

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Patrícia Lopes de Campos

Depleção de glicogênio e suplementação aguda de Aminoácidos de Cadeia Ramificada em ratos treinados: implicações sobre as reações anapleróticas.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) PATRICIA LOPES DE CAMPOS e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Antonio Herbert Lancha Júnior

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C157d	<p>Campos, Patrícia Lopes de Depleção de glicogênio e suplementação aguda de aminoácidos de cadeia ramificada no exercício sub-máximo em ratos treinados: implicações sobre as reações anapleróticas / Patrícia Lopes de Campos. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.</p> <p>Orientador: Antonio Hebert Lancha Junior. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Aminoácidos de cadeia ramificada. 2. Exercícios físicos. 3. Rato. 4. Krebs, Ciclo de. I. Hebert Lancha Junior. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdet/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Glycogen depletion and acute branched-chain aminoacids supplementation on submaximal exercise in trained rats: implications on anaplerotic reactions.

Palavras-chave em inglês: branched chain amino acids, physical exercises, rat, Krebs cycle.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutorado.

Banca examinadora: Hebert Lancha Junior, Julio Orlando Tirapegui Toledo, Luis Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa, Miguel Arcaño Áreas, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes,

Data da defesa: 29/06/2005.

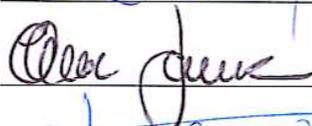
Data da Defesa: 29/06/2005

BANCA EXAMINADORA:

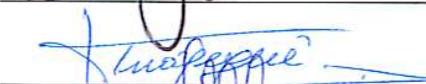
Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior (Orientador)



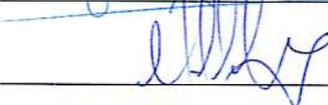
Prof. Dr. Eivor Martins Júnior



Prof. Dr. Júlio Orlando Tirapgui Toledo



Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas



Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes



Prof. Dr. Eduardo Kokubun



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



**“Thou hast spoken right, ‘tis true.
The wheel is come full circle.”**

Edmund, in King Lear.

“Vós haveis falado corretamente, isto é verdade.
A roda se tornou um ciclo completo”

Dedico esse trabalho ao
Rodrigo Ferraz, meu
marido, e ao Prof. Dr. Luis
Fernando Bicudo Pereira
Costa Rosa, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Ao querido orientador e, sobretudo, grande amigo, Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior, pela amizade, motivação, confiança, empenho e oportunidade de aprender e evoluir, como pesquisadora e como ser humano. Obrigada por tudo!

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo fomento aos meus projetos na forma de auxílio à pesquisa, tanto no Doutorado (Proc. 01/00110-3), como no Mestrado. Sem isso, nenhum deles teria sido possível.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP e o Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano da Escola de Educação Física e Esporte da USP, pelo apoio recebido e por toda a estrutura disponibilizada.

Aos colegas e amigos de laboratório, sempre prestativos e presentes, cujo auxílio foi imprescindível para a realização desse trabalho: Thomas Bozza Adolpho, Thiago Onofre Freire, Patrícia Berbel, Bruno Gualano, Hamilton Augusto Roschel, Fernanda Scagliusi, Desire Coelho, Fabiana Benatti, Viviane Polacow, Marcelo Marquezi, André dos Santos Costa, Guilherme Artioli e Josilene Gomes.

Às grandes amigas Luciana Oquendo Pereira Lancha, Rachel Pamfilio e Camila Sanchez de Freitas, que dividiram comigo os revezes e as conquistas de todo esse trabalho, entre muitas outras coisas.

Ao querido Prof. Dr. Luiz Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa (*in memoriam*), Chefe do Laboratório de Metabolismo do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela amizade, pelo constante apoio, por sempre disponibilizar todos os recursos que estivessem ao seu alcance, pelo auxílio no desenvolvimento de vários métodos e dosagens bioquímicas.

Ao Prof. Dr. Eivor Martins Júnior e ao doutorando Wilton M. Cunha, membros do Laboratório de Metabolismo do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo apoio nas dosagens bioquímicas lá realizadas.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, Andréia Vigilato e Marina Andresa da Cruz, pela eficiência e presteza.

Ao Grupo Pão de Açúcar, pelo estímulo, compreensão e apoio recebidos, principalmente pela Diretoria Executiva e Departamento de Recursos Humanos.

Aos meus pacientes, que me despertam a vontade de ser uma profissional em constante aperfeiçoamento.

Ao meu marido Rodrigo Ferraz, pelo amor, carinho e apoio incondicional ao meu trabalho, mesmo que isso significasse alguns sacrifícios, e por ter tornado minha vida muito mais feliz. À Penélope, parte integrante da nossa família, pelos incontáveis momentos de alegria.

Aos meus pais, Pedro Lopes de Campos e Dejanira Scarceli Lopes de Campos, por todas as lições de vida, muito grandes e valiosas para caberem em poucas linhas.

Ao meu irmão Alexandre Lopes de Campos e família, pelo carinho e apoio de todas as horas.

A Deus, que me deu forças e oportunidade de realizar tudo o que fiz, até hoje.

A todos vocês, meu mais sincero **MUITO OBRIGADO!**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
A. INTRODUÇÃO	12
1. Exercício Intenso em Depleção de Glicogênio Muscular	12
2. Importância das Reações Anapleróticas para o funcionamento do Ciclo de Krebs nos primeiros momentos do Exercício Físico	16
3. Metabolismo Muscular dos BCAA	20
4. Uso de Suplementação de BCAA no Exercício	24
5. Hipótese de Estudo	28
B. OBJETIVO	31
C. METODOLOGIA	32
1. Condições Experimentais	32
1.1 Animais	32
1.2 Reagentes	33
1.3 Grupos Experimentais	33
1.4 Treinamento Físico	34
1.4.1. Teste de Limiar de Lactato	36
1.5. Procedimento Experimental	38
1.5.1. Suplementação de Aminoácidos de Cadeia Ramificada	38
1.5.2. Teste de Desempenho	38
1.5.3. Determinação de Exaustão dos Animais	38
2. Métodos de Análise	39
2.1. Determinações referentes ao Estudo 1	39
2.1.1. Determinação do Conteúdo de Glicogênio Muscular e Hepático	39
2.2. Determinações referentes ao Estudo 2	40
2.2.1. Homogeneização dos Músculos Gastrocnêmios	40
2.2.2. Determinação de 2-oxo-glutarato Muscular	41
2.2.3. Determinação de Citrato e Oxaloacetato Musculares	41
2.2.4. Determinação de Fumarato e Malato Musculares	42
2.3. Determinações referentes ao Estudo 3	44
2.3.1. Determinação da Atividade Máxima de Citrato Sintase	44
2.3.2. Determinação da Concentração da Aspartato-Aminotransferase	45
2.3.3. Determinação da Concentração de Alanina-Aminotransferase	45
2.4. Análise Estatística	45
D. RESULTADOS	46
1. Concentração de Lactato após Teste de Limiar	47
2. Determinações referentes a Resistência à Fadiga durante	48

o teste de Desempenho	
3. Concentração de Glicogênio Hepático	51
4. Concentração de Glicogênio Muscular	52
5. Concentração de 2-oxoglutarato Muscular	53
6. Concentração Muscular de Citrato	54
7. Concentração Muscular de Oxaloacetato	55
8. Concentração Muscular de Fumarato e Malato	56
9. Atividade Máxima da Citrato Sintase Muscular	57
10. Concentração de Aspartato Aminotransferase Muscular	58
11. Concentração de Alanina Aminotransferase Muscular	59
E. DISCUSSÃO	61
F. CONCLUSÕES	71
G. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
H. APÊNDICES	78

Apêndice 1: Cópia do artigo submetido ao International Journal Sports Nutrition Metabolism IJSNEM 2005 (Estados Unidos)

Apêndice 2: Resumo enviado para o X European Congress of Sports Science 2005 (Sérvia-Montenegro)

Apêndice 3: Resumo enviado para 54th Congress of the American College Sports Medicine 2005 (Estados Unidos)

RESUMO:

Durante o exercício sub-máximo, a utilização de estoques de glicogênio muscular é de suma importância para possibilitar a continuidade do mesmo. A suplementação de Aminoácidos de Cadeia Ramificada (AACR ou BCAA, do inglês *Branched Chain Amino Acids*) tem sido experimentada como forma de gerar energia para o músculo nessas condições. Através da utilização dos seus esqueletos de carbono, podem ser gerados intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT ou TCA, do inglês *Tricarboxilic Acids Cycle*); no entanto, há controvérsias quanto à eficiência dos AACR em aumentar a atividade do ciclo, uma vez que autores sugerem a diminuição da eficiência do mesmo após tal estratégia de suplementação. Por outro lado, há toda uma discussão na literatura acerca da importância do aumento dos intermediários do TCA nos primeiros momentos do exercício para apoiar o metabolismo oxidativo, assim como o impacto que as reações anapleróticas, que promovem esse fenômeno, apresentam, considerando-se o fluxo de energia total do TCA.

O objetivo desse trabalho foi avaliar se a suplementação dos aminoácidos em questão seria capaz de alterar o desempenho de ratos treinados em exercício sub-máximo, e também a formação de alguns intermediários do TCA ou mesmo a atividade de enzimas importantes para esse fenômeno. Para isso foram utilizados ratos Wistar machos adultos, que foram treinados por 8 semanas em sistema de natação, e receberam na última semana, a suplementação de isoleucina, leucina ou valina, exclusivamente, ou então os três aminoácidos em conjunto, ou placebo, por 7 dias. No sexto dia de suplementação, eles fizeram a última sessão de treinamento de 1 hora de natação, foram mantidos em jejum por 24 horas e, no dia seguinte, foram submetidos a um teste sub-máximo de natação, até a exaustão.

O grupo AACR teve aumento na síntese de malato e o grupo isoleucina apresentou maior atividade das transaminases de alanina e aspartato (AAT e AST), quando comparados ao placebo. Não houve diferença no desempenho dos animais em relação à resistência à fadiga, apesar do grupo leucina apresentar menores concentrações de glicogênio muscular que o grupo placebo.

Concluiu-se que os AACR não foram capazes de alterar atividade do ciclo de Krebs, nem o desempenho nessas condições experimentais.

Palavras-chave: Aminoácidos de Cadeia Ramificada, exercício, ratos, intermediários do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

ABSTRACT:

During submaximal exercise, muscle glycogen utilization is important. Branched-chain AminoAcids supplementation has been utilized during the past years to provide energy for muscles in this condition, through their carbon skeletons, which might generate tricarboxylic acids cycle's intermediates (TCAI). However, this hypothesis remains controversial. On the other hand, there is a recent discussion on the literature about the real importance of the rapid muscle TCAI raise and its role for de TCA cycle.

This study aimed to evaluate if BCAA supplementation in trained rats submitted to sub-maximal exercise were capable of changing TCAI activity or transaminases (AAT and AST) concentration, or even performance in muscle depletion.

Wistar Male Adult rats were trained for 8 weeks in a proper swimming system. In the last week they received BCAA supplementation. Before the final experiment, they trained for 1 hour, and then went through a 24 h fasting. The final test consisted on swimming until exhaustion, then they were euthanized and tissues were kept in liquid Nitrogen until further analysis.

BCAA group had higher muscle concentrations of malate. Isoleucine group had higher muscle transaminases' concentration, although rats supplemented with leucine alone had lower muscle glycogen levels than placebo group.

We concluded that none of the BCAA supplementation was able to affect performance or TCA activity in our experimental conditions.

Key words: Branched-Chain Amino Acids, exercise, rats, Tricarboxylic Acids Cycle Intermediates

LISTA DE ABREVIACOES:

AACR: Aminoácidos de Cadeia Ramificada

AAT: Alanina Amino Transferase

ACETIL-CoA: Acetil Coenzima A

ADP: Adenosina Difosfato

AIN-93M: Relatrio Final *Ad Hoc* do *American Institute of Nutrition* realizado em 1993 sobre dieta de roedores – Modalidade Manuteno

AMP: Adenosina Monofosfato

AMPK: Adenosina monofosfato-quinase

AST: Aspartato Amino Transferase

ATP: Trifosfato de Adenosina

BCAA: *Branched Chain Amino Acids*

BCAAT: *Branched Chain Aminoacids Transaminase*

BCKADH: *Branched Chain Ketoacids Dehydrogenase*

CO₂: Dióxido de carbono

GDH: Glutamato-desidrogenase

GLUTs 1,4, 11, 12: Transportadores específicos de glicose

NAD⁺: nicotinamida adenina reduzido

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

O₂: Oxignio

PEPCK: Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase

Pi: Fosfato Inorgânico

PNC: *Purine Nucleotide Cycle*

TCA: *Tricarboxilic Acids Cycle*

TCAI: *Tricarboxilic Acids Cycle Intermediates*

VO₂Max: Consumo Máximo de Oxignio

A. Introdução

1) Exercício sub-máximo e depleção de glicogênio muscular

Tem-se cada vez mais claro que a saúde e o bem-estar melhoram com a prática regular de atividade física, assim como através de uma dieta saudável. Tanto o exercício como a dieta estimulam processos que, no decorrer do tempo, alteram a morfologia e bioquímica do organismo. Porém, o exercício deve ser visto como provedor de estímulos que promovem adaptações específicas, de acordo com o tipo, intensidade e duração do mesmo (COYLE, 2000).

Carboidratos, gorduras e proteínas, obtidas diretamente da dieta ou de estoques endógenos do organismo, provém os substratos para as reações químicas, catalisadas por enzimas e co-fatores. Nesses processos, a energia química dos substratos é convertida num tipo de energia química que a célula pode utilizar: o ATP. Este pode ser ressintetizado anaerobicamente, a partir da glicose ou glicogênio no citoplasma das células, ou aerobicamente, através de reações químicas no interior da mitocôndria. Essas reações metabólicas ocorrem nas taxas necessárias para manter a concentração de ATP dentro das células (COYLE, 2000).

A intensidade do exercício físico pode ser classificada, de forma genérica, usando-se como referência o consumo máximo de oxigênio. O consumo máximo de oxigênio (VO_2 max.) é uma medida da capacidade de produzir ATP, usualmente medido através de ventilometria pulmonar. Assim,

classificamos de exercício intenso aquele realizado numa faixa superior a 70% do consumo. O exercício máximo é aquele realizado a 100 % desse consumo, sendo o sub-máximo, que é aquele utilizado no nosso estudo, caracterizado como aquele realizado acima dos 75% do VO₂ máx. (McARDLE et al, 2000).

Nessa intensidade de exercício, a glicose sangüínea é um importante substrato para a contração muscular, especialmente quando as concentrações de glicogênio neste tecido estão baixas devido ao exercício prolongado e extenuante, sendo que os estoques de glicogênio muscular durante o esforço são determinantes da capacidade de resistência à fadiga (HARGREAVES, 1995).

A concentração elevada de glicose sangüínea, por sua vez, resulta em maior captação e aproveitamento de glicose durante a atividade física, já que a translocação (do meio intracelular à membrana plasmática) do principal transportador de glicose no músculo, o GLUT-4, se intensifica com a contração muscular (HARGREAVES, 1998).

A reposição dos estoques musculares ou hepáticos de glicogênio requer glicose derivada tanto da dieta como da glicogenólise. A glicose derivada da dieta, no estado pós-absortivo, representa a maior parte da glicose utilizada. O transporte de glicose na célula muscular ocorre por difusão facilitada, utilizando proteínas transportadoras específicas expressas nesse tecido: as isoformas GLUT-1 e GLUT-4, GLUT-11 e GLUT-12 (PEREIRA & LANCHÁ JR., 2004). A primeira não é muito abundante, mas tem papel importante no transporte de glicose em estado basal. A segunda está localizada no compartimento intracelular e é translocada à membrana plasmática em duas situações: ou sob estímulo da insulina, que através de receptores específicos

sinaliza a fosfatidil-inositol-3-quinase, ou através da contração muscular, que ao liberar cálcio no retículo sarcoplásmico, ativa a proteína-C quinase, ou através de outros mecanismos (AMPK, adenosina, óxido nítrico) (JENTJENS & JEUKENDRUP, 2003).

Apesar de estar-se bem estabelecido que a fadiga durante o exercício prolongado coincide com estoques musculares reduzidos de glicogênio (SAHLIN et L, 1998), o significado funcional dessa associação não parece estar muito claro. Vários estudos sugerem que um aumento na concentração total de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, que chamaremos de TCA, é necessário para estabelecer e manter uma alta taxa de seu fluxo, propondo-se inclusive que, em depleção de glicogênio, haveria um declínio da concentração dos TCAI e da geração de ATP através da fosforilação oxidativa (BALDWIN et al, 2003). Trataremos desse assunto com mais detalhes adiante.

O aumento da glicólise muscular durante o exercício, com conseqüente aumento da captação da glicose pela célula no decorrer do mesmo, está relacionado a alguns aspectos. O primeiro deles diz respeito ao fato de esta glicose ser convertida a piruvato no tecido muscular, e por uma reação de transaminação, converte-se em alanina. Este ciclo, que consiste na liberação de alanina pelo músculo para a circulação sanguínea e posterior processamento hepático, é fundamental para os mecanismos de neoglicogênese e manutenção da glicemia durante a atividade física. Alguns autores acreditam que o ciclo alanina-glicose tenha atividade significativa durante o exercício, já que as quantidades de alanina liberadas do tecido muscular são proporcionais à intensidade do esforço (FELIG & WAHREN, 1971).

A maior produção de piruvato durante o exercício também está relacionada ao deslocamento da reação da enzima alanina-aminotransferase na direção da síntese do alfa-cetoglutarato (piruvato + glutamato = alanina + alfaceto-glutarato), que é um dos intermediários do TCA, aumentando-se a sua atividade pela maior capacidade de metabolizar acetil-CoA derivado da oxidação de piruvato e ácidos graxos. (WAGENMAKERS, 1998).

GIBALA et al (1998), no entanto, indicam que a maior concentração muscular dos intermediários do TCA, desde o início da atividade submáxima até a exaustão, apesar de estar correlacionado com o aumento do fluxo estimado deste ciclo em humanos, não é proporcional. Por exemplo, enquanto a concentração total de todos os intermediários do ciclo dobra na exaustão, o fluxo estimado pode estar até 70 vezes maior que o registrado no repouso.

O segundo aspecto refere-se à importância da captação de glicose pelo músculo após o exercício, especialmente em resposta a ingestão de glicose, na qual uma fração dessa glicose captada pelo músculo se transforma em piruvato e pode receber um grupo amino, formando alanina prontamente liberados na corrente sanguínea e glutamina, quando um grupo amino é recebido pelo glutamato, facilitando a remoção da amônia, através do ciclo purina-nucleotídeo (GALASSETI et al, 1998).

Como descrito anteriormente, durante o exercício realizado com glicemia normal, o piruvato gerado na glicólise, juntamente com o glutamato gerado pela transaminação de outros aminoácidos, originam alanina e alfa-

ceto-glutarato, através da enzima alanina-aminotransferase. Em condições de glicemia e concentrações de glicogênio muscular reduzidas, este alfa-ceto-glutarato poderia alimentar o ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou TCA.

Entretanto, nesta condição, esta forma de suprir o ciclo de Krebs com alfa-ceto glutarato estaria prejudicada (Wagenmakers, 1998). Isso poderia comprometer a anaplerose do ciclo de Krebs, forçando a utilização de acetil-Co-A vindo de outras fontes, como gordura por exemplo. Porém essa fonte estaria sendo utilizada numa atividade correspondente a aproximadamente 50% do $VO_2\text{max.}$, intensidade esta que não condiz, muitas vezes, com aquela praticada numa competição prolongada, por exemplo.

2) Importância das Reações Anapleróticas para o funcionamento do Ciclo de Krebs nos primeiros momentos do Exercício Físico

O termo “seqüências anapleróticas” foi utilizado pela primeira vez em Bioquímica por Sir Hans Kornberg, em 1966, para descrever uma série de reações enzimáticas ou vias que repõem os *pools* de intermediários metabólicos no ciclo dos TCA. Esses intermediários são críticos para o funcionamento do ciclo, cujo papel principal é a descarboxilação oxidativa de acetil-CoA a CO_2 . Porém, o ciclo dos TCA também funciona em processos biossintéticos, onde os TCAI deixam o ciclo para serem convertidos primariamente em glicose, ácidos graxos ou aminoácidos não-essenciais (OWEN et al, 2002).

A concentração dos TCAI nos tecidos é controlada por várias reações de carboxilação e descarboxilação, que regulam o fluxo de carbono no ciclo dos

TCA. Em condições normais, a quantidade dos intermediários gerada pelos processos anapleróticos é contrabalançada pela remoção dos mesmos por processos catapleróticos, de tal forma que a concentração dos mesmos permanece constante (Gibala et al, 1997b).

Uma das principais reações anapleróticas do ciclo é catalisada pela piruvato carboxilase, que catalisa a formação de oxaloacetato a partir de piruvato em vários tecidos, principalmente no fígado. A anaplerose é obrigatória para a ocorrência tanto da gliconeogênese como da lipogênese, quando o malato ou o citrato deixam a mitocôndria para formar glicose ou ácidos graxos, respectivamente. Se intermediários podem ser adicionados ao ciclo, é importante que eles sejam também retirados, para evitar o acúmulo de ânions na matriz mitocondrial. A cataplerose descreve as reações envolvidas na remoção dos TCAI. As principais enzimas que catalisam essas reações são a fosfoenol-piruvato-carboxiquinase (PEPCK), a aspartato-aminotransferase (AST) e a glutamato desidrogenase (GDH).

A regulação da anaplerose e cataplerose depende do estado fisiológico e metabólico do indivíduo e também do tecido/órgão envolvido. Durante o jejum, por exemplo, a cataplerose via fosfoenolpiruvato para apoiar a gliconeogênese pode ser regulatória no fígado. O tecido muscular, apesar de seu baixo *turnover* de proteína, representa o maior reservatório de aminoácidos no organismo, um exemplo disso é a alta quantidade de alanina e glutamina no plasma, liberados amplamente por esse tecido nessa condição (OWEN et al, 2002).

Durante uma restrição calórica, aminoácidos podem se constituir numa fonte alternativa de energia, principalmente durante a desaminação oxidativa,

quando seus esqueletos de carbono podem gerar acetil Co-A (exemplo: leucina ou isoleucina, aminoácidos cetogênicos), que por sua vez são utilizados diretamente no TCA, ou então através da formação de glicose/glicogênio no fígado ou rins, que posteriormente serão oxidados a CO₂ e água (glicogênicos). (OWEN et al, 2002).

Existe um acúmulo de TCAI importante nos primeiros minutos da contração muscular num exercício prolongado ou intenso, que excede em grande parte as reações catapleróticas. Vários mecanismos poderiam ser importantes para esse fenômeno, como o ciclo purina-nucleotídeo (PNC), as reações catalisadas pela alanina-aminotransferase (AAT), etc.

GIBALA et al (1997b) conduziram um experimento com 8 sujeitos que fizeram extensão do joelho em cicloergômetro com apenas uma das pernas. Foi feita uma coleta de sangue arterial e venoso durante o exercício (1, 3 e 5 minutos), e uma biópsia muscular (repouso e ao final dos 5 minutos de exercício). O protocolo consistiu em extensão do joelho a 80% da intensidade máxima por 5 minutos. Durante o exercício, houve diminuição na concentração de glutamato intramuscular e aumento na concentração de alanina, ambos significativos. A concentração de sete TCAIs medidos foi maior durante o exercício comparado ao repouso. Succinato, fumarato e malato mostraram os maiores aumentos durante o primeiro minuto de exercício. Segundo o autor, a magnitude da alteração desses três intermediários é ilustrada pelo fato de eles comporem 60% do *pool* de TCAI em repouso, e mais de 80% do *pool* total durante o exercício. Ele conclui que, de todos os mecanismos estudados, aquele que mais influenciou o aumento dos TCAI é o aumento da atividade da AAT, embora não houvesse um

aumento da quantidade de alfa-ceto-glutarato no sistema e sim, de alanina, o que o autor atribuiu ao rápido consumo de alfa-cetoglutarato pelas reações do ciclo.

Sabe-se que o treinamento aeróbico diminui a utilização de glicose e o acúmulo de lactato durante o exercício, podendo influenciar a magnitude do aumento da concentração dos TCAI durante os primeiros momentos do exercício. Em um grupo de oito mulheres submetidas a exercício em cicloergômetro que correspondeu a 70% do VO₂ máx. por 45 minutos durante 5 dias seguidos, fizeram testes pré e pós-treino para avaliar os efeitos do treinamento aeróbico sobre a expansão do ciclo dos TCA. O que foi encontrado nesse trabalho foi a redução do acúmulo do pool dos TCAI durante o exercício, em sujeitos treinados, comparado ao estado pré-treino. O acúmulo de glicogênio e lactato foi 50% menor durante o exercício pós-treino aeróbico, assim como o aparecimento de glutamato, o que é consistente com a diminuição do fluxo da reação da AAT nessa circunstância (DAWSON et al, 2003).

Vários trabalhos têm demonstrado que o tamanho do *pool* de TCAI muscular não está necessariamente acoplado a mecanismos de provisão aeróbia de energia, medidos através de marcadores indiretos da respiração mitocondrial (HOWARTH et al, 2004; DAWSON et al, 2003, GIBALA et al, 2003b). Com relação ao exercício prolongado, a principal evidência que apóia a teoria que liga alterações no *pool* de TCAI com a disponibilidade de glicogênio e a capacidade do fluxo do ciclo dos TCA é o fato de que, na exaustão, a quantidade total de TCAI (após 75 a 90 minutos) é menor que nos minutos iniciais do exercício. Gibala et al (2003 a) mediram a concentração dos TCAI e VO₂ da coxa em sujeitos que fizeram extensão de joelho por 90

minutos, numa intensidade correspondente a 70% do máximo. Eles puderam comprovar que o maior decréscimo dos TCAI ocorreu entre 10 e 30 minutos de atividade, apesar de o glicogênio muscular ainda estar relativamente alto nesse momento. Porém, depois de 30 minutos de atividade, os TCAI variaram pouco, enquanto que a concentração de glicogênio diminuiu. Houve um decréscimo de 50% da concentração dos TCAI, que não teve relação nem com o consumo de O₂ na coxa, nem com a concentração de glicogênio muscular.

A queda na concentração dos TCAI durante a atividade física prolongada se trata de um fenômeno que depende de inúmeros fatores, como a concentração dos reactantes nas reações em equilíbrio, atividade enzimática nas reações em não-equilíbrio e compartimentalização celular.

Medidas na atividade direta do ciclo total dos TCA, como das reações anapleróticas no músculo, foram feitas por ressonância nuclear magnética, utilizando-se isômeros de glutamato com ¹³C por WALTON et al (2003), com o objetivo de quantificar as reações anapleróticas e sua real importância para o funcionamento total do ciclo. Viu-se que essas reações anapleróticas respondem por 15% a 41% do total das reações do TCA, no repouso e no exercício, respectivamente, e que o aumento da concentração dos TCAI inicial durante o exercício está relacionado com os processos de oxidação na mitocôndria, contrariando outros pesquisadores.

3) Metabolismo muscular dos BCAA

Os aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) constituem aproximadamente um terço das proteínas musculares. Destes, a

leucina tem sido mais extensivamente investigada, devido à sua taxa de oxidação ser maior que a dos outros dois aminoácidos. (MERO, 1999).

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA ou AACR), juntamente com o aspartato e o glutamato representam o conjunto de aminoácidos oxidados diretamente no tecido muscular. Eles são transaminados inicialmente pelo complexo enzimático BCAA aminotransferase (BCAAT), gerando os cetoácidos correspondentes e glutamato. A leucina é degradada a alfa-cetoisocaproato, que por sua vez origina o acetil-CoA; a isoleucina é degradada em succinil-CoA e também Acetil-CoA. Já a valina, é degradada em isobutiril-CoA, que por sua vez origina o succinil-CoA (CHAMPE, 1998). A importância dos BCAA reside no fato de gerarem intermediários para o TCA diretamente no tecido muscular (GIBALA, 1998).

A BCAAT tem sua atividade aumentada no citosol de células de fibras musculares de contração rápida, enquanto que nas fibras oxidativas, sua maior atividade está nas mitocôndrias dessas células (HARGREAVES, 1996). No citosol, o grupo amino resultante é frequentemente transaminado ao alfa-cetoglutarato para formar glutamato, que pode ser transaminado ao piruvato para formar alanina (WOLFE et al, 1984, apud TARNOPOLSKY, 1999). O glutamato pode ainda receber um grupo amino pela ação da glutamina-sintase e formar glutamina. Uma pequena parte deste grupo amino pode ser liberada como amônia livre do músculo (TARNOPOLSKY, 1999).

O glutamato pode ser reconvertido a alfaceto-glutarato e NH_3 , pela glutamato-desidrogenase (HARGREAVES, 1996), porém essa enzima parece ter uma baixa atividade no músculo de roedores. Numa etapa posterior à transaminação, os cetoácidos derivados dos BCAA, por sua vez, podem sofrer

a desaminação através do complexo enzimático Branched-chain ketoacids Dehydrogenase (BCKADH), localizado na matriz mitocondrial. Este complexo enzimático é regulado através de um processo de fosforilação (inativação) /desfosforilação (ativação), e catalisa uma reação irreversível de não-equilíbrio, que é o ponto mais importante dessa via .

Durante o repouso, a fração ativa da BCKADH é muito pequena no tecido muscular (cerca de 4% a 6%), aumentando muito durante a atividade.

Vários metabólitos parecem exercer ação estimuladora neste complexo: piruvato, acetil-Co-A, cetoácidos de cadeia ramificada, acil-CoA de cadeia ramificada, e ADP mitocondrial, NAD/NADH, jejum, leucina e H⁺ (HARGREAVES, 1996). Mas falta consenso quanto aos efeitos da depleção do glicogênio muscular sobre a atividade dessa enzima.

A BCKADH durante o exercício agudo tem sua atividade aumentada através da desfosforilação pela BCKADH fosfatase (Van HALL et al, 1997). Esses autores investigaram o efeito da suplementação de BCAA e da depleção de glicogênio na atividade da BCKADH em 5 sujeitos submetidos a exercício agudo moderado por 90 minutos. A ingestão prévia de 308 mg BCAA/kg de peso/dia aumentou a captação e a concentração intramusculares de BCAA e a ativação da enzima tanto no repouso, como após o exercício. A fração ativa da enzima em porcentagem não foi diferente entre os grupos Controle e Depleção de glicogênio. Porém a atividade da BCKADH após o exercício agudo no grupo Depleção foi maior que no grupo Controle ($46 \pm 2\%$ e $26 \pm 2\%$, respectivamente). Os autores concluíram que a ativação da BCKADH pelo exercício agudo e pela suplementação de BCAA são aditivos, que a baixa concentração de glicogênio muscular aumenta a ativação dessa enzima pelo

exercício e que a ingestão de BCAA e a depleção de glicogênio constituem mecanismos diferentes de ativação.

JACKMAN et al (1997), usando um protocolo bastante parecido, observaram que a BCKADH é rapidamente ativada em situações de depleção de glicogênio por volta do 15^o minuto de exercício submáximo, mas após 50 minutos, não se nota mais diferenças nesse parâmetro entre grupos depletados e controle, e que as taxas de glicogênio e glicólise pouco influem na atividade dessa enzima. Já naquela época, os autores observaram, também, que a concentração dos cetoácidos de cadeia ramificada no músculo não aumentou nos ratos suplementados com BCAA em depleção de glicogênio.

O treinamento de resistência (endurance) atenua a oxidação de leucina e a ativação da BCKADH durante o exercício em humanos, comparado ao estado de pré-treinamento. Pode ser que os fatores estejam relacionados. MacENZIE et al (2000) especularam, em seu trabalho com humanos, que isso se deve à capacidade aumentada de poupar glicogênio muscular ao longo do treinamento, associado com a menor redução na carga de energia da célula muscular (relação ATP/ADP + Pi). No entanto, sabe-se que, em ratos, essa ação pode ser um pouco diferente, já que setenta por cento dessa enzima se encontra no fígado, ao contrário dos humanos, que tem apenas 30% do total dessa enzima localizada nesse órgão (JACKMAN et al, 1997).

SIRDEKOFF & ADIBI (2001) analisaram a atividade da BCKADH em fígado e músculo de ratos submetidos ou não a jejum de 48 horas. Eles verificaram que o jejum aumentou a atividade de BCKADH em 100% tanto no músculo quanto no fígado, comparados aos ratos controle. Segundo esses autores, há 2 mecanismos de incremento de ativação dessa enzima: o aumento

do estado de ativação ou o aumento da sua massa protéica, ambos avaliados nesse trabalho. A expressão protéica da BCKADH pode ser medida através das suas sub-unidades (E1, E2 e E3). No fígado dos animais, a expressão da subunidade E1 alfa foi maior no jejum. Para investigar se o mecanismo acima das expressões das proteínas era pré-traducional, mediu-se a expressão gênica em ambos os tecidos de ambos os grupos, sem encontrar diferenças. Para estabelecer o estado de ativação deste complexo enzimático, partiu-se de sua inativação, usando-se método cinético para determinar a inatividade em função do tempo, quando ATP foi adicionado ao extrato enzimático. A taxa de inativação foi mais rápida no músculo de ratos em jejum, mostrando que seu estado de ativação foi maior, porém esse mecanismo não se deu pelo aumento da expressão gênica que codifica a BCKADH quinase, e sim por mecanismos celulares específicos. Os maiores fatores que influenciaram no estado de ativação dessa enzima no músculo foram as concentrações de BCKADH quinase, alfa-cetoisocaproato e ATP.

4) Uso de suplementação do BCAA no exercício

Apesar de os efeitos anabólicos dos aminoácidos originários da proteína da dieta sobre a síntese protéica e função celular terem sido reportados há aproximadamente 25 anos, até poucos anos atrás não conhecíamos as bases moleculares para muitas dessas observações. Agora se sabe que os aminoácidos participam em vias de transdução de sinal, ativando em determinadas células algumas das cascatas sinalizadoras comuns à insulina, por exemplo, principalmente a leucina (HUTSON & HARRIS, 2001).

A suplementação de BCAA em exercício prolongado tem sido usada em vários trabalhos no intuito de otimizar o tempo de resistência ao esforço. A leucina, por exemplo, estimula a síntese de proteínas no músculo e está relacionada com a liberação de precursores neoglicogênicos deste tecido, tais como a alanina (MERO, 1999). Os BCAA, principalmente a leucina, estimulam a síntese protéica muscular em ratos em jejum ou logo após o exercício. Os mecanismos prováveis seriam o estímulo da iniciação da tradução no músculo esquelético, através da ativação de fatores de iniciação específicos (eIF4E e G) e da proteína S6Quinase (ANTHONY et al, 2001).

Autores têm investigado se estes aminoácidos influenciam a captação de triptofano livre pela barreira hematoencefálica, diminuindo assim a produção de 5-HT, ou se prejudicam o desempenho, através da formação aumentada de amônia, mas os resultados tem sido controversos (GUEZENNEC et al, 1998; CALDERS et al, 1997).

Durante o exercício prolongado, há um aumento da oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA). Esse fato pode acarretar em fadiga por alguns mecanismos que caracterizam a fadiga central (CALDERS et al, 1997; BLOMSTRAND et al, 1996), tais como a hiperamonemia. Isso acarretaria um possível aumento da oxidação de substratos energéticos nesse tecido, podendo ainda diminuir a formação de glutamato e GABA (GUEZENNEC et al, 1998). Estes dois são sabidamente importantes como neurotransmissores responsáveis pelo controle motor.

Por outro lado, a oxidação aumentada de BCAA nessa condição pode levar a um decréscimo em suas concentrações plasmáticas, o que favorece a entrada de triptofano livre no cérebro, precursor de 5-HT, neurotransmissor

responsável pela sensação de fadiga. Vários trabalhos tentaram elucidar os efeitos de uma suplementação de BCAA para diminuir os efeitos da fadiga central (BLOMSTRAND, 1996, 1995). Inclusive alguns autores tentaram estudar a relação entre mecanismos de fadiga central com a depleção de estoques de glicogênio cerebral, já que, em indivíduos em recuperação de um exercício máximo, a razão de captação de O₂/carboidrato cerebral se tornaria mais baixa, e a captação de lactato aumentaria muito além da captação de oxigênio pelo cérebro (NYBO et al, 2003.).

Segundo NEWSHOLME et al (1992), durante uma atividade prolongada, há um aumento da concentração de Ácidos Graxos Livres (AGL), que ocasionam um desacoplamento do triptofano ligado à albumina, que também transporta os primeiros. Assim, o triptofano livre seria mais facilmente transportado à barreira hemato-encefálica. Os BCAA teriam como função principal competir com os mesmos transportadores que o triptofano na barreira, impedindo sua entrada neste compartimento, diminuindo a razão triptofano livre/BCAA e aumentando o tempo de resistência ao esforço (BLOMSTRAND et al,1995). Porém, a suplementação de BCAA pode aumentar a geração de amônia plasmática, outra fonte potencial de fadiga tanto periférica como central (MITTLEMAN et al, 1998). Ou ainda, a grande atividade da BCAAT citosólica no tecido cerebral poderia estar relacionada com a formação do glutamato, que é um neurotransmissor excitatório (HUTSON et al, 2001 b).

CALDERS et al, (1999) reportam que a melhora do desempenho de ratos suplementados com BCAA durante exercício tanto submáximo como exaustivo se devem à melhora da disponibilidade de carboidratos durante a atividade, devido à utilização dos seus esqueletos de carbono no TCA. Porém,

a ação benéfica dos BCAA durante o exercício numa situação de depleção de glicogênio é um pouco controversa.

Há ainda uma outra hipótese a ser considerada sobre os BCAA: a chamada “hipótese do combustível”, onde, na ausência de carboidratos, os BCAA seriam oxidados como substratos para o metabolismo energético. Quando os carboidratos são suplementados juntamente com os BCAA, há uma inibição da atividade da BCKADH durante o exercício e também inibição da oxidação da leucina induzida pela atividade (GUEZENNEC et al, 1998). Isso nos leva a crer que, em caso de depleção dos estoques de glicogênio muscular ocorrentes numa atividade física prolongada (BLOMSTRAND & SALTIN, 1999) os BCAA podem ser substratos energéticos importantes.

Do ponto de vista nutricional, muitas pessoas utilizam suplementos alimentares. Algumas razões para o seu consumo seriam:

- 1) compensar uma inadequada ingestão dietética de um determinado nutriente;
- 2) novas informações científicas indicam que as atuais recomendações daqueles nutrientes subestimam as necessidades individuais
- 3) presença de condições fisiológicas especiais que alteram as necessidades nutricionais, sem mudanças correspondentes na dieta
- 4) efeitos farmacológicos que corrigem funções celulares que se tornaram anormais, como resultado de uma doença, por exemplo, ou de atividade física excessiva.

Nesse último caso, que se assemelharia ao que encontramos na população que usa suplementos de aminoácidos, é razoável aos consumidores pensar neles quase como fármacos, considerando os benefícios e riscos muito mais cuidadosamente do que considerariam o alimento fonte desse nutriente (ZEISEL, 2000).

5) Hipótese

GIBALA et al (1997) afirmam que o *pool* dos intermediários do Ciclo de Krebs aumenta mais intensamente nos primeiros 5 minutos de atividade submáxima, permanecendo assim até a exaustão, exceto o 2-oxoglutarato e o oxaloacetato. Isso mostra que grande parte dos processos anapleróticos superaria as possíveis reações de “desvio” dos intermediários do TCA (cataplerose).

Em outro trabalho de 1998, GIBALA et al afirmam que o aumento da disponibilidade de átomos de carbono no ciclo de Krebs se concentra na segunda metade do ciclo, mais precisamente nas reações que envolvem a formação do malato, succinato e oxaloacetato. Eles apontam que o acúmulo destes intermediários pode ocorrer devido à formação excessiva de piruvato no início da atividade ou enquanto os estoques de glicogênio estiverem mantidos, ou ainda, as vias metabólicas que envolvam a enzima málica não dêem conta de aproveitar os esqueletos de carbono resultantes do aumento do fluxo.

Porém WAGENMAKERS et al. (1998) apontam que a suplementação de AACR em músculos depletados de glicogênio, principalmente de leucina, teria um efeito deletério sobre o ciclo de Krebs. Lembramos que, quando a reação da alanina aminotransferase ocorre normalmente, transformando o piruvato + NH_3 em alanina e alfa-ceto glutarato, este último pode ser direcionado ao ciclo de Krebs.

Em caso de depleção de estoques de glicogênio muscular, não haveria formação adequada de alfa-ceto-glutarato para manter a transaminação crescente de leucina, necessitando-se assim “seqüestrar” o alfa-ceto-glutarato

do próprio ciclo (como receptor de grupo NH_3) (Fig. 1), para se oxidar a leucina a alfa-KIC e glutamato. A isso se chama hipótese do “desvio de carbono”. Portanto, segundo este autor, a suplementação de BCAA não contribuiria como substrato energético nestas condições, até podendo diminuir a atividade do ciclo.

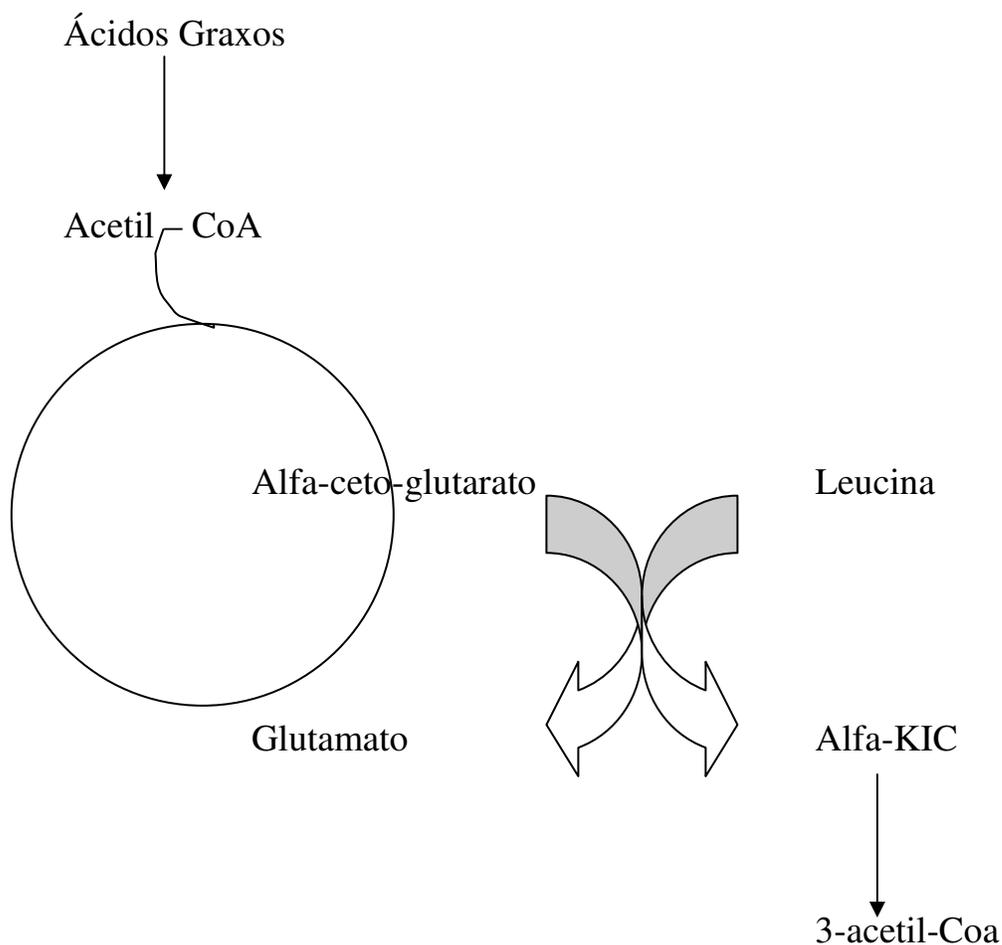


Fig.1: Hipótese da remoção de alfa-ceto-glutarato pela desaminação da Leucina.

(WAGENMAKERS, 1998)

Em revisão, WAGENMAKERS (1999) afirma que os BCAA realmente não são eficazes na melhora do desempenho durante o exercício prolongado, assim como outros suplementos nutricionais (arginina, glutamina) nas doses usuais não exercem os efeitos preconizados em suas embalagens

Por outro lado, Van HALL et al (1999) indicam que os BCAA são usados para a anaplerose do Ciclo, devido às crescentes quantidades destes aminoácidos mobilizados do sangue durante a atividade. GRAHAM & GIBALA (1998) assinalam que as reações anapleróticas do Ciclo parecem estar exponencialmente relacionadas à intensidade do exercício e a reação da Alanina-Aminotransferase parece ser a primeira responsável pela anaplerose no início da atividade. Ao mesmo tempo, estes autores discutem o papel fisiológico da anaplerose; se ela representaria um sinal regulador do metabolismo ou simplesmente uma consequência do aumento enorme no fluxo metabólico que ocorre durante o exercício.

Frente a esses dados, vemos que os efeitos da suplementação de BCAA em atividade prolongada, no caso de músculos depletados em glicogênio, não têm ainda dados consensuais acerca de sua eficácia como gerador de energia, o que justificaria a continuação das pesquisas neste campo. Além disso, os “possíveis malefícios” ao TCA reportados por alguns autores dizem respeito à leucina, especificamente, o que justificaria a investigação da administração deste aminoácido isoladamente.

Comercialmente, os suplementos de BCAA veiculam todos os 3 ramificados, e não só a leucina. Este último está presente na maior proporção em muitas formulações. E pouco há na literatura sobre os efeitos isolados dos

outros dois aminoácidos ramificados (isoleucina e valina) sob o ponto de vista das reações anapleróticas. Portanto o intuito deste trabalho é verificar se a suplementação de BCAA diminui a anaplerose do ciclo no tecido muscular em exercício moderado executado na depleção de glicogênio, assim como a possível implicação de cada um deles nas reações anapleróticas nesta condição fisiológica.

Nossa hipótese, então, é que a suplementação de leucina isoladamente diminua a produção de alfa-cetoglutarato nas nossas condições experimentais, e que isso se reverta diretamente tanto na redução da concentração de alguns dos TCAI como na queda de desempenho dos animais, em comparação ao grupo placebo. Nos outros grupos experimentais, esperamos que isso não ocorra, e que o fluxo das reações anapleróticas seja similar ou maior que o grupo placebo apesar das baixas concentrações de glicogênio.

B.Objetivos:

Geral: verificar como a suplementação de BCAA isolados e em conjunto altera a atividade de algumas enzimas ou a concentração de intermediários do ciclo de Krebs, bem como o seu fluxo, numa situação de depleção muscular de glicogênio

Específico: determinar possíveis alterações do ciclo dos TCA à suplementação de BCAA isolados e em conjunto, relacionando-as à capacidade de anaplerose do ciclo de Krebs em exercício sub-máximo e depleção de glicogênio.

C. Metodologia:

1. Condições Experimentais

1.1. Animais

Foram utilizados 110 ratos machos albinos da linhagem Wistar SPF, fornecidos pelo CEMIB–UNICAMP, adquiridos com 4 semanas de idade. Eles foram acondicionados em gaiolas plásticas, no total de 4 animais por gaiola, e mantidos em biotério com temperatura de 23 °C e ciclo claro-escuro (12/12h) invertido, ou seja, claro das 19h00 às 07h00, e escuro das 07h00 às 19h00. Dessa forma, eles puderam treinar durante o ciclo escuro, onde a atividade metabólica é maior, visto que os ratos são animais noturnos. Durante a manipulação dos animais, foram utilizadas lâmpadas infravermelhas, cuja frequência os ratos albinos não enxergam.

A partir de oito semanas de idade (250 g), eles foram divididos em 5 grupos experimentais, e começaram os protocolos de treinamento descritos mais adiante. Os animais foram alimentados com ração comercial *ad libitum* (NUVILAB CR 1, Nuvital Nutrientes LTDA. Estrada da Ribeira 3001, Km 3, Curitiba – PR), com composição centesimal aproximada de 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios.

1.2. Reagentes

Todos os reagentes nacionais utilizados foram obtidos da marca Synth.

Reagentes como enzimas, NAD, DTBN (5,5-Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid), TRITON X-100, piruvato, acetyl-CoA, e outros, foram obtidos da Sigma Chemical, St. Louis, MI, EUA.

1.3. Grupos Experimentais

Estudos 1, 2 e 3.

Cinco grupos experimentais foram criados: grupos Placebo (PLA), Isoleucina (ISO), Leucina (LEU), BCAA e Valina (VAL) (tab. 1) com 8 animais cada, para cada um dos estudos. Eles realizaram treinamento de 5 semanas, conforme descrito no item seguinte, e após o mesmo, fizeram o teste de limiar de lactato durante a sexta semana de treino.

Tabela 1: Divisão dos Ratos em Grupos Experimentais (a partir da 4^a.semana)

Grupos	PLA	ISO	LEU	BCAA	VAL
Suplementação	Placebo	Isoleucina	Leucina	BCAA	Valina

Na sétima semana, durante sete dias consecutivos, receberam a suplementação de aminoácidos na forma de 2 ml solução aquosa (166mg/kg de peso corporal /dia), ministrada via gavagem intragástrica. Essa quantidade corresponde a um acréscimo de aproximadamente 35% sobre a recomendação AIN-93M. Para cálculo da concentração da solução, foi utilizada a média de peso corporal do grupo, ajustada às segundas-feiras de cada semana.

Basicamente, os três estudos realizados foram semelhantes. O que diferiu em cada um deles foram as determinações realizadas: no primeiro estudo (n= 40, oito animais por grupo), foram determinadas as concentrações plasmáticas de glicogênio hepático e muscular e tempo de resistência ao esforço. No segundo estudo (n= 40, oito animais por grupo), foram determinadas as concentrações de alguns intermediários do ciclo de Krebs (citrato, alfa-cetolglutarato, fumarato, malato, oxaloacetato) e, finalmente, no terceiro estudo (n=30, seis animais por grupo), as atividades máximas de enzimas musculares relacionadas com a atividade do ciclo de Krebs e o metabolismo dos aminoácidos (citrato sintase, aspartato aminotransferase e alanina amino transferase).

1.4. Treinamento Físico

Ao serem aleatoriamente divididos nos grupos descritos acima, os animais foram treinados por 8 semanas em sistema de natação específico (Vieira et al, 1988), em água com temperatura controlada (32°C), trocada diariamente. Esse procedimento foi modificado, originário do protocolo

caracterizado como treinamento de baixa intensidade e longa duração, por Lancha Jr. (1994), comprovadamente eficiente em aumentar a capacidade oxidativa muscular.

As sessões de treinamento físico foram realizadas entre 13h00 e 18h00 e o treinamento consistiu em natação 5 vezes por semana, com sobrecarga de 5% do peso corporal preso ao dorso até a quinta semana. Nas semanas seguintes, conforme os ratos iam ficando mais pesados, notou-se uma dificuldade maior em nadar por 60 minutos com essa carga, relatada também por outros pesquisadores que se utilizaram do mesmo protocolo em laboratórios vizinhos. Quando essa dificuldade era percebida, preferíamos priorizar o tempo de exercício, reduzindo ou retirando as cargas dos animais, para que o treinamento se caracterizasse em atividade predominantemente aeróbia (baixa intensidade e longa duração).

Conforme os testes-pilotos realizados anteriormente, comprovou-se que a intensidade de 5% de sobrecarga, pelo menos na faixa de peso de 250 gramas, ficou abaixo do limiar de lactato dos animais, que foi atingido com natação realizada com sobrecarga de aproximadamente 7% a 9% do peso corporal, no teste de desempenho.

Tabela 2: Protocolo de Treinamento dos Animais

Semana	Tempo de Natação
Adaptação	20 minutos sem sobrecarga
1 ^a semana	20 a 25 minutos (c/ 5% de carga)
2 ^a .	25 a 30 minutos (c/ 5% de carga)
3 ^a .	35 a 40 minutos (c/ 5% de carga)
4 ^a .	45 a 50 minutos (c/ 5% de carga)
5 ^a .	55 a 60 minutos (c/ 5% de carga)
6 ^a .	Teste de Limiar Anaeróbico
7 ^a .	Suplementação de BCAA (Gavagem)
Experimento Final	Teste de Resistência com 2 cargas acima do Limiar (8 a 9% de sobrecarga)

1.4.1 Teste Descontínuo de Limiar de Lactato

Para obtermos informações mais seguras sobre a intensidade do treinamento físico e também sobre qual intensidade de esforço faríamos os experimentos finais nos animais, utilizamos o teste de tolerância ao lactato, desenvolvido em nosso laboratório por MARQUEZI et al (2003). O mesmo foi utilizado nos experimentos pilotos, onde tentamos adaptá-lo à corrida na esteira.

O protocolo original consiste nas etapas descritas abaixo (tab.3):

Tabela 3: Protocolo do Teste de Limiar de Lactato

Coleta de lactato em repouso

10 minutos de aquecimento: natação sem carga

Coleta de lactato

3 minutos de natação com sobrecarga de 4% do peso corporal

Coleta de lactato

3 minutos de natação com sobrecarga de 5% do peso corporal

Coleta de lactato

3 minutos de natação com sobrecarga de 6% do peso corporal

Coleta de lactato

3 minutos de natação com sobrecarga de 7% do peso corporal

Coleta da lactato

3 minutos de natação com sobrecarga de 8% do peso corporal

A coleta de lactato plasmático dos animais foi realizada através de punção da veia caudal, utilizando-se capilares de 25ul, e acondicionando o sangue em tubos eppendorf com 50ul de solução de fluoreto a 2%. Cada coleta do lactato foi realizada quando o animal era retirado da água, numa pausa de 1 minuto, e acondicionado numa caixa plástica coberta, onde somente sua cauda era manipulada. No fim dessa pausa, ele era colocado novamente na água com a carga correspondente à fase seguinte, onde permanecia nadando mais 3 minutos ou era retirado da água caso apresentasse sinais de fadiga, ou seja, se não fosse capaz de manter as narinas fora d'água por 10 segundos.

Após a finalização do teste, as amostras foram lidas em lactímetro Yellow Springs modelo ES800, para a obtenção das curvas de concentração plasmática de lactato.

1.5. Procedimento Experimental

1.5.1 Suplementação de Aminoácidos de Cadeia Ramificada

Após 7 dias de suplementação de aminoácidos ou placebo, que coincidiu com a 8^a. semana de treino dos animais, eles foram submetidos a um período de jejum de 24 horas antes do teste de exaustão final.

1.5.2 Determinação do Tempo de Exaustão

A intensidade do exercício que escolhemos para caracterizar atividade física intensa foi aquela de sobrecarga 2 pontos percentuais acima do ponto de inflexão da curva de lactato, para que houvesse a maior mobilização possível de carboidratos como fonte de energia muscular. Por exemplo: se um animal tivesse apresentado o ponto de inflexão da curva de lactato ao nadar com uma carga presa ao corpo correspondente a 6% do peso corporal, seu teste final seria realizado com uma carga correspondente a 8% do peso corporal.

1.5.3 Teste de Desempenho

No dia do teste de exaustão (ou de desempenho), os ratos fizeram um aquecimento de 10 minutos, a partir desse momento, nadaram com a sobrecarga determinada pelo teste de lactato até entrarem em exaustão.

Assim que os ratos eram retirados da água, eram sacrificados por decapitação, sempre no período de 14 às 18h00. Fígado e músculo gastrocnêmio foram removidos e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para posteriores determinações do conteúdo de glicogênio hepático e muscular (estudo 1), concentração dos intermediários do ciclo de Krebs no músculo (estudo 2) e atividade máxima de enzimas (estudo 3). Foram necessários 3 estudos para fazer todas essas análises, pois a quantidade de tecidos fornecida por apenas 1 estudo seria insuficiente.

Antes do sacrifício para dosagens teciduais, o tempo de resistência ao teste de exaustão foi computado, e foi considerado exausto o animal que não conseguisse manter as narinas para fora d'água por 10 segundos.

2. Análises (Métodos)

2.1. Determinações referentes ao estudo 1

2.1.1 Determinação do Conteúdo de Glicogênio Muscular e Hepático

O conteúdo de glicogênio muscular (gastrocnêmio) e hepático foi determinado pelo método de HASSID & ABRAHAMS (1957). Os tecidos foram digeridos em solução de KOH 6N, em banho-maria fervente, por 30 minutos, para extrair o glicogênio. Posteriormente foram feitas duas

precipitações com etanol 70% em banho-maria fervente (etapa de extração). Posteriormente, foi adicionado solução de ácido sulfúrico e antrona, para hidrolisar o glicogênio a glicose e fazer uma reação colorimétrica com a mesma, originando uma coloração verde. O produto de reação foi proporcional à intensidade de cor formada, determinada a 650nm de absorvância, em espectrofotômetro.

2.2. Determinações referentes ao estudo 2

2.2.1 Homogeneização dos Músculos

Alíquotas de um grama de músculo gastrocnêmio congelado em nitrogênio líquido, proveniente de animais do estudo 2, foram separadas e diluídas em 10ml de tampão ácido perclórico 0,6M. Posteriormente eles foram homogeneizados com uma topia, até dissolução completa. Centrifugamos os homogenatos em tubos eppendorfs de 2ml de capacidade, em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm (800g), em 10°C (BERGMEYER, 1969, modificado).

Posteriormente, foram homogeneizados por sonicação (nível de energia 5, por 10 segundos). Foram retirados os sobrenadantes e desprezados os precipitados. Após essa etapa, os primeiros foram neutralizados com 10µL de indicador universal, e finalmente com 60 µL tampão TRIS/KOH até se obter coloração verde.

Esse homogenato foi então mantido em nitrogênio líquido até posterior análise da concentração dos intermediários do ciclo de Krebs.

2.2.2. Determinação de Alfa-Cetoglutarato

O princípio desse método enzimático é o de promover a desaminação de 2-oxoglutarato pela enzima Glutamato-desidrogenase, com consumo de NADH, assim, a formação de cor amarela corresponde à quantidade de NADH na amostra, ao ser lida numa absorvância de 340nm. No nosso caso, essa leitura é decrescente após a adição da enzima, e a quantidade de NADH consumido na reação é então proporcional à de 2 oxoglutarato na alíquota.

Duzentos microlitros de homogenato de músculo foram misturados com 800µl de solução de NaHCO₃ 1% e 60 µl NADH diluídos nessa mesma solução. Foi feita uma leitura preliminar no espectrofotômetro a 340nm, com temperatura controlada em 30°C. Deu-se uma pausa de 3 minutos para estabilização da reação antes da segunda leitura. Ao final, foram adicionados 10µl de Glutamato-desidrogenase (1,8U/ml) diluídos em tampão fosfato (2 mol/l), e novamente se fez uma leitura no espectrofotômetro, e após 3 minutos de pausa, a última leitura. O cálculo da quantidade de 2-oxoglutarato foi feito através da diferença das leituras de antes e após a adição da enzima.

2.2.3. Determinação de Citrato e Oxaloacetato

Foi utilizado novamente método enzimático descrito por BERGMAYER (1969) para a dosagem desses intermediários do ciclo dos TCA. Nessa análise, utilizamos as enzimas Malato-desidrogenase e Citrato-liase para desaminar o oxaloacetato e o citrato respectivamente, consumindo NADH. Após a adição

das enzimas, foi feita nova leitura espectrofotométrica à 340nm onde se verificou uma diminuição dos valores. O consumo de NADH pela reação enzimática, verificado através das leituras decrescentes das alíquotas a 340nm, foi usado para calcular as quantidades de citrato e oxaloacetato nas amostras.

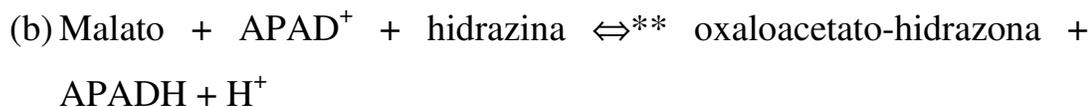
Os homogenatos dos tecidos (200µl) foram adicionados a 650 µl de tampão glicina, que consistiu de 6,6 g de glicina, 8 mg ZnCl₂, 80 ml de água. O pH da solução foi ajustado para 7,8 com solução de NaOH 2 mol/l, e diluído para o volume final de 100 ml. Posteriormente, foram adicionados 10 µl de solução de NADH (3,5 mg/ml). Foi feita a primeira leitura à 340nm. Após, foi adicionado ao meio uma mistura de Malato-desidrogenase (500 U/100 µl) e Lactato-desidrogenase (180U/220µl) diluídos no tampão glicina. Após 6 minutos, foi feita a segunda leitura à 340nm. A diferença entre essas duas leituras correspondeu à concentração de oxaloacetato no músculo.

Depois dessa etapa, foi adicionada ao meio a enzima citrato-liase (0,24U/10µl), diluída em tampão glicina e mais uma leitura espectrofotométrica a 340nm foi feita. Após mais 6 minutos, a última leitura foi realizada. A diferença entre essas últimas leituras foi utilizada para calcular a concentração de oxaloacetato no músculo.

2.2.4. Determinação de Fumarato e Malato

Para esse ensaio de dosagem de fumarato, foi utilizado método fluorimétrico (BURLINA, 1993), devido à sua baixa concentração nos tecidos. O fumarato é um intermediário do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) , é também uma ligação entre o TCA e o ciclo da uréia. A fluorimetria é capaz de

determinar 10^{-10} moles dessa substância. O fluorímetro utilizado pertence ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP (mod. PHP73C, PHILCO HITACHI). O princípio do método é como descrito abaixo:



* Fumarase, L-malato hydrolase, EC 4.2.1.2

** Malato-desidrogenase, L-malato: NAD^+ oxidoreductase, EC 1.1.1.37.

O aumento da concentração do acetil-piridina-adenina-dinucleotídeo reduzido (APAD), medido pelo incremento da fluorescência, é proporcional à quantidade de fumarato (ou malato) presentes na amostra. O equilíbrio da reação (b) depende bastante do pH. A análise é feita em pH 9,0 para deslocar o equilíbrio da reação para a direita. O APAD foi escolhido devido ao seu maior potencial de oxidação, comparado ao NAD. EDTA foi acrescentado para aumentar a estabilidade de MDH. A hidrazina age como agente seqüestrador de cetona.

Vinte microlitros de homogenato de músculo gastrocnêmio, neutralizados em pH básico (cor verde indicada pelo indicador universal) foram adicionados a 160 μ L de tampão hidrazina. Este último foi feito com 5 ml de hidrato de Hidrazina, 10 ml de HCl (1 mol/l), completando o volume final para 100 ml e estocado em congelador. Posteriormente, foram adicionados 20 μ L de solução de EDTA (0,1 mol/l), e 20 μ L de solução de APAD (0,1 mol/l). As alíquotas foram lidas no comprimento de onda primário (360nm) e secundário (440nm). Após essa leitura, foi adicionado ao meio

malato-desidrogenase (5000 U), na concentração de 1µl de enzima para 5 ml de tampão TRIS (0,02mol/l) + 0,02% de Albumina Bovina Sérica, para determinar o malato. Esperou-se 20 minutos até a próxima leitura, em temperatura ambiente. Adicionou-se então a fumarase (1kU/l) na concentração de 10µl de enzima para 9,990 ml de tampão TRIS (0,02 mol/l), para determinar o fumarato. Esperou-se 20 minutos para a segunda leitura, em temperatura ambiente. A curva padrão foi feita com solução padrão de fumarato (1mol/l) e o branco, com ácido perclórico, KHCO₃, e água destilada.

2.3 Determinações referentes ao estudo 3

2.3.1 Atividade máxima de Citrato-Sintetase (EC 4.1.3.7.)

Essa determinação foi realizada segundo o método descrito por ALP et al. (1976), que se baseia na reação do oxaloacetato com o acetil-CoA, originando citrato e CoA. O ácido ditio-nitrobenzóico (DTNB), ao reagir com a Coenzima-A, origina um complexo de cor amarela (DTNB-CoA), cuja formação é proporcional à atividade da enzima. O meio de extração para essa determinação consistiu em TRIS-HCl 50mM e EDTA 1mM, com pH final em 7,4. O tampão de ensaio consistiu, por sua vez, em TRIS-HCl 100 mM, DTNB 0,4mM, TRITON X-100 0,05% e acetil CoA 15 mM, o substrato adicionado foi oxaloacetato 1mM, sendo o volume final do ensaio de 950 µl.

Após a adição de substrato, a quantidade de DTNB-CoA formada foi medida nos 10 minutos seguintes, em temperatura ambiente, em espectrofotômetro a 412 m.

2.3.2 Concentração de Aspartato-AminoTransferase (EC 2.6.1.1)

A AST catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para o alfa-cetoglutarato, levando à formação de Glutamato e Oxalacetato. O Oxalacetato em presença do MDH reage com o NADH, reduzindo-se a Malato e o NADH oxida-se a NAD^+ . Esta velocidade de oxidação é medida em 340nm, (334 - 365) e é proporcional à atividade da AST na amostra, segundo o método de BERGMEYER, 1976, modificado.

2.3.3. Concentração de Alanina AminoTransferase (EC 2.6.1.19)

A ALT catalisa a transferência do grupamento amina da Alanina para Alfa-Cetoglutarato, formando Piruvato e Glutamato. O Piruvato em presença de LDH, reage com o NADH reduzindo-se a Lactato e o NADH oxida-se a NAD^+ . A velocidade de oxidação, medida em 340nm (334 - 365) é proporcional à atividade da ALT na amostra.

2.4. Análise Estatística

As análises estatísticas entre os grupos foram calculadas por Análise de Variância (ANOVA 1 fator). Quando o valor de p era menor que

0,05, as análises foram submetidas ao teste *post-hoc* de Tuckey, utilizando-se para isso programa informatizado específico, o *SPSS 13.0 for Windows*.

D. Resultados:

Como o principal aspecto do nosso trabalho foi detectar a influência da suplementação de aminoácidos sobre a resistência à fadiga e a concentração dos intermediários do TCA em cada um dos grupos experimentais, podemos inferir que o protocolo de exaustão utilizado no experimento final foi eficaz em aumentar a atividade do Ciclo dos Ácidos TriCarboxílicos (TCA). Lancha Jr. (1993) apontou que, em ratos no repouso, a atividade máxima dessa enzima é de $2,5 \pm 1,41 \mu \text{ mol/min/g}$ e após o treinamento, de $8,36 \pm 2,74 \mu \text{ mol/min/g}$ de peso fresco. E após a exaustão, essa atividade foi $11,61 \pm 4,54 \mu \text{ mol/min/g}$ de peso fresco

Os valores médios encontrados nos nossos ratos no momento pós-exercício exaustivo variaram de $9,6 \pm 3$ a $12,4 \pm 4 \mu \text{ mol/min/g}$.

3.1 Estudo 1

A concentração de lactato plasmático em todos os animais deste estudo foi analisada durante o Teste de Limiar de Lactato. Observou-se, ao longo do teste, que entre o repouso e a carga mais intensa do protocolo, a concentração de lactato elevou-se cerca de 4 vezes, apresentando um incremento condizente

com a sobrecarga conforme a tabela 4. Mais especificamente, observou-se um incremento de aproximadamente 0,6 $\mu\text{Mol/l}$ por nível de sobrecarga. Na passagem da penúltima para a última etapa ou teste, ou seja, de 7% para 8% do peso corporal anexado ao dorso do animal, observou-se um incremento por volta de 3 vezes maior que o descrito acima, sendo este em torno de 1,6 $\mu\text{Mol/L}$, o que aponta para o valor médio do ponto de inflexão da curva de lactato ter ocorrido na natação com sobrecarga de 6 a 8% do peso corporal, e a utilização da sobrecarga na natação que fizemos no teste de exaustão ter sido entre 8 e 10%.

No estado de repouso, a concentração deste metabólito foi maior que o esperado (1 $\mu\text{Mol/l}$).

Tabela 4: Concentração de Lactato (mmol/l)
(todos os animais pós-treino e pré-suplementação).

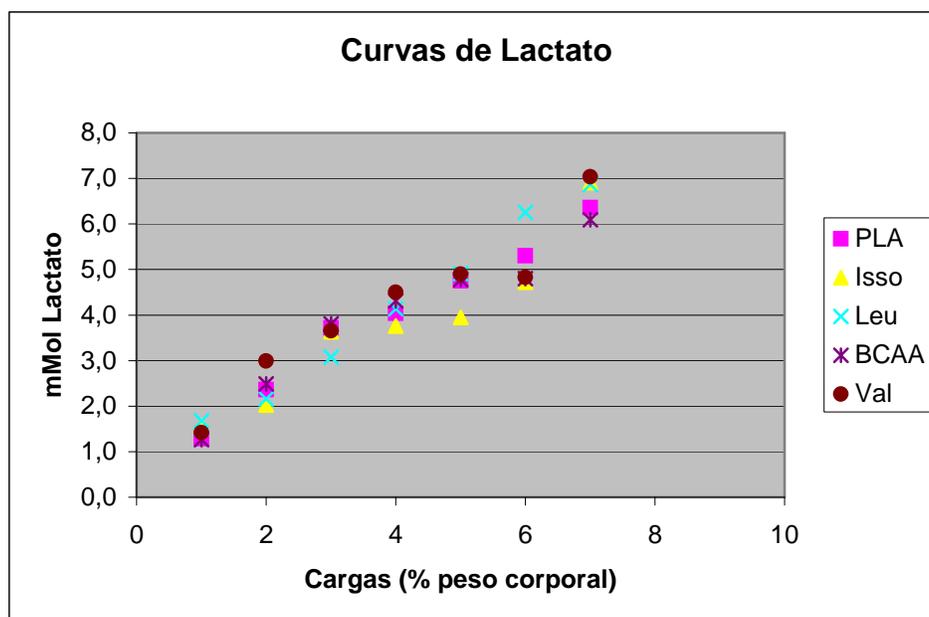
Carga (% peso corporal)	Lactato (mmol/l)
Repouso	1,43 \pm 0,6
Aquecimento	2,44 \pm 1,1
1a. Carga (4% peso)	3,59 \pm 1,1
2a. Carga (5% peso)	4,17 \pm 1,4
3a. Carga (6% do peso)	4,66 \pm 1,2
4a. Carga (7% do peso)	5,15 \pm 1,6
5a. Carga (8% do peso)	6,63 \pm 1,4

Dados apresentados como média \pm desvio padrão da média.

Para avaliarmos se houve correlação entre os valores de lactato plasmático e as sobrecargas do protocolo utilizado, calculamos o coeficiente de correlação da reta formada por todos os dados (r), plotados na figura abaixo, cujo resultado foi maior que 0,7, indicando haver uma boa correlação entre esses parâmetros.

Gráfico 1: Dispersão –Regressão Linear ($r > 0,7$)

($n= 39$)



Ao expressarmos os dados dos animais desse estudo por grupos experimentais, embora ainda não estivessem recebendo suplementação nesse momento, temos a configuração (tab. 5) no grupo que seria suplementado posteriormente com isoleucina, o incremento de 0,6 $\mu\text{Mol/l}$ de lactato por faixa de sobrecarga não ocorreu uniformemente nas faixas de 5 e 6% de peso

corporal, que caracterizava exercício moderado. O mesmo fato ocorreu nos grupos que seriam suplementados com BCAA e valina, nas intensidades de 6 e 7% do peso corporal. Mas consideramos que esse fato não tenha prejudicado nosso protocolo final de exaustão.

Tabela 5: Concentração de Lactato Plasmático durante o teste de Limiar de Lactato, antes da Suplementação (n=8, por grupo)

	Placebo	Isoleucina	Leucina	BCAA	Valina
Cargas					
Rep	1,3 ± 0	1,6 ± 1	1,7 ± 1	1,3 ± 0	1,4 ± 0
Aq. 10'	2,4 ± 0	2,0 ± 1	2,2 ± 1	2,5 ± 1	3,0 ± 2
4%	3,7 ± 1	3,6 ± 1	3,1 ± 1	3,8 ± 1	3,7 ± 1
5%	4,0 ± 1	3,8 ± 2	4,1 ± 2	4,3 ± 2	4,5 ± 1
6%	4,8 ± 1	3,9 ± 2	4,9 ± 1	4,8 ± 1	4,9 ± 1
7%	5,3 ± 2	4,7 ± 2	6,3 ± 3	4,8 ± 1	4,8 ± 1
8%	6,4 ± 1	6,9 ± 1	6,8 ± 2	6,1 ± 2	7,0 ± 1

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Quanto ao tempo de resistência ao esforço no teste de exaustão, podemos observar que não ocorreram diferenças significativas entre os vários grupos experimentais ($p = 0,49$). Ou seja, após a suplementação, não foi possível observar diferenças no desempenho dos animais nesse protocolo de exercício intenso, embora numa primeira análise dos dados, tende-se a

observar que ratos suplementados com placebo apresentaram maior resistência à fadiga que os demais grupos experimentais (tab. 6).

Tabela 6: Tempo de resistência ao Esforço durante o teste de exaustão (n=8, por grupo)

Grupos	Resistência ao Esforço (s)
Placebo	400,4 ± 222
BCAA	257,0 ± 110
Iso	347,3 ± 183
Leu	398,6 ± 306
Val	283,0 ± 147

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Quanto à concentração de Glicogênio Hepático (tab.7), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, embora podemos observar que ratos suplementados com valina tenderam a apresentar resultados maiores.

Tabela 7: Concentração de Glicogênio Hepático (n=8, por grupo)

Grupos	Glicogênio Fígado (mg/ 100mg tec)
Placebo	0,106 ± 0,13
BCAA	0,197 ± 0,10
Iso	0,084 ± 0,06
Leu	0,189 ± 0,12
Val	0,243 ± 0,12

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Na concentração de glicogênio muscular (tab. 8), observou-se diferenças significativas entre os grupos suplementados com Leucina e o grupo Placebo. Na primeira condição, esse parâmetro foi menor que no grupo controle (placebo). Já entre os outros grupos experimentais, não foi possível observar diferenças significativas nessa análise.

Tabela 8: Concentração Muscular de Glicogênio (n= 8, por grupo)

Grupos	Glicogênio Muscular (mg/100 mg tec.)
Placebo	0,186 ± 0,09
BCAA	0,107 ± 0,06
Iso	0,071 ± 0,06
Leu	0,062 ± 0,07 b
Val	0,106 ± 0,04

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

b: diferença significativa em relação ao grupo Placebo

3.2 Estudo 2

Nesse estudo, foram analisadas as concentrações de alguns intermediários do TCA. As concentrações de alfa-cetogluturato (tab. 9) do grupo placebo pareceu ser maior do que todos os outros grupos experimentais, porém não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 9: Concentração Muscular de Alfa-Cetogluturato
(n= 8, por grupo)

Grupos	Alfa-Cetogluturato (μMol/mg tec. fresco)	Erro Padrão
Placebo	24,6 \pm 18	8,01
BCAA	13,8 \pm 9	8,40
Iso	16,9 \pm 10	8,40
Leu	17,3 \pm 16	8,01
Val	15,2 \pm 11	8,01

Dados apresentados como média \pm desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 10: Concentração Muscular de Citrato
(n= 8, por grupo)

Grupos	Citrato ($\mu\text{Mol/mg}$ tec. fresco)	Erro Padrão
Placebo	$3,53 \pm 1$	2,79
BCAA	$11,40 \pm 2, \mathbf{b}$	2,92
Iso	$7,30 \pm 6$	2,92
Leu	$4,99 \pm 3$	2,79
Val	$9,40 \pm 7$	2,79

Dados apresentados como média \pm desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

b: diferença significativa em relação ao grupo Placebo

Observa-se, na tabela acima (tab. 10), que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto à concentração de Citrato no músculo gastrocnêmio, exceto no grupo BCAA em relação ao grupo PLA.

Tabela 11: Concentração Muscular de Oxaloacetato

(n=8, por grupo)

Grupos	Oxaloacetato	Erro Padrão
	($\mu\text{Mol/mg tec. fresco}$)	
Placebo	6,06 \pm 6	5,79
BCAA	9,15 \pm 5	5,79
Iso	17,10 \pm 15	5,79
Leu	8,95 \pm 6	5,52
Val	13,0 \pm 11	5,52

Dados apresentados como média \pm desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Observa-se, na tabela acima (tabela 11), que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto à concentração de Oxaloacetato no músculo gastrocnêmio.

Tabela 12: Concentração Muscular de Fumarato

Grupos	Fumarato (uMol/mg peso fresco)
Placebo	271 ± 230
BCAA	423 ± 298
Isso	366 ± 70
Leu	382 ± 170
Val	173 ± 14

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Observa-se, na tabela acima (tab. 12), que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto à concentração de Fumarato no músculo gastrocnêmio

Tabela 13: Concentração Muscular de Malato

Grupos	Malato (uMol/mg peso fresco)
Placebo	147 ± 25, d
BCAA	340 ± 32
Isso	236 ± 58, d
Leu	160 ± 66, d
Val	193 ± 27, d

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

d: diferença significativa em relação ao grupo BCAA

Observa-se, na tabela acima (tab. 13), que a concentração de Malato no músculo gastrocnêmio foi significativamente maior no grupo BCAA comparado a todos os outros.

3.3 Estudo 3

Tabela 14: Atividade máxima da enzima Citrato Sintase

(n=8, por grupo)

Grupos	Atividade Máxima ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ tec.)
Placebo	12,3 \pm 4
BCAA	12,3 \pm 5
ISO	12,5 \pm 4
Leu	11,8 \pm 2
Val	9,6 \pm 3

Dados apresentados como média \pm desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Observa-se, nessa tabela de número 14, que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quanto à atividade máxima dessa enzima-chave do ciclo dos TCA.

Tabela 15: Concentração de AST
(n=8, por grupo)

Grupos AST (U/ mg tec. Fresco)	
Placebo	125,8 ± 33
BCAA	161,9 ± 55
ISO	241,8 ± 72 b
Leu	152 ± 60
Val	158 ± 63

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

b: diferença significativa em relação ao grupo Placebo

Nessa tabela de número 15, podemos perceber que o grupo suplementado com isoleucina apresentou maior atividade da AST, quando comparado com o grupo PLA. Porém, quando comparamos a concentração de AST de grupos tratados com isoleucina, com grupos suplementados com BCAA, leucina e valina, não se observou diferenças.

Tabela 16: Concentração Muscular de Alanina AminoTransferase
(n=8, por grupo)

Grupos	AAT (U/mg tec. fresco)
Placebo	78,9 ± 51 a
BCAA	115,8 ± 32
ISO	190,1 ± 62
Leu	123,4 ± 36
Val	94,8 ± 42 a

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. Quando foram encontradas diferenças significativas indicadas pela Análise de Variância (1 fator), foi realizado teste *post-hoc*, utilizando-se a equação de Tuckey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

a: diferença significativa em relação ao grupo Isoleucina

A concentração enzimática de Alanina-Aminotransferase (tab. 16) no músculo gastrocnêmio dos ratos deste estudo apresentou algumas diferenças significativas: os ratos suplementados com isoleucina apresentaram maior concentração muscular de AAT, quando comparados aos ratos controle (placebo) e aos animais suplementados com valina. Ratos suplementados com BCAA e LEU também tiveram concentrações ligeiramente maiores que os ratos controle, porém sem que se configurasse em diferenças significativas.

E: Discussão

O exercício sub-máximo pressupõe uma grande mobilização dos estoques de glicogênio muscular (ROMIJN et al, 1993); por outro lado, como já foi abordado antes, existe um aumento da concentração dos TCAI muito grande nos primeiros cinco minutos de atividade física em geral. O significado preciso desse incremento dos TCAI não está muito claro, porém o fenômeno parece estar relacionado com a disponibilidade de carboidratos (GIBALA et al, 1999).

Um ponto central na oxidação de carboidratos na contração do músculo esquelético é a magnitude da ativação do complexo enzimático Piruvato-desidrogenase (PDH), sendo que a atividade dessa enzima aumenta do seu estado inativo no repouso, paralelamente à intensidade do exercício, até aproximadamente 75 a 90% VO_2 máx., quando a taxa de oxidação de carboidratos é máxima (CONSTANTIN-TEODOSIU et al, 2004).

Nem o treinamento aeróbio de curta duração (agudo) parece aumentar seu estado de ativação. Porém, sabe-se que, com um treinamento regular e de longo prazo (crônico), uma das adaptações decorrentes é um menor estado de ativação da enzima Glicogênio Fosforilase e Piruvato Desidrogenase durante a atividade, devido ao menor fluxo de piruvato e menores taxas de glicogenólise e de geração de ADP, de tal modo que, para a mesma intensidade de esforço, a oxidação de carboidratos passa a ser menor (LeBLANC et al, 2004).

A maior utilização de outros substratos que não o glicogênio ocorre também numa situação de jejum em animais submetidos ao treinamento físico

aeróbico, caso a disponibilidade de carboidratos esteja reduzida. O aumento da oxidação de leucina, por exemplo, está relacionado com a diminuição da quantidade de alfa-ceto-glutarato, segundo a hipótese do “desvio de carbono” (WAGENMAKERS et al,1998) descrita anteriormente.

Baixas concentrações de glicogênio muscular após o exercício estão associadas ao aumento da taxa de transporte de glicose, e também ao incremento na capacidade de converter glicose em glicogênio; talvez o glicogênio possa ter algum tipo de controle no número de transportadores GLUT-4 que podem estar associados à membrana, facilitando a ligação das proteínas GLUT-4 ou vesículas contendo GLUT-4 às partículas de glicogênio, sugerindo que o número de vesículas contendo GLUT-4 disponíveis para translocação em resposta à insulina ou à contração podem aumentar quando a concentração de glicogênio estiver baixa, ou diminuir, quando as concentrações de glicogênio estiverem altas (JENTJENS & JEUKENDRUP, 2003).

Com relação à concentração de glicogênio hepático, observou-se que no caso do Grupo VAL, esse parâmetro estava aumentado em relação ao grupo PLA em mais de duas vezes, embora não se configurasse numa diferença estatisticamente significativa. Em caráter especulativo, poderíamos supor que a concentração maior de valina poderia aumentar o fornecimento de succinato, provendo fumarato e conseqüentemente malato para a lançadeira malato-aspartato. A valina poderia suprir com mais eficiência a reação anaplerótica de produção do succinato em relação aos outros aminoácidos isoladamente e AACR, pois estes últimos teriam mecanismos de competição. Ao olharmos a concentração de oxaloacetato, o caso se repete: embora não se tenha configurado em diferença estatística, em virtude do alto desvio padrão

apresentado na análise, o grupo VAL apresenta valores médios maiores desse metabólito, quando comparados ao grupo PLA.

Um estudo *in vitro* da influência da concentração de piruvato sobre o fluxo oxidativo da mitocôndria muscular mostrou que o estado de ativação da PDH age em conjunto com a alteração da concentração de piruvato *per se* para alterar esse parâmetro; e que diminuições progressivas na disponibilidade de piruvato, como por exemplo, no exercício submáximo prolongado, parece necessitar de diminuições compensatórias no ΔG (variação de energia livre/Gibbs) para sustentar um dado nível de produção de O_2 (MESSER et al, 2004).

No nosso protocolo, o exercício sub-máximo não foi prolongado, e por isso não observamos a queda compensatória da variação de energia descrita acima. No entanto, podemos especular que, mesmo assim, a capacidade de geração de oxaloacetato a partir de VAL pode ter sido interessante para manter o fluxo oxidativo, independentemente do piruvato gerado diretamente através das reservas de carboidrato, já que os animais tinham estoques depletados de glicogênio.

Já na concentração de glicogênio muscular, observou-se que um comportamento um pouco diferente: somente os ratos suplementados com leucina tiveram níveis de glicogênio muscular significativamente menores quando comparados aos ratos controle (PLA). Podemos interpretar esse fato como que corroborando parte da hipótese inicial do estudo: onde a oxidação maior de leucina nesse grupo poderia “seqüestrar” o alfa-cetoglutarato do TCA, como alternativa, havendo então maior utilização de glicogênio

muscular para gerar piruvato, deslocando a reação da ALT para a direita, formando alanina e alfa-cetoglutarato novamente.

Já vimos anteriormente que treinamento físico, assim como o jejum (GIBALA, 2001) atenuam a atividade da BCKADH quando comparada ao estado não-treinado, e conseqüentemente a oxidação de leucina muscular, mas que, em ratos, talvez esse não seja um mecanismo importante, visto que 70% dessa enzima se encontra no fígado (JACKMAN et al,1997).

Segundo os nossos dados, podemos supor que, apesar de a literatura mostrar que a quantidade da BCKADH em músculo de ratos ser bem menor que em músculo de humanos, essa limitação certamente foi compensada pela própria ingestão dos BCAA juntos ou separadamente, que são ativadores desse complexo enzimático. Portanto esse parece não representar um mecanismo que limite a oxidação de leucina, pelo menos nas nossas condições experimentais.

Observou-se que nenhum tipo de suplementação foi eficaz em alterar o tempo de resistência ao esforço, mas tudo indica que, se a intensidade escolhida para o teste tivesse permitido que os ratos nadassem por um período de tempo maior, teríamos visto, provavelmente, diferenças significativas no desempenho dos animais, já que nessa situação, a concentração dos TCAI começaria a diminuir significativamente. Em humanos, nas nossas observações práticas, foi observado que, caso a suplementação de AACR não fosse acompanhada por um adequado suprimento de carboidratos na corrida longa, o desempenho ficava prejudicado.

Ao se analisar o comportamento de todos os intermediários do TCA analisados no trabalho, vê-se que o grupo BCAA apresentou maiores concentrações de citrato, fumarato e malato, quando comparados ao grupo PLA, embora não tenha havido diferenças significativas nos dois primeiros casos. Isso nos indica que a suplementação desses aminoácidos em conjunto pode ser mais importante na reposição destes intermediários, talvez devido a mecanismos de transporte mais eficientes, do que se suplementados separadamente, gerando intermediários tanto no lado direito do ciclo através da leucina ou isoleucina, como no lado esquerdo, já que a valina e a isoleucina podem originar o succinato.

Vários estudos têm investigado a ligação entre baixas concentrações de glicogênio muscular e a diminuição na concentração total de intermediários do TCA como determinantes da provisão de energia oxidativa durante o exercício (GIBALA et al, 2002 a,b; GIBALA, 2003, BALDWIN et al, 2003) e alguns têm concluído que seus dados não apóiam o conceito de que o decréscimo na concentração dos intermediários do TCA no decorrer da atividade prolongada em humanos possa comprometer a provisão de energia aeróbia, ou mesmo que essa seja a causa da fadiga.

Parece não estar bem estabelecido que a fadiga durante o exercício moderado prolongado coincida com estoques baixos de glicogênio muscular; SAHLIN et al (1998) indicam que está bem documentado que o conteúdo de glicogênio muscular pré-exercício moderado está relacionado ao desempenho, devido ao acúmulo de produtos da hidrólise do ATP (ADP + Pi, AMP e IMP) que ocorre não só após o exercício de alta intensidade, mas também após o exercício moderado prolongado, a ponto de inibir os processos de contração muscular. Porém BALDWIN et al (2003) encontraram que, em homens

exercitados até exaustão em cicloergômetro a 95% do Limiar de lactato, com baixos estoques de glicogênio muscular nas 24h anteriores, não há relação de baixas concentrações de glicogênio com a alteração na concentração dos intermediários do TCA, nem com o *pool* de adenina-nucleotídeos total, nem com aumento do IMP durante o exercício, mas o tempo de resistência ao esforço e o RER foram menores nessa condição.

Uma das principais diferenças desse protocolo para o nosso trabalho, além do modelo experimental que, em nosso caso é o rato, seria o fato de o nosso experimento ter sido desenhado para constituir em exercício sub-máximo com duração de poucos minutos, e sabe-se que mesmo em exercícios sub-máximos prolongados, nos primeiros 15 minutos de atividade, a relação entre glicogênio muscular e o *pool* de *adenina-nucleotídios* ou mesmo intermediários do TCA e fadiga é mais clara. Mas, no nosso estudo, não houve diferença no tempo de resistência ao esforço entre os grupos, embora a concentração de glicogênio muscular e hepático e a concentração de alguns intermediários tenham sido diferentes.

A menor concentração de glicogênio muscular ocorreu justamente no grupo LEU, e não foi acompanhada de nenhuma alteração na concentração muscular de alfa-cetoglutarato, nem no tempo de resistência ao esforço. Vale lembrar que o tempo de exercício submáximo variou entre 4 a 5 minutos. Ou seja, para o mesmo desempenho com relação ao tempo de esforço, a utilização de glicogênio muscular foi maior. Uma das causas poderia ser o possível efeito da leucina sobre a translocação de GLUT-4 e GLUT-1 para a membrana plasmática. NISHITANI et al (2004), trabalhando com ratos portadores de cirrose hepática, revelou que experimentos medindo a captação de glicose (*Oral Glucose Tolerance Test* ou *OGTT*) em músculos sóleos de ratos tratados

com leucina, isoleucina e valina isoladamente, mostraram que a administração oral de leucina ou isoleucina, sem a carga de glicose usualmente aplicada nesse teste, induziu a translocação de GLUT-4 e GLUT-1 na membrana plasmática, através de um mecanismo de *up-regulation*.

Temos algumas conjecturas a partir desse dado: se a leucina foi capaz de estimular a captação de glicogênio nas células musculares no estado pós-absortivo pelo mecanismo de *up-regulation* no nosso estudo, que partiu de um jejum de 24 horas, ele poderia agir tornando a utilização do glicogênio mais acelerada que nos outros grupos experimentais. Em caráter especulativo, poderíamos até mesmo supor que esse efeito da leucina atenuaria a maior utilização de alfa-cetoglutarato para o processo oxidativo nessa situação de depleção de glicogênio muscular, mascarando a teoria do “desvio de carbono” abordada anteriormente, já que estaria facilitando o transporte de glicose.

Se observarmos que a concentração de glicogênio hepático muscular tendeu a ser maior no grupo PLA do que nos grupos restantes, e que no fígado, esse comportamento foi justamente o inverso, esse fato pode reforçar a idéia que os BCAA de forma geral potencializaram a mobilização dos estoques de glicogênio muscular para mobilizar mais glicose para o fígado, o que seria esperado numa situação de jejum.

A rápida expansão inicial dos intermediários do TCA é geralmente atribuída a um fluxo crescente através da reação da AAT no início do exercício. No nosso estudo, também se observa esse aumento da concentração da AAT em um dos grupos experimentais (ISO) ao final do protocolo de exaustão, e podemos relacioná-lo a maiores gerações de succinil Co-A e OAA, e conseqüentemente a maiores taxas de transaminação de glutamato,

como forma alternativa de gerar alfaceto-glutarato (AKG), pois o suprimento de piruvato a partir do glicogênio muscular provavelmente estava deficiente, visto que os animais do nosso estudo foram submetidos ao esforço intenso em depleção de carboidratos. Esses dados nos reportam à lançadeira malato-aspartato, que será discutida um pouco mais adiante.

Devemos lembrar que o músculo é o maior sítio de catabolismo de BCAA. Eles são liberados como cetoácidos, e como já vimos, a desidrogenase correspondente se encontra no fígado do rato, predominantemente (BROSAN, 2003). A primeira etapa do metabolismo de BCAA envolve a transaminação tendo o alfa-cetoglutarato como receptor do grupo amino, gerado tanto pelo ciclo de Krebs na mitocôndria, como pela lançadeira malato-aspartato, através da enzima malato-desidrogenase. A lançadeira malato-aspartato é uma via importante para transferir equivalentes redutores do citosol à mitocôndria no músculo (HUTSON et al, 1988).

O transporte glutamato-aspartato é eletrogênico e, na membrana, o glutamato vai entrar na mitocôndria, acoplado ao fluxo de aspartato. A força que move a lançadeira é o potencial elétrico gerado pelo metabolismo oxidativo (NADH). Dessa maneira, durante a operação da lançadeira, o glutamato entra na mitocôndria (e deprime a atividade da piruvato-carboxilase) e o alfa-cetoglutarato produzido pela transaminação deixa a mitocôndria em troca pelo malato (HUTSON et al, 1988). Assim, o alfa-cetoglutarato produzido por esse processo poderia ser usado nova para transaminação de BCAA mesmo que o piruvato vindo primariamente da glicogenólise estivesse em baixas concentrações no decorrer do exercício.

Se observarmos a maior concentração de malato e oxaloacetato e a atividade da AST nos grupos BCAA e ISO, notaremos que eles estão relacionados entre si, e que provavelmente indicam uma maior atividade da lançadeira malato-aspartato e também a conversão de OAA a malato, já que a enzima malato-desidrogenase ligada ao NADH parece ter um Km muito alto no sentido OAA-malato.

MARQUEZI et al (2003) suplementaram ratos com aspartato e asparagina por 7 dias, e exercitaram os animais até a exaustão. Eles verificaram que a suplementação dos mesmos aumentou o tempo de resistência ao esforço, diminuiu a concentração de lactato sanguíneo e diminuiu a taxa de degradação de glicogênio, concluindo que essa suplementação poderia aumentar a contribuição ao metabolismo oxidativo na produção de energia em exercício realizado acima do limiar de lactato. Relacionando os resultados obtidos com essa suplementação e a utilizada no presente estudo, acreditamos que a contribuição de aspartato e asparagina sobre a lançadeira malato-aspartato seja mais direta que as do BCAA, que devem ser metabolizados primeiro antes de gerar os intermediários. Além do que, o aspartato e a asparagina não parecem ter o efeito que os BCAA tem sobre o transporte de glicose.

Outra alternativa que poderíamos considerar é o ciclo purina-nucleotídeo. Numa situação de depleção de glicogênio, a carga de energia de célula tende a diminuir, pela constante degradação de ATP em ADP + Pi. Sabemos que até um certo momento, esse aumento na concentração de ADP estimula as vias oxidativas, porém, à medida que essas vias não vão sendo mantidas de forma a suprir a demanda energética, há uma inibição da hidrólise do ATP e grande formação de ADP e AMP. Essas reações estão concentradas

no citosol. Normalmente, no músculo de fibras lentas do rato, não ocorreria perda de adenina nucleotídeo, somente nas fibras de contração rápida ela é dominante. Nas fibras de contração lenta, esse fenômeno ocorreria apenas em caso de estresse metabólico, como por exemplo uma isquemia muscular (MAUGHAN et al.2000).

Mas talvez o exercício intenso somado ao processo de depleção de glicogênio pudesse ser considerada com o tal. No músculo do rato, a perda de nucleotídeo, quando ocorre, é por desfosforilação do AMP e não por desaminação. Mas pelos nossos resultados, poderíamos sugerir que os processos de desaminação do Ciclo Purina-Nucleotídeo poderiam ser importantes no nosso caso, visto que o grupo BCAA, ISSO e LEU tendem a ter maiores concentrações de fumarato que o restante dos grupos.

F:Conclusões

Através dos nossos dados experimentais, podemos concluir que:

- Nenhum dos aminoácidos suplementados foi capaz de alterar o tempo de resistência ao esforço, nem a atividade do ciclo dos TCA, medida através da atividade da enzima Citrato Sintase.
- Somente a suplementação de BCAA em conjunto foi capaz de aumentar a concentração de intermediário do ciclo dos TCA (citrato).
- A concentração de glicogênio muscular foi menor nos animais suplementados com leucina, mas não a concentração de alfa-cetoglutarato,

Portanto, através de nossos resultados experimentais, não foi possível demonstrar a importância da suplementação de Aminoácidos de Cadeia Ramificada sobre o aumento da atividade das reações anapleróticas em ratos treinados submetidos a Exercício Sub-máximo.

G: Bibliografia

- ALP, P.R. NEWSHOLME E.A., ZAMMIT V.A. Activities of cytrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates, Biochem. J. 154: 689-700, 1976.
- ANTHONY, J.C., ANTHONY, T.G, KIMBALL, S.R. and JEFFERSON, L. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. J. Nutr. 131: 856S-860S, 2001.
- BALDWIN, J, SNOW, RJ, GIBALA, MJ, ANDREW GARNHAM, A, HOWARTH, K and FEBBRAIO, M. Glycogen availability does not affect the TCA cycle or TAN pools during prolonged, fatiguing exercise. J. Appl. Physiol 94: 2181-87, 2003.
- BERGMEYER, Bowers and cols., Clin. Chim., Acta.,70, 19 – 42, 1976.
- BERGMEYER, H.U In: Methods of Enzymatic Analysis, New York, ed. Bergmeyer, H.U., Academic Press, 1969.
- BLOMSTRAND, E. & SALTIN, B. Effect of muscle glycogen on glucose, lactate and aminoacid metabolism during exercise and recovery in human subjects. J. Physiol. (Lond.), Jan, 514 (Pt 1), pp. 293-302, 1999.
- BLOMSTRAND, E.; EK, S.; NEWSHOLME, E.A.; Influence of ingesting a solution of branched chain aminoacids on plasma and muscle concentrations of aminoacids during prolonged submaximal exercise. Nutrition, 12, pp.485-90, 1996.
- BOWTELL, JL, LEESE, GP, SMITH, K, WATT, PW, NEVILL A, ROOYACKERS O, WAGENMAKERS, AJM, RENNIE MJ. Modulation of whole body protein metabolism during and after exercise, by variation of dietary protein. J. Appl. Physiol., 85(5): 1744-1752, 1998.
- BROSNAN, J.T. Interorgan amino acid transport and its regulation. J. Nut. 133: 2068S-2072S, 2003.
- BURLINA, A. Fumarate. IN: Bergmeyer, HU. Enzymatic Analysis, a practical guide. (VII) Tri –and Dicarboxilic Acids, p, 35-38, 1983.

- CALDERS, P.; PANNIER, J.L.; MATTHYS, D.M.; LACROIX, E.M. Pre-exercise branched-chain aminoacid administration increases endurance performance in rats. Med. Sci, Sports. Ex.29 (9), pp.1182-1186, 1997.
- CALDERS, P; MATTHYS, D; DERAIVE, W; PANNIER, JL. Effect of branched-chain aminoacids (BCAA), glucose and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. Med. Sci. Sports Exerc. 31(4): 583-87, 1999.
- CONSTANTIN-TEODOSIU, D., PEIRCE, N., FOX, J., GREENHAFF, P. L., Muscle pyruvate availability can limit the flux, but not activation, of the pyruvate dehydrogenase complex during submaximal exercise in humans. J. Physiol. 561(2): 647-55, 2004.
- COYLE, E. F. Physical Activity as a metabolic stressor. Am. J. Clin. Nutrition, 72 (Suppl): 512S-20S, 2000.
- DAWSON, K.D., HOWARTH, K.R., TARNOPOLSKY, M.A. WONG, N.D., GIBALA, M. Short-term training attenuates muscle TCA expansion during exercise in women. J. Appl. Physiol 95: 999-1004, 2003.
- FELIG, P & WAHREN, J. Aminoacid metabolism in exercising man. J. Clin. Invest. 50:2703-2714, 1971.
- GIBALA, M.; MacLEAN, D.A.; GRAHAM, T.E.; SALTIN, B. Anaplerotic processes in human skeletal muscle during brief dynamic exercise. J. Appl. Physiology, 502 (3): 703-12, 1997b.
- GIBALA, M.; TARNOPOLSKY, M.A., GRAHAM, T. Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle at rest and during prolonged cycling. Am. J. Physiol., 272 (Endocr. Metab. 35): E239-244, 1997 a.
- GIBALA, MJ Anaplerosis of the muscle tricarboxylic acid cycle pool during contraction: does size matter? J. Physiol. 548 (2): 334, 2003.
- GIBALA, MJ, GONZÁLEZ-ALONSO and SALTIN, B. Dissociation between muscle tricarboxylic acid cycle pool size and aerobic energy provision during prolonged exercise in humans. J. Physiol. 545(2) 705-13, 2002 b.
- GIBALA, MJ, MacLEAN, DA, GRAHAM, TE and SALTIN, B. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size and estimated flux in human muscle

- during exercise. Am. J. Physiol. 275 (Endoc. Metab. 38): E235-E242, 1998.
- GIBALA, MJ, PEIRCE, N, CONSTANTIN-TEODOSIU, D and GREENHAFF, P. Exercise with low muscle glycogen augments TCA cycle anaplerosis but impairs oxidative energy provision in humans. J. Physiol. 540(3): 1079-86, 2002a.
- GIBALA, MJ, Regulation of skeletal muscle aminoacid metabolism during exercise. Int. J. Sports Nutr Exerc Metab, 11(1), 87-108, 2001
- GUEZENNEC, C.Y.; ABDELMAKI, B.; SERRURIER, B., MERINO, D; BIGARD, M.; BERTHELOT, M.; PIERARD, C; PERES, M. Effects of prolonged exercise on brain ammonia and aminoacids. Int. J. Sports Med. 19, 323-327, 1998.
- HARGREAVES, M, Skeletal Muscle Glucose Metabolism during Exercise: Implications for Health and Performance. J. Sci. Med. in Sport 1 (4): 195-202, 1998.
- HARGREAVES, M. Skeletal muscle carbohydrate metabolism during exercise. IN: Hargreaves, M (ed). Exercise Metabolism, p.41-72, Human Kinetics, Champaign, 1995.
- HOWARTH, K.R, LeBLANC, P.J., HEIGENHAUSER, G.J.F., GIBALA, MJ. Effect of endurance training on muscle TCA cycle metabolism during exercise in humans. J. Appl. Physiol 97: 579-84, 2004.
- HUTSON, S. M. & HARRIS, R. A. Symposium: Leucine as a Nutritional Signal. Introduction. J. Nutr. 131: 839S-840S, 2001a.
- HUTSON, S. M.; BERKICH, D; DROWN, P; XU, B; ASCHNER, M; LaNOUE, KF. Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neuro transmitter metabolism. J. Neurochem. Aug, 71:2, 863-74, 1998.
- HUTSON, S. M., LIETH, E., LANOUE, K. F. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. J. Nut. 131: 846S-50S, 2001.
- JACKMAN, M. L. GIBALA, M. J, HULTMAN, E. and GRAHAM, T.E. Nutritional status affects branched-chain oxoacid dehydrogenase activity

- during exercise in humans. Am. J. Physiology Endocrinol. Metab (35): E233-E238, 1997.
- JENTJENS, R, & JEUKENDRUP, A.E. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. Sports Med, 33 (2): 117-143, 2003.
- KOBAYASHI, R., SHIMOMURA, Y.; POPOV, KM; HARRIS, RA. Experimental hyperthyroidism causes inactivation of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in rat liver. Arch. Biochem. Biophys. Mar, 375:1, 55-61, 2000
- LANCHA JR. A.H. Papel da geração de oxaloacetato no exercício físico em ratos: conseqüências da suplementação de aspartato, asparagina e carnitina. São Paulo, 1993, 76 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- LANCHA JR., A.H, Recco, M. B. Curi, R. Pyruvate carboxylase activity in the heart and skeletal muscles of the rat. Evidence for a stimulating effect of exercise. Biochem Mol Biol Int, 32(3): 483-9, 1994.
- LeBLANC, P.J., HOWARTH, K., GIBALA, M., HEIGENHAUER, G.J.F. Effects of 7-week endurance training on human skeletal muscle metabolism during submaximal exercise. J. Appl. Physiol. (97) 2148-2153, 2004.
- MARQUEZI, M. L., ROSCHEL, H.A., COSTA, A. S. SAWADA, L. A., LANCH JR., A. H. Effect of aspartate and asparagine supplementation on fatigue determinants in intense exercise. Int. J. Sports Nutr. Exerc. Metab 13(1): 65-75, 2003.
- McENZIE, S, PHILLIPS, S.M., CARTER, S.L., LOWTHER, S, GIBALA, M and TARNOPOLSKY, M. A. Endurance exercise training attenuates - leucine oxidation and BCOAD activation during exercise in humans. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 278: E580-87, 2000.
- MERO, A. Leucine supplementation and intensive training. Sports Med. 27 (6), 347-358, 1999.
- MESSER, J.I., JACMAN, M. R., WILLIS, W. T. Pyruvate and citric acid cycle intermediates in isolated skeletal muscle mitochondria. Am. J. Physiol. Cell Physiology, 286: C565-C572, 2004.

- MITTLEMAN, KD, RICCI, M, and BAILEY, SP. Branched chain aminoacids prolong exercise during heat stress in men and women. Med. Sci. Sports Exerc. 30 (1), 83-91, 1998.
- NEWSHOLME, EA, BLOMSTRAND, E. & EKBLUM, B. Physical and mental fatigue: metabolic mechanisms and importance of plasma aminoacids. Br. Med. Bull. 48:477-495, 1992.
- NISHITANI, S., TAKEHANA, K, FUJITANI, S. SONAKA, I. Branched-chain aminoacids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 288:G1292-G1300, 2004.
- NYBO, L., NIELSEN, B, BLOMSTRAND, E. MOLLER, K, SECHER, N. Neurohumoral responses during prolonged exercise in humans. J. Appl. Physiol. 95: 1125-1131, 2003.
- OWEN, O.E.; KALHAM, S.C.; HANSON, R. W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. J. Biol. Chemistry, 277(34): 30409-12, 2002.
- PEREIRA, Luciana O; LANCHA JR, Antonio Herbert. Effect of insulin and contraction upon glucose transport in skeletal muscle. Progress in Biophysics and Molecular Biology, Oxford, v. 84, n. 1, p. 1-27, 2004.
- ROMIJN, JA, COYLE, EF, SIDOSSIS, LS, et al. Regulation of endogenous fat in carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. Am. J. Physiol, 265: E380-91, 1993.
- SAHLIN, K., TONKONOJI, M., SÖDERLUNG, K. Energy supply and muscle fatigue in humans. Acta Physiol. Scand 162: 261-66,1998.
- SERDIKOFF, C. & ADIBI, S. Protein expressions of Branched-Chain Keto Acid Dehydrogenase Subunits are selectively and posttranscriptionally altered in liver and skeletal muscle of starved rats. J. Nut 131: 1682-6, 2001.
- SHINNICK, F.L. & HARPER, A.E. Biochimica Biofisica Acta, 437: 477-486, 1976.
- TARNOPOLSKY, M. Protein metabolism in strenght and endurance activites. IN: Perspectives in exercise science and sports medicine, vol 12,

- “The metabolic basis of performance in exercise and sport”. LAMB, D., MURRAY, R (Eds.), Cooper Publishing Group, Carmel, 1999, 125-63.
- Van HALL, G., Mac LEAN, D. A., SALTIN, B. and WAGENMAKERS, A. J. M. Mechanisms of activation of muscle branched-chain alpha-keto-acid dehydrogenase during exercise in man. J. Physiol. 494(3): 899-905, 1996.
- VIEIRA, R., HAEBISCH, H., KOKUBUN, E., HELL, N. S., CURI, R. Swimming system for physical exercise of rats. Arq. Biol. Tecnol. 31: 387-394, 1988.
- ZEISEL, S. H. Is there a metabolic basis for dietary supplementation? Am. J. Clin. Nut. (72S): 507S-11S, 2000.
- WAGENMAKERS, A.J.M., Muscle aminoacid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. In: HOLLOSZY, J. Ed. Ex. Sports Sci. Rev. Vol. 26, pp; 287-314, 1998.
- WAGENMAKERS, A.J.M., BROOKES, JH, COAKLEY, JH, REILLY, T, EDWARDS, RHT. Exercise-induced activation of the branched-chain 2 oxo-acid dehydrogenase in human muscle. Eur. J. Appl. Physiol. 59:159-167,1989.
- WAGENMAKERS, AJ. Aminoacid supplements to improve athletic performance. Curr. Opin. Metab. Care, Nov; 2 (6): 539-44, 1999.
- WALTON, M.E., EBERT, D., HALLER, R.G. Relative rates of anaplerotic flux in rested and contracted rat skeletal muscle measured by ¹³C NMR spectroscopy. J. Physiol. 548(2): 54-58, 2003.

ANEXO 1:

Muscle glycogen depletion and BCAA supplementation in sub-maximal exercise: some implications on anaplerotic reactions and performance in trained rats

Patricia L. Campos^{3,1}; Thomas B. Adolpho¹; Hamilton Roschel¹; Thiago O. Freire^{3,1}; Bruno Gualano¹; Patricia Berbel¹; Desire Coelho¹; Luiz F. B. C. Rosa² and Antonio H. Lancha Jr¹

¹School of Physical Education and Sport - University of Sao Paulo (USP), Brazil

²Institute of Biomedical Sciences - University of Sao Paulo (USP), Brazil

³Institute of Biology - State University of Campinas (UNICAMP), Brazil

Correspondence and reprint requests:

Dr. Patricia Lopes de Campos
Av. Prof . Mello Moraes, 65
Cidade Universitaria
Sao Paulo – SP
05508-900
BRAZIL

e-mail: patlcamp@yahoo.com.br

Phone: 55-11-3091-3136

Fax: 55-11-3819-5921

Key-words

Amino acids, anaplerosis, exercise, rats

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of glycogen depletion and BCAA supplementation on TCA cycle activity, performance and anaplerosis in trained rats.

Rats were trained in a swimming system during 8 weeks, 5 times a week, 1 hour a day. On the 7^h week, they received 166 mg/kg Body Weight/day of BCAA or Placebo, Leucine, Isoleucine or Valine separately. They performed a sub maximal test after a 24h fast plus exercise. Resistance to exhaustive exercise was not different among experimental groups. Muscle glycogen content on Leucine group was significantly lower than in placebo group ($0,062 \pm 0,07$ x $0,186 \pm 0,09$ mg/mg wet tissue).

Muscle transaminases' concentration (ALT and AST) were higher in Isoleucine group comparing to Placebo group ($190,1 \pm 62$ x $78,9 \pm 51$ / $241,8 \pm 72$ x $125,8 \pm 33$ U/mg tissue) and Citrate Synthase maximum activity was not different among experimental groups.

Although leucine did reduce muscle glycogen content, none of the BCAAs were able to reduce either TCA cycle activity or exercise performance.

Introduction

Glucose is an important fuel for exercising muscles. Pyruvate, which is generated during its oxidation, when in excess, combines with glutamate forming alanine and alpha-keto-glutarate, through ALT (alanine amino transferase) reaction. This reaction appeared to be responsible for the rapid increase in muscle tricarboxylic acid intermediates (TCAIs), which occurs during the initial minutes of moderate to intense exercise in humans (Gibala et al, 2002a). The expansion of the TCAI pool during exercise is a very rapid phenomenon; after reaching the peak within few minutes, they decline as the exercise goes further, such that, after 75-90 min, their concentration is lower than those observed at resting state (Gibala et al, 1999).

Wagenmakers (1990) proposed that the increase in TCAI pool was necessary to attain high rates of aerobic energy provision, probably by activating near-equilibrium reactions in the TCA cycle. A few years later, he and others showed that changes in the size of muscle pool of some amino acids might play a role in the establishment and maintenance of a high concentration of TCA cycle intermediates, allowing a high aerobic oxidation rate during prolonged exercise (Mourtzakis & Graham, 2002, Bruce et al, 2001, Calders et al, 1997). Also, that amino acids seemed to play a role in the failure to maintain high concentrations of TCAI during prolonged exercise,

which could potential the development of fatigue in glycogen depleted muscles (Wagenmakers, 1998).

Recent studies have questioned the idea that changes in anaplerotic reactions during muscle contraction may regulate delivery of oxidative energy. Gibala et al (2002b) observed that despite the 50% increase in muscle [TCAI], aerobic provision measured through VO_2 _{thigh} was not changed in 6 men performing one-legged cycling at 70% of maximum capacity. In this experiment, subjects were not glycogen depleted. Jackman et al (1997) evaluated the effect of glycogen availability and BCAA supplementation on BCOAD activity during sub-maximal exercise in glycogen depleted subjects supplemented or not with BCAA, and she observed that in glycogen depletion + exercise, with or without BCAA supplement, BCOAD activity was rapidly activated, but still did not observe any relationship between BCOAD activity and glycogen concentration or net glucogenolysis, suggesting there are other factors important to this enzyme's regulation in muscle.

Endurance training seems to play an important role in regulating Alanine Amino transferase (ALT) and BCOA Dehydrogenase reactions: they are attenuated even with an acute training protocol, comparing to sedentary situation (Dawson et al, 2003, McEnzie et al, 2000).

However, the possible role of anaplerosis in maintaining TCA flux, to support oxidative phosphorylation remains controversial. Walton (2003),

using ^{13}C NMR spectroscopy to evaluate muscle TCA flux, showed that proportional increase of TCA flux through anaplerotic reactions and oxidative carbon entry in TCA cycle during muscle contraction supports the hypothesis of the importance of anaplerotic flux to maintain general function of TCA cycle and a transduction of energy during exercise.

The present study examined the effect of BCAA supplementation (together and isolated) in trained rats performing sub maximal exercise in glycogen depletion, to evaluate if anaplerosis was related to either glycogen depletion or performance.

Methods

Animals: the Ethics Committee of the Institute of Biology – UNICAMP, approved the Experimental Protocol. 40 male Wistar SPF rats (90g), aged 4 weeks, provided by the Central Biotery of the State University of Campinas (CEMIB- UNICAMP, Campinas, Brazil) were kept in our facility until they were 8 week-old (250 g, adult). They were housed (4 animals/cage) under controlled environmental conditions (temp 22° C, 12-h dark period starting at 07h00) and fed with appropriate chow (NUVILAB CR1, NUVITAL, Curitiba, Brazil), containing approximately 52% carbohydrates, 21% protein and 24% lipids. Water and food were provided freely. The animals were treated and exercised always in the dark phase of the 12-h cycle, and infrared

lights were used in the facility, so that they would not be bothered by UV light.

Experimental design: After the animals reached the 8th week of age, they were randomly divided into 5 experimental groups (n=8), as described in table 1. They started the exercise program in a swimming device specially designed (Vieira, 1988) as described in table 2, always between 14h00 and 17h00. After 6 weeks of training, they were able to swim for 1 hour with a 5% of their body weight lead load attached to their bodies, which corresponded to a moderate intensity exercise (Lancha Jr et al, 1995). In order to precisely adjust the exercise intensity of the final performance experiment, they were submitted to an intermittent, progressive swimming test to determine lactate threshold at the 7th week of training. This test consisted on determinations of lactate blood, by puncture of tail vein, either with the animal at rest, or after a 3 minute exercise with a determined lead load attached to its body (tab. 3), until exhaustion, which was defined as a period of 10 sec without emerging their noses out of the water. Tail Vein blood was collected by capillarity; NaF 2% solution was used to prevent coagulation, and the samples were read immediately in an Yellow Springs Lactometer (ES 800). Blood Lactate levels were plotted into curves and lactate threshold was determined at their inflexion points (Marquezi et al, 2004).

On the following day, BCAA supplementation started. Animals were supplemented by intragastric gavage through the seven following days with either the BCAA or placebo (tab. 1), 166mg of the corresponding kg/kg weight/day diluted in 2 ml distilled water, and their swimming sessions remained taking 1h/day, 5 days a week.

On the 6th day of supplementation, rats were kept fasted after their swimming session, until complete 24 h before the final experiment, in order to deplete liver glycogen. On the 7th day of supplementation, rats were submitted to a different swimming protocol: they swam gently for the first 10 minutes, then a 7 or 8% of body weight lead load was attached to their bodies, according to the animal's lactate threshold test, until achieve 2 load levels higher than its lactate curve's inflection point (sub-maximal exercise). They swam until exhaustion, after that, they were euthanised by decapitation. Muscles gastrocnemius and liver were depicted and rapidly frozen in Liquid Nitrogen, until further analysis.

Chemicals: radioactive isotopes and all the enzymes were purchased from Sigma Co. (St. Louis – MO). Kits for enzyme activity determinations, when utilized, were obtained from Bioclin (QUIBASA, Belo Horizonte, Brazil).

Measurements

Muscle and Liver Glycogen: were determined according to the method described by Hassid & Abrahams (1957). 1-gram piece of frozen muscle was removed from each sample. Tissues were heated in 6N KOH solution, then were submitted to glycogen extraction with ethanol 70% solution. Glycogen was then hydrolyzed to glucose with a sulfuric acid + enthrone solution, which produced a green color. Colorimetric determinations were made at 650nm, in an

Perkin-Elmer Lambda 25 Spectrophotometer.

Muscle TCA intermediates: 1-gram piece of frozen muscle was removed from each sample. They were diluted in 10ml of 0,6M perchloric acid buffer. They were homogenated gently with a pestle. The homogenates were centrifuged at 10000 rpm, 10°C, and a sonicator was used to improve the centrifugation. Supernatants were separated, neutralized with 60µL TRIS/KOH buffer and 10µL of Universal Indicator, so that a green color was formed. Homogenates were frozen in liquid nitrogen until further analysis. They were assayed enzymatically for: alpha-keto glutarate, citrate, malate, 2-oxoglutarate, by spectrophotometry (Perkin-Elmer Lambda 25 Spectrophotometer), and fumarate was determined using a fluorimetric assay (Hitachi F-2000 fluorescence spectrophotometer, Hitachi Instruments, Japan), according to Bergmeyer (1983, modified).

Enzymes activity: maximum Citrate Synthase activity (EC 4.1.3.7) was determined according to Alp et al (1976). Alanine Amino transferase (EC 2.6.1.19) and Aspartate Amino transferase (EC 2.6.1.1) concentrations were assayed according to Berg Meyer (1976); kinetic test kits usually utilized in clinical laboratories in Brazil (Bioclin) were used.

Statistical analysis: Values are presented as means \pm SD. Statistical evaluation was performed by one-way ANOVA to analyze the effects of supplementation type. When a significant overall effect was detected, differences among statistical means were assessed with Turkey *post-hoc* test. The level of significance was set at $P < 0.05$ for all statistical tests. All statistical analysis were performed using the software *SPSS* 13.0 for Windows.

Results

The aim of this study was to verify if branched-chain amino acids supplementation influenced parameters such as resistance to fatigue, muscle TCAI levels and some enzymes activity in our experimental protocol. For that, it was necessary to evaluate if our experimental design was adequate to our purposes, for example: if we got proper liver and gastrocnemius glycogen depletion, and if our exercise protocol raised TCA cycle activity as expected. In prior experiments, we tested if a 24-h fast would be sufficient to deplete

muscle and liver glycogen content. Our data showed that liver glycogen levels ranged from $2,9 \pm 1,1$ in fed rats to $0,179 \pm 0,09$ mg/100mg tissue in fasted animals, without exercise; gastrocnemius glycogen ranged from $0,229 \pm 0,09$ in fed rats to $0,276 \pm 0,076$ mg/100 mg tissue in fasting. Citrate Synthase Maximum Activity is used to measure TCA cycle activation. This activity in untrained rats muscle is $2,5 \pm 1,41 \mu \text{ mol/min/g}$. After swimming for one hour, this activity raises to $8,36 \pm 2,74 \mu \text{ mol/min/g}$ fresh tissue (Lancha Jr. et al, 1995). In our experiments, maximum rats muscle Citrate Synthase activity ranged between $9,6 \pm 3$ to $12,4 \pm 4 \mu \text{ mol/min/g}$, after swimming until exhaustion. So, we considered our experimental design was able to deplete glycogen and the final exhaustion test was adequate in elevating TCA cycle activity, as expected.

Lactate threshold test: Lactate Concentration (LC) of all animals was observed during this test. LC was four times higher in the last exercise load than in resting state. In table 4, we can see there was a 0,6 mMol/L in LC per BW load. Between the 7% BW load and the 8% BW load, there was an increment in LC almost three times higher than observed in lighter BW loads. This was the average exercise load where the inflexion point of LC occurred. This was used as basis for calculating each rats' sub-maximal exercise for the final test which was swimming with 9 to 10% BW load attached to the rat body) these values were determined for each rat separately.

Resistance to Fatigue: in table 5 we observed there were no significant differences among all experimental groups regarding this parameter ($p = 0,49$), although PLA and LEU groups had slightly higher values than the others.

Muscle and Liver Glycogen content: liver glycogen levels did not feature any statistical difference (tab. 6). LEU supplemented rats featured lower gastrocnemius muscle levels than PLA rats.

TCA Intermediates in muscle: Muscle citrate, alpha-keto-glutarate, fumarate and oxaloacetate levels did not feature any significant difference among our experimental groups. Malate level was higher in ISO group than in all the others (tab. 7).

Enzymes' activity: Muscle Citrate Synthase activity did not feature any significant difference among the experimental groups. ALT and AST concentrations were higher only in VAL group, compared to PLA group (tab. 8).

Discussion

Sub maximal exercise requires a large mobilization of muscle glycogen reserves (Romijn et al, 1993). It is known that one of the major biochemical adaptations to a regular training program is a lower activation state of Glycogen Phosphorylase and Pyruvate Dehydrogenase during exercise, due to

lower flux of private, so that for the same exercise intensity, there is a lower glycogen oxidation (LeBlanc et al, 2004).

However, exhaustive exercise performed by trained animals, whose carbohydrate availability is reduced by prolonged fasting, implicates in higher oxidation of other substrates. Higher oxidation of leucine, for example, is related to a lack of alpha-keto-glutarate, one of the TCA intermediates (Gibala, 2001), but maximal activity of BCKA Dehydrogenase, the enzyme that decarboxilates leucine, do not seem to rise significantly in this condition.

In our experimental results, none of the Branched-chain Amino acids altered resistance to fatigue during a sub maximal effort; it seems to corroborate the current hypothesis about the lack of correlation between muscle TCA intermediates concentration and oxidative energy provision (Gibala, 2003).

Regarding liver glycogen level, it was observed that the experimental data did not feature any statistical difference among experimental groups. On the other hand, rats supplemented with leucine had muscle glycogen levels significantly lower when compared to control animals (PLA), but both of the groups had the same performance in the final test. This might indicate that higher oxidation of leucine would not trap muscle alpha-keto-glutarate (AKG) to LEU transamination. In fact, in our experimental data, AKG levels of LEU group is as low as it is in PLA group. One of the possible reactions described

by Wagenmakers (1998) to characterize the carbon drift caused by excessive LEU oxidation was a higher mobilization of glycogen stores to generate pyruvate, shifting ALT reaction to the right (pyruvate + glutamate \leftrightarrow alanine + AKG), forming AKG, could be altered when glycogen stores were low after prolonged exercise. So this shift of the ALT reaction could be driven to the left, diminishing muscle AKG levels. Again, when we observe muscle ALT concentration, we can notice that these values in LEU group compared to PLA group were not different, perhaps because our final exhaustion protocol did not consist in prolonged exercise.

When all the TCA Intermediates' levels measured in the study were observed, no group featured any statistically different muscle levels of AKG, citrate, OAA and fumarate, except in malate concentration. That indicates that BCAA supplementation might be important to replenish TCA intermediates to the left side of the cycle, through succinate and OAA formed by valine or isoleucine.

In the ISO group, AST and ALT concentrations were higher than the in other groups. Muscle succinate levels were not measured in this study, and ISO group OAA levels did not feature any statistical difference compared to PLA group ($17,1 \pm 13 \times 6 \pm 5$ ug/mg fresh muscle). If the experimental ($n = 8$) groups were higher, probably we could have noticed a significant difference in this case. Anyway, if oxaloacetate concentration in muscle were raised by

ISO supplementation, this would justify the higher muscle concentration of transaminases, without having any positive correlation to glycogen levels in this case.

It seems to be well established that fatigue caused by prolonged exercise occurs when muscle glycogen reserves are low, however Baldwin et al (2003) found that low muscle glycogen levels are not related to any change in muscle TCA intermediates' concentration, in subjects who exercised until exhaustion in cycloergometer. The rapid initial expansion of TCA intermediates is generally attributed to an increased flux through ALT reaction at the onset of exercise.

In our study, however, this rise in ALT concentration in ISO group, at the final experiment, could not be related to higher levels of succinyl-CoA and OAA, and consequently, to higher glutamate transamination rates, as an alternative path to originate AKG to ALT reaction. In our case, pyruvate supply was probably under generated, but isoleucine or valine, as stated before, might have provided pyruvate to the muscle.

And finally, some studies have investigated the relationship between low muscle glycogen and TCA intermediates' levels after exercise and higher glucose transport rates, and also the increasing capacity of converting glucose to glycogen (Jentjens & Jeukendrup, 2003, Gibala et al, 2002a,b, Baldwin et al 2003). All of them, except the first one, lead to the same conclusion: their data

do not support the idea that decrease in muscle TCAI concentrations during prolonged activity in humans might compromise aerobic energy provision, or even that is the cause of fatigue in this case.

Conclusion

We conclude, from our experimental data, that BCAA were the only form of amino acids that did increase muscle TCAI levels (malate), and leucine supplementation did reduce muscle glycogen content more rapidly than the other amino acids, however none of the amino acids supplemented to the animal either altered TCA cycle activity or improved their performance in sub maximal exercise.

References

- Baldwin, J, Snow, RJ, Gibala, MJ, Andrew, M, Graham, A, Howarth, K and Febbraio, M. Glycogen availability does not affect the TCA cycle or TAN pools during prolonged, fatiguing exercise. J. Appl. Physiol 94: 2181-87, 2003
- Bergmeyer, Bowers and cols., Clin. Chim., Acta., (70) 19 - 42,1976; (71) 21 - 22, 1977
- Burlina, A. Fumarate/Malate. IN:. Bergmeyer, HU. Enzymatic Analysis, a practical guide. (VII) Tri and Di-carboxylic Acids, p, 35-38, 1983.
- Bruce, M, Constantin-Teodosiu, D, Greenhaff, PL, Boobis, LH, Williams, C and Bowtell, JL. Glutamine supplementation promotes anaplerosis but not oxidative energy delivery in human skeletal muscle. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab, 280(4): E669-75, 2001
- Calders, P, Pannier, JL, Matthys, D and Lacroix, EM. Pre-exercise branched-chain amino acid administration increases endurance performance in rats. Med. Sci. Sports Ex, 29(9): 1182-6, 1997
- Dawson, KD, Howarth, KR, Tarnopolsky, MA Wong, ND and Gibala, MJ. Short-term training attenuates muscle TCA cycle expansion during exercise in women. J. Appl. Physiol 95: 999-1004, 2003
- Gibala, M; Lozej, M; Tarnopolsky, MA; McLean,C and Graham, T. Low glycogen and Branched Chain amino acid ingestion do not impair anaplerosis during exercise in humans. J. Appl. Physiol. 87(5): 1662-1667, 1999
- Gibala, M; Peirce, N; Constantin-Teodosiu, D and Greenhaff, P. Exercise with low muscle glycogen augments TCA cycle anaplerosis but impairs oxidative energy provision in humans. J. Physiol 540(3): 1079-86, 2002 (a)
- Gibala, MJ; González-Alonso, J and Saltin, B. Dissociation between muscle tricarboxylic acid cycle pool size and aerobic energy provision during prolonged exercise in humans. J. Physiol. 545(2): 705-13, 2002 (b)

- Hassid, WZ and Abraham, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. Methods Enzymol. 3:34-50, 1957
- Howarth, KR, LeBlanc, PJ, Heigenhauser, GJF and Gibala, MJ. Effect of endurance training on muscle metabolism during exercise in humans. J. Appl. Physiol. 97:579-584, 2004
- Jackman, ML, Gibala, MJ, Hultman, E and Graham, TE. Nutritional status affects branched-chain oxoacid dehydrogenase activity during exercise in humans. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab 272(35): E233-8, 1997
- Jentjens, R, & Jeukendrup, A.E. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. Sports Med, 33 (2):117-143, 2003.
- LeBlanc, P.J., Howarth, K., Gibala, M., Heiguenheuer, G.J.F. Effects of 7-week endurance training on human skeletal muscle metabolism during sub maximal exercise. J. Appl. Physiol. (97) 2148-2153, 2004.
- McEnzie, S, Phillips, SM, Carter, SL, Lowther, S, Gibala, MJ and Tarnopolsky, MA. Endurance exercise training attenuates leucine oxidation and BCOAD activation during exercise in humans. Am. J. Appl. Physiol. Endocrinol. Metab. 278: E580-E587, 2000
- Mourtzakis, M and Graham, TE. Glutamate ingestion and its effects at rest and during exercise in humans. J. Appl. Physiol, 93: 1251-1259, 2002.
- Romijn, JA, Coyle, EF, Sidossis, LS, et al. Regulation of endogenous fat in carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. Am. J. Physiol, 265: E380-91, 1993.
- Vieira, R., Haebisch, H., Kokubun, E., Hell, N. S., Cury, R. Swimming system for physical exercise of rats. Arq. Biol. Tecnol. 31: 387-394, 1988.
- Wagenmakers, A.J.M., Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. In: HOLLOSZY, J. ed. Ex. Sports Sci. Rev. Vol. 26, 287-314, 1998.
- Wagenmakers, AJM; Coakley, JH and Edwards, RHT. Metabolism of Branched-chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. Int. J. Sport Med. 11, S101-13, 1990.

Walton, ME, Ebert, D and Haller, RG. Relative rates of anaplerotic flux in rested and contracted rat skeletal muscle measured by ^{13}C NMR spectroscopy. *J. Physiol.*548:2, 54-548, 2003

Acknowledgements:

We would like to thank the Sao Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) for whole funding of the project (no. Fapesp 01/00110-3).

Table 1: Experimental Groups (n= 8)

Groups	G1	G2	G3	G4	G5
Supplementation	Placebo	Isoleucine	Leucine	BCAA	Valine
After 6 weeks of training					

Table 2: Training Protocol

Week of training	Swimming Session
Adaptation	20 minutes, no load attached to the animal
1 st	20 a 25 minutes (5% BW load)
2 nd	25 a 30 minutes (c/ 5% BW load)
3 rd	35 a 40 minutes (c/ 5% BW load)
4 th	45 a 50 minutes (c/ 5% BW load)
5 th	55 a 60 minutes (c/ 5% BW load)
6 th	Lactate Threshold Test + maintenance of training)
7 th	BCAA supplementation (Intra-gastric Gavage) + maintenance of training)
Final Test	Performance Test (8 a 10% BW load)

Table 3: Intermittent Protocol of Lactate Threshold Determination

1st Blood lactate determination at rest

10 min. warm-up: swimming without any attached load

2nd Lactate determination (1-minute break)

3 minutes of swimming with a 4% BW load

3rd Lactate determination (1-minute break)

3 minutes of swimming with a 5% BW load

4th Lactate determination (1-minute break)

3 minutes of swimming with a 6% BW load

5th Lactate determination (1-minute break)

3 minutes of swimming with a 7% BW load

6th Lactate determination (1-minute break)

3 minutes of swimming with a 8% BW load

7th Lactate determination (1-minute break)

Graph. 1: Linear Regression (r = 0,7)

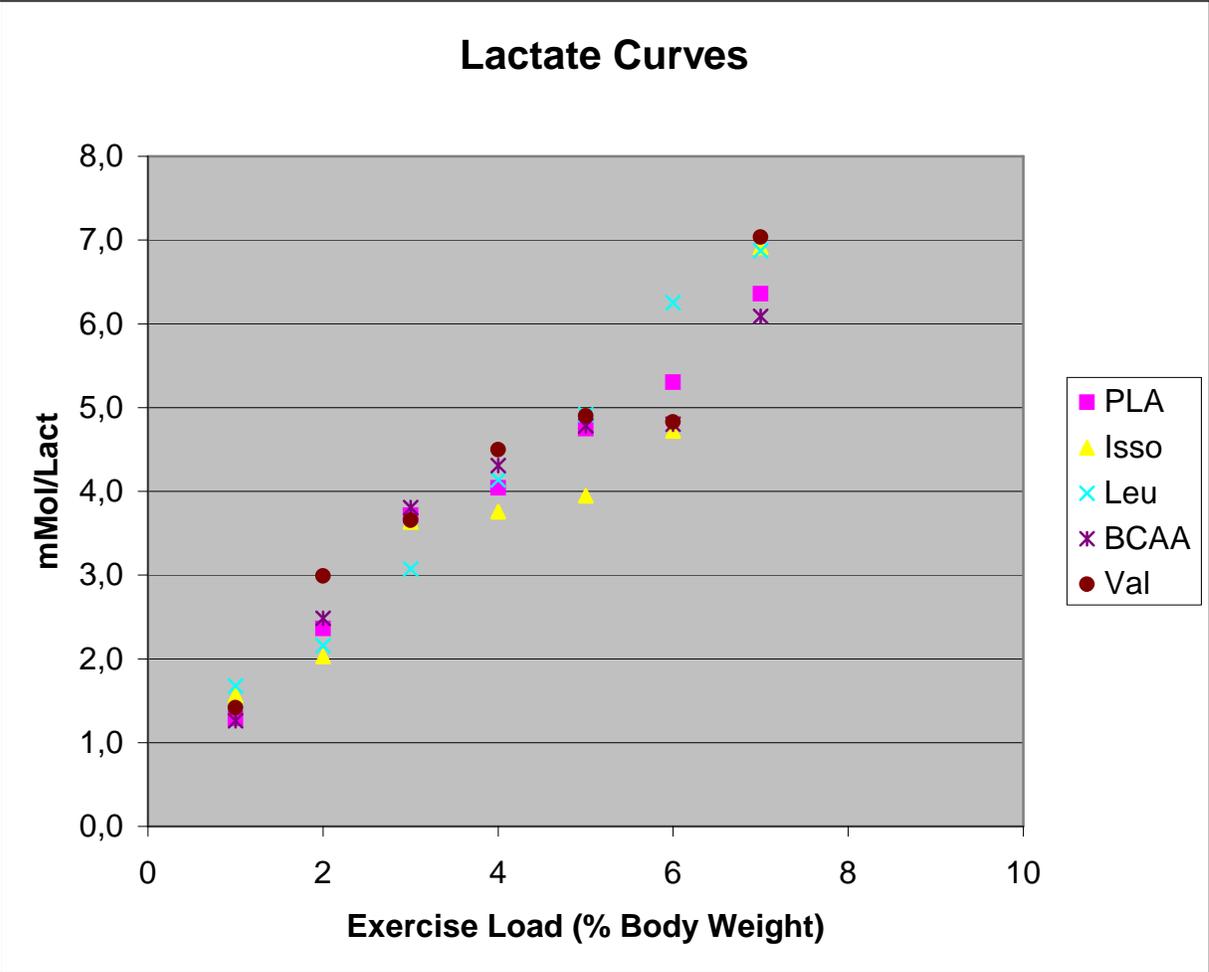


Table 4: Blood Lactate Concentration (mmol/l)
(after 6 weeks of training and before any supplementation)

Load (% Body Weight - BW)	Lactate [] (mmol/l)
Rest (n=39)	1,4354 ± 0,604
10 min Warm-up (n=39)	2,4410 ± 1,134
1 st . Load (4% BW) (n= 39)	3,5918 ± 1,181
2 nd . Load (5% BW) (n=39)	4,1733 ± 1,43
3 rd . Load (6% BW) (n=37)	4,6692 ± 1,242
4 th . Load (7% BW) (n=39)	5,1572 ± 1,678
5 th . Load (8% BW) (n=37)	6,6354 ± 1,414

Data shown as average ± standard deviation

Table 5: Resistance to fatigue during final test.

Groups	Resistance to Fatigue (s)
Placebo	400,4 ± 222
BCAA	257 ± 110
Iso	347,3 ± 183
Leu	398,6 ± 306
Val	283 ± 147

Data shown as average ± standard deviation.

- a: significant difference to Iso group
- b: significant difference to Placebo group
- c: significant difference to Leucine group
- d: significant difference to BCAA group
- e: significant difference to Valine group

Tabela 6: Glycogen content (n=8)

Groups	Liver Glycogen (mg/ 100mg fresh tissue)	Muscle Glycogen (mg/ 100mg fresh tissue)
Placebo	0,106 ± 0,13	0,186 ± 0,09 c
BCAA	0,197 ± 0,10	0,107 ± 0,06
Iso	0,084 ± 0,06	0,071 ± 0,06
Leu	0,189 ± 0,12	0,062 ± 0,07 b
Val	0,243 ± 0,12	0,106 ± 0,04

Data shown as average ± SD.

a: significant difference to Iso group

b: significant difference to Placebo group

c: significant difference to Leucine group

d: significant difference to BCAA group

e: significant difference to Valine group

Table 7: Muscle Content of TCA Intermediates (n=6)
(uMol/mg wet tissue)

Groups	Alpha-keto glutarate	Citrate	Oxalo acetate	Fumarate	Malate
Placebo	24,6 ± 18	3,5 ± 1	6,06 ± 6	8076 ± 7202	22146 ± 2057, d
BCAA	13,8 ± 9	11,4 ± 2	9,1 ± 5	9935 ± 2242	34631 ± 9413, a,b,c,e
Iso	16,9 ± 9	7,3 ± 6	17,1 ± 15	11516 ± 2947	27806 ± 12186, d
Leu	17,3 ± 16	4,9 ± 3	8,9 ± 6	8571 ± 1170	50682 ± 10119, d
Val	15,2 ± 11	9,4 ± 7	13,8 ± 11	5072 ± 1773	30176 ± 4176, d

Data shown as average ± standard deviation.

- a: significant difference to Iso group
- b: significant difference to Placebo group
- c: significant difference to Leucine group
- d: significant difference to BCAA group
- e: significant difference to Valine group

Table 8: Enzymes' Activity/ Concentration

Groups	Citrate Synthase Max. Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ tissue)	ALT (U/mg wet tissue)	AST (U/mg wet tissue)
Placebo	12,3 \pm 4	78,9 \pm 51 a	125,8 \pm 33 a
BCAA	12,3 \pm 5	115,8 \pm 32	161,9 \pm 55
ISO	12,5 \pm 4	190,1 \pm 62 b,e	241,8 \pm 72 b
Leu	11,8 \pm 2	123,4 \pm 36	152 \pm 60
Val	9,6 \pm 3	94,8 \pm 42 a	158 \pm 63

Data shown as average \pm standard deviation.

- a: significant difference to Iso group
- b: significant difference to Placebo group
- c: significant difference to Leucine group
- d: significant difference to BCAA group
- e: significant difference to Valine group

ANEXO 2:

Muscle Glycogen depletion and BCAA supplementation in trained rats: influence on performance and anaplerotic reactions

Campos Patrícia L¹, Bozza Thomas², Freire Thiago O¹, Gualano Bruno², Berbel Patrícia², Coelho Desiree², Costa Rosa Luis FB³, Lancha Jr Antonio H²

¹Institute of Biology, State University of Campinas, Brazil

²School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Brazil

³Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil

Introduction

BCAA have been largely utilised by athletes to either enhance performance or to prevent muscle damage caused by endurance activities. High levels of leucine in muscle might trap alpha-keto-glutarate from Tricarboxylic Acids Cycle (TCA), when glycogen stores are depleted, according to some authors, and therefore impair sports performance. However, BCAA's carbon groups might be used as fuel to oxidation, according to the literature. The aim of this work is to verify whether BCAA supplementation in trained rats submitted to glycogen depletion and intense exercise affects performance and TCA intermediates concentration in muscle.

Methods

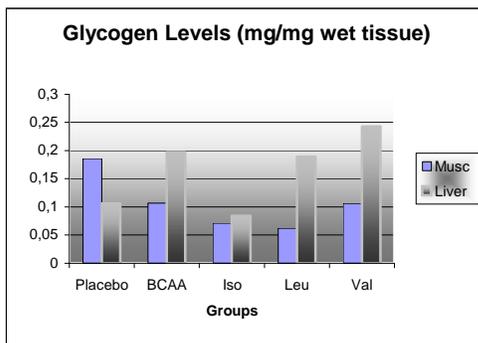
40 male Wistar rats (age 8 weeks) were divided into 5 groups (n= 8)(BCAA, ISOleucine, LEUcine, VALine, PLAcabo) and were trained using a swimming protocol of 8 weeks, 1 hour a day, 5 days a week, with a 5 % load attached to their tails. In the sixth week, they performed an anaerobic threshold test (lactate). Then they were given BCAA for the last 7 days (166 mg/kg weight/day). One day before the final experiment, they trained 1 hour, and were kept fasted during 24h to deplete glycogen stores. The final test consisted on swimming for 10 min without any load on their tails (warm up) and then to swim with 7 or 8% load according to their lactate threshold test (submaximal exercise) until fatigue was reached. Then they were euthanized by decapitation, blood and tissues were collected and kept in liquid N₂ until further analysis. The parameters utilized were the following: muscle and liver glycogen, resistance to fatigue (s), alphaketoglutarate and citrate synthase total activity.

Results

Groups	Time of Exercise (s)	AKG (mg/mg wet tissue)	Citrate Synthase Activity (umol/min/mg tissue)
PLA	400,4 + 222	0,8 + 0,1e	12,3 + 4
BCAA	257 + 110	0,33 + 0,2e	12,3 + 5
ISO	347,3 + 183	0,049 + 0,03e	12,5 + 4
LEU	398,6 + 306	0,010 + 0,06e	11,8 + 2
VAL	283 + 147	1,5 + 0,8 a,b,c,d,	9,6 + 3

Table 1: Parameters of performance and TCA cycle in muscle

Exercise performance was not different among experimental groups, regardless of their supplementation. Alphaketoglutarate levels in muscle tended to be very low in LEU group, but still they were not different from the others, except the VAL Group. The latter had higher concentrations of AKG than all the others. Citrate synthase activity was the same for all experimental groups.



Muscle Glycogen was lower in LEU group when compared to PLA. Liver Glycogen did not feature any statistical difference among experimental groups.

Discussion/Conclusion

It was not possible to observe any statistical difference among experimental groups regarding exercise performance, however muscle AKG levels tended to be lower in LEU group. We cannot affirm AKG was deviated to transaminate Leucine, though, and it did not impair TCA cycle, as measured by Citrate Synthase activity. It seems the BCAA supplementation or any of them supplemented individually tended to keep higher liver glycogen throughout intense exercise. They might have been transaminated in muscle to generate glucose in liver through alanine-glucose cycle.

Fig 1: Glycogen content

References

Calders P et al (1997). Med Sci Sports Ex 29 (9): 1182-1186

Gibala M et al (2002). J Physiology 540(3): 1079-86

*Wagenmakers AJM (1998) In :HOLLOSZY J ed. Ex Sports Sci Rev vol 26 :
287-314*

Influence of Branched-Chain Aminoacids (BCAA) supplementation on free fatty acids oxidation during endurance exercise after muscle glycogen depletion

ADOLPHO, T.B.; CAMPOS, P.L.; GUALANO, B.; GOMES, J.C.; SCAGLIUSI, F.B.; ARTIOLI, G.G.; LANCHI JUNIOR, A. H.

Laboratory of Nutrition and Metabolism of Exercise – School of Physical Education and Sport – University of São Paulo

There is some controversy among few studies in demonstrating positive (anaplerotic) and negative effects of BCAA upon the Tricarboxylic Acids Cycle (TCA). Our hypothesis is that BCAA might generate Succinyl-CoA, one of the TCA intermediates, to enhance oxaloacetate availability, which possibility this cycle maintenance, even in carbohydrate depletion. **Purpose:** The aim of this study was to verify the possible influence of BCAA supplementation on Free-fatty Acids (FFA) oxidation, in muscle glycogen depletion. Subjects: seven men physically active, with similar aerobic capacities were studied under three different situations. **Methods: Test 1:** maximum VO_2 (treadmill), with blood samples drawing each 3 minutes to verify lactate levels. **Supplementation:** 3 days before test 2 and 3, subjects were given 300 mg/kg body weight/day BCAA or placebo, divided into 3 parts. This was a double-blind study and each subject was his own control. **Glycogen depletion:** 10 hours before the following tests, the subjects performed 45 min treadmill run in 70% VO_2 max. + 2 x 10 min in 90% VO_2 max. Afterwards, subjects ingested only supplementation and water. **Test 2 and 3:** 1 week and 2 weeks respectively after the test 1, subjects were glycogen depleted as described above and performed a treadmill run in 80% 2nd metabolic threshold until exhaustion. Blood samples were drawn pre and post-tests to analyze FFA, ammonia and ketone-bodies. During the tests, blood samples were drawn every 5 minutes for glucose and lactate determinations. RER was measured every 10

minutes. **Results:** Significant differences were found ($P < 0,05$) among tests 2 and 3 in the following parameters: Average time (min): BCAA = $34,6 \pm 8,5$; Placebo = $29,1 \pm 7,1$; RER BCAA in 10min = $0,99 \pm 0,07$, placebo in 10min = $1,09 \pm 0,06$, RER BCAA in 20min = $0,97 \pm 0,08$, placebo in 20min = $1,04 \pm 0,05$. There were no significant differences in blood FFA, ammonia and ketone bodies levels among subjects. However, there were significant differences among blood glucose levels in 20 minutes: BCAA = $3,27 \pm 0,56$; placebo = $2,63 \pm 0,74$; 25 minutes: BCAA = $3,44 \pm 0,60$; placebo = $2,55 \pm 0,61$ **Conclusion:** results above suggest that BCAA supplementation might enhance muscle lipid utilization and glucose levels maintenance during prolonged exercise, thus optimizing exercise performance when muscle glycogen levels are low.

Supported by FAPESP.

Control/Tracking Number : 05-SA-1779-ACSM

Activity :Scientific Abstract

Current Date/Time : 10/29/2004 12:25:54 PM