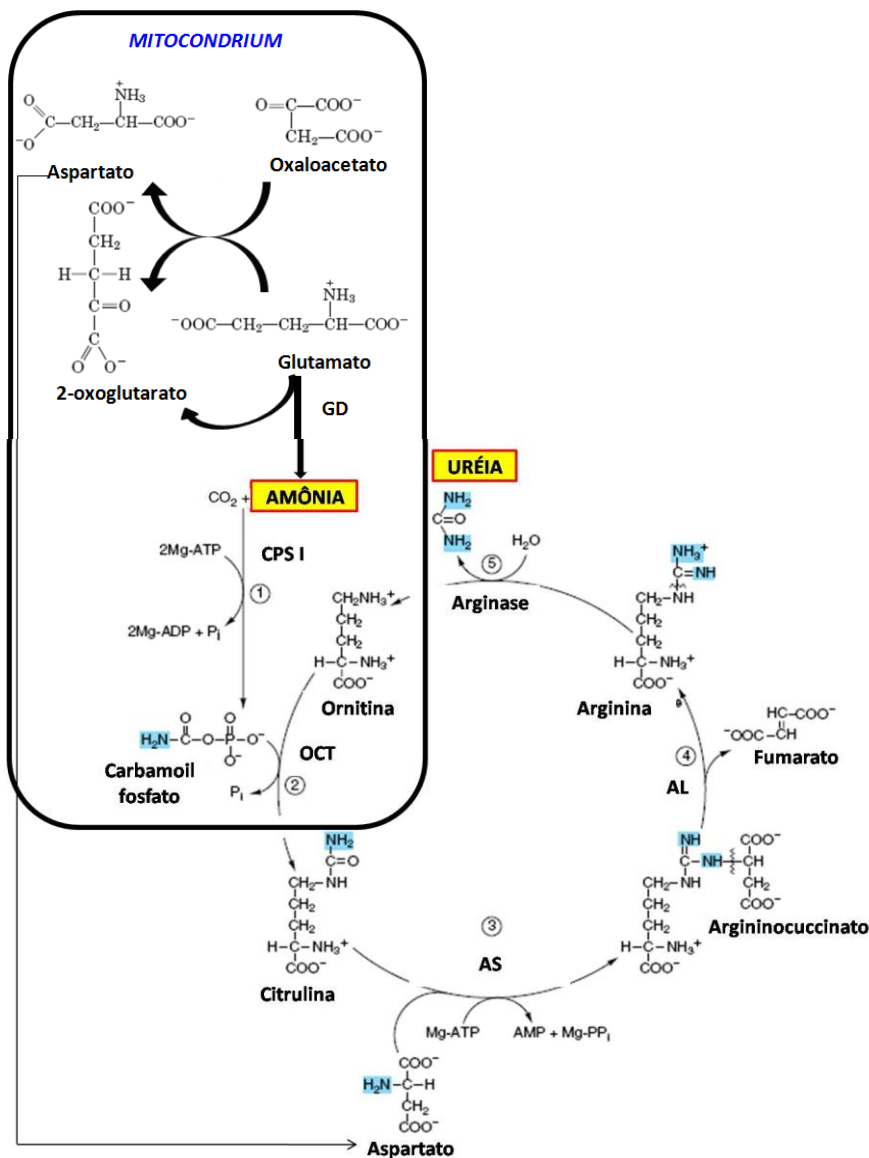


Figura 4. Ciclo da uréia. A uréia é produzida da amônia em cinco passos enzimáticos (Dois no interior da mitocôndria do hepatócito e três no citosol. Números indicam os passos. Grupos nitrogenados sombreados em azul contribuem para formação da uréia). GD: glutamato desidrogenase; CPS I: carbamoil fosfato sintetase I; OCT: ornitina transcarbamilase; AS: argininosuccinato sintetase; AL: argininosuccinato liase. Extraído e adaptado de Walker, 2009.

O fumarato, produzido na reação da argininosuccinato do ciclo da uréia, é também um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), assim, os ciclos da uréia e TCA encontram-se interconectados. Além disso, o fumarato pode ser convertido em outros intermediários do TCA, tais como o malato e o oxaloacetato. Além do fumarato, o aspartato (Asp), também promove uma interação entre os ciclos. Formado na mitocôndria por transaminação entre o oxaloacetato e o Glu, o Asp pode ser transportado para o citosol, onde serve como doador de nitrogênio na reação do ciclo da uréia catalisado pela argininosuccinato sintetase (SHAMBAUGH 1977).

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

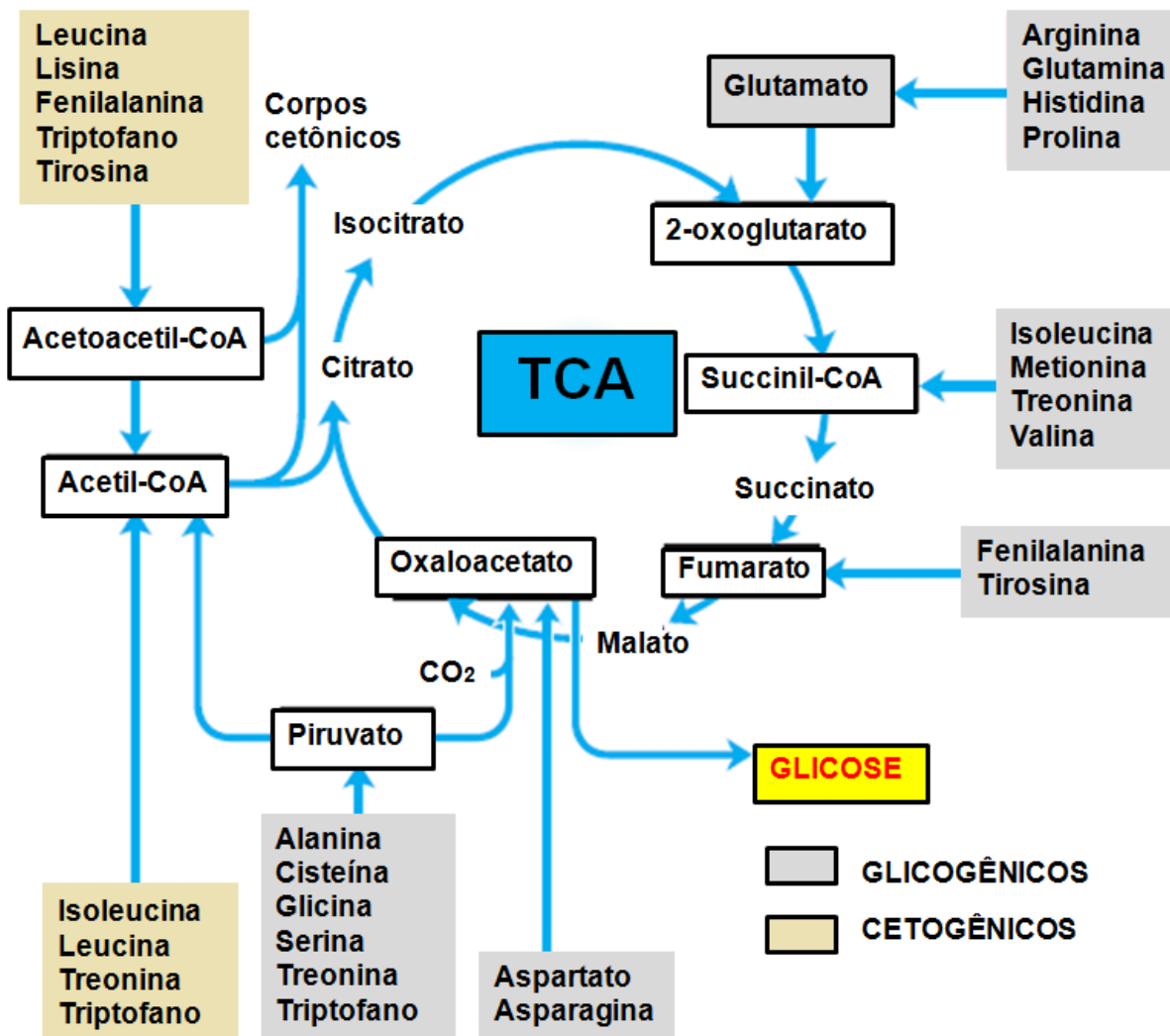


Figura 5. Destino catabólico dos aminoácidos via anaplerose. TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico. Extraído e adaptado de Nelson e Cox, 2005.

Como a amônia é tóxica, e também pode ser produzida em tecidos extra-hepáticos (músculo esquelético, por exemplo), esta precisa ser transportada desses tecidos para o fígado, através do sangue, para detoxicação (GRAHAM; MACLEAN, 1992). As concentrações plasmáticas de amônia na circulação sistêmica são controladas por processo coordenado, em que a maioria da amônia gerada nos tecidos extra-hepáticos é metabolizada a Gln (Figura 6). Neste caso, a Gln pode ser

o transportador de amônia na corrente sanguínea (HOLECEK, 2002; WU, 2009). Para isso, a amônia é combinada com o Glu, através da GS, para formar e liberar Gln. A Gln, uma forma não-tóxica de transporte da amônia, é transportada pelo sangue para o fígado e rins. No hepatócito é convertida em Glu e amônia, pela enzima glutaminase. O Glu formado, também é trabalhado pela GDH, liberando mais amônia e produzindo esqueletos de carbono que são utilizados como combustível metabólico (AMENT et al, 1997; WAGENMAKERS, 1998b).

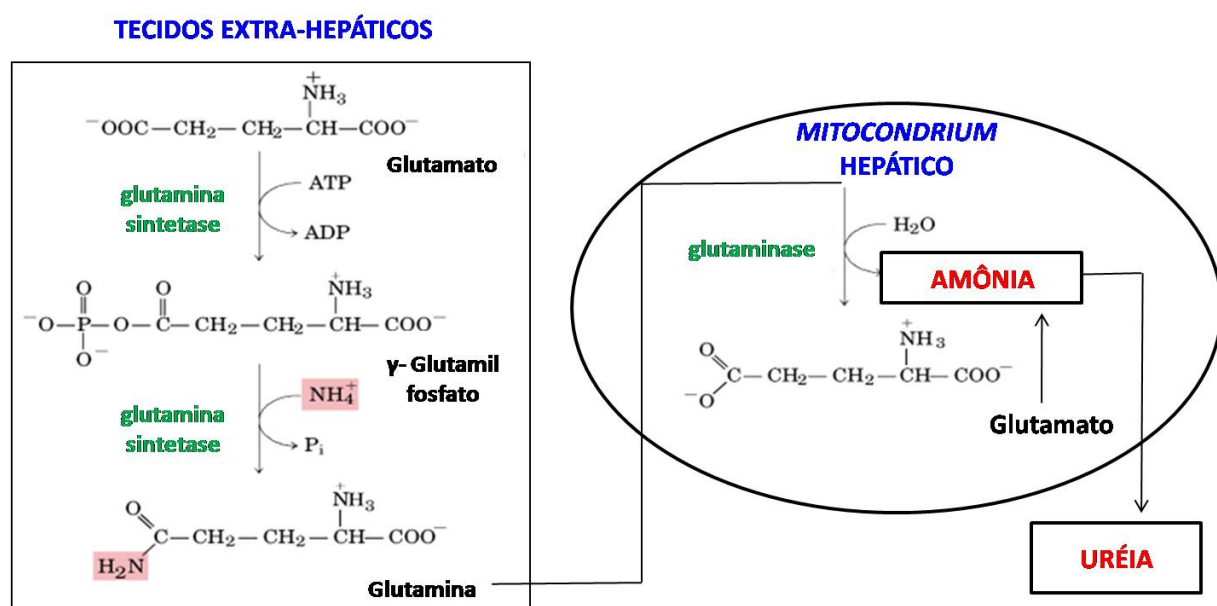


Figura 6. A glutamina transporta a amônia na corrente sanguínea.

A Ala também desempenha um papel especial no transporte de grupos amino para o fígado em uma forma não-tóxica (WAGENMAKERS, 1998a; SNOW et al, 2000) (Figura 7). Nos músculos, que degradam aminoácidos para empregá-los como combustível, os grupos amino são coletados por transaminação na forma de Glu (DESVERGNE; MICHALIK; WAHLI, 2006). O Glu pode ser convertido em Gln para ser transportado até o fígado ou transferir o seu grupo amino para o piruvato (cetoanálogo; produto final da glicólise) pela ação da alanina aminotransferase (ALT), formando Ala. A Ala formada é transportada pelo sangue até o fígado. No citosol dos hepatócitos, a ALT transfere o grupo amino da Ala para o 2-oxoglutarato, formando

Glu e piruvato (HOLECEK, 2002). O Glu pode entrar na mitocôndria e formar amônia ou sofrer transaminação com o oxaloacetato para formar Asp (doador de nitrogênio para formar uréia). Já o piruvato sofre gliconeogênese e forma glicose que pode retornar ao músculo, via corrente sanguínea, e ser utilizado na glicólise para fins energéticos (GRAHAM; MACLEAN, 1992). Como os músculos em contração vigorosa operam em anaerobiose, há uma produção, não apenas de amônia da quebra de proteínas, mas também piruvato e lactato da glicólise. Esses produtos precisam encontrar um caminho para o fígado (amônia para ser convertida em uréia e excretada; piruvato para formar nova glicose; e lactato para formar nova glicose por gliconeogênese) (DESERGNE; MICHALIK; WAHLI, 2006; MIZUSHIMA, 2007; WU 2009).

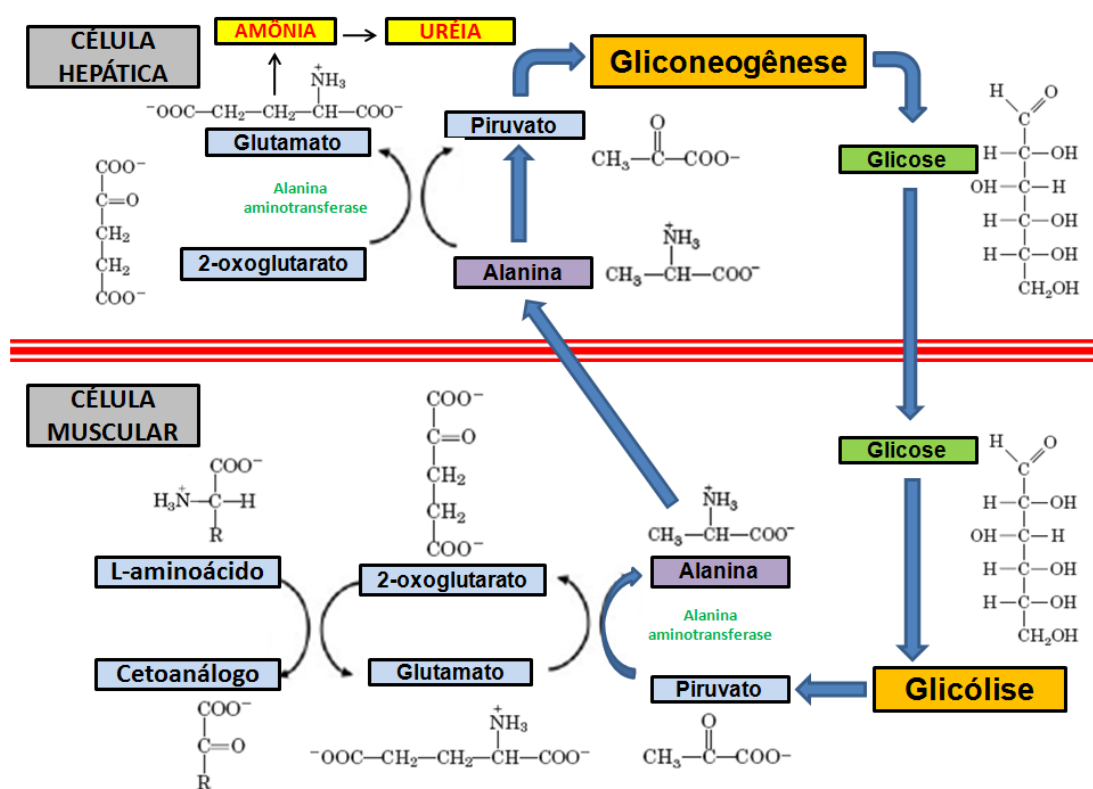


Figura 7. Ciclo alanina-glicose. Adaptado de Desvergne, Michalik e Wahli, 2006.

Apesar de o fígado ser o principal órgão envolvido no catabolismo de aminoácidos, três aminoácidos com cadeias laterais ramificadas (leucina, isoleucina

e valina), também denominados de BCAA, são oxidados como combustíveis, principalmente nos tecidos musculares, adiposo, renal e cerebral. Esses tecidos extra-hepáticos têm uma BCAA aminotransferase (BCAT) e uma α -cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase (BCKDH), que age em todos os três aminoácidos, contribuindo assim para a ressíntese de ATP (HAUSCHILDT; BRAND, 1980; HOLECEK, 2002; LAYMAN, 2002) (Figura 8). Para melhor revisão, consultar Shimomura et al (2006).

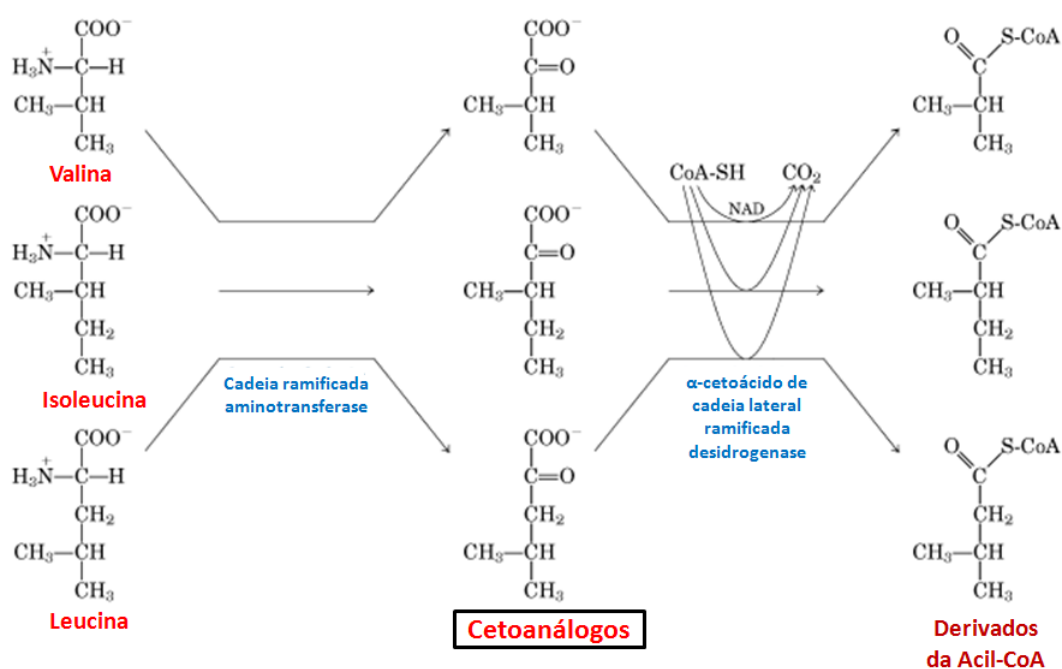


Figura 8. Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. Extraído e adaptado de Nelson e Cox, 2005.

Na primeira reação, catalisada pela BCAT, o grupo amino do BCAA é utilizado para formar Glu a partir de 2-oxoglutarato. Este Glu pode então formar Gln via GS ou Ala através da combinação com piruvato. Em determinada situação, como no caso de depleção de glicogênio muscular, o Glu pode reagir com o co-fator NAD^+ através da reação catalisada pela GDH, levando à formação de amônia (WAGENMAKERS et al, 1990) (Figura 9).

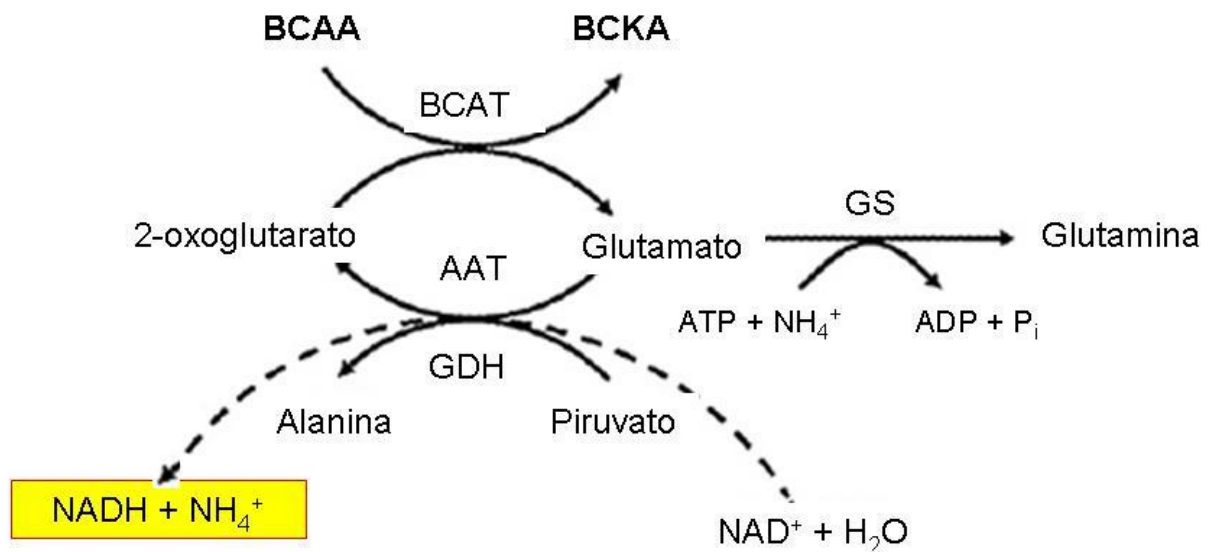


Figura 9. Ação da aminoácido cadeia ramificada aminotransferase (BCAT) no catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada; BCKA: cetoanálogos dos aminoácidos de cadeia ramificada; BCAT: aminoácido cadeia ramificada aminotransferase; AAT: alanina aminotransferase; GDH: glutamato desidrogenase; GS: glutamina sintetase; NAD⁺: nicotinamida adenina de nucleotídeo; NADH: hidrato de nicotinamida adenina de nucleotídeo. Extraído e adaptado de Wilkinson, Smeeton, Watt, 2010.

Na disponibilidade de piruvato, o grupo amino do Glu será doado para formar Ala. Contrariamente, na redução dos níveis de piruvato, tal como na depleção dos estoques de glicogênio muscular, o Glu reage com a NAD⁺, via GDH, produzindo elevadas concentrações de amônia. Em indivíduos com doença de McArdle (deficiência da miofosforilase que os torna incapazes de utilizar glicogênio como fonte de energia), a produção de amônia foi elevada durante o exercício, principalmente, por adotarem o catabolismo de BCAA com fonte alternativa de energia. Outra condição de maior depleção de glicogênio muscular é no final do exercício prolongado quando os níveis de piruvato podem está reduzidos e o metabolismo de BCAA está aumentado (WAGENMAKERS et al, 1990). Por outro

lado, a produção de amônia parece acontecer no início do exercício prolongado submáximo (60%-65% da potência máxima), mesmo na ausência de desaminação de AMP, sugerindo que amônia pode ser produzida pelo catabolismo de BCAA, independentemente da disponibilidade de glicogênio (VAN HALL et al, 1995).

A segunda reação é uma etapa limitante da taxa de catabolismo do BCAA que é controlada pelo complexo enzimático BCKDH. A atividade deste complexo é regulada por um ciclo de fosforilação-desfosforilação (SHIMOMURA et al, 2006). A conversão para sua forma fosforilada (forma inativa) é controlada pela BCKDH quinase, ao passo que a sua conversão para a forma desfosforilada (forma ativa) é controlada pela BCKDH fosfatase (SHIMOMURA et al, 2006). Em repouso, o complexo está sob a forma fosforilada e inativa, no entanto, durante o exercício, a atividade do complexo BCKDH pode aumentar em até quatro vezes no músculo humano (WAGENMAKERS et al, 1989) (Figura 10).

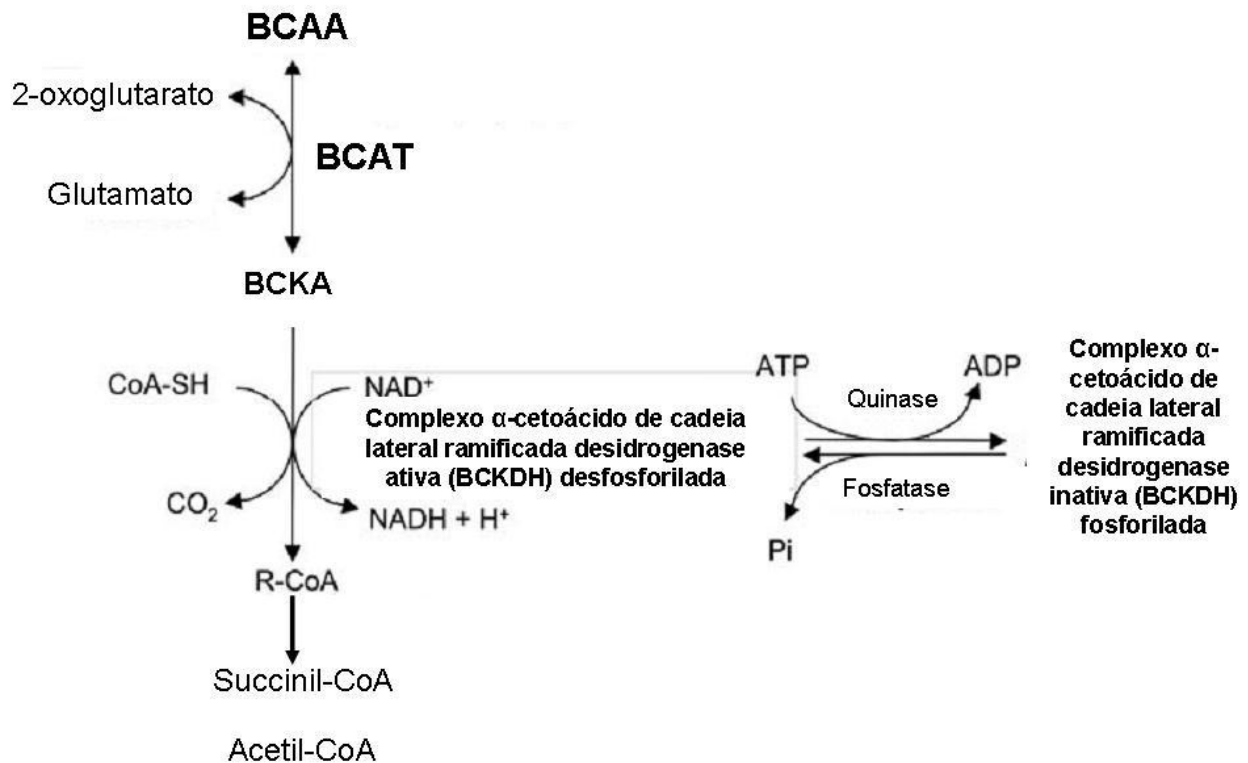


Figura 10. Ação do complexo α-cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase (BCKDH) sobre os cetoanálogos dos aminoácidos de cadeia ramificada. BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada; BCKA: cetoanálogos dos aminoácidos de cadeia ramificada; BCAT: aminoácido cadeia ramificada aminotransferase; BCKDH: complexo α-cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase CoA-SH: coenzima A na forma reduzida; R-CoA: Acil coenzima A. Extraído e adaptado de Shimomura et al 2006.

À medida que o exercício se prolonga, há um maior catabolismo de BCAA pelo músculo, via BCAT, desencadeando um aumento dos níveis de BCKA muscular. Níveis elevados de BCKA favorecem a inibição da BCKDH quinase (significa que há menor conversão para a sua forma fosforilada e inativa). Tal ação contribuirá para aumento da ativação do complexo enzimático BCKDH, que por sua vez, leva a um aumento no fluxo da via BCAT, aumentando assim, a disponibilidade de substrato para a produção elevada de amônia via GDH (WAGENMAKERS et al, 1990; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010). Além disso, vários outros tratamentos e

condições podem afetar o estado de atividade do complexo BCKDH quinase no músculo e fígado de ratos. Uma alimentação rica em proteína aumenta o estado ativo da BCKDH quinase no fígado de ratos (SHIMOMURA et al, 2006).

c. Ciclo das purinas nucleotídeos

Existem duas grandes fontes de produção de amônia no músculo esquelético: catabolismo de aminoácidos como visto anteriormente, e o ciclo das purinas nucleotídeos (PNC), uma forma extrema de aproveitamento energético pelo músculo esquelético (BROBERG; SAHLIN, 1989). O acúmulo de adenosina difosfato (ADP), AMP e H^+ , estimulam a AMP deaminase. Esta enzima, através do processo de hidrólise, deamina a AMP, levando ao aumento das concentrações intracelulares de inosina monofosfato (IMP) e amônia (SAHLIN; TONKONOGI; SÖDERLUND, 1998). Em condições de concentrações normais de ATP, guanosina trifosfato (GTP) e aumento na concentração de P_i , o IMP é reaminado pela entrada de Asp e GTP catalizado pela adenilsuccinato sintetase formando adenilsuccinato, podendo fornecer fumarato, alimentando o TCA. Tais eventos estão associados com a velocidade de desaminação da AMP (GRAHAM; MACLEAN, 1992).

A AMP também pode ser desfosforilada a adenosina pela ação da enzima 5' nucleotidase, que é deaminada a inosina pela ação da adenosina deaminase. Devido a incapacidade de o músculo reverter a síntese de inosina, esta é transformada em hipoxantina, xantina e deixa o músculo para ser metabolizada nos hepatócitos formando urato (HELLSTEN et al, 1999) (Figura 11). Vale ressaltar que o PNC também possui outras funções tais como: manutenção da alta taxa ATP/ADP e reabastecimento dos intermediários do TCA (SAHLIN; TONKONOGI; SÖDERLUND, 1998).

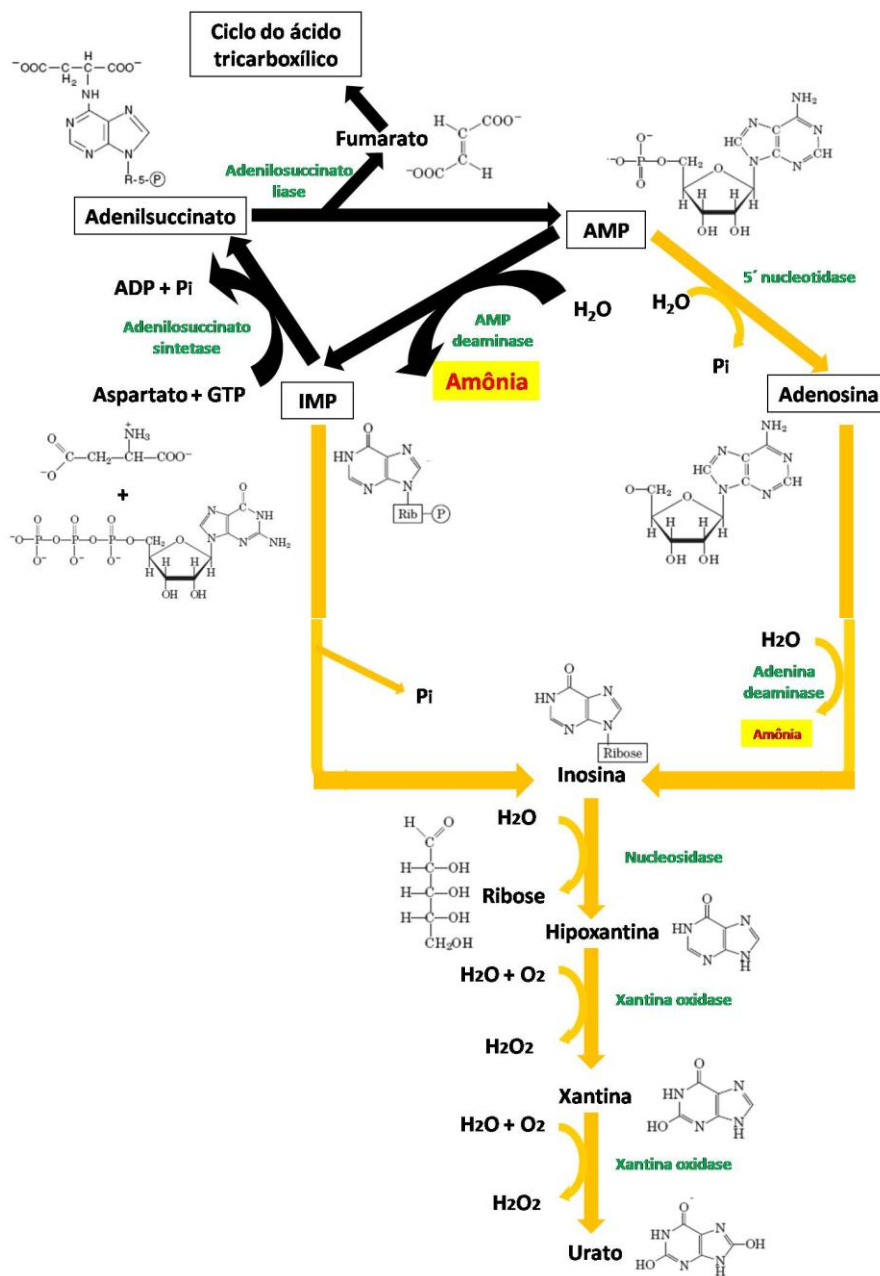


Figura 11. Intermediários metabólicos na gênese de amônia e urato. O ciclo das purinas nucleotídeos é demonstrado pelas setas pretas.

d. Cafeína como auxílio ergogênico e modificador no estudo do metabolismo nitrogenado

A lista dos possíveis recursos ergogênicos é longa, mas poucos realmente possuem tal propriedade (WILLIAMS, 1992). A cafeína é um componente ativo, farmacologicamente, produzindo efeitos em tecidos e órgãos do corpo, considerada um auxílio ergogênico, porém, liberada pela World Anti-Doping Code (WADA) desde 2004.

A cafeína é uma 1,3,7-trimetilxantina metabolizada no fígado onde suas vias metabólicas primárias envolvem reações de desmetilação para formar três dimetilxantinas: paraxantina, teobromina, e teofilina. A xantina é considerada uma droga psicoativa e, provavelmente, um dos estimulantes mais usados no esporte por causa de seu baixo custo e mínimos efeitos colaterais (WILLIAMS, 1992; SPRIET, 1995). Experimentos bem-controlados confirmam que cafeína pode de fato ser um ergogênico para várias atividades atléticas, envolvendo tipos de exercícios prolongados e de força (GRAHAM, 2001; JUHN, 2003; SPRIET; GIBALA, 2004; TARNOPOLSKY, 2008).

A melhoria do desempenho, através do uso da cafeína, ocorre com a administração de doses orais que variam entre 3-9 mg.kg⁻¹, especialmente no exercício prolongado, que pode ser explicado, por vários mecanismos orgânicos (JUHN, 2003; MAGKOS; KAVOURAS, 2005). O mecanismo de ação mais relevante em termos fisiológicos com o uso da cafeína é, provavelmente, funcionar como antagonista dos receptores de adenosina (FREDHOLM et al, 1994; GRAHAM et al, 2008). Porém, as evidências sugerem que, pelo menos sob determinadas condições, outros mecanismos bioquímicos também podem ser importantes, tais como: liberação de cálcio para contração muscular; inibição de isoenzimas fosfodiesterases; inibição de enzimas glicogênio fosforilase; e, estimulação da bomba de Na⁺/K⁺ (GRAHAM, 2001; MAGKOS; KAVOURAS, 2005).

Embora haja pouca evidência para apoiar a hipótese de que a cafeína favoreça uma maior oxidação de gordura (GRAHAM et al, 2008), ainda tem sido comumente proposto o seu uso para tal finalidade, além de proporcionar uma

inibição da oxidação de carboidratos. Esta ação tem sido sugerida como resultado de uma redução na dependência dos estoques de glicogênio muscular para gerar ATP durante o exercício, o que conseqüentemente, pouparia glicogênio nos tecidos hepático e muscular (SPRIET, 1992; MAGKOS; KAVOURAS, 2005).

Considerando a sugestão de que uma elevada concentração de amônia no sangue promove a fadiga central e periférica, e que um melhor controle de produção de amônia melhoraria o desempenho do exercício (BANISTER; CAMERON, 1990; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010), a relação entre os efeitos da cafeína sobre o desempenho e amonemia ainda não foi estudada.

e. Amônia e toxicidade

O aumento da amonemia pode ser resultante de desordens enzimáticas do ciclo da uréia, tais como na ornitina transcarbamilase (OCT), responsável pela etapa de conversão de ornitina em citrulina, ou ainda por lesão hepática, provocada por ingestão de toxinas (inclusive etanol), infecções virais ou doenças auto-imunes (COOPER, 2001; KELLY; STANLEY, 2001). O fígado metaboliza amônia em uréia e a redução da capacidade de remoção do metabólito tóxico, associada a desordens do ciclo da uréia ou lesão hepática, resulta em amonemia elevada (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002a; WALKER, 2009). Embora algumas questões não estejam claras, o exercício físico também pode promover uma elevação da amonemia, aumentando a toxicidade cerebral e muscular, induzindo fadiga central e periférica (BANISTER; CAMERON, 1990; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010).

O aumento das concentrações plasmáticas de amônia promove efeitos deletérios no CNS e apresenta um importante papel na patogênese da encefalopatia hepática (EH). Nessas condições, a amônia pode levar a edema cerebral, convulsões e coma (SCHLIESS; GÖRG; HÄUSSINGER, 2009; TIMMERMANN et al, 2005). Modelos animais de insuficiência hepática desenvolvem amonemia aumentada e EH que estão associados com mudanças bioquímicas, fisiológicas e moleculares. As concentrações aumentadas de amônia no cérebro resultam em

alterações no metabolismo que afetam atividades de enzimas importantes, como a glutaminase, GS e GDH (BOSOI; ROSE, 2009).

Tradicionalmente, alguns dos efeitos deletérios incluem alterações no metabolismo energético dos neurônios, com menor capacidade de gerar ATP; e no funcionamento dos astrócitos (CHAN et al, 2000; FELIPO; BUTTERWORTH, 2002b). Modificações no metabolismo energético parecem ser explicadas pela inibição do TCA via α -cetoglutarato desidrogenase (α KGDH) que é escoado a Glu ou ácido gama amino-butírico (GABA) e aumento da atividade glicolítica, demonstrada pela maior atividade da fosfofrutoquinase (PFK) e dos transportadores de glicose (GLUT-1), como também, pela maior produção de lactato, não permitindo assim, um acesso adequado do piruvato para o TCA. Outra explicação seria pelo aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase provocado pela hiperatividade dos receptores de *N*-metil-*D*-aspartado (NMDA) que funcionam como canais de Ca^{2+} , que levaria a uma maior depleção da ATP (HERTZ et al, 2000; COOPER, 2001). Já os astrócitos seriam alterados morfológicamente, através do inchamento (swelling) que desencadearia um aumento da pressão intracraniana (CHAN et al, 2000; KELLY; STANLEY, 2001).

De acordo com Bosoi e Rose (2009), a amônia pode oferecer um efeito direto sobre a função celular (Figura 12). Recentemente, surgiram vários outros fatores que parecem desempenhar papéis importantes na toxicidade da amônia no CNS em geral, e em astrócitos particularmente (Figura 13) (NORENBERG; RAMA RAO; JAYAKUMAR, 2009; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010).

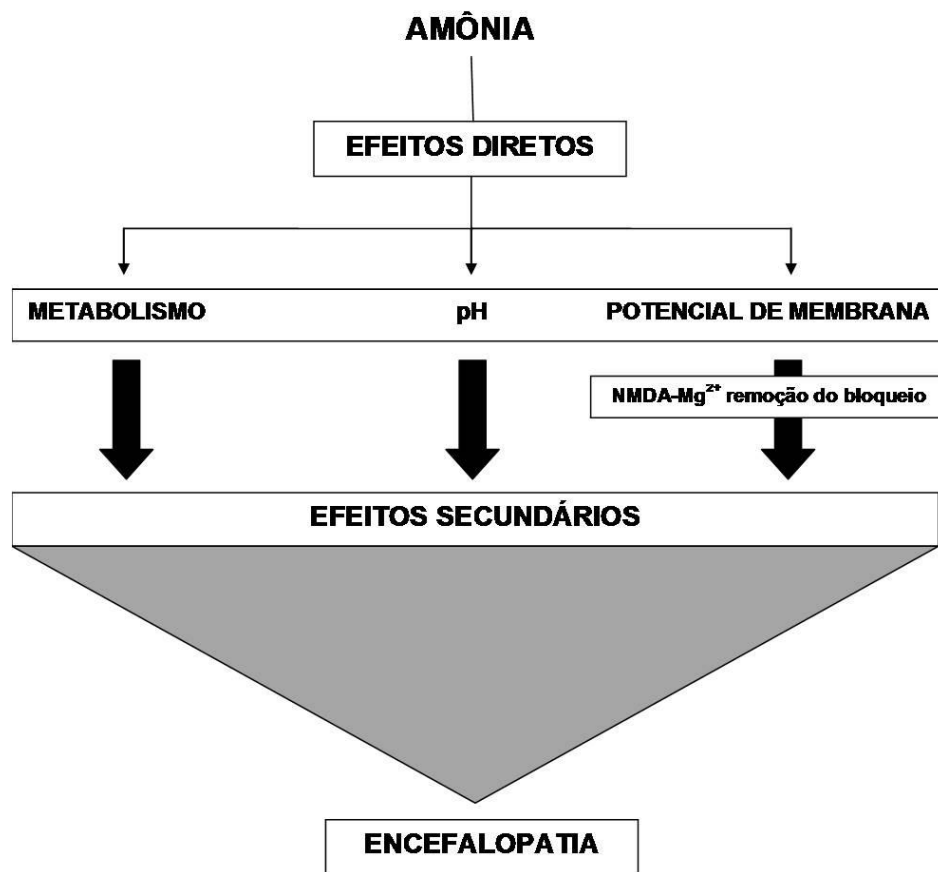


Figura 12. Efeito direto da amônia leva a efeitos secundários. Extraído e adaptado de Bosoi e Rose, 2009.

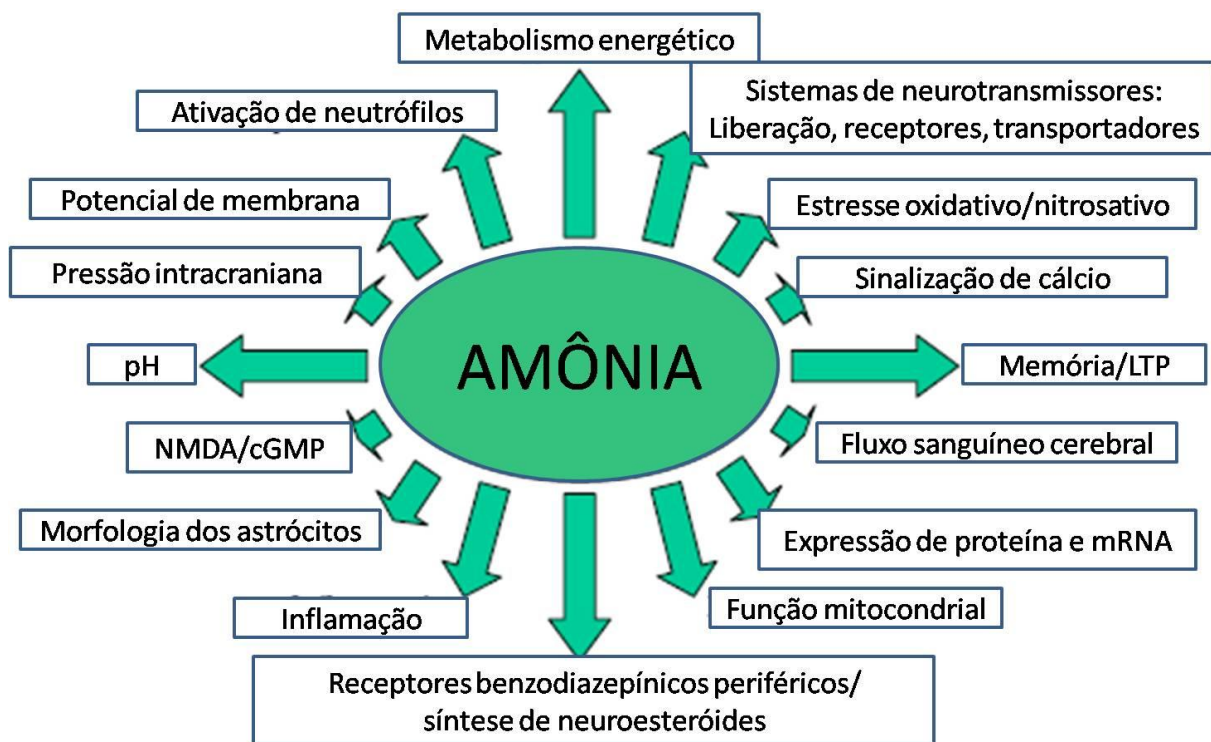


Figura 13. Efeitos cerebrais devido à toxicidade da amônia. Extraído e adaptado de Bosoi e Rose, 2009.

Os mecanismos pelos quais concentrações elevadas de amônia exerce sua neurotoxicidade ainda não estão bem esclarecidos. Considerando que um aumento da amonemia desencadeada por uma insuficiência hepática contribui para o desenvolvimento de um edema cerebral, pacientes com cirrose e EH, normalmente não apresentam sinais clínicos de um edema cerebral e ostensivo aumento da pressão intracraniana (SCHLIESS; GÖRG; HÄUSSINGER, 2009). Além disso, observações clínicas não demonstram uma consistente correlação entre a concentração plasmática de amônia e a manifestação dos sintomas da EH. (ZWINGMANN et al, 2003; SHAWCROSS et al, 2005). No entanto estratégias para redução de uma amonemia elevada continuam a ser um processo chave de abordagem terapêutica (NORENBERG; RAMA RAO; JAYAKUMAR, 2009; BOSOI; ROSE, 2009).

f. Concentrações plasmáticas da amônia

A amônia produzida é transportada entre os órgãos pela corrente sanguínea (CÓRDOBA; MÍNGUEZ, 2008). Indivíduos saudáveis e em repouso, apresentam uma concentração de amônia relativamente baixa nos líquidos corporais e teciduais (SAHLIN, 1994) (Tabela 1). Já portadores de doenças hepáticas crônicas, com falência hepática aguda ou com grave pressão intracraniana, demonstram um aumento acentuado da amonemia (CLEMMENSEN et al, 1999; CLEMMENSEN; KONDRUP; OTT, 2000; OLDE DAMINK et al, 2002) (Tabela 2).

Tabela 1. Concentração de amônia e pH em fluidos e tecidos corporais em condição basal

	Plasma	Eritrócitos	Miócitos	Suor
Amônia ($\mu\text{mol/L}$)	27 ± 3	194	140	827 ± 33
pH	7,4	7,2	7,0	4-6,8

Tabela 2. Concentração de amônia em doenças hepáticas

Humanos	Amônia (μM)	Referências
Cirrose hepática	60-80	Clemmesen et al. 2000.
Doença aguda hepática	90-120	Olde Damink et al. 2002.
Falência hepática	150-180	Clemmesen et al. 2000.
Falência hepática e grave pressão intracraniana	~ 340	Clemmesen et al. 1999.

Durante o exercício físico, surgem vários produtos do metabolismo energético, entre os quais a elevação da amonemia, que é suportada devido a uma proteção por mecanismos ainda desconhecidos (SAHLIN, 1994) (Tabela 3). Entretanto níveis elevados do metabólito podem provocar efeitos negativos no desempenho físico (MUJIKÁ et al, 2004; NYBO et al, 2005). Assim, durante o exercício físico,

mecanismos de detoxicação devem ser utilizados (HIRAI et al, 1995; YUAN et al, 2002).

Tal produção pode levar a níveis elevados significativos de amônia sistêmica (90 e > 200 $\mu\text{mol/L}$) (HELLSTEN et al, 1999; NYBO et al, 2005). Este são níveis de três a dez vezes maiores do que níveis comumente observados em indivíduos saudáveis em repouso que pode variar de 20-80 $\mu\text{mol/L}$ (VAN HALL et al, 1995). As únicas condições semelhantes de níveis elevados de amonemia somente são observadas na presença de certas complicações patológicas (como a EH), que acredita-se, podem causar deteriorações graves à saúde e bem estar.

Tabela 3. Concentração de amônia em fluidos e tecidos corporais em diferentes intensidades de exercício físico

	Plasma	Eritrócitos	Miócitos	Suor
Exercício a 75-80% $\text{VO}_2\text{máx}$ até fadiga ou por 30min				
Amônia ($\mu\text{mol/L}$)	170 $\pm$ 29	337	566	7.140 $\pm$ 768
Exercício a 100% $\text{VO}_2\text{máx}$ até a fadiga				
Amônia ($\mu\text{mol/L}$)	120 $\pm$ 18	392	1.354	X

I.II. Exercício físico e amônia

Qualquer forma de exercício físico executado por um indivíduo intensifica diferentes vias metabólicas produtoras de ATP. Essas vias serão ativadas de acordo com a duração e a intensidade adotada (COYLE, 2000). O catabolismo de aminoácidos, pode se tornar uma importante fonte energética, principalmente se os estoques de carboidratos estiverem reduzidos (BLOMSTRAND; SALTIN, 1999; GRAHAM; ADAMO, 1999). A degradação de aminoácidos eleva a produção de amônia, principalmente, se os níveis musculares e hepáticos de glicogênio estiverem baixos (BROBERG; SAHLIN, 1988; ROEYKENS et al, 1998; SNOW et al, 2000). Porém, o próprio exercício físico pode favorecer a um aumento da amonemia. A

magnitude de sua produção depende da intensidade do exercício (GRAHAM; MACLEAN, 1992; GRAHAM; BANGSBO; SALTIN, 1993). Assim sendo, é possível acreditar que o consumo e acúmulo de amônia, via barreira hematoencefálica, durante o exercício, proporcione distúrbios motores e/ou cognitivos que levem a um processo de fadiga (WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010).

Acredita-se que uma redução da amonemia elevada, proporcionada pelo exercício, melhora o desempenho retardando a fadiga, e existem numerosas intervenções distintas usadas para reduzir o aumento desse metabólito no exercício, tais como o uso de suplementos nutricionais (BANISTER; CAMERON, 1990; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010).

g.Exercício físico de curta duração e alta intensidade e amônia

A elevação da amonemia induzida pelo exercício físico intenso é frequentemente associada a um maior estresse energético causado pelo desequilíbrio entre o suprimento e a demanda de ATP (SAHLIN; TONKONOGLI; SÖDERLUND, 1998). Assim, parece que durante um exercício de alta intensidade, a maior fonte é dada pela desaminação do AMP, pois a taxa de utilização de ATP, no músculo esquelético, é maior do que a taxa de ressíntese causando um acúmulo de ADP e AMP. Para evitar um acúmulo de AMP dentro da célula, esta é deaminada em IMP com liberação de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ livre (HELLSTEN et al, 1999; ZHAO et al, 2000; SCHUZ; HECK, 2003). O IMP resultante, como já comentado, será degradado em hipoxantina e urato, representantes finais do metabolismo das purinas (ZIELINSKI et al, 2009).

Uma contração muscular intensa desencadeia uma maior hidrólise da ATP em ADP, P_i e H^+ , podendo levar a uma menor ressíntese da ATP pela CP (catalisada pela creatina quinase) e um acúmulo de ADP (MUTCH; BANISTER, 1983). Uma concentração elevada de ADP promove a ativação da mioquinase, enzima responsável pela síntese de ATP e AMP a partir de ADP. A relação entre as concentrações de ATP, ADP e AMP é importante na regulação do metabolismo, sendo assim a produção de AMP pela mioquinase deve ser equilibrada, isso ocorre a

partir da ativação da AMP deaminase que leva a uma maior produção de IMP, amônia e urato (BROBERG; SAHLIN, 1989; KUIPERS, 1998) (Figura 14). A fase de reaminação ocorre durante o repouso, quando é cessada a atividade intensa da hidrólise da ATP (GRAHAM; MACLEAN, 1992). Porém, outra possibilidade, é que no exercício intenso, aproximadamente 50%-60% da AMP deaminase torna-se ligada a miofibrila, causando uma maior degradação de AMP para IMP. Tal reação estimularia a ação da adenilato quinase (mioquinase), favorecendo a formação de ATP pelo ADP para aumentar a disponibilidade de energia e manter a contração muscular intensa (WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010).

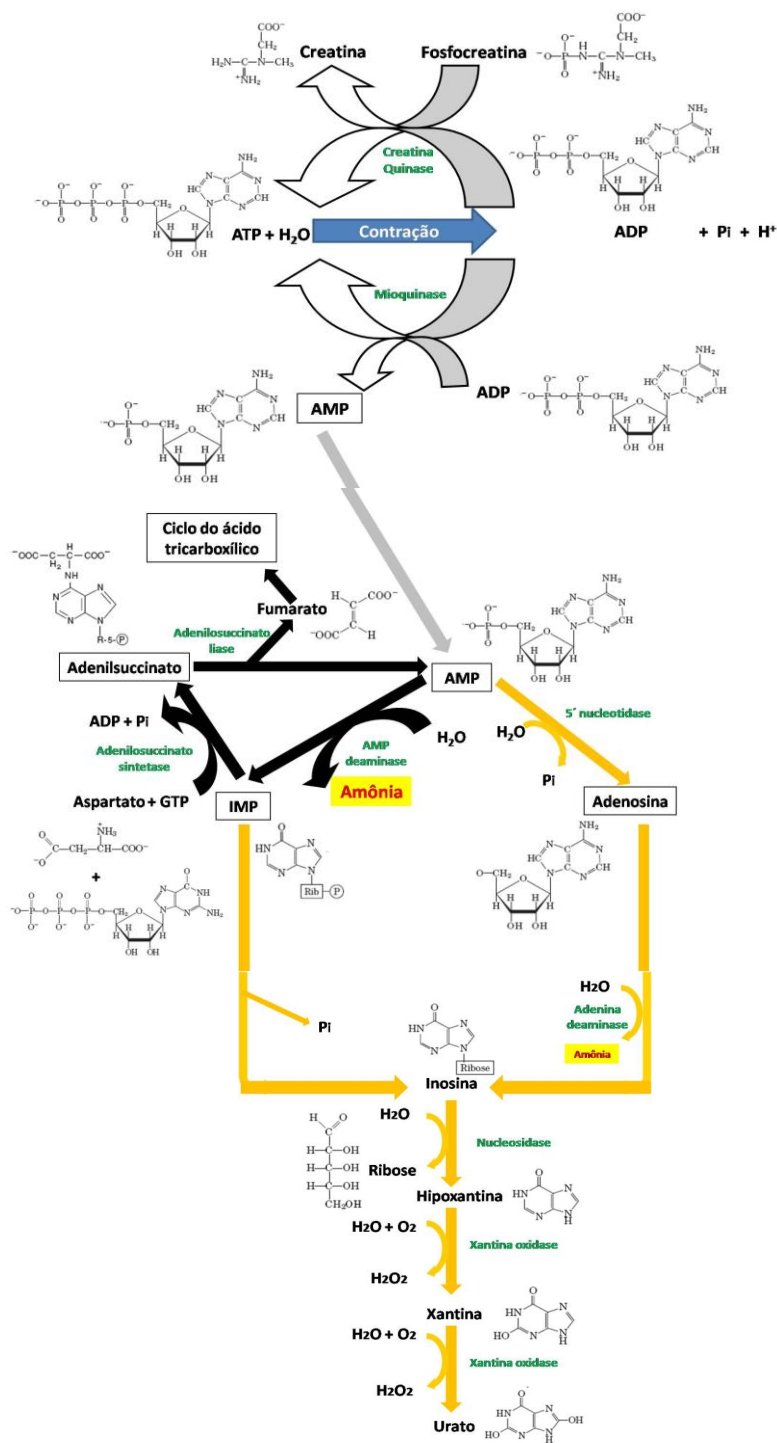


Figura 14. Vias da perda de adenina nucleotídeo no músculo esquelético em contração intensa, com formação de amônia e urato.

A diminuição do pH da célula muscular durante um exercício intenso, também constitui um fator para a ativação da AMP deaminase. Este efeito é pronunciado em fibras de contração rápida, pois estas são mais sensíveis às mudanças de pH e tem maior capacidade de desaminação de AMP (DUDLEY; TERJUNG, 1985; JANSSON et al, 1987; TULLSON et al, 1996).

Parte da amônia é incorporada ao Glu pela GS que o converte em Gln e esta é liberada pela célula muscular (AMENT et al, 1997; WAGENMAKERS, 1998a). Parte da amônia difunde-se livremente através das membranas celulares, participando em diversas reações enzimáticas nas células do CNS (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002a). A hipoxantina é convertida em urato no fígado, liberando-a na circulação sanguínea e, posteriormente, excretada pelos rins (STATHIS et al, 1999).

A queda do desempenho com repetidos movimentos muscular é causada pela redução de PC, aumento de H^+ , prejuízo na função do retículo sarcoplasmático ou alguma fadiga induzida por um agente ainda desconhecido (HARGREAVES et al, 1998; DAHLSTEDT et al, 2000; WESTERBLAD; ALLEN; LÄNNERGREN, 2002; ROBERGS; GHIA SVAND; PARKER, 2004). Acredita-se que o acúmulo progressivo de amônia possa causar fadiga (BANISTER; CAMERON, 1990).

Aumentos nos níveis sanguíneos de amônia durante um exercício de alta intensidade, contínuos ou intermitentes, são bem demonstradas na literatura (ROEYKENS et al, 1998; SAHLIN; TONKONOGLI; SÖDERLUND, 1998; HELLSTEN et al, 1999; OGINO et al, 2000; OHKUWA et al, 2001; FISCHER et al, 2007; LACERDA et al, 2007; LIU et al, 2009). Aumento da amonemia plasmática foi verificado em 15 jogadores amadores de rugby durante um jogo dessa modalidade (ALVEAR-ORDENES et al, 2005). O mesmo foi observado em nadadores após testes de alta intensidade (TOUBEKIS; DOUDA; TOKMAKIDIS, 2005). Ament et al (1997) verificaram concentrações de ~200 $\mu\text{mol/L}$ de amônia e ~10 mmol/L de lactato sanguíneos em 10 indivíduos durante um teste máximo no cicloergômetro pedalando por 3,5 minutos a 0, 50, 100, 150 e 200W de carga. Ravier et al (2009) observaram concentrações da amonemia de ~160 $\mu\text{mol/L}$ após aplicação de teste máximo em dois grupos de karatecas submetidos a formas distintas de treinamento. De acordo

com Secher, Seifert e Van Lieshout (2008), durante um exercício intenso, a desoxigenação arterial, ao lado do calor, redução da tensão arterial de CO₂ e acúmulo de amônia desafiam a capacidade cerebral de controlar o trabalho muscular, prejudicando o desempenho.

h.Exercício físico prolongado e amônia

Em atividades de baixa intensidade (inferior a 50% do VO₂máx) ocorre pequena liberação de amônia pelo músculo, quando comparada com atividades intensas, em que há um aumento significativo do metabólito e cuja liberação pelo músculo é proporcional ao aumento de suas concentrações neste tecido (SAHLIN, 1994). Porém, a concentração de amônia aumenta substancialmente em atividades prolongadas entre 70% a 80% do VO₂máx. Nessas condições, as fontes de amônia podem ser devido à desaminação da AMP pelo aumento da atividade da AMP deaminase, mas parece que sua produção ocorre principalmente pelo catabolismo de aminoácidos (KATZ et al, 1986; HELLSTEN et al, 1999; SNOW et al, 2000; FEBBRAIO, 2001). Apesar disso, o consenso atual é que a produção de amônia durante o exercício ocorre por meio, tanto da desaminação da AMP quanto pelo metabolismo de BCAA, que são ativadas de forma dependente da intensidade e duração.

Durante o exercício, o músculo é a principal fonte de produção de amônia. Se este for prolongado os aminoácidos podem contribuir com 5% a 10% do total de energia utilizado proveniente de reações anapleróticas ou neoglicogênicas (WAGENMAKERS, 1998b; BOWTELL et al, 2007). Os BCAA são os aminoácidos mais oxidados pelo músculo esquelético, apesar do envolvimento metabólico de outros aminoácidos como a Ala, Glu e Asp. O grupo amino é transferido para o 2-oxoglutarato via BCAT para formar Glu e o cetoanálogo dos BCAA que pode ser oxidado no músculo ou transportado para oxidação hepática. O Glu pode ser convertido em Ala ou Gln ou ainda ser desaminado via GDH para produzir amônia e 2-oxoglutarato. O Glu ainda pode participar de uma reação de transaminação com o

oxaloacetato para formar 2-oxoglutarato e Asp. Este último pode ser desaminado pelo PNC (GRAHAM; MACLEAN, 1992) (Figura 15).

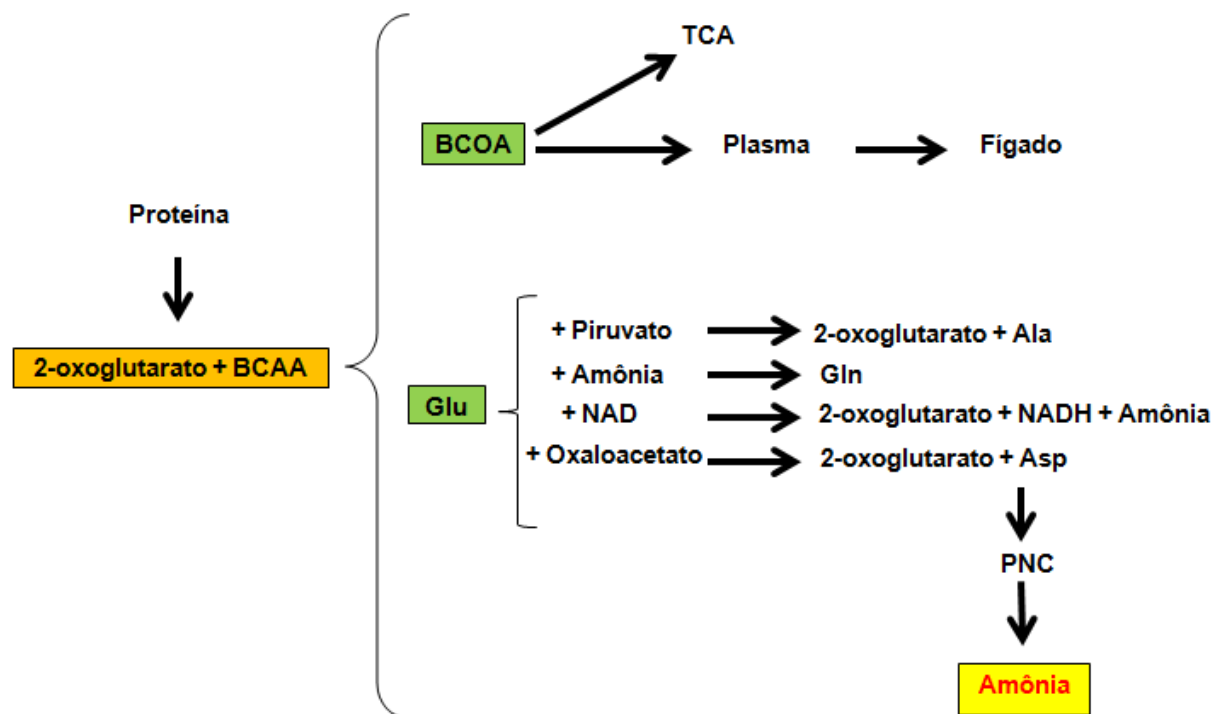


Figura 15. Possíveis vias do catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e seu grupo amino no músculo esquelético. BCOA: α-cetoácido análogo dos BCAA; TCA: Ciclo do Ácido Tricarboxílico; PNC: Ciclo das Purinas Nucleotídeos; NAD e NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada e reduzida, respectivamente; Glu: glutamato; Gln: glutamina; Ala: alanina; e, Asp: aspartato. Extraído e adaptado de Graham e MacLean, 1992.

Estudos vêm demonstrando a relação amônia, exercício e fadiga (LEPERS et al, 2002; MUJIKÁ et al, 2004; AMENT; VERKERKE, 2009) e outras alterações bioquímicas relacionadas a amônia. Mensurando as respostas fisiológicas de 11 homens treinados (~20 anos de idade), submetidos a um teste em cicloergômetro até a exaustão, verificou-se um aumento progressivo da amonemia, atingindo $184,4 \pm 51,8 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ de amônia sanguínea no final do teste (BARON et al, 2008). Fallon

et al (1999), investigando alterações bioquímicas relacionadas com lesões hepáticas e musculares em participantes de uma ultramaratona de 1600 km, observaram aumento significativo em diversas variáveis bioquímicas e enzimáticas tais como: uréia, fosfatase alcalina, ALT, aspartato desidrogenase aminotransferase, lactato, creatina quinase, bilirrubina, proteínas totais, albumina, glicose, cálcio e fosfato. Os níveis de uréia antes da corrida eram de $5,7 \pm 1,1$ mmol/L e aumentaram para $9,3 \pm 2$ mmol/L no quarto dia de competição.

A uréia constitui a fração de nitrogênio não protéico mais importante na maioria dos líquidos biológicos e é proveniente da conversão da amônia nas mitocôndrias dos hepatócitos (WALKER, 2009). As determinações do conteúdo de uréia no sangue têm sido utilizadas por causa da relação existente entre a concentração de uréia e a velocidade de catabolismo das proteínas. Concentrações elevadas podem sinalizar uma possível aceleração do catabolismo das proteínas musculares, como no exercício prolongado (TIPTON; WOLFE, 1998). Atletas geralmente exibem altas concentrações de uréia em repouso, provavelmente como um resultado do estresse contínuo do treinamento ou após um exercício intenso. Esses valores mais elevados podem ser explicados pela redução do fluxo sanguíneo renal (consequência da queda na taxa de filtração glomerular), ou ainda, pela deficiência de volume de fluidos e/ou aumento do catabolismo de proteínas (WARBURTON et al, 2002).

A neurobiologia do exercício físico tem estudado, principalmente, os aspectos que envolvem a fadiga central. Alguns dos mecanismos associados a deficiência da ativação voluntária de neurônios motores durante o exercício extenuante prolongado incluem o aumento dos níveis da serotonina e amônia (DISHMAN et al, 2006). Durante o exercício prolongado, a percepção de esforço e o dano na contração muscular, estão relacionados com acúmulo de amônia no cérebro, promovidas por perturbações circulatórias (SECHER; SEIFERT; LIESHOUT, 2008). Por outro lado, Friedmann et al (2007) verificaram uma diminuição significativa da concentração pico de amônia capilar em triatletas quando em situação de exercício e hipóxia em relação a uma condição de normoxia (97 ± 52 vs 121 ± 44 μ mol/L, $P = 0,032$). Provavelmente, a diminuição dos níveis sanguíneos de amônia em hipóxia pode ser

explicada pela redução significativa do tempo de exaustão e a concomitante diminuição total de hidrólise de ATP. Avaliando-se a produção periférica de amônia durante o exercício prolongado e a intensidade de absorção e subsequente acúmulo de amônia no cérebro, verificaram que há uma captação cerebral e acúmulo de amônia, podendo provocar fadiga pelo dano a homeostase dos neurotransmissores Glu e GABA (NYBO et al, 2005).

Durante exercício prolongado de intensidade moderada (50% a 75% do $VO_2\text{máx}$), parece ocorrer poucas alterações no PNC para a produção da amônia. Porém, uma desaminação de aminoácidos pode contribuir para o aumento da amonemia (TIPTON; WOLFE, 1998; RENNIE; TIPTON, 2000). Isso será mais exacerbado com uma redução do glicogênio muscular durante o exercício prolongado. Assim, um baixo consumo de carboidratos aumentará a oxidação de aminoácidos durante um exercício prolongado (SAHLIN; TONKONOGLI; SODERLUND, 1998; WAGENMAKERS et al, 1991). Sabe-se que uma ingestão diária suficiente de carboidrato, promoverá pouco impacto sobre a necessidade dietética de proteína de indivíduos não atletas, mas que se exercitam regularmente. Diferentemente, atletas de alto rendimento poderiam exceder essa recomendação para $1,6 \text{ g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (TARNOPOLSKY, 2004). A oxidação de aminoácidos, especialmente os BCAA, pode aumentar durante um exercício prolongado, dependendo da disponibilidade de carboidrato, sem reduzir a concentração total de intermediários do TCA do músculo (GIBALA; YOUNG; TAEGTMEYER, 2000; GIBALA, 2003; GIBALA, 2007; KUMAR et al, 2009).

Vários estudos com humanos ou ratos têm relacionado alterações na amonemia com o uso de suplementos nutricionais (BLOMSTRAND; EK; NEWSHOLME, 1996; ARAÚJO JR et al, 2006; ROGERO et al, 2006). Parece que a produção de amônia também está relacionada a ingestão de BCAA. Grandes quantidades de BCAA ingeridas (20-30g) parecem causar um aumento da amonemia. Porém, a ingestão de pequenas quantidades (7-10g), ofertada em parcelas durante e na recuperação do exercício, não causam uma maior liberação de amônia pelos músculos. Essa quantidade seria benéfica para equilibrar o aumento do triptofano livre durante e após o exercício (BLOMSTRAND, 2006). No entanto, um

estudo objetivando verificar os efeitos da suplementação aguda do BCAA no exercício prolongado, não observou nenhum benefício (WATSON; SHIRREFFS; MAUGHAN, 2004).

Foi verificado que duas semanas de suplementação com L-carnitina L-tartrato (2 g/dia) altera a produção ou remove a amônia sanguínea durante exercício prolongado de intensidade moderada (90 minutos a 70% do $\text{VO}_2\text{máx}$) (BROAD; MAUGHAN; GALLOWAY, 2008).

A suplementação de Asp tem sido considerada um ergogênico por atenuar o aumento da amonemia induzida pelo exercício prolongado e aumentar a resistência por poupar glicogênio e favorecer uma maior taxa de oxidação dos ácidos graxos livres. No entanto, o número de estudos e distintas combinações de Asp com outros suplementos dificultam as conclusões para tal benefício (TRUDEAU, 2008).

Aumentos dos níveis de amônia e sua relação ou não com a fadiga também são observados em exercícios intermitentes, tais como o futebol (KELLIS; KATIS; VRABAS, 2006; BASSINI-CAMERON et al, 2008). Outros fatores que influenciam a resposta da amonemia induzida pelo exercício prolongado ou intermitente é o estresse do calor (FEBBRAIO, 2001; MOHR et al, 2006).

I.III. Dieta cetogênica

i.Definição

Uma dieta com concentrações baixa de carboidratos e alta em gorduras, que proporciona aumento da presença de cetonas na urina, é denominada dieta cetogênica (BISSCHOP et al, 2003; WESTMAN et al, 2007). Apesar de a literatura não ter consenso claro quanto à quantidade de carboidratos por dia, Freedman, King e Kennedy (2001) descrevem que uma dieta cetogênica, pode ser caracterizada por uma distribuição percentual da quantidade diária calórica de 55-65% de gordura, < 20% de carboidratos e 25-30% de proteína. Johnston et al (2006), conduziram um estudo onde uma dieta cetogênica foi caracterizada por 60% de gordura, 9% de

carboidratos e 31% de proteína. Esses valores, também são demonstrados por outros trabalhos (SHARMAN et al, 2002; VOLEK; SHARMAN, 2004).

Dietas pobres em carboidratos foram popularizadas sem provas detalhadas de sua eficácia ou segurança e não há evidência suficiente para fazer recomendações a favor ou contra sua utilização, especialmente para dietas com 20g/d ou menos de carboidratos (BRAVATA et al, 2003).

j. Relação da dieta cetogênica com a depleção de glicogênio e alterações de grupos nitrogenados

Os principais substratos para ressíntese de ATP nos músculos ativos são: gordura e carboidrato, com a proteína em menor utilização, exceto em casos extremos tais como condições análogas à fome. O estresse metabólico durante um exercício físico é geralmente determinado pelo tipo e intensidade de exercício, estado de aptidão física e estado nutricional (COYLE, 2000). A dieta pode exercer grande influência tanto na utilização do substrato durante o exercício quanto no desempenho em si (EVANS; HUGHES, 1985).

A adoção de uma dieta cetogênica, em pouco tempo (três a sete dias), resulta em reduções significativas dos estoques hepáticos e musculares de glicogênio. Com as reservas de glicogênio limitadas o desempenho no exercício físico poderia ser comprometido (KOVACS, 2006). No entanto, dependendo do tempo de adaptação a uma dieta cetogênica (menos de 20g de carboidratos por dia), o desempenho em exercício submáximo não será prejudicado, apesar dos estoques reduzidos de glicogênio (PHINNEY et al, 1980; PHINNEY, 2004).

Vários estudos têm sido realizados abordando adaptações dietéticas com baixo conteúdo de carboidratos e exercício físico (PHINNEY, 1992; SHERMAN, 1995; CAREY et al, 2001; STEENBERG et al, 2002). Por cinco dias, oito ciclistas bem treinados consumiram ou uma dieta com alto conteúdo de carboidratos (9,6 g.kg⁻¹.dia⁻¹ carboidrato; 0,7 g.kg⁻¹.dia⁻¹ gordura) ou uma com alto teor de gordura (2,4 g.kg⁻¹.dia⁻¹ carboidrato; 4 g.kg⁻¹.dia⁻¹ gordura) enquanto participavam de um programa de treinamento. No sexto dia, os sujeitos ingeriram um alto conteúdo

dietético de carboidrato e no sétimo dia, executaram um teste de 2 h em bicicleta a 70% do $\text{VO}_2\text{máx}$ e, logo após, um teste de alta intensidade. Não foram verificadas diferenças na utilização do glicogênio muscular e no desempenho. Além disso, foram observadas adaptações metabólicas após cinco dias com dieta rica em gordura (BURKE et al, 2000).

Havemann et al (2006), investigando o efeito de uma dieta rica em gordura seguida por um dia de dieta rica em carboidrato, em oito ciclistas, verificaram que o desempenho em um teste de 100 km não foi prejudicado, apesar de uma redução em 1 km de pedaladas rápidas.

Três dias de dieta cetogênica contendo 50% de gordura, 5% de carboidratos e 45% de proteína, em oito homens destreinados, submetidos a um teste até a exaustão em cicloergômetro, acelerou a produção de amônia (LANGFORT et al, 2004). Na verdade, a dieta cetogênica, antes e depois de exercícios ou treinamentos intensos podem diminuir os estoques de glicogênio de forma aguda ou crônica, o que poderia induzir uma elevação da amonemia mais rapidamente (SNOW et al, 2000; SCHULZ; HECK, 2003; CARVALHO-PEIXOTO; ALVES; CAMERON, 2007).

A depleção de glicogênio no músculo esquelético aumenta a amonemia e a concentração de lactato durante um teste físico com incremento de carga, devido à diminuição no fluxo glicolítico (ROEYKENS et al, 1998). Tal modificação metabólica gera incrementos nas concentrações de IMP e de intermediários do TCA (BROBERG; SAHLIN, 1988; OWEN et al, 2002; GIBALA, 2003). Esses achados sugerem que a amônia e o lactato possam ser marcadores bioquímicos do treinamento físico.

Além disso, vários outros efeitos metabólicos ocorrem com a adoção de dieta cetogênica (BISSCHOP et al, 2003; JOHNSTON et al, 2006). Entre os efeitos metabólicos ocasionados pela dieta cetogênica, descritos na literatura, estudos demonstram um aumento das concentrações de uréia e urato. Porém, alguns trabalhos não verificaram alterações sanguíneas do urato (FREEDMAN; KING; KENNEDY, 2001)

I.IV. Cetoanálogos

k.Cetoanálogos e sua relação com a remoção de grupos nitrogenados

Modificações dietéticas, especialmente uma redução da ingestão de proteínas, em indivíduos com insuficiência renal crônica são bem descritos na literatura (ATTMAN et al, 1979; ALVESTRAND; FURST; BERGSTROM, 1983; GARIBOTTO et al, 1995). E a possibilidade de usar cetoanálogos como suplemento em dietas pobres em proteína na insuficiência hepática, obesidade ou deficiência enzimática no ciclo da uréia gerou interesse pelas suas respostas metabólicas obtidas (HAUSCHILDT; BRAND, 1980).

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

A capacidade de cetoanálogos de aminoácidos essenciais serem transaminados por derivados de amônia foi confirmada proporcionando uma dieta quase livre de proteínas na insuficiência renal crônica e diminuição na produção de substâncias nitrogenadas tóxicas, tais como a amônia e uréia, como também reduções plasmáticas da creatinina (CHOW; WALSER, 1974; BURNS et al, 1978; ELL et al, 1978; GIORDANO et al, 2000; SAVICA et al, 2005).

Sabe-se que no músculo, BCAA e seus cetoanálogos são mantidos em equilíbrio por reações de transaminases reversíveis com o 2-oxoglutarato e Glu. O Glu é subsequencialmente transaminado com piruvato para produzir Ala e regenerar 2-oxoglutarato. A Ala sintetizada pelo músculo pode ser substrato para gliconeogênese hepática. A proporção pela qual suplemento de cetoanálogos de

aminoácidos de cadeia ramificada é convertido para BCAA, dependerá do equilíbrio dessas reações (DALTON; CHANTLER, 1983).

Hauschildt e Brand (1980) investigaram a eficiência de conversão (transaminação) dos cetoadálogos de aminoácidos de cadeia ramificada em seus aminoácidos correspondentes em ratos submetidos à dieta pobre em proteína pela atividade das três enzimas que afetam o metabolismo dos cetoadálogos de aminoácidos de cadeia ramificada: BCAT e BCKDH (fígado, rim e cérebro); e GDH (fígado). Foi verificada uma diminuição drástica da BCKDH hepática, favorecendo a transaminação. Sabe-se que uma má nutrição de proteína ativa a BCKDH (KALANTAR-ZADEH et al, 2004). Além disso, o exercício também aumenta a atividade (desfosforilação) da BCKDH (VAN HALL et al, 1996).

Referências

Alvear-Ordenes I, García-López D, De Paz JA, González-Gallego J. Sweat lactate, ammonia, and urea in rugby players. **Int J Sports Med.** 2005;26(8):632-7.

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

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

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

Araujo JA Jr, Falavigna G, Rogero MM, Pires IS, Pedrosa RG, Castro IA, Donato J Jr, Tirapegui J. Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. **Life Sci.** 2006;79(14):1343-8.

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

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

Baron B, Noakes TD, Dekerle J, Moullan F, Robin S, Matran R, Pelayo P. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? **Br J Sports Med.** 2008;42(10):528-33.

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

Bisschop PH, De Sain-Van Der Velden MG, Stellaard F, Kuipers F, Meijer AJ, Sauerwein HP, Romijn JA. Dietary carbohydrate deprivation increases 24-hour nitrogen excretion without affecting postabsorptive hepatic or whole body protein metabolism in healthy men. **J Clin Endocrinol Metab.** 2003;88(8):3801-5.

Blomstrand E, Ek S, Newsholme EA. Influence of ingesting a solution of branched-chain amino acids on plasma and muscle concentrations of amino acids during prolonged submaximal exercise. **Nutrition.** 1996;12(7-8):485-90.

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

Blomstrand E. A role for branched-chain amino acids in reducing central fatigue. **J Nutr.** 2006;136(2):544S-547S.

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

Bowtell JL, Marwood S, Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size: functional importance for oxidative metabolism in exercising human skeletal muscle. **Sports Med.** 2007;37(12):1071-88.

Bravata DM, Sanders L, Huang J, Krumholz HM, Olkin I, Gardner CD, Bravata DM. Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review. **JAMA.** 2003;289(14):1837-50.

Bredemeier C, Mundstock CM. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Cienc Rural [online]**. 2000;30(2):365-72.

Broad EM, Maughan RJ, Galloway SD. Carbohydrate, protein, and fat metabolism during exercise after oral carnitine supplementation in humans. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**. 2008;18(6):567-84.

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

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

Burke LM, Angus DJ, Cox GR, Cummings NK, Febbraio MA, Gawthorn K, Hawley JA, Minehan M, Martin DT, Hargreaves M. Effect of fat adaptation and carbohydrate restoration on metabolism and performance during prolonged cycling. **J Appl Physiol**. 2000;89(6):2413-21.

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

Carey AL, Staudacher HM, Cummings NK, Stepto NK, Nikolopoulos V, Burke LM, Hawley JA. Effects of fat adaptation and carbohydrate restoration on prolonged endurance exercise. **J Appl Physiol**. 2001;91(1):115-22.

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

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

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

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

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

Cooper AJ, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. **Physiol Rev.** 1987;67(2):440-519.

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

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

Coyle EF. Physical activity as a metabolic stressor. **Am J Clin Nutr.** 2000;72(2 Suppl):512S-20S.

Dahlstedt AJ, Katz A, Wieringa B, Westerblad H. Is creatine kinase responsible for fatigue? Studies of isolated skeletal muscle deficient in creatine kinase. **FASEB J.** 2000;14(7):982-90.

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

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

Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandeia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salamone JD, Van Hoomissen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ. Neurobiology of exercise. **Obesity (Silver Spring).** 2006;14(3):345-56.

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

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

Evans WJ, Hughes VA. Dietary carbohydrates and endurance exercise. **Am J Clin Nutr.** 1985;41(5 Suppl):1146-54.

Fallon KE, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. **Br J Sports Med.** 1999;33(4):264-9.

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

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

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

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

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacol Rev.** 1994;46(2):143-56.

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

Friedmann B, Frese F, Menold E, Bärtsch P. Effects of acute moderate hypoxia on anaerobic capacity in endurance-trained runners. **Eur J Appl Physiol.** 2007;101(1):67-73.

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

Gibala MJ, Young ME, Taegtmeyer H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. **Acta Physiol Scand.** 2000;168(4):657-65.

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

Gibala MJ. Protein metabolism and endurance exercise. **Sports Med.** 2007;37(4-5):337-40.

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

Graham T, Bangsbo J, Saltin B. Skeletal muscle ammonia production and repeated, intense exercise in humans. **Can J Physiol Pharmacol.** 1993;71(7):484-90.

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

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

Graham TE, Battram DS, Dela F, El-Sohemy A, Thong FS. Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? **Appl Physiol Nutr Metab.** 2008;33(6):1311-8.

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

Hargreaves M, McKenna MJ, Jenkins DG, Warmington SA, Li JL, Snow RJ, Febbraio MA. Muscle metabolites and performance during high-intensity, intermittent exercise. **J Appl Physiol.** 1998;84(5):1687-91.

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

Havemann L, West SJ, Goedecke JH, Macdonald IA, St Clair Gibson A, Noakes TD, Lambert EV. Fat adaptation followed by carbohydrate loading compromises high-intensity sprint performance. **J Appl Physiol.** 2006;100(1):194-202.

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

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

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

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

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

Jansson E, Dudley GA, Norman B, Tesch PA. ATP and IMP in single human muscle fibres after high intensity exercise. **Clin Physiol.** 1987;7(4):337-45.

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

Juhn MS. Popular sports supplements and ergogenic aids. **Sports Med.** 2003;33(12):921-39.

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

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

Kellis E, Katis A, Vrabas IS. Effects of an intermittent exercise fatigue protocol on biomechanics of soccer kick performance. **Scand J Med Sci Sports**. 2006;16(5):334-44.

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

Kovacs MS. Carbohydrate intake and tennis: are there benefits? **Br J Sports Med**. 2006;40(5):e13.

Kuipers H. Training and overtraining: an introduction. **Med Sci Sports Exerc**. 1998;30(7):1137-9.

Kumar V, Atherton P, Smith K, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. **J Appl Physiol**. 2009;106(6):2026-39.

Lacerda AC, Gripp F, Rodrigues LO, Silami-Garcia E, Coimbra CC, Prado LS. Acute heat exposure increases high-intensity performance during sprint cycle exercise. **Eur J Appl Physiol**. 2007;99(1):87-93.

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

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

Lepers R, Maffiuletti NA, Rochette L, Brugniaux J, Millet GY. Neuromuscular fatigue during a long-duration cycling exercise. **J Appl Physiol.** 2002;92(4):1487-93.

Liu TH, Wu CL, Chiang CW, Lo YW, Tseng HF, Chang CK. No effect of short-term arginine supplementation on nitric oxide production, metabolism and performance in intermittent exercise in athletes. **J Nutr Biochem.** 2009;20(6):462-8.

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

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

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

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

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

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

Nelson DL, COX MM. **Lehninger: principles of biochemistry.** 4th ed. New York: Freeman, 2005.

Nissim I. Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. **Am J Physiol.** 1999;277(4 Pt 2):F493-7.

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

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

Ogino K, Kinugawa T, Osaki S, Kato M, Endoh A, Furuse Y, Uchida K, Shimoyama M, Igawa O, Hisatome I, Shigemasa C. Ammonia response to constant exercise: differences to the lactate response. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2000;27(8):612-7.

Ohkuwa T, Itoh H, Yamamoto T, Yanagi H, Yamazaki Y, Akimaru T. Effect of varying light intensity on maximal power production and selected metabolic variables. **Arch Physiol Biochem.** 2001;109(5):430-4.

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

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

Phinney SD, Horton ES, Sims EA, Hanson JS, Danforth E Jr, LaGrange BM. Capacity for moderate exercise in obese subjects after adaptation to a hypocaloric, ketogenic diet. **J Clin Invest.** 1980;66(5):1152-61.

Phinney SD. Exercise during and after very-low-calorie dieting. **Am J Clin Nutr.** 1992;56(1 Suppl):190S-194S.

Phinney SD. Ketogenic diets and physical performance. **Nutr Metab (Lond).** 2004;1(1):2.

Ravier G, Dugué B, Grappe F, Rouillon JD. Impressive anaerobic adaptations in elite karate athletes due to few intensive intermittent sessions added to regular karate training. **Scand J Med Sci Sports**. 2009;19(5):687-94.

Rennie MJ, Tipton KD. Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. **Annu Rev Nutr**. 2000;20:457-83.

Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2004;287(3):R502-16.

Roeykens J, Magnus L, Rogers R, Meeusen R, De Meirleir K. Blood ammonia-heart rate relationship during graded exercise is not influenced by glycogen depletion. **Int J Sports Med**. 1998;19(1):26-31.

Rogero MM, Tirapegui J, Pedrosa RG, Castro IA, Pires IS. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**. 2006;22(5):564-71.

Sahlin K, Tonkonogi M, Söderlund K. Energy supply and muscle fatigue in humans. **Acta Physiol Scand**. 1998;162(3):261-6.

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

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

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

Schulz H, Heck H. Glycogen depletion as indication for ammonia determination in exercise testing. **Eur J Sport Sci.** 2003;3:1-9.

Secher NH, Seifert T, Van Lieshout JJ. Cerebral blood flow and metabolism during exercise: implications for fatigue. **J Appl Physiol.** 2008;104(1):306-14.

Shambaugh GE 3rd. Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships to the citric acid cycle. **Am J Clin Nutr.** 1977;30(12):2083-7.

Sharman MJ, Kraemer WJ, Love DM, Avery NG, Gómez AL, Scheett TP, Volek JS. A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. **J Nutr.** 2002;132(7):1879-85.

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

Sherman WM. Metabolism of sugars and physical performance. **Am J Clin Nutr.** 1995;62(1 Suppl):228S-241S.

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

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

Spriet LL. Caffeine and performance. **Int J Sports Nutr.** 1995;5 Suppl:S84-99.

Spriet LL, Gibala MJ. Nutritional strategies to influence adaptations to training. **J Sports Sci.** 2004;22(1):127-41.

Spriet LL, MacLean DA, Dyck DJ, Hultman E, Cederblad G, Graham TE. Caffeine ingestion and muscle metabolism during prolonged exercise in humans. **Am J Physiol.** 1992;262(6 Pt 1):E891-8.

Stathis CG, Zhao S, Carey MF, Snow RJ. Purine loss after repeated sprint bouts in humans. **J Appl Physiol.** 1999;87(6):2037-42.

Steensberg A, van Hall G, Keller C, Osada T, Schjerling P, Pedersen BK, Saltin B, Febbraio MA. Muscle glycogen content and glucose uptake during exercise in humans: influence of prior exercise and dietary manipulation. **J Physiol.** 2002;541(Pt 1):273-81.

Tarnopolsky M. Protein requirements for endurance athletes. **Nutrition.** 2004;20(7-8):662-8.

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

Timmermann L, Butz M, Gross J, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. Neural synchronization in hepatic encephalopathy. **Metab Brain Dis.** 2005;20(4):337-46.

Tipton KD, Wolfe RR. Exercise-induced changes in protein metabolism. **Acta Physiol Scand.** 1998;162(3):377-87.

Toubekis AG, Douda HT, Tokmakidis SP. Influence of different rest intervals during active or passive recovery on repeated sprint swimming performance. **Eur J Appl Physiol.** 2005;93(5-6):694-700.

Trudeau F. Aspartate as an ergogenic supplement. **Sports Med.** 2008;38(1):9-16.

Tullson PC, Arabadzis PG, Rundell KW, Terjung RL. IMP reamination to AMP in rat skeletal muscle fiber types. **Am J Physiol.** 1996;270(4 Pt 1):C1067-74.

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

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

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

Volek JS, Sharman MJ. Cardiovascular and hormonal aspects of very-low-carbohydrate ketogenic diets. **Obes Res.** 2004;12 Suppl 2:115S-23S.

Wagenmakers AJ, Beckers EJ, Brouns F, Kuipers H, Soeters PB, van der Vusse GJ, Saris WH. Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. **Am J Physiol.** 1991;260(6 Pt 1):E883-90.

Wagenmakers AJ, Brookes JH, Coakley JH, Reilly T, Edwards RH. Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** 1989;59(3):159–167.

Wagenmakers AJ, Coakley JH, Edwards RH. Metabolism of branched chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. **Int J Sports Med.** 1990;11 Suppl. 2:S101–S113.

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

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

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

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

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

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

Warburton DE, Welsh RC, Haykowsky MJ, Taylor DA, Humen DP. Biochemical changes as a result of prolonged strenuous exercise. **Br J Sports Med.** 2002;36(4):301-3.

Watson P, Shirreffs SM, Maughan RJ. The effect of acute branched-chain amino acid supplementation on prolonged exercise capacity in a warm environment. **Eur J Appl Physiol.** 2004;93(3):306-14.

Westerblad H, Allen DG, Lännergren J. Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? **News Physiol Sci.** 2002;17:17-21.

Westman EC, Feinman RD, Mavropoulos JC, Vernon MC, Volek JS, Wortman JA, Yancy WS, Phinney SD. Low-carbohydrate nutrition and metabolism. **Am J Clin Nutr.** 2007;86(2):276-84.

Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. **Prog Neurobiol.** (2010), doi:10.1016/j.pneurobio.2010.01.012.

Williams MV. Ergogenic and ergolytic substances. **Med Sci Sports Exerc.** 1992;24(9 Suppl):S344-S8.

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

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

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

Zieliński J, Rychlewski T, Kusy K, Domaszewska K, Laurentowska M. The effect of endurance training on changes in purine metabolism: a longitudinal study of competitive long-distance runners. **Eur J Appl Physiol.** 2009;106(6):867-76.

Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [^1H - ^{13}C] nuclear magnetic resonance study. **Hepatology.** 2003;37(2):420-8.

CAPÍTULO II: Keto analogues and amino acids supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions.

Short Communication

Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions

Eduardo Seixas Prado^{1,2,3,4}, José Melquiades de Rezende Neto³, Rosemeire Dantas de Almeida^{1,2,3}, Marcelia Garcez Dória de Melo⁵ and Luiz-Claudio Cameron^{1,2,6*}

¹Laboratory of Protein Biochemistry, Federal University of State of Rio de Janeiro, Avenue Pasteur, 296, Urca, Rio de Janeiro, CEP 22290 240, Brazil

²Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, MG, Avenue Pará, 1720 Umuarama, Uberlândia, Brazil

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

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

⁵Department of Clinical Biochemistry, Governor João Alves Filho Hospital, Avenue Presidente Tancredo Neves, 7501 Novo Paraíso, Aracaju, Brazil

⁶Graduate Program in Human Movement Science, University Castelo Branco, Avenue Salvador Allende, 6700 Recreio, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

(Received 17 May 2010 – Revised 1 December 2010 – Accepted 3 December 2010)

Abstract

Hyperammonaemia is related to both central and peripheral fatigue during exercise. Hyperammonaemia in response to exercise can be reduced through supplementation with either amino acids or combined keto analogues and amino acids (KAAA). In the present study, we determined the effect of short-term KAAA supplementation on ammonia production in subjects eating a low-carbohydrate diet who exercise. A total of thirteen male cyclists eating a ketogenic diet for 3 d were divided into two groups receiving either KAAA (KEx) or lactose (control group; LEx) supplements. Athletes cycled indoors for 2 h, and blood samples were obtained at rest, during exercise and over the course of 1 h during the recovery period. Exercise-induced ammoniaemia increased to a maximum of 35 % in the control group, but no significant increase was observed in the supplemented group. Both groups had a significant increase (approximately 35 %) in uraemia in response to exercise. The resting urate levels of the two groups were equivalent and remained statistically unchanged in the KEx group after 90 min of exercise; an earlier increase was observed in the LEx group. Glucose levels did not change, either during the trial time or between the groups. An increase in lactate levels was observed during the first 30 min of exercise in both groups, but there was no difference between the groups. The present results suggest that the acute use of KAAA diminishes exercise-induced hyperammonaemia.

Key words: Ammonia; Uric acid; Ketogenic diet; Endurance

Ammonia (used here as a synonym for the sum of NH_3 and NH_4^+) is highly toxic to humans and can cross the blood–brain barrier, which leads to a decrease in cerebral function, neuropsychiatric disorders and death^(1,2). Ammonia-mediated excitotoxicity has been implicated in the mediation of central nervous system damage^(3,4).

Data obtained from exercise studies have been used to elucidate the effects of hyperammonaemia. Several investigations have demonstrated that increased ammoniaemia occurs during various types of exercise^(5–8). During

prolonged submaximal exercise, an increase in ammoniaemia ($>160 \mu\text{mol/l}$) has been observed in various studies^(8,9). The consensus view is that the production of ammonia during exercise occurs via a combination of both AMP deamination and catabolism of amino acids, processes that are activated in an intensity- and duration-dependent manner⁽²⁾. It has been suggested that ammonia promotes both central and peripheral fatigue and that better control of ammonia production will improve exercise performance^(4,10).

Abbreviation: KAAA, keto analogue and amino acid.

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

The increase in the ammonia levels in response to exercise can be managed through the use of amino acids or carbohydrates that interfere with ammonia metabolism⁽⁷⁾. During metabolism, amino acids are deaminated or transaminated to form keto acids via release of the amino group⁽¹¹⁾. These reactions are reversible, and the use of keto analogues could reduce blood ammonia concentration, resulting in the production of amino acids⁽¹²⁾. The long-term use of keto analogues associated with amino acids (KAAA) to provide amino acid supplementation has been described previously⁽¹³⁾; to our knowledge, the acute use of KAAA has never been studied.

Although ammonia has been shown to be produced by branched chain amino acid catabolism, independent of glycogen availability⁽¹⁴⁾, various studies have linked ammonia formation to carbohydrate availability^(4,7). Adopting a low-carbohydrate diet (termed a ketogenic diet) combined with physical exercise can reduce glycogen stores before exercise and induce hyperammonaemia^(15,16). We used this metabolic effect of a ketogenic diet to enhance the effect of exercise on ammonia production.

In the present study, we evaluated the acute effect of KAAA supplementation on ammonia production during prolonged exercise. We hypothesised that acute KAAA supplementation can prevent the increase in ammonia during exercise owing to the function of keto analogues as energetic substrates or as ammonia-chelating agents.

Materials and methods

A total of thirteen male endurance-trained cyclists (28.6 (SEM 1.6) years; 68.8 (SEM 2.3) kg; 1.77 (SEM 0.01) m) with similar exercise training levels ($\text{VO}_{2\text{max}}$ 52.7 (SEM 2.8) ml/kg per min and maximum heart rate 191.4 (SEM 1.6) beats/min) participated in the study voluntarily. All subjects had similar physical capabilities and had a minimum of 3 years of training. They had not used ergogenic substances or any other drugs. The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects were approved by the Ethics Committee for Human Research at the Federal University of the State of Rio de Janeiro; ethics number: 117/2007. Written informed consent was obtained from all subjects.

Athletes reported to the laboratory 3 d before the start of the experiment to become familiar with the cycle ergometer and to optimise the power output. Subjects received an individualised ketogenic diet (Table 1; 12.9 (SEM 0.4) MJ; 35% of the recommended energy intake from protein, 3.8 (SEM 0.1) g/kg; 55% from lipids, 2.7 (SEM 0.1) g/kg; and less than 10% from carbohydrates, 1.1 (SEM 0.1) g/kg; see Westman *et al.*⁽¹⁷⁾ for a review of the effects of a low-carbohydrate diet on metabolism) for 2 d before the experiment and during the day of the experiment.

Subjects were asked to maintain their normal training schedule (approximately 70 km/d) and to follow the

Table 1. Metabolisable energy from a ketogenic diet*

	Size	Carbohydrates	Lipids	Proteins
Meat	400	0	42.0	135.4
Cheese	300	17.2	83.2	28.2
Ham	300	2.2	22.7	48.3
Egg	400	2.5	39.1	53.2
Tangerine	200	19.6	0.2	1.6
Orange	200	17.9	0.2	2.0
Watermelon	200	16.6	0.1	1.8
Total		76.0	187.5	270.5

*Values are expressed in g from prepared meals.

ketogenic diet up to 48 h (normal training and a ketogenic diet were used to reduce muscle glycogen stores and to induce a higher increase in ammoniaemia) before the day of the experiment. On the day of the experimental period, the subjects reported to the laboratory in a fasting state and received breakfast and a light lunch. At 1 h after lunch, the subjects received either five tablets of a KAAA mixture (experimental group (KEx), *n* 6; Ketosteril®; Fresenius, Bad Homburg, Germany) or five 200 mg tablets of lactose (control group (LEx), *n* 7; Via Farma, São Paulo, Brazil) in a randomised double-blind manner. The composition of the KAAA mixture/tablet was as follows: α -keto analogues of isoleucine (335 mg), leucine (505 mg), phenylalanine (430 mg) and valine (340 mg); α -hydroxy analogue of methionine (295 mg); L-lysine acetate (75 mg L-lysine); L-threonine (265 mg); L-tryptophan (115 mg); L-histidine (190 mg); L-tyrosine (150 mg). Both supplements were provided in indistinguishable capsules.

Before the experimental trial, initial stretching was followed by a warm-up of 10 min at 50% of the maximum heart rate. The experiment began 1 h after supplementation, and athletes cycled indoors for 2 h at 80 rpm according to a metronome in a room with constant temperature and relative humidity ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ and $60 \pm 5\%$, respectively). The subjects' heart rates were recorded continuously throughout the exercise period using a heart rate monitor (Polar CS200, Kempele, Finland). The power output was modified for each individual every 5 min so that the athletes maintained 75–85% of their estimated maximum heart rate (approximately 156.0 (SEM 2.8) beats/min with a work of 180.0 (SEM 1.4) W, respectively).

A catheter was placed into the median cubital vein. At 1 h after the supplementation, blood samples were obtained at rest and at 30 min intervals throughout the exercise period. Finally, blood samples were collected during a 1 h recovery period at 30 min intervals. Athletes received water *ad libitum* during the trial.

Blood samples were analysed after collection. To avoid the loss of volatile compounds, blood samples were immediately centrifuged, and the serum was separated, frozen in liquid N_2 and stored at -70°C for subsequent biochemical analysis in a 24 h period. Biochemical determination of glucose, urea and urate concentrations was performed in serum using commercially available

spectrophotometric assays (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Lactate and ammonia concentrations were measured using an enzymatic UV method (Randox, Crumlin, UK) on a Dade Model Dimension RXL Automated Chemistry Analyzer (Dade Behring, Eschborn, Germany).

Statistical analyses were performed using SigmaStat version 3.5 for Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). To decrease individual variability, data were normalised to 0 min values. After testing for normality (Kolmogorov–Smirnov) and equality test variance (Levene median), the changes in the variables between time points were analysed by a one-way ANOVA, and the group changes were evaluated by a two-way ANOVA for repeated measures. Significance ($P < 0.05$) was confirmed using the Tukey *post hoc* test. Data are presented as means with their standard errors. The area under the curve for blood ammonia data for each individual in each treatment was determined using the following equation:

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

assuming that the ammonia level at baseline corresponds to the resting ammonia level and where AUC is the area under the curve, A is ammonia and T is time.

Results

A 120 min cycling session was employed to evaluate the effect of KAAA on blood ammonia concentration. The resting ammoniaemia, before exercise and after supplementation, was elevated (approximately $90 \mu\text{mol/l}$) in both groups, and ammonia concentration increased up to a maximum of 35% above baseline levels in response to exercise in the LEx group (normalised values) at 60, 90 and 120 min ($P < 0.001$). In contrast, ammonia concentration was not increased (approximately 17%) in the KEx group at 60, 90 or 120 min. The KEx group actually experienced an approximately 18% decrease in ammonia concentration at 60 min ($P = 0.040$) and 90 min ($P = 0.049$) compared with the LEx group. The area under the curve of the KEx group was 12% smaller than that of the LEx group. Ammonia concentrations in the LEx group returned to baseline levels at 150 min (30 min into the recovery period). The KEx group demonstrated a greater decrease in ammoniaemia (approximately 20%) compared with the LEx group at 150 min, reaching levels significantly lower than those of the control after 1 h of recovery ($P = 0.022$; Fig. 1(a)).

To evaluate the effect of KAAA on urea synthesis, we measured the blood urea concentration. Both groups had a significant increase in blood urea levels in response to exercise (approximately 35% at 120 min; $P < 0.001$). Even after a 60 min recovery period, the levels of urea remained constant (Fig. 1(b)).

To differentiate the ammonia produced by AMP deamination from that produced by amino acid deamination, we measured blood urate levels. Resting urate levels

were equivalent in both groups and remained statistically unchanged in the KEx group up to 90 min. In contrast, the blood urate levels increased by approximately 16% at 90 and 120 min in the LEx group. Urate levels remained constant from the end of the exercise period throughout the recovery period (Fig. 1(c)).

To understand the role of KAAA in gluconeogenesis, we measured the blood glucose level during the exercise and recovery periods. No observable difference in glucose levels was found during the trial time between the different groups. An increase in the lactate level was observed during the first 30 min of exercise in both groups, with no difference between the groups (Fig. 1(d)).

Discussion

For several years, it has been accepted that KAAA are able to prevent nephrotoxicity, delaying the necessity for dialysis in patients with chronic nephropathies⁽¹³⁾. Therefore, we investigated the effect of KAAA on exercise-induced ammonia production.

Ammonia production in muscle may be due to the depletion of glycogen stores and the deamination of both AMP and amino acids^(15,18). A low-carbohydrate diet increases the production of ammonia during exercise⁽¹⁹⁾. Furthermore, it is acknowledged that excessive protein intake leads to increased ammoniaemia, and ammonia is metabolised to urea by the liver^(1,20). In the present study, we used a ketogenic diet (with 10% of energy from carbohydrates and 35% from protein) to decrease the availability of glycogen in the liver and muscle and to increase the availability of amino acids to supply energy. Exercise intensity is the key point in this type of metabolism because increases in exercise intensity increase the rate of AMP deamination, leading to the release of more ammonia into the bloodstream.

Although both studied groups were ammoniaemic at baseline due to the ketogenic diet (approximately $90 \mu\text{mol/l}$), and although we know that ammonia is critical to the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain oedema, clinical observations have not shown a consistent correlation between the concentration of ammonia in the blood and symptoms of hepatic encephalopathy^(20,21).

NH_3 concentration increased in response to exercise in the LEx group, and this effect was reduced by the administration of KAAA. The supplement also kept the blood ammonia level lower during the recovery period. These effects may be due to the anaplerotic action of KAAA entering directly into the Krebs cycle as intermediates or due to the chelation of ammonia by the keto analogues. Additionally, KAAA may increase glucose availability via gluconeogenesis. In the present study, we did not detect any changes in glucose levels during exercise or as a result of KAAA supplementation. In addition, blood lactate concentration fluctuated similarly in both groups. These data may suggest that ammonia production

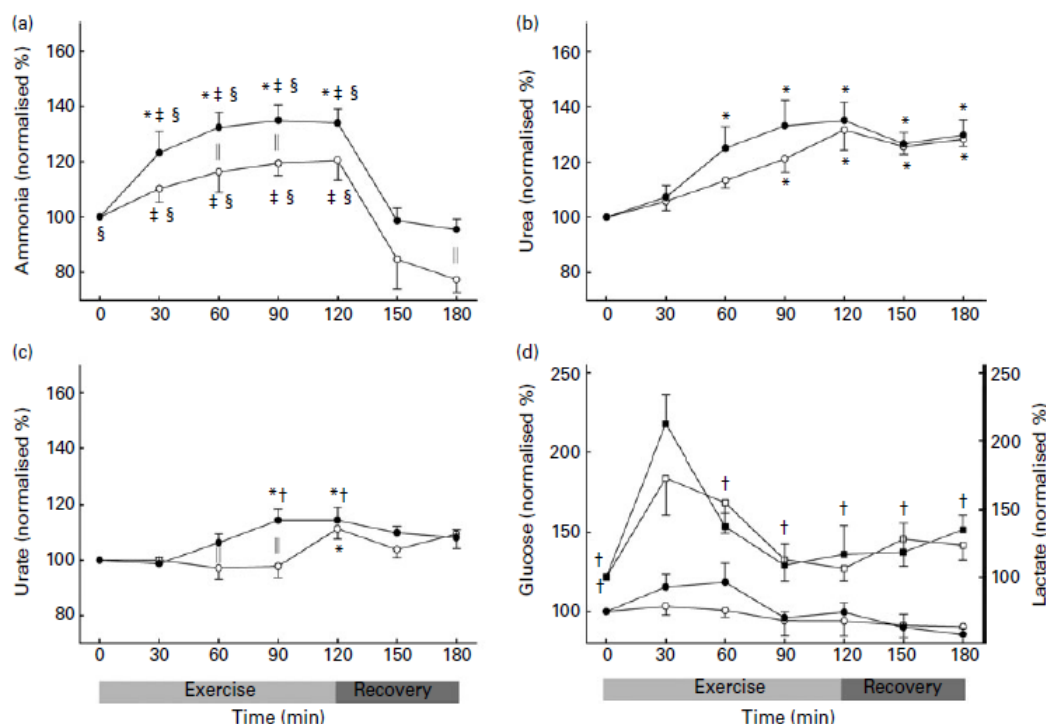


Fig. 1. Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the ammonia and urate levels but not the urea level, the glucose level or lactate metabolism. Athletes exercised for 2 h after KAAA supplementation (experimental group (KEX), ○) or control supplementation (LEX, ●). Note that the lactate values were KEX 17.25 (SEM 1.94) mmol/l and LEX 16.47 (SEM 1.79) mmol/l; (a) ammonia: resting values were KEX 94.31 (SEM 6.86) μ mol/l and LEX 84.36 (SEM 9.06) μ mol/l; (b) urea: resting values were KEX 17.25 (SEM 1.94) mmol/l and LEX 16.47 (SEM 1.79) mmol/l; (c) urate: resting values were KEX 295.51 (SEM 20.47) μ mol/l and LEX 293.25 (SEM 19.24) μ mol/l; (d) glucose: resting values were KEX 4.72 (SEM 0.17) mmol/l and LEX 5.24 (SEM 0.18) mmol/l; lactate: resting values were KEX 1.70 (SEM 0.08) mmol/l and LEX 1.92 (SEM 0.15) mmol/l. The 0 min values for the five metabolites did not differ between the two groups. Values are means, with standard errors represented by vertical bars; data were normalised to individual 0 min values (100%). *Mean values were significantly different from 0 min within the group. †Mean values were significantly different from 30 min within the group. ‡Mean values were significantly different from 150 min within the group. §Mean values were significantly different from 180 min within the group; || Mean values were significantly different between treatments ($P < 0.05$).

related to the ingestion of KAAA is not decreased by gluconeogenesis.

Previous studies have shown that KAAA supplementation can effectively decrease blood urea levels after long-term usage^(13,22). In the present study, in which acute supplementation of KAAA was used in the presence of a high basal concentration of urea, exercise increased blood urea levels similarly in both groups. During a low-energetic state, the ATP:ADP ratio decreases in muscle, and myokinase is activated to synthesise ATP. This process leads to an increase in both AMP deamination and urate synthesis rates⁽²³⁾. However, while AMP deamination appears to be inhibited during the initial phase of intense exercise, it is pronounced during the recovery period⁽²⁴⁾. In the present study, acute KAAA supplementation delayed the increase in blood urate concentration during prolonged exercise. Our data suggest that the effect of KAAA during exercise is not primarily due to ammonia removal via the synthesis of urea but rather to the carbon bodies used to produce ATP.

The KAAA supplement is a mixture of glucogenic and ketogenic amino acids. Thus, this supplement may

promote anaplerosis via different Krebs cycle intermediates. In addition, it has been described previously that KAAA supplementation does not increase the insulin response, an important goal in exercise supplementation⁽²⁵⁾.

In a recent study, we employed KAAA as a supplement to modify amino acid metabolism and ammonia biogenesis during resistance exercise in an animal model⁽²⁶⁾. In the present study, we confirmed that when using a ketogenic diet to promote metabolic stress, the acute use of a mixture of amino acids and keto acids in acute supplementation can diminish the increase in ammoniaemia caused by endurance exercise in humans. Due to the high amount of amino acids in the diet used in the present study, this effect seems to be due more to the presence of keto acids in the supplement than to a contribution from an acute intake of additional amino acids.

Acknowledgements

The present study was supported in part by the Institute of Technology and Research – Tiradentes University. E. S. P. and L.-C. C. performed the design; E. S. P., J. M. d. R. N., M.

G. D. d. M., R. D. d. A. and L.-C. C. were involved in the data collection and interpretation; E. S. P., R. D. d. A., J. M. d. R. N. and L.-C. C. were involved in the manuscript writing. The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Felipe V & Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* **67**, 259–279.
2. Wilkinson DJ, Smeeton NJ & Watt PW (2010) Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol* **91**, 200–219.
3. Munoz MD, Monfort P, Gaztelu JM, *et al.* (2000) Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus *in vitro*. *Neurochem Res* **25**, 437–441.
4. Nybo L (2010) CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Front Biosci (Elite Ed)* **2**, 779–792.
5. Wagenmakers AJ, Coakley JH & Edwards RH (1990) Metabolism of branched chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. *Int J Sports Med* **11**, Suppl. 2, S101–S113.
6. Wagenmakers AJ, Beckers EJ, Brouns F, *et al.* (1991) Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. *Am J Physiol* **260**, E883–E890.
7. Carvalho-Peixoto J, Alves RC & Cameron LC (2007) Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammoniaemia increase during endurance field exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* **32**, 1186–1190.
8. Bassini-Cameron A, Monteiro AN, Gomes A, *et al.* (2008) Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. *Br J Sports Med* **42**, 260–266.
9. Graham TE & MacLean DA (1992) Ammonia and amino acid metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Can J Physiol Pharmacol* **70**, 132–141.
10. Banister EW & Cameron BJ (1990) Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med* **11**, Suppl. 2, S129–S142.
11. Furst P (1989) Amino acid metabolism in uremia. *J Am Coll Nutr* **8**, 310–323.
12. Walser M (1975) Nutritional effects of nitrogen-free analogues of essential amino acids. *Life Sci* **17**, 1011–1020.
13. Savica V, Santoro D, Ciolino F, *et al.* (2005) Nutritional therapy in chronic kidney disease. *Nutr Clin Care* **8**, 70–76.
14. van Hall G, van der Vusse GJ, Söderlund K, *et al.* (1995) Deamination of amino acids as a source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol* **15**, 251–261.
15. Snow RJ, Carey MF, Stathis CG, *et al.* (2000) Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol* **88**, 1576–1580.
16. Langfort J, Czarnowski D, Zendzian-Piotrowska M, *et al.* (2004) Short-term low-carbohydrate diet dissociates lactate and ammonia thresholds in men. *J Strength Cond Res* **18**, 260–265.
17. Westman EC, Feinman RD, Mavropoulos JC, *et al.* (2007) Low-carbohydrate nutrition and metabolism. *Am J Clin Nutr* **86**, 276–284.
18. Ogino K, Kinugawa T, Osaki S, *et al.* (2000) Ammonia response to constant exercise: differences to the lactate response. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**, 612–617.
19. Wagenmakers AJ (1998) Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. *Exerc Sport Sci Rev* **26**, 287–314.
20. Shawcross DL, Olde Damink SW, Butterworth RF, *et al.* (2005) Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metab Brain Dis* **20**, 169–179.
21. Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, *et al.* (2003) Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [¹H–¹³C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* **37**, 420–428.
22. Walser M (1978) Principles of keto acid therapy in uremia. *Am J Clin Nutr* **31**, 1756–1760.
23. Sahlin K, Tonkonogi M & Söderlund K (1999) Plasma hypoxanthine and ammonia in humans during prolonged exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **80**, 417–422.
24. Hellsten Y, Richter EA, Kiens B, *et al.* (1999) AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol* **520**, 909–920.
25. Dalton RN & Chantler C (1983) Metabolism of orally administered branched-chain alpha-keto acids. *Kidney Int* **15**, S11–S15.
26. Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, *et al.* (2010) Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. *Br J Nutr* **104**, 1438–1442.

**CAPÍTULO III: Acute supplementation with keto analogues and amino acids
in rats during resistance exercise.**

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

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

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

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

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

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

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

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

(Received 17 November 2009 – Revised 11 May 2010 – Accepted 12 May 2010)

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

Ammonia: Urate: Urea: Resistance exercise

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

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

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

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

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

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

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

Materials and methods

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

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

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

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

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

Results

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

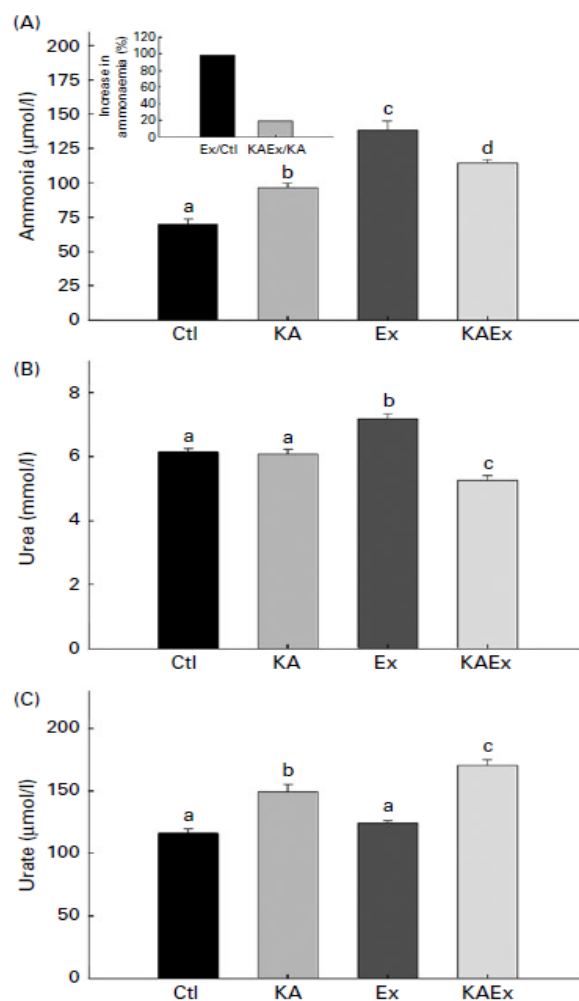


Fig. 1. Acute supplementation of keto analogues associated with amino acids (KAAA) affects ammonia (A), urea (B) and urate (C) metabolism. Ctl, control group (neither KAAA nor exercise); KA, KAAA-only group; Ex, exercise-only group; KAEx, KAAA and exercise group. Values are means, with standard errors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

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

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

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

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

The present study was supported in part by Tiradentes University.

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

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

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

CAPÍTULO IV: Caffeine affects the ammonemia response in athletes during prolonged exercise under ketogenic conditions.

Manuscript Number:

Title: Caffeine affects the ammonemia response in athletes during prolonged exercise under ketogenic conditions

Article Type: Original Research

Section/Category: Regular Issue

Keywords: ammonia; xanthine; ketogenic diet; endurance

Corresponding Author: PhD Luiz-Cláudio Cameron,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Eduardo Seixas Prado

Order of Authors: Eduardo Seixas Prado; José Rezende Neto; Rosemeire Almeida; Marcelia Melo; Luiz-Cláudio Cameron

Abstract: Both exercise and ketogenic diet favoring glycogen depletion and increased ammonemia. High ammonia levels can impair physical performance. Caffeine has been used as a resource to improve performance in exercise situations. The aim of this study was to evaluate the effect of caffeine supplementation on ammonemia cyclists under ketogenic diet and prolonged exercise. Thirteen athletes male cyclists (18-36 years) followed a ketogenic diet (35% protein, 55% fat and 10% carbohydrate) before and during the experimental trial experiment and were divided into groups: caffeine (CEx, n = 7) and placebo (LEx, n = 7). The athletes performed cycling indoors for 120 minutes (min) with an intensity of 75% to 85% HRmax estimated and blood samples were obtained at rest, during exercise, and throughout 60 min during the recovery period. Ammonemia rest was high (~ 90 μ mol/L) in both groups and increased up to 35% in response to exercise in LEx. The CEx group showed a significant decrease ammonemia at 60 min (P=0.001), 90 min (P=0.013), 120 min (P=0.004) and 180 min (P=0.045) compared with group LEx. Both groups showed a significant increase (~ 35%) of blood urea levels in response to exercise after 120 min of exercise, but with a higher concentration of blood urea in the LEx group. Blood urate levels were equivalent in both groups at rest and during exercise. Our results suggest that the use of caffeine may attenuate the increased ammonemia that occurs during exercise and ketogenic diet because it prevents glycogen depletion.

Abstract

Both exercise and ketogenic diet favoring glycogen depletion and increased ammonemia. High ammonia levels can impair physical performance. Caffeine has been used as a resource to improve performance in exercise situations. The aim of this study was to evaluate the effect of caffeine supplementation on ammonemia cyclists under ketogenic diet and prolonged exercise. Thirteen athletes male cyclists (18-36 years) followed a ketogenic diet (35% protein, 55% fat and 10% carbohydrate) before and during the experimental trial experiment and were divided into groups: caffeine (CEx, n = 7) and placebo (LEx, n = 7). The athletes performed cycling indoors for 120 minutes (min) with an intensity of 75% to 85% HR_{max} estimated and blood samples were obtained at rest, during exercise, and throughout 60 min during the recovery period. Ammonemia rest was high ($\sim 90 \mu\text{mol/L}$) in both groups and increased up to 35% in response to exercise in LEx. The CEx group showed a significant decrease ammonemia at 60 min ($P=0.001$), 90 min ($P=0.013$), 120 min ($P=0.004$) and 180 min ($P=0.045$) compared with group LEx. Both groups showed a significant increase ($\sim 35\%$) of blood urea levels in response to exercise after 120 min of exercise, but with a higher concentration of blood urea in the LEx group. Blood urate levels were equivalent in both groups at rest and during exercise. Our results suggest that the use of caffeine may attenuate the increased ammonemia that occurs during exercise and ketogenic diet because it prevents glycogen depletion.

Keywords: ammonia; xanthine; ketogenic diet; endurance.

Introduction

Caffeine is a 1,3,7-trimethylxanthine metabolised in the liver and the primary metabolic pathways involve demethylation reactions to form three dimethylxanthines: paraxanthine, theobromine, and theophylline [1]. The xanthine is a psychoactive drug and probably one of the most commonly used stimulants in sports because of its low cost and minimal side effects [2,3]. The performance improvement occurs with administration of oral doses ranging 3-9 mg.Kg⁻¹, especially in prolonged exercise, which can be explained, for various organic mechanisms [4,5]. The most physiologically relevant mechanism of action is probably the blockade of adenosine receptors, but evidence suggests that, at least under certain conditions, other biochemical mechanisms may also be operational, such as: mobilization of free fatty acids (FFA) from adipose tissue, resulting in higher rates of fat oxidation and sparing of muscle glycogen [1,5].

Ammonia (used here as a synonym for the sum of NH₃ and NH₄⁺) is highly toxic to humans and can cross the blood–brain barrier, which leads to a decrease in cerebral function, neuropsychiatric disorders, and death [6,7]. Ammonia-mediated excitotoxicity has been implicated in the mediation of central nervous system damage [8]

Data obtained from exercise studies have been used to elucidate the effects of hyperammonaemia. Several investigations have demonstrated that increased ammonia production occurs during various types of exercise [9-12]. During prolonged sub-maximal exercise a rise in ammonia concentration (>160 µmol/L) was observed in various studies [13,12] The consensus view is that the production of ammonia during exercise occurs via a combination of both AMP deamination and catabolism of amino acids, which are activated in an intensity and duration dependent manner [7] It has been suggested that ammonia promotes both central and peripheral fatigue and that better control of ammonia production will improve exercise performance [14]. The relationship between the effects of caffeine on performance and ammonia not been studied.

Furthermore, although ammonia has been shown to be produced by BCAA catabolism, independent of glycogen availability [15] various studies have linked ammonia formation to

carbohydrate availability [9,16] A low carbohydrate diet (termed a ketogenic diet) combined with physical exercise can reduce glycogen stores and induce hyperammonaemia [17,18] We used this metabolic effect of a ketogenic diet to enhance the effect of exercise on ammonia production.

In the present study, we evaluated the effect of caffeine supplementation on ammonia production during prolonged exercise.

Materials and methods

Thirteen male endurance-trained cyclists aged 18 to 36 years (27.8 ± 2.3 years; 70.42 ± 1.9 kg; 1.77 ± 0.01 m; VO_{2max} 54.6 ± 1.8 mL/kg⁻¹/min⁻¹ and maximum heart rate (HR_{max}) 192.14 ± 2.35 ; mean $\pm$ SE) participated in the study voluntarily. All subjects had similar physical capabilities and a minimum of three years of training. They had not used ergogenic substances or any other drugs. This study was approved by the Ethics Committee for Human Research at the Federal University of the State of Rio de Janeiro.

Athletes reported to the laboratory three days before the experimental trial (D-3) to become habituated with the cycle ergometer and to optimize the power output. Subjects received an individualized ketogenic diet (35% of the recommended energy intake from proteins; 55% from lipids; and less than 10% from carbohydrates; see [19] for a review on the effects of a low carbohydrate diet on metabolism) for two days before (D-2; D-1) and during the experimental day (D0).

Subjects were asked to maintain their normal training schedule (~70 km per day) and to follow the ketogenic diet up to 48 h (normal training and ketogenic diet was used to reduce muscle glycogen stores and induce ammoniaemia) before the experimental day. On the experimental day, the subjects reported to the laboratory in a fasting state and received breakfast (T-360) and a light lunch (T-120). One hour after lunch (T-60), the subjects received either 5mg.Kg⁻¹ body weight of caffeine (CEx; n = 7) or lactose (LEx; n=7) in a random double-blind manner. Each of the two types of supplement was provided in indistinguishable capsules (Figure 1).

Before the experimental trial, initial stretching was followed by a warm-up of 10 minutes at 50% of the HR_{max}. The experiment began one hour after supplementation and athletes cycled indoors for two hours at 80 revolutions per minute (rpm) according to a metronome in a room with a constant temperature and relative humidity (23 ± 2 °C and $60 \pm 5\%$, respectively). HR was recorded continuously throughout the exercise using a HR monitor (Polar CS200, Kempele, Finland). The power output was modified for each individual every 5

min so that the athletes maintained 75% to 85% of their estimated HR_{max} ($\sim 180.15 \pm 1.13$ W; $\sim 157.35 \pm 2.41$ beats.min⁻¹; mean $\pm$ SE, respectively).

A catheter was placed into the medial cubital vein. Blood samples were obtained at rest (T0) and at thirty-minute intervals throughout the exercise period (T30, T60, T90, T120). Finally, blood samples were collected during one hour of recovery period every thirty-minute intervals (T150, T180). Athletes received water *ad libitum* during the trial.

Blood samples were analyzed after collection. To avoid the loss of volatile compounds, a portion of the blood samples were immediately centrifuged, and the sera was separated, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C for subsequent biochemical analysis. The remaining blood sample was stored for hematological analysis. Biochemical analyses of glucose, urea and urate concentration were performed using commercially available spectrophotometric assays (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Lactate and ammonia were measured using enzymatic UV method (Randox, Crumlin, United Kingdom) on a Dade Model Dimension RXL Automated Chemistry Analyzer, and hematologicals were analyzed using a Sysmex SE-9500 Automated Hematology Analyzer.

To decrease individual variability, the data were normalised to the 0 min values. The data changes between time points were analyzed by one-way ANOVA. Group changes were evaluated by two-way ANOVA for repeated measures. Significance ($P < 0.05$) was confirmed using the Tukey post hoc test. The data are presented as the mean $\pm$ SE. The area under the curve (AUC) for the blood ammonia data for each individual in each treatment was determined using the following equation:

$$AUC = A_i (T_{i+1} - T_i) + 0.5(A_{i+1} - A_i) (T_{i+1} - T_i)$$

assuming resting ammonia data as the baseline, and where A is ammonia and T is time.

Results

A 120-min cycling session was employed to evaluate the effect of caffeine on blood ammonia concentration. Ammonemia rest was high ($\sim 90 \mu\text{mol/l}$) in both groups and increased up to 35% in response to exercise in LEx. No significant increase in ammonemia was detected in the CEx group. The CEx group showed a significant decrease ammonemia 60 min ($P = 0.001$), 90 min ($P = 0.013$), 120 min ($P = 0.004$) and 180 min ($P = 0.045$) compared with group LEx. The AUC from the supplemented group was 14% smaller than the control group. The ammonia concentrations in the LEx group returned to the baseline levels at 150 min. The CEx group demonstrated a significantly greater decrease in ammonemia ($\sim 20\%$) compared to LEx at 150 min, reaching levels significantly lower after 1 h of recovery (Figure 2A).

To evaluate the effect of caffeine on urea synthesis, we measured the blood urea concentration. Both groups showed a significant increase ($\sim 35\%$) of blood urea levels in response to exercise after 120 min of exercise, but with a higher concentration of blood urea LEx apparent in the group, with 60-90 min of exercise (Figure 2B).

To differentiate the ammonia produced by AMP deamination from amino acid deamination, we measured blood urate levels. Resting urate levels were equivalent in both groups and remained statistically unchanged in the KEx group throughout of the exercise period (Figure 2C).

To understand the effect of caffeine on glycemia maintenance, we measured glycemia during the exercise and recovery periods. Glucose was not altered either during exercise or between groups (Figure 3A). An increase was observed in blood lactate during the first 30 min of exercise in both groups, but group CEx showed higher lactate production during exercise, especially after 60 min of exercise ($P = 0.026$) (Figure 3B).

Discussion

The benefits of caffeine on endurance performance are well established in human models, even under adverse conditions [20,21]. Of the mechanisms purported to explain the beneficial effects of caffeine supplementation, recent findings support a CNS response mediated by antagonism of adenosine receptors, but other biochemical mechanisms may also be operational [1,5]. On the other hand, it is widely reported that ammonia production increases during exercise and that ammonia could be a deleterious metabolite that promotes fatigue [14,7]. Further, a low carbohydrate diet increases the production of ammonia [22]. Therefore, we investigated the effect of caffeine on exercise-induced ammonia production.

The relationship between ammonia formation and carbohydrate availability has been investigated [17]. Ammonia production in the muscle may be due to the depletion of glycogen stores and the deamination of AMP [17,23]. Furthermore, it is acknowledged that excessive protein intake leads to increased generation of ammoniaemia, and ammonia is metabolized to urea by the liver [6]. In this study, we used a ketogenic diet (with 10% from carbohydrates and 35% from proteins) to decrease the availability of glycogen in the liver and muscle and increase the availability of amino acids to supply energy. The coingestion of caffeine ($5.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) with carbohydrate during exercise enhanced time trial performance lasting approximately 45 min by 4.6% compared with only carbohydrate and 9.0% compared with water placebo. However, caffeine did not influence exogenous carbohydrate oxidation or glucose kinetics during 105-min steady-state cycling at 62% $\text{VO}_{2\text{max}}$ [24].

Although basal ammoniaemia was high in both studied groups due to the ketogenic diet ($\sim 90 \text{ }\mu\text{mol/L}$) and we know that ammonia is critical to the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema, clinical observations did not show a consistent correlation between the concentration of ammonia in the blood and symptoms of hepatic encephalopathy [25]. The levels are higher than levels commonly seen in healthy subjects at rest ($20\text{--}80 \text{ }\mu\text{mol/L}$) [15].

The ammonia concentration increased in response to exercise in the control group, and this effect was reduced by administration of caffeine. The supplement also increased ammonia clearance in the blood during the recovery period. These effects may be due to the

mobilization of free fatty acids from adipose tissue, resulting in higher rates of fat oxidation and sparing of muscle glycogen.

In the present study, we did not detect any changes in glycemia during exercise or as a result of caffeine supplementation. In addition, the blood lactate concentration, fluctuated similarly in both groups but caffeine group showed higher lactate production during exercise. These data demonstrate that caffeine can promotes higher rates of sparing of muscle glycogen and and consequently decreases ammonemia during exercise.

Although there is very little evidence to support the hypothesis that caffeine has effects as a result of enhanced fat oxidation [26], it is has been commonly proposed to enhance exercise capacity, among others, by promoting fat oxidation and inhibiting carbohydrate oxidation. This action has been suggested to result in a reduced dependence on muscle glycogen stores, and the glycogen sparing then promotes increased endurance (5,20).

It seems that caffeine promotes an inhibition of conversion of glycogen phosphorylase b (inactive form) to glycogen phosphorylase a (active form), resulting in less degradation of glycogen in both muscle and in liver glycogen resulting in higher rates of sparing of muscle glycogen. Furthermore, caffeine appears to inhibit the activity of phosphodiesterase isoenzymes, producing an accumulation of intracellular cAMP and thereby potentiating the stimulation of adenylyl cyclase. This action, stimulate protein kinase A to promote cellular responses such as fat oxidation[5].

In the study, even in the presence of a high basal concentration of urea, exercise increased blood urea levels similarly in both groups. This result elucidates the source of ammonia production because urea is the primary route of ammonia excretion in humans. An increase en urea synthesis has been found in rats administered large doses of caffeine, but this increase appeared only after some days of caffeine treatment [27,28]..

Our data suggest that the effect of caffeine as a ergogenic aid during exercise may be due to reduction amonemia and consequent reduction in central fatigue and / or peripheral.

Acknowledgements

This study was supported in part by the Institute of Technology and Research - Tiradentes University. Design: ESP and LCC; Data collection and interpretation: ESP, JMRN, MGD, RDA and LCC; Manuscript writing: ESP, RDA, JMRN and LCC.

References

1. Graham TE. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports Med* 2001;**31**:785-807.
2. Williams MV. Ergogenic and ergolytic substances. *Med Sci Sports Exerc* 1992;**24**:S344-S48.
3. Spriet LL. Caffeine and performance. *Int J Sports Nutr* 1995;**5**:84-99.
4. Juhn MS. Popular sports supplements and ergogenic aids. *Sports Med* 2003;**33**:921-39.
5. Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;**45**:535-62.
6. Felipe V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 2002;**67**:259-79.
7. Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol*. Forthcoming 2010.
8. Munoz MD, Monfort P, Gaztelu JM, et al. Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro. *Neurochem Res* 2000;**25**:437-41..
9. Wagenmakers AJ, Coakley JH, Edwards RH. Metabolism of branched chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. *Int J Sports Med* 1990;**11** Suppl 2:S101–S13.
10. Wagenmakers AJ, Beckers EJ, Brouns F, et al. Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. *Am J Physiol* 1991;**260**(6 Pt 1):E883-90.
11. Carvalho-Peixoto J, Alves RC, Cameron LC. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonia increase during endurance field exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007;**32**:1186-190.
12. Bassini-Cameron A, Monteiro AN, Gomes A, et al. Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. *Br J Sports Med* 2008;**42**:260-66.

13. Graham TE, MacLean DA. Ammonia and amino acid metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;**70**:132-141.
14. Banister EW, Cameron BJ. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med* 1990;**11** Suppl 2:S129-S42.
15. van Hall G, van der Vusse GJ, Söderlund K, et al. Deamination of amino acids as a source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol* 1995;**15**:489 (Pt 1):251-61.
16. Snow RJ, Carey MF, Stathis CG, et al. Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol* 2000;**88**:1576-80.
17. Roeykens J, Magnus L, Rogers R, et al. Blood ammonia–heart rate relationship during graded exercise is not influenced by glycogen depletion. *Int J Sports Med* 1998;**19**:26-31.
18. Andrews JL, Sedlock DA, Flynn MG, et al. Carbohydrate loading and supplementation in endurance-trained women runners. *J Appl Physiol* 2003;**95**:584-90.
19. Westman EC, Feinman RD, Mavropoulos JC, et al. Low-carbohydrate nutrition and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2007;**86**:276–284.
20. Costill DL, Dalsky G, Fink W. Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. *Med Sci Sports Exerc* 1978;**10**:155-8.
21. Graham TE, Spriet LL. Performance and metabolic responses to a high caffeine dose during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 1991;**71**:2292-8.
22. Wagenmakers AJ. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. *Exerc Sport Sci Rev* 1998;**26**:287-314.
23. Ogino K, Kinugawa T, Osaki S, et al. Ammonia response to constant exercise: differences to the lactate response. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;**27**:612-617.
24. Hulston CJ, Jeukendrup AE. Substrate metabolism and exercise performance with caffeine and carbohydrate intake. *Med Sci Sports Exerc* 2008;**40**:2096-104.
25. Shawcross DL, Olde Damink SW, Butterworth RF, et al. Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metab Brain Dis* 2005;**20**:169-179.

26. Graham TE, Battram DS, Dela F, et al. Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;**33**:1311-8.
27. Jordá A, Saéz GT, Portolés M, et al. In vitro effect of caffeine on some aspects of nitrogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochimie* 1988;**70**:1417-21.
28. Jordá A, Portolés M, Guasch R, et al. Effect of caffeine on urea biosynthesis and some related processes, ketone bodies, ATP and liver amino acids. *Biochem Pharmacol* 1989;**38**:2727-32.

Figure 1. Experimental design. Cyclists were subjected to habituation and received an individualized dietary prescription (D-3). Two days before the experimental day (D-2; D-1), the subjects followed a ketogenic diet and normal training. On the experimental day (D0), cyclists received breakfast (T-360) and lunch (T-120) in accordance with the ketogenic diet. Supplement (CEx or LEx) was administered 60 min before the trial (T-60), and the athletes exercised for two hours (T0 to T120) and recovered for 60 min (T150 and T180). Blood was collected before, during, and after exercise.

Figure 2. Acute caffeine supplementation affects ammonia, urea and urate metabolism. Athletes exercised for two hours after caffeine supplementation (CEx, ○) or control supplementation (LEx, ●). Note that graph values were normalized (mean ± SE) to the pre-exercise values (0 min; 100%). (A) Ammonia: resting values were CEx = 96.33 ± 9.30 μmol/L and LEx = 84.36 ± 9.06 μmol/L; (B) Urea: resting values were CEx = 18.46 ± 0.83 mmol/L and LEx = 16.47 ± 1.79 mmol/L; (C) Urate: resting values were CEx = 293.25 ± 24.65 μmol/L and LEx = 293.25 ± 19.24 μmol/L. 0 min values for the three metabolites did not differ between the two groups. * denotes a difference from 0 min within the group; † denotes a difference from 30 min within the group; ‡ denotes a difference from 150 min within the group; § denotes a difference from 180 min within the group; || denotes a difference between treatments ($P < 0.05$).

Figure 3. Acute caffeine supplementation affects glucose and lactate metabolism. Athletes exercised for two hours after caffeine supplementation (CEx, ○) or control supplementation (LEx, ●). Note that lactate values were CEx (□) or LEx (■) and graph values were normalized (mean ± SE) to the pre-exercise values (0 min). (A) Glucose: resting values were CEx = 5.16 ± 0.25 mmol/L and LEx = 5.24 ± 0.18 mmol/L; and (B) Lactate: resting values were CEx = 1.97 ± 0.14 mmol/L and LEx = 1.92 ± 0.15 mmol/L. 0 min values for the two metabolites did not differ between the two groups. * denotes a difference from 0 min within the group; † denotes a difference from 30 min within the group; ‡ denotes a difference from 150 min within the group; § denotes a difference from 180 min within the group; || denotes a difference between treatments ($P < 0.05$).

Caffeine affects the ammonemia response in athletes during prolonged exercise under ketogenic conditions

Running head: **Caffeine reduce ammonemia in exercise**

Eduardo Seixas Prado^{1,2,3,4}

José Melquiades de Rezende Neto³

Rosemeire Dantas de Almeida^{1,2,3}

Marcelia Garcez Dória de Melo⁵

Luiz-Claudio Cameron^{1,2,6}

¹Laboratory of Protein Biochemistry – Federal University of State of Rio de Janeiro - RJ

Av. Pasteur, 296, Urca, Rio de Janeiro, Brazil

²Institute of Genetics and Biochemistry – Federal University of Uberlândia – MG

Av. Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia, Brazil

³Biological and Health Sciences Center - Tiradentes University – SE

Av. Murilo Dantas, S/N, Farolândia, Aracaju, Brazil

⁴Poet João Freire Ribeiro School – Sergipe Secretary of Education– SE

Av. Nação, S/N, Jardins, Aracaju, Brazil

⁵Department of Clinical Biochemistry – Governor João Alves Filho Hospital

Av. Presidente Tancredo Neves, 7501, Novo Paraíso, Aracaju, Brazil

⁶Graduate Program in Human Movement Science – University Castelo Branco – RJ – Brazil

Rua da Quitanda, 71, Centro, Rio de Janeiro, Brazil

Mailing Address:

Prof. L. C. Cameron

Laboratory of Protein Biochemistry

Federal University of State of Rio de Janeiro.

Av. Pasteur, 296, Urca, Rio de Janeiro, Brazil

Telephone: +55 21 25425280

CEP 22290–240

cameron@unirio.br

Cover Letter

Professor Gregory Kolt
Editor-in-Chief
Journal of Science and Medicine in Sport

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled "**Caffeine affects the ammonia response in athletes during prolonged exercise under ketogenic conditions**" by Prado et al. for publication in Journal of Science and Medicine in Sport. This manuscript contains original material that has not been previously published and is not currently under consideration elsewhere. In addition, the manuscript will not be submitted elsewhere until a final decision has been made by the journal.

We studied a low-carbohydrate ketogenic diet and exercise as a hyperammonaemia model in order to understand the role of the association of caffeine supplementation in ammonia metabolism.

Previous results from our laboratory showed that both glutamine and carbohydrates protect against an increase in ammonia levels in the blood (Carvalho-Peixoto et al., 2007 - Appl Physiol Nutr Metab), and that glutamine and alanine function distinctly in metabolism in an exercise intensity-dependent way (Bassini-Cameron et al., 2008 - Br J Sports Med). In parallel, we attempted to clarify the kinetics of muscle injury and its relation to white blood cells (Bassini-Cameron et al., 2007 and Bessa et al., 2008 - Br J Sports Med; Lazarim et al., 2007 - J Sci Med Sport; Gonçalves et al., 2010 - Amino Acids - submitted). Indeed two of our papers were recently quoted in a Wilkinson and colleagues review (Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Prog Neurobiol. 2010).

"Since the publication of the original ideas by Banister and colleagues, few researchers have attempted to fully substantiate this theory. Of the studies which have been performed, the majority have either investigated the production and metabolism of ammonia within the periphery (Spodaryk et al., 1990; Graham et al., 1993, 1995b; Rush et al., 1995; Esbjornsson-Liljedahl and Jansson, 1999; Snow et al., 2000; Mohr et al., 2006), or investigated the link between attenuation of ammonia production during exercise and performance (Denis et al., 1991; Eto et al., 1994; **Carvalho-Peixoto et al., 2007; Bassini-Cameron et al., 2008**). In light of this, it is unsurprising that the ammonia fatigue theory has not remained at the forefront of research interest. However, the findings presented in some more recent literature may warrant the link between ammonia, the brain and fatigue to be revisited."

Here, we attempted to elucidate caffeine supplementation and the protection it confers in ammonia production. Since ammonia is toxic to the nervous system, studying protection against increases in ammonia due to exercise can identify ways to improve athletes' performance and facilitate the elucidation of therapeutic targets. Therefore, we believe that the

present study contributes important data to our understanding of metabolism, and that these findings could be helpful for the development of future therapies. This knowledge could also be used for caffeine supplementation during hyperammonaemic states.

The present research was conducted with written consent from the subjects, who were instructed about the nature of and the procedures used in this study, thus meeting the requirements for carrying out research in human subjects (National Health Council, Brazil, 1996), and was approved by the Human Research Committee of the Universidade Castelo Branco. The manuscript meets all points of the Journal's guidelines and has not conflict of interest. In addition, we declare that the manuscript has not been submitted to any other journal and that all authors have read and approved the final version of the manuscript and made significant contributions to the study.

We sincerely believe that our work is in accordance with the scope of Journal of Science and Medicine in Sport and that it is acceptable for publication as a original research papers due to the importance of these findings.

Sincerely yours,

L. C. Cameron, Ph.D.

Professor

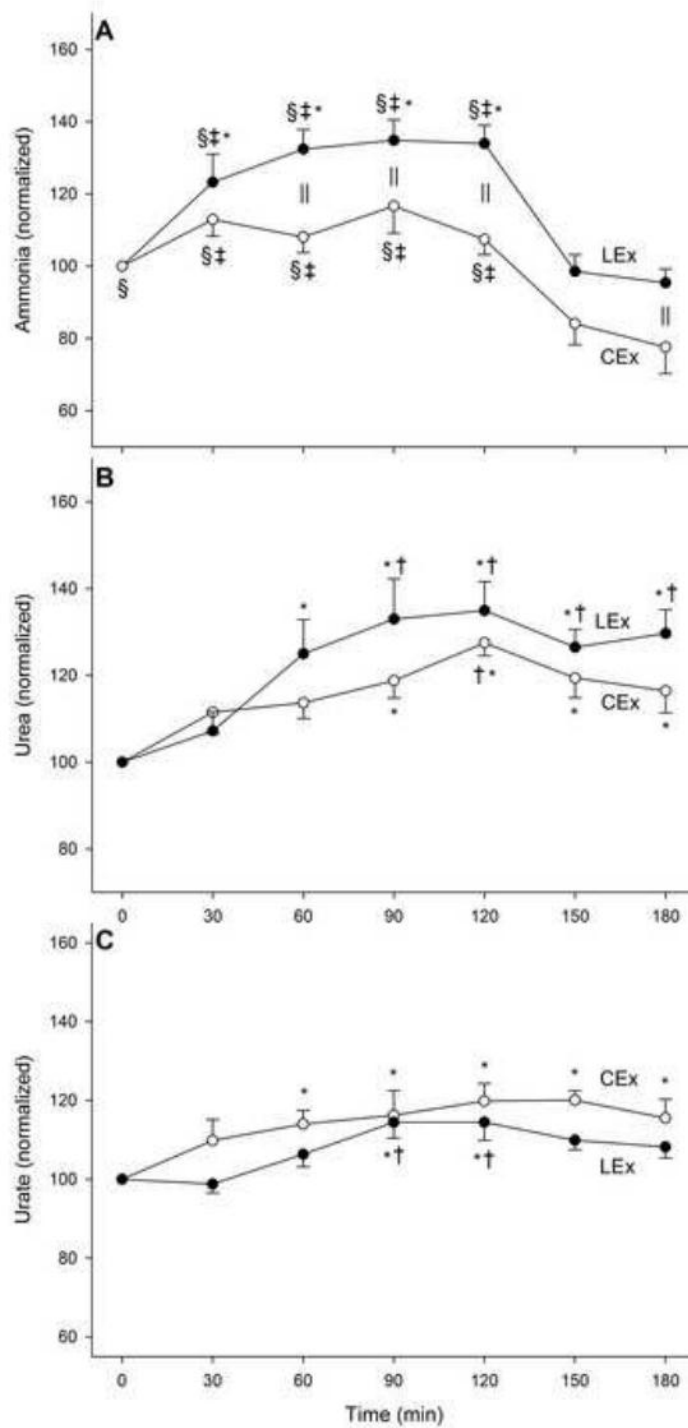
cameron@unirio.br

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

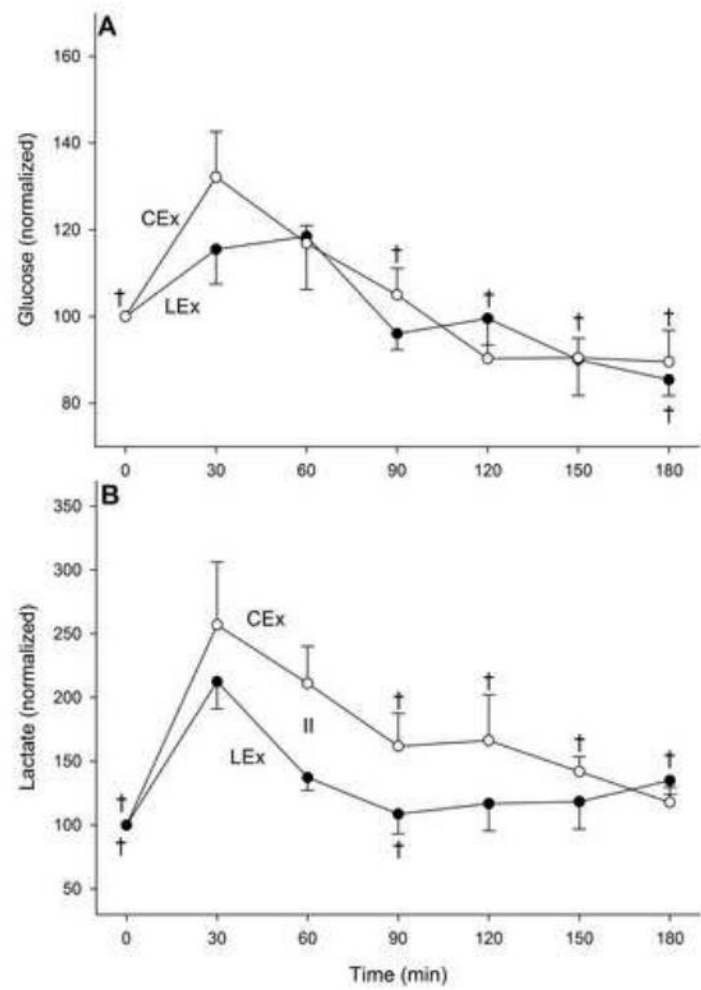
Experimental Day with ketogenic diet and exercise	D ₋₃	Habituation and prescription	
	D ₋₂	Ketogenic diet	
	D ₋₁		
	D ₀	T-360	Breakfast
		T-120	Lunch
		T-60	Supplementation
		T-10	Warming up
		T0	Exercise
		T30	
		T60	
		T90	
		T120	
		T150	Recovery
		T180	

Blood sample

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)



Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)



Conclusão geral

Um aumento da amonemia, induzido tanto pelo exercício prolongado como pelo de curta duração e alta intensidade, é exacerbado pela dieta cetogênica. Por outro lado, a suplementação de cetoanálogos promove uma redução da amonemia e de outros compostos nitrogenados. A dieta cetogênica combinada ao exercício parece induzir um aumento sinérgico da neoglicogênese.

ANEXO: Resultados complementares

Introdução

Este tópico apresenta resultados complementares do artigo descrito no capítulo II, intitulado “Keto analogues and amino acids supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions”. Assim, todos os procedimentos metodológicos, foram iguais aos apresentados no artigo acima descrito.

IV.1. Número de leucócitos e suas subpopulações

O exercício físico, seja ele agudo ou crônico, exerce um efeito sobre a função imunológica, prejudicando temporariamente as funções das células imunes (NIEMAN; NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994; GLEESON, 2002). Esses efeitos, dependem da intensidade e duração do exercício, e promovem alterações dos níveis de mediadores pró-inflamatórios circulantes e, conseqüentemente, os anti-inflamatórios (OSTROWSKI et al, 1999).

A ingestão de carboidratos por atletas sugere que durante o exercício ocorre uma atenuação na concentração de cortisol, hormônio do crescimento, diminuída resposta de adrenalina, poucas perturbações na contagem dos leucócitos, menor fagocitose dos granulócitos e dos monócitos (NIEMAN et al, 2003).

Em nosso experimento a quantidade de leucócitos aumentou durante o exercício (~100%), especialmente no grupo KEx em relação ao grupo LEx, após 120 min de atividade (Figura 16). Sugere-se que a leucocitose é modulada pelos efeitos do estresse, secreção de catecolaminas, e conseqüentemente, o aumento da demarginação celular pode estar relacionado a um aumento gradativo da intensidade do exercício físico (NATALE et al, 2003). Vale ressaltar, que este aumento foi devido principalmente a um aumento de linfócitos, em ambos os grupos, retornando aos valores basais após uma hora de recuperação (Figura 17), o que corrobora com pesquisas anteriores (RONSEN et al, 2001; BOYUM et al, 2002). Sugere-se também que, essas alterações decorrem da resposta à adrenalina, pois atividades com intensidade acima de 60% do $\text{VO}_2\text{máx}$ provocam aumento agudo de secreção desse

hormônio e aumento da atividade dos receptores β 2-adrenérgicos (KHAN et al, 1986; MAISEL et al, 1990).

Nossos achados corroboram com estudos anteriores (NATALE et al, 2003). Porém o grupo KEx parece exercer maiores alterações na contagem de neutrófilos no sangue, imediatamente, após o início do exercício, mantendo-se elevada até mesmo depois da recuperação (Figura 18). Poucas alterações foram verificadas nos valores de eosinófilos e basófilos para ambos os grupos (Figuras 19 e 20).

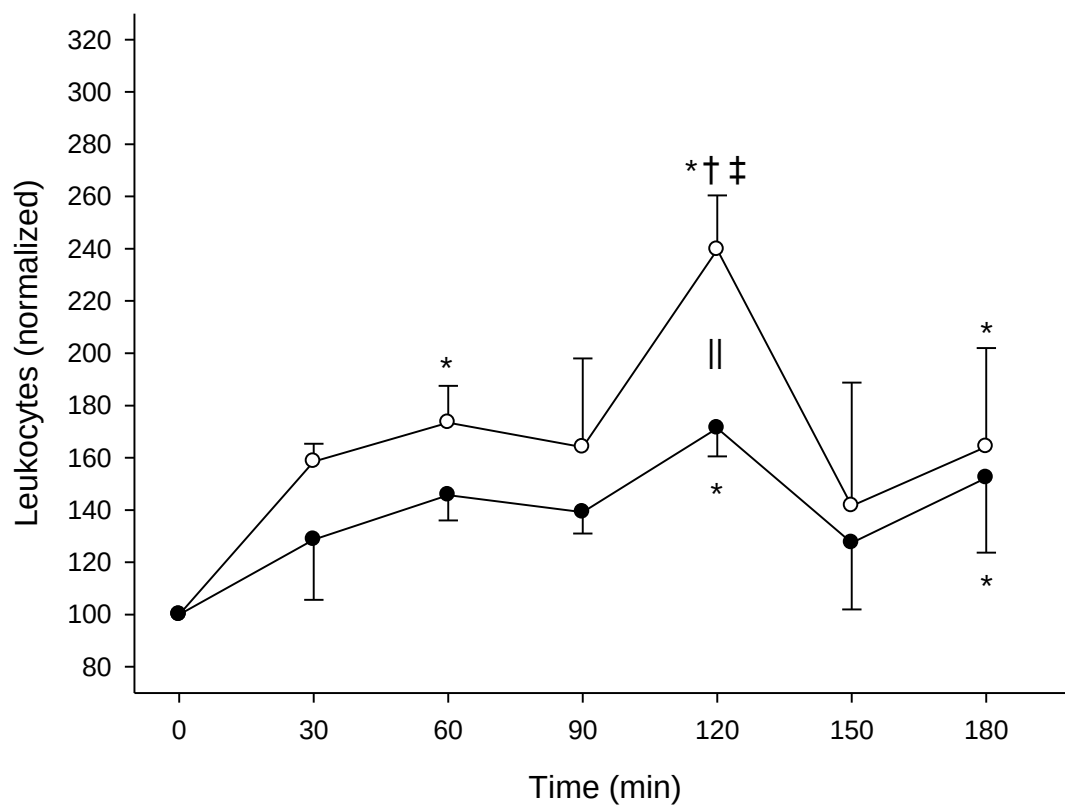


Figura 16: Contagem de leucócitos durante exercício e recuperação. Grupo placebo • (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; ‡ diferença significativa de 150 dentro do grupo; || diferença significativa entre os grupos.

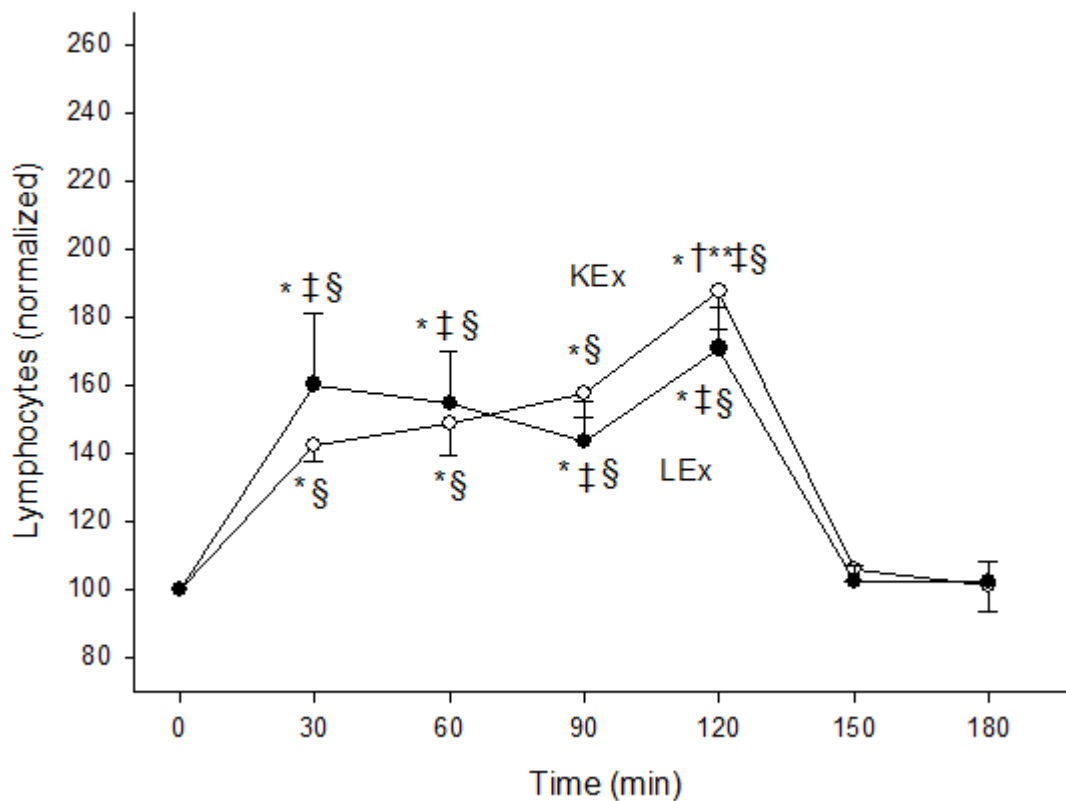


Figura 17: Contagem de linfócitos durante exercício e recuperação. Grupo placebo • (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; ** diferença significativa de 60 dentro do grupo; ‡ diferença significativa de 150 dentro do grupo; § diferença significativa de 180 dentro do grupo.

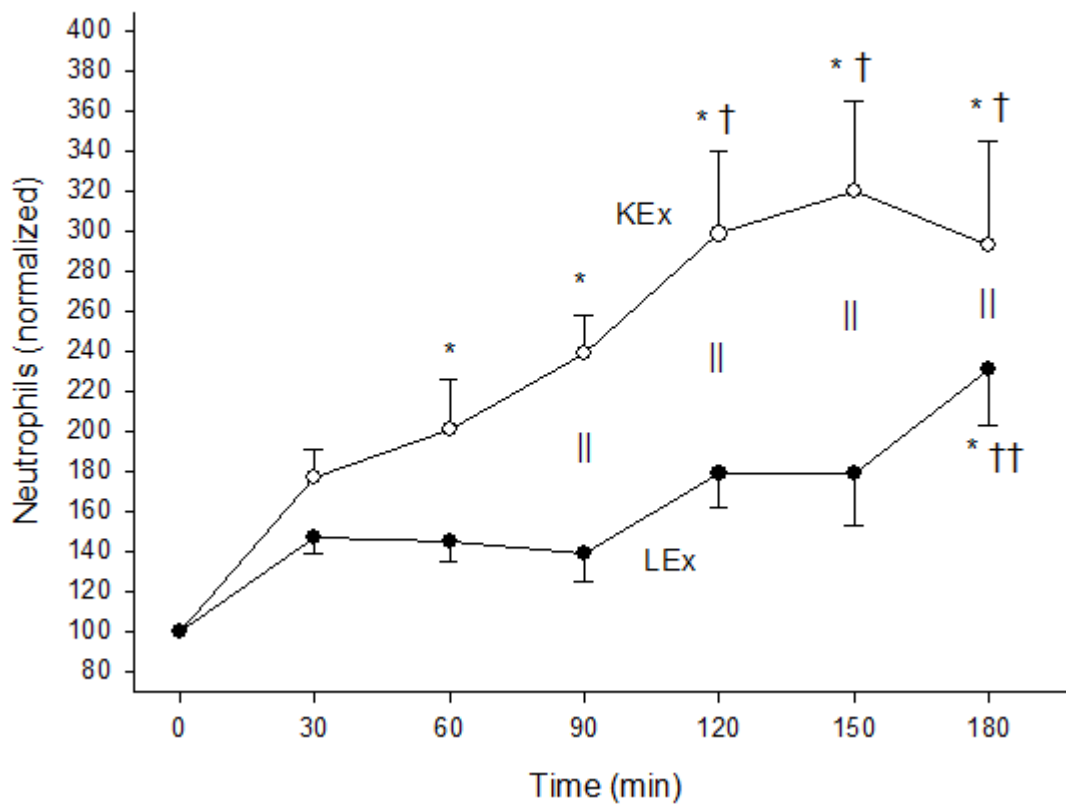


Figura 18: Contagem de neutrófilos durante exercício e recuperação. Grupo placebo • (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; †† diferença significativa de 90 dentro do grupo; || diferença significativa entre os grupos.

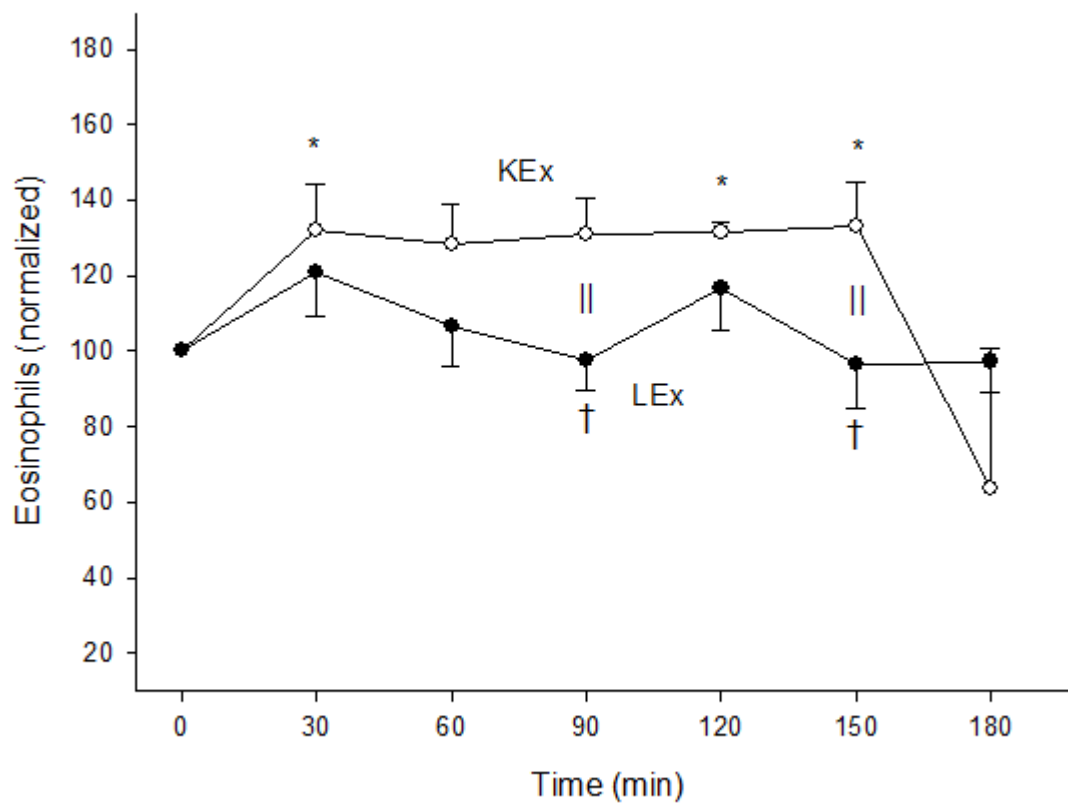


Figura 19: Contagem de eosinófilos durante exercício e recuperação. Grupo placebo • (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; II diferença significativa entre os grupos.

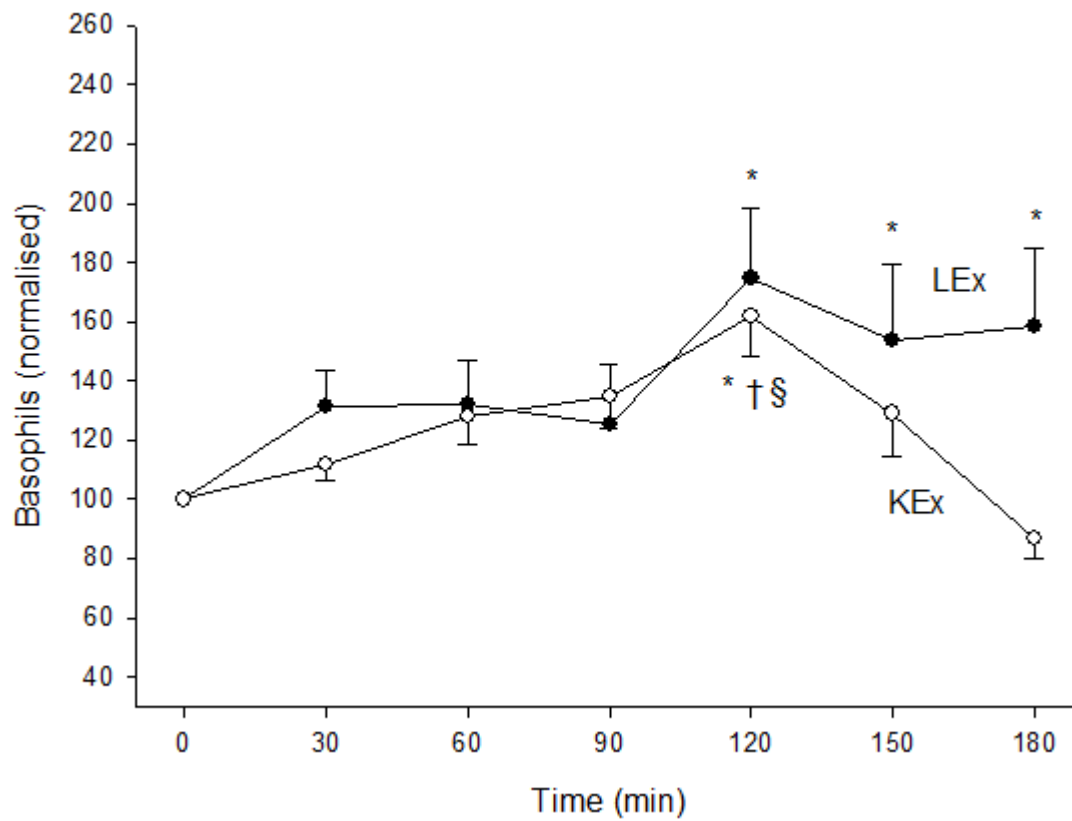


Figura 20: Contagem de basófilos durante exercício e recuperação. Grupo placebo • (LEx); Grupo experimental ○ (KEx). * diferença significativa de 0 dentro do grupo; † diferença significativa de 30 dentro do grupo; § diferença significativa de 180 dentro do grupo.

Referências

Bøyum A, Rønsen O, Tennfjord VA, Tollefsen S, Haugen AH, Opstad PK, Bahr R. Chemiluminescence response of granulocytes from elite athletes during recovery from one or two intense bouts of exercise. **Eur J Appl Physiol.** 2002;88(1-2):20-8.

Gleeson M. Immune function in sport and exercise. **J Appl Physiol.** 2007;103(2):693-9.

Khan MM, Sansoni P, Silverman ED, Engleman EG, Melmon KL. Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes. **Biochem Pharmacol.** 1986;35(7):1137-42.

Maisel AS, Harris T, Rearden CA, Michel MC. Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. **Circulation.** 1990;82(6):2003-10.

Natale VM, Brenner IK, Moldoveanu AI, Vasiliou P, Shek P, Shephard RJ. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. **Sao Paulo Med J.** 2003;121(1):9-14.

Nieman DC, Davis JM, Henson DA, Walberg-Rankin J, Shute M, Dumke CL, Utter AC, Vinci DM, Carson JA, Brown A, Lee WJ, McAnulty SR, McAnulty LS. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. **J Appl Physiol.** 2003;94(5):1917-25.

Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL. The immune response to exercise. **Semin Hematol.** 1994;31(2):166-79.

Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol.** 1999;515(Pt 1):287-91.

Ronsen O, Pedersen BK, Øritsland TR, Bahr R, Kjeldsen-Kragh J. Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. **J Appl Physiol.** 2001;91(1):425-34.