BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeitos de dietas suplementadas com aminoácidos de cadeia ramificada sobre mecanismos de fadiga em ratos submetidos a exercício moderado

Gina Falavigna

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2003

17712

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeitos de dietas suplementadas com aminoácidos de cadeia ramificada sobre mecanismos de fadiga em ratos submetidos a exercício moderado

Gina Falavigna

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005624

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Falavigna, Gina
F177e Efeitos de dietas suplementadas com aminoácidos de cadeia ramificada sobre mecanismos de fadiga em ratos submetidos a exercício moderado / Gina Falavigna. -- São Paulo, 2003.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Tirapegui Toledo, Julio Orlando

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Esporte : Nutrição 1. T. II. Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.

641.1 CDD

Gina Falavigna

Efeitos de dietas suplementadas com aminoácidos de cadeia ramificada sobre mecanismos de fadiga em ratos submetidos a exercício moderado

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

São Paulo, _____ de _____

Aos meus amados pais, Joseph e Maria Helena Falavigna, pelo exemplo de conduta e caráter que representam, além do constante apoio, confiança e afeto. A minha eterna gratidão.

Aos meus queridos irmãos Manlio, Nicole e Julio, pelo grande incentivo e carinho.

À minha avó, D. Ilva, e à minha tia Maria Eloísa Kochenborger pela demonstração de carinho.

Ao Luiz Henrique Burnett Jr., por todo apoio, compreensão, e acima de tudo amor, apesar da saudade.

Mesmo que afastados da minha convivência diária durante o período do mestrado, estiveram presentes todos os dias em meus pensamentos e coração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Julio Tirapegui, pela orientação e confiança, além da contribuição e incentivo para o crescimento profissional de seus alunos.

Ao Jonas Alves de Araújo Jr., pelo trabalho em conjunto, companheirismo, amizade, e pelos momentos alegres durante esses anos de parceria.

Ao Rogério Graça Pedrosa, pelo auxílio durante todo experimento, pelos valiosos conselhos, além da grande amizade.

Ao Marcelo Macedo Rogero, por sua capacidade e disponibilidade em ajudar aos colegas, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, e à sua amizade.

À Ivanir de Oliveira Pires, pela amizade e imensurável dedicação e auxílio em todas determinações experimentais deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando B. P. Costa Rosa, pela colaboração em ceder seu laboratório para a determinação de serotonina, além dos esclarecimentos sobre esse projeto.

Ao Eivor Martins Junior, pelo auxílio e dedicação na determinação de serotonina. Seu modo alegre de ser proporcionou momentos sempre agradáveis durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Herbert Lancha Jr., pelo auxílio e atenção.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Inar Alves de Castro, pela ajuda e atenção no tratamento estatístico do relatório enviado à FAPESP.

Ao Prof. Dr. Fernando Moreno, pelo estímulo durante o mestrado.

Aos companheiros de laboratório: Isabela Guerra, Renata Rebello Mendes, Regina Célia Silva, Sandra Lima Ribeiro, José Donatto Jr., Leandro Altimari, Mariana Rezende, Luciana Rossi, Nelson Nardo, Maysa Vieira e Érica Gomes, pela amizade e momentos divertidos.

Aos queridos colegas: Céphora, Cíntia, Arlindo, Raquel, Aline, Thomas, Malú, Tatiana, Patrícia, Stella, Beatriz, pelo companheirismo e agradável convivência.

À Marlene Santos da Rocha pelo auxílio na leitura das amostras de insulina e corticosterona.

À Joana e Lurdinha pelo café, organização, e bom humor.

À Silvânia Neves e à todos funcionários do Biotério da FCF-USP pelo auxílio com os animais. Ao Edgar Muniz Machado Jr. pelo auxílio no uso dos equipamentos para mistura de ração.

Aos Professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela competência em ministrar as disciplinas da Pós-Graduação, contribuindo sempre de maneira crítica e positiva para a formação dos alunos.

A todos funcionários das Secretarias de Pós-Graduação do Departamento, pela eficiência e atenção.

À Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. pelo fornecimento dos aminoácidos de cadeia ramificada para suplementação das rações.

À FAPESP pelo recurso financeiro científico (processo n. 99/03421-8).

À CAPES pela bolsa outorgada.

SUMÁRIO

Página

RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE QUADROS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....02
2.1. Alguns aspectos do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.....02
2.2. Alterações metabólicas no exercício.....03
2.3. Fatores metabólicos da fadiga.....07
2.3.1. Fadiga periférica.....08
2.3.2. Hipótese da fadiga central.....10
2.4. Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada..15
2.4.1. Efeitos positivos da suplementação com ACR no rendimento.....15
2.4.2. Ausência de efeitos da suplementação com ACR no rendimento.....19
2.4.3. Efeitos da suplementação com ACR em parâmetros bioquímicos.....22
2.5. Efeito do exercício na síntese de 5-HT cerebral..... 26
3. OBJETIVOS..... 29
3.1. Objetivo Geral.....29
3.2. Objetivos Específicos.....29
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 30
4.1. Animais.....30
4.2. Dietas experimentais.....30
4.3. Protocolo de treinamento.....34

4.4. Grupos experimentais....35
4.5. Sacrifício dos animais e coleta das amostras....36
4.6. Determinações experimentais....36
4.6.1. Glicose....37
4.6.2. Ácidos graxos livres....37
4.6.3. Amônia....38
4.6.4. Insulina....38
4.6.5. Corticosterona....38
4.6.6. Lactato....39
4.6.7. Glicogênio hepático e muscular....39
4.6.8. Serotonina – hipotálamo....39
4.6.9. Atividade máxima da enzima citrato sintase....40
4.7. Análise estatística....40
5. RESULTADOS....41
5.1. Peso inicial....41
5.2. Peso final....42
5.3. Consumo de ração....43
5.4. Tempo de tolerância ao esforço....44
5.5. Atividade máxima da enzima citrato sintase....45
5.6. Glicose....46
5.7. Insulina....47
5.8. Índice glicose / insulina....48
5.9. Corticosterona....49
5.10. Amônia....50
5.11. Lactato....51
5.12. Glicogênio hepático....52
5.13. Glicogênio muscular – gastrocnêmio....54
5.14. Glicogênio muscular – sóleo....55
5.15. Taxa de degradação de glicogênio hepático e muscular....56
5.16. Ácidos graxos livres....57
5.17. Serotonina – hipotálamo....58
6. DISCUSSÃO....60
6.1. Parâmetros biométricos....60

6.2. Parâmetro de rendimento.....60
6.3. Parâmetros bioquímicos.....62
6.4. Considerações gerais: rendimento x parâmetros bioquímicos.....73
7. CONCLUSÕES.....77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....78
ANEXO

RESUMO

Os processos de fadiga durante o exercício prolongado podem envolver mecanismos relacionados ao músculo (fadiga periférica) e/ou ao sistema nervoso central (fadiga central). O desenvolvimento de estratégias nutricionais, como a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), pode representar uma alternativa para melhorar o rendimento durante o exercício. Diante disso, o presente estudo avaliou os efeitos de dietas suplementadas com ACR, de forma crônica, sobre mecanismos de fadiga em ratos submetidos à natação. Foram utilizados 54 ratos Wistar (peso inicial: 240 g) divididos em grupos sedentários e treinados, que receberam dieta controle (C), suplementada com 3,57% (S1) ou 4,76% de ACR (S2) durante 6 semanas. O treinamento em natação realizado nesse período foi: 1 hora ao dia, 5 vezes por semana, com sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal atada à cauda. No último dia do protocolo os animais treinados foram sacrificados após 1 hora de natação e após o teste de exaustão, e os sedentários foram sacrificados em repouso. Os resultados obtidos demonstraram que o tempo de natação até exaustão aumentou em 37% para o grupo S1, e diminuiu em 43% para o grupo S2, em relação ao grupo C. Observou-se que o exercício prolongado ocasionou redução da glicemia, da insulinemia e das concentrações de glicogênio hepático e muscular. Notou-se, ainda, aumento das concentrações de amônia plasmática, corticosterona sérica, lactato sangüíneo e serotonina do hipotálamo. Referente ao efeito das suplementações nos grupos submetidos ao teste de exaustão, a dieta S1 aumentou a concentração de glicogênio muscular (sóleo) e diminuiu a amônia plasmática, enquanto a S2 causou aumento da concentração da amônia plasmática. Portanto, a dieta S1 promoveu um efeito benéfico no desempenho físico, provavelmente por poupar glicogênio no músculo sóleo e pela menor concentração de amônia plasmática. Diferentemente, a dieta S2 proporcionou um efeito negativo no desempenho, possivelmente devido a hiperamonemia.

ABSTRACT

The fatigue processes during prolonged exercise can envolve mechanisms related to muscle (peripheral fatigue) and/or central nervous system (central fatigue). Development of dietary manipulation represents an alternative to improve exercise performance. This study has assessed the effects of chronic diet supplementations with branched-chain amino acids (BCAA) on fatigue mechanisms in rats submitted to swim. Wistar rats (n=54), weighing 240 g, were divided in sedentary and trained groups, under control diet (C), supplemented diet with 3,57% (S1) or 4,76% (S2) of BCAA, for 6 weeks. The swimming protocol was 1 hour per day, 5 days per week, with 5% of body- weight attached to the animal tail. The last experimental day was realized killing the trained animals by two conditions: after 1 hour of swimming or after swimming until exhaustion. Sedentary groups were killed at rest. The results obtained showed the time to exhaustion 37% longer for S1 group, and 43% lower for S2 group, compared to control group. The concentrations of plasma glucose, serum insulin, muscular and hepatic glycogen was decreased by prolonged exercise. However, the concentrations of plasma ammonia, serum cortisol, blood lactate and hypothalamus serotonin was increased. The BCAA diets induced on animals submitted to exhaustion the following effects: diet S1) higher concentration of muscular glycogen (soleus) and lower concentration of plasma ammonia; diet S2) increment of plasma ammonia concentration. Thus, diet S1 promoted better performance through sparing muscular glycogen (soleus) and lower concentration of plasma ammonia. Differently, diet S2 suggest a negative effect on performance, possibly by hyperammonemia.

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Protocolo de treinamento do exercício moderado (% de carga e tempo de natação em minutos).....34

Quadro 2 (dietas S1 e S2 x C): Resumo dos efeitos das suplementações nos parâmetros bioquímicos e de rendimento nos grupos submetidos ao teste de tolerância ao esforço, em relação à dieta controle.....75

Quadro 3 (condição EX x 1H e SED): Resumo dos efeitos da condição exaustão em relação às condições de 1 hora e sedentário, nas três dietas experimentais.....76

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Hipótese de alguns mecanismos envolvidos na fadiga periférica e central.....10

Figura 2. Alterações dos principais componentes envolvidos na hipótese da fadiga central durante o repouso e exercício prolongado.....14

Figura 3. Peso final dos grupos experimentais.....42

Figura 4. Tempo de tolerância ao esforço dos grupos treinados submetidos à exaustão.....44

Figura 5. Atividade máxima da enzima citrato sintase nos grupos sedentários e treinados.....45

Figura 6. Concentração plasmática de glicose dos grupos experimentais.. .46

Figura 7. Concentração sérica de insulina dos grupos experimentais.....47

Figura 8. Índice glicose / insulina dos grupos experimentais.....48

Figura 9. Concentração sérica de corticosterona dos grupos experimentais.....49

Figura 10. Concentração plasmática de amônia dos grupos experimentais.50

Figura 11. Concentração sangüínea de lactato dos grupos experimentais...51

Figura 12. Concentração de glicogênio hepático dos grupos experimentais.....52

Figura 13. Concentração de glicogênio muscular (gastrocnêmio) dos grupos experimentais.....54

Figura 14. Concentração de glicogênio muscular (sóleo) dos grupos experimentais.....55

Figura 15. Taxa de degradação de glicogênio nos diferentes tecidos dos grupos experimentais treinados.....56

Figura 16. Concentração plasmática de AGL dos grupos experimentais.....57

Figura 17. Concentração de serotonina dos grupos experimentais.....58

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Causas para a hipótese da fadiga central durante o exercício.....12

Tabela 2. Conteúdo dos ACR das dietas (g/kg de ração).....31

Tabela 3. Formulação das dietas experimentais (g/kg dieta).....32

Tabela 4. Estimativa da composição dos macronutrientes da dieta AIN-93M.....33

Tabela 5. Porcentagem de proteína e nitrogênio encontrada nas diferentes rações experimentais.....34

Tabela 6. Grupos experimentais.....35

Tabela 7. Peso inicial (g) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle, suplementada 1 e 2.....41

Tabela 8. Peso final (g) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada...42

Tabela 9. Consumo de ração (g/dia) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....43

Tabela 10. Tempo de tolerância ao esforço (minutos) dos grupos treinados submetidos à exaustão com dieta controle e suplementada.....44

Tabela 11. Atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo (µmol/min/g de tecido) nos grupos sedentários e treinados (1 hora e exaustão).....45

Tabela 12. Concentração plasmática de glicose (mg/dL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....46

Tabela 13. Concentração sérica de insulina (ng/mL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....47

Tabela 14. Índice glicose / insulina dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....48

Tabela 15. Concentração sérica de corticosterona (ng/mL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....49

Tabela 16. Concentração plasmática de amônia (μg/mL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....50

Tabela 17. Concentração sangüínea de lactato (mmol/L) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....51

Tabela 18. Concentração de glicogênio hepático (mg/100 mg de tecido) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....52

Tabela 19. Concentração de glicogênio muscular - gastrocnêmio (mg/100 mg de tecido) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....54

Tabela 20. Concentração de glicogênio muscular - sóleo (mg/100 mg de tecido) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....55

Tabela 21. Taxa de degradação de glicogênio (10^{-4} mg/100mg tecido/min) nos diferentes tecidos dos grupos treinados com dieta controle (C) e suplementada (S1 e S2).....56

Tabela 22. Concentração plasmática de ácidos graxos livres (mmol/L) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....57

Tabela 23. Concentração de serotonina do hipotálamo (pg/mg de tecido fresco) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada.....58

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR: aminoácidos de cadeia ramificada

ATCR: aminotransferase de cadeia ramificada

DDCR: desidrogenase de cetoácido de cadeia ramificada

PFK: fosfofrutoquinase

SNC: sistema nervoso central

TRP_L: triptofano livre

AGL: ácidos graxos livres

AMP: adenosina monofosfato

IMP: inosina monofosfato

PCr: fosfocretatina

NH_3: amônia

AA: aminoácidos neutros

CPN: ciclo purina nucleotídio

ATP: adenosina trifosfato

ADP: adenosina difosfato

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5-HIAA: ácido 5- hidroxindolacético

PDH: complexo enzimático piruvato desidrogenase

NaCl: cloreto de sódio

$VO_{2\ máx}$: volume de oxigênio máximo inspirado

AIN-93M: *American Institute of Nutrition* - dieta para manutenção de roedores

C: dieta controle (AIN-93M)

S1: dieta suplementada 1 (AIN-93M com adição de 3,57% ACR)

S2: dieta suplementada 2 (AIN-93M com adição de 4,76% ACR)

SED: grupo sedentário

1H: grupo treinado e submetido à 1 hora de natação

EX: grupo treinado e submetido ao teste de tolerância ao esforço (exaustão)

1. INTRODUÇÃO

Com o objetivo de obter melhor desempenho físico, muitos atletas e praticantes de atividade física vem consumindo diversos tipos de suplementos nutricionais, fato que despertou interesse entre pesquisadores da área na busca de evidências científicas para garantir a validade do uso de tais substâncias.

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados para compreender os fatores limitantes do desempenho físico. As pesquisas com manipulação nutricional têm procurado identificar as causas e retardar o aparecimento da fadiga.

Dentre as abordagens ergogênicas, os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) têm sido bastante utilizados. Entretanto, os efeitos da suplementação com ACR no desempenho em exercícios prolongados ainda são controversos, visto que, na literatura são encontrados efeitos benéficos (HEFLER *et al.*, 1995; MITLEMAN, RICCI & BAILEY, 1998; BLOMSTRAND *et al.*, 1991; CALDERS *et al.*, 1997; CALDERS *et al.*, 1999; ROSSI, 2001), ou nenhum efeito ergogênico (VAN HALL *et al.*, 1995; PERTRUZZELO *et al.*, 1992; GALIANO *et al.*, 1991; DAVIS *et al.*, 1999; VERGER *et al.*, 1994). Porém, essas discrepâncias podem ser justificadas pela existência de diferenças entre os protocolos experimentais, tais como: modelo animal ou humano; quantidade, tempo de oferta (crônico ou agudo) e via de administração do suplemento; tipo e duração do exercício.

Os estudos que utilizam o modelo animal podem representar melhor alternativa para a investigação dos mecanismos envolvidos na fadiga, em virtude de apresentar melhor controle ambiental, da ingestão de ração e líquidos, do protocolo de treinamento físico e obtenção de amostras de sangue e tecidos para análise.

Desse modo, ressalta-se a importância do desenvolvimento de estudos que esclareçam melhor a relação entre nutrição, exercício físico e fadiga.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Alguns aspectos do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Dos vinte aminoácidos do organismo que são oxidados no fígado, a musculatura esquelética pode oxidar apenas seis: os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR: leucina, isoleucina e valina), aspartato, asparagina e glutamato (WAGENMAKERS, 1998). No músculo, os ACR exercem um importante efeito como substrato de energia durante o exercício e períodos de estresse, bem como precursor para síntese de outros aminoácidos e proteínas (FERRANDO *et al.*, 1995).

A primeira etapa no catabolismo dos ACR nos tecidos periféricos, catalisada pela enzima aminotransferase de cadeia ramificada (ATCR), é a transaminação reversível para produzir cetoácidos de cadeia ramificada. Estes são incorporados em proteína, ou circulam pelo organismo para servir como um importante substrato energético não apenas na musculatura esquelética, mas também no cérebro, rins, fígado e coração (ABUMRAD *et al.*, 1982). Nesses órgãos, os cetoácidos de cadeia ramificada sofrem descarboxilação oxidativa (processo irreversível), catalisada pela enzima desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR), com conseqüente geração de substratos para o ciclo do ácido cítrico (HARRIS, HAWES & POPOV, 1997; PLATELL *et al.*, 2000).

A oxidação dos ACR em tecidos isolados pode ser limitada pela atividade das enzimas transaminase ou desidrogenase, uma vez que suas atividades podem variar de tecido para tecido, influenciando no metabolismo dos ACR. Estudos que avaliaram a atividade da enzima DCCR em diversos tecidos de ratos verificaram atividade aumentada no fígado (SHINNICK & HARPER, 1976), sugerindo que esse órgão é um importante local para a

degradação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada. A regulação do complexo DCCR é regulado pela fosforilação (inativação) e desfosforilação (ativação), através da DCCR quinase (POPOV *et al.*, 1992; XU *et al.*, 2001).

Os ACR exercem um relevante efeito na homeostase do músculo-esquelético. Estudos que avaliaram o efeito da ingestão ou infusão de ACR verificaram que altas concentrações de leucina são associadas com a supressão da proteólise muscular (FERRANDO *et al.*, 1995; LOUARD, BARRET & GELFAND, 1995). Estudos *in vitro* demonstraram que a infusão de ACR no músculo serve como uma fonte de combustível oxidativo, estimula a síntese de glutamina e alanina (ALVESTRAND *et al.*, 1990; HOOD & TERJUG, 1990), além de estimular a síntese protéica e inibir a degradação protéica, regulando o *turnover* protéico (FREUND *et al.*, 1979 *apud* PLATELL *et al.*, 2000).

A relação entre o metabolismo de ACR e a liberação de glutamina e alanina tem sido objeto de diversos estudos. Após a ingestão de proteínas, os ACR e glutamato são captados pelo músculo, e seus esqueletos de carbono são utilizados para síntese *de novo* de glutamina, que é maior no período pós-prandial do que no período pós-absortivo. Na reação catalisada pela enzima aminotransferase de ACR, o grupo amino desses aminoácidos é doado para o α-cetoglutarato para formar glutamato e um α-cetoácido de cadeia ramificada. Na reação catalisada pela enzima glutamina sintetase, o glutamato reage com a amônia para formar glutamina. Alternativamente, o glutamato pode doar o seu grupo amino para o piruvato para formar alanina e, desse modo regenerar o α-cetoglutarato. Estas reações fornecem um mecanismo para a eliminação de grupos aminos, a partir do tecido muscular na forma de carreadores de nitrogênio não-tóxicos, alanina e glutamina (WAGENMAKERS, 1998).

2.2. Alterações metabólicas no exercício

O exercício promove alteração do *turnover* protéico em humanos pelo aumento do catabolismo e diminuição da síntese protéica (DOHM *et al.*,

1985). Estudos recentes relacionados ao *turnover* protéico têm enfocado sobre os principais reguladores da síntese e degradação protéica, sendo observado que a síntese protéica é aumentada em resposta à insulina, hormônio do crescimento, leucina e outros aminoácidos, mas é diminuída pelo exercício físico, reduzida ingestão de proteínas na dieta e diminuição do estado energético intracelular. Por outro lado, a degradação protéica é aumentada em resposta ao jejum, exercício e glicocorticóides, e diminuída pela infusão de leucina e triacilgliceróis de cadeia média e ingestão de proteínas. Existem diferentes reguladores em potencial da síntese e degradação protéica, e o saldo final das mudanças ocorridas sobre o *turnover* protéico é dependente da somatória desses fatores. Entretanto, durante o exercício prolongado ocorre um aumento da concentração plasmática de glucagon e glicocorticóides, que poderia promover a diminuição da síntese de proteínas e o aumento da degradação protéica. Desse modo, a sinalização endócrina, considerada o mais potente dos reguladores do *turnover* protéico, reforça a ocorrência de degradação protéica durante o exercício (HARGREAVES, 1995).

Após o exercício moderado, de um modo geral, a síntese é maior do que a degradação protéica (BOOTH *et al.*, 1982), portanto há um balanço nitrogenado positivo e decréscimo na taxa de degradação de proteínas miofibrilares (SEENE, ALEV & PEHME, 1986), em contraste com a aparente degradação global observada previamente (PASQUALE, 1997).

A demanda metabólica do exercício físico determinará a efetiva utilização das fontes energéticas, para tanto fatores como intensidade, tipo, duração, ambiente e outros devem ser considerados (GOLLNICK, 1985). Há ativação de sistemas energéticos e metabólicos específicos de acordo com a duração e intensidade do exercício, onde entre 50-60 % do $VO_{2\ máx}$ os principais substratos energéticos são a glicose plasmática, o glicogênio muscular e os ácidos graxos livres (GOODMAN & RUDERMAN, 1982).

A degradação da glicose até piruvato (glicólise) fornece a energia para ressíntese do ATP. O ATP gerado deste modo possibilitará o transporte do piruvato para a mitocôndria e sua utilização no Ciclo de Krebs. Na

mitocôndria há a produção de acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase, o qual se condensa com o oxaloacetato e forma o citrato, iniciando o primeiro passo no Ciclo de Krebs. O piruvato também pode formar oxaloacetato pela ação da enzima piruvato carboxilase de acordo com a demanda de Acetil-CoA provinda de ácidos graxos livres (LANCHA Jr. *et al.*, 1995). Com a contínua demanda de citrato, esse pode vir a inibir a enzima fosfofrutoquinase (PFK) da via glicolítica. Como resultado há uma diminuição da produção de energia desta via, fazendo com que outras vias de fornecimento de energia sejam ativadas, como a via de oxidação de ácidos graxos e aminoácidos.

Com a continuidade da atividade até a exaustão, sem suplementação, haverá uma depleção de glicogênio que fará com que cada vez mais se utilizem as outras fontes de energia. No caso dos aminoácidos, estes podem responder de 5 a 15 % da energia em exercícios prolongados (BROOKS, 1987; DOHM *et al.*, 1985; GOODMAN & RUDERMAN, 1982). Em relação ao metabolismo protéico durante a atividade física moderada, há alteração da concentração do *pool* muscular de dois aminoácidos: a alanina e o glutamato. O glutamato apresenta uma diminuição intramuscular inicial em torno de 50-70%, e esta baixa concentração se mantém ao longo da atividade até a exaustão. A alanina apresenta inicialmente um aumento da sua concentração e liberação pelo músculo (30 primeiros minutos do exercício), e gradualmente retorna aos valores de repouso, para diminuir somente no momento de exaustão. Neste momento, também se observa uma depleção dos estoques de glicogênio muscular. Essas alterações nas concentrações dos aminoácidos se relacionam diretamente com a maior oxidação aeróbica dos substratos, produzindo um aumento de até 80 vezes na atividade do Ciclo de Krebs. Assim, no início do exercício haveria uma necessidade de aumento dos intermediários do Ciclo de Krebs (anaplerose) para produção de energia (ATP), pela reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase (BROOKS, 1987).

Como citado anteriormente, com o prosseguimento do exercício haverá a depleção de glicogênio muscular, que promove o aumento na

oxidação de ACR, a qual exerce um papel relevante na diminuição dos intermediários do Ciclo de Krebs. Além disso, o músculo começa a utilizar cada vez mais ACR provenientes da circulação. Ao mesmo tempo, observa-se aumento do potencial da enzima responsável pela oxidação dos ACR no músculo (desidrogenase de α-cetoácido de cadeia ramificada), que levaria a maior taxa de utilização dos ACR plasmáticos (WAGENMAKERS *et al.*, 1991; SHIMOMURA *et al.*, 2000). Com o aumento da oxidação dos ACR, ocorre uma perda de intermediários do Ciclo de Krebs. Assim, temos taxas inadequadas de fornecimento de energia e aumento de mediadores celulares da fadiga, como por exemplo, íons H^+, amônia, entre outros (SAHLIN, 1992).

O mecanismo de fadiga é mais complexo durante exercício moderado-intenso e de longa duração, sendo que fatores periféricos (musculares) e centrais (cerebrais) são difíceis de serem distinguidos. Após exercício de longa duração, sem suplementação de carboidratos, a glicose sangüínea diminui devido à depleção de glicogênio muscular e, principalmente, hepático (SAHLIN, 1992). A hipoglicemia diminui o fornecimento de substrato energético para o cérebro, o que prejudica várias funções do sistema nervoso central (SNC), se tornando um fator agravante na fadiga. A amônia, uma potente neurotoxina que também está relacionada com prejuízo das funções cerebrais, aumenta no plasma, tecidos e cérebro tanto em exercícios de alta intensidade como de longa duração (SAHLIN & BROBERG, 1990). Ainda, destaca-se a hipótese de que o aumento da razão TRP_L/ACR, que pode ocorrer no exercício prolongado devido à oxidação dos ACR, altera a oferta de triptofano ao cérebro e síntese de serotonina, o que influenciaria o desempenho físico.

2.3. Fatores metabólicos da fadiga

A sensação de fadiga pode ocorrer em diversas situações, como em recuperação cirúrgica, insônia, distúrbios psicológicos, síndrome da fadiga crônica, infecções e outras desordens relacionadas à saúde, as quais aparentemente não estão envolvidas com o músculo (DAVIS & BAILEY, 1997; DAVIS, ALDERSON & WELSH, 2000). Entretanto, a fadiga abordada no presente estudo está relacionada ao esforço muscular voluntário, induzido pelo exercício.

Há uma diversidade de definições para a fadiga na literatura científica, mas de uma forma geral, pode ser definida como a incapacidade de manter a força muscular esperada levando a uma redução do rendimento durante um exercício prolongado (SAHLIN, 1992; GANDEVIA, 1992; NEWSHOLME & BLOMSTRAND, 1996; DAVIS & BAILEY, 1997; JAKEMAN, 1998). Uma outra definição é do termo exaustão, que é resultante do estado de fadiga, ocasionando o término do exercício antes do tempo planejado (LEHMAN, FOSTER & KEUL, 1993).

A fadiga durante o exercício prolongado é um fenômeno multifatorial, podendo diferenciar-se em componentes periféricos e centrais. Essa divisão leva em consideração fatores metabólicos interativos: os que afetam diretamente os músculos referem-se aos mecanismos periféricos, e os que residem no SNC relacionam-se aos mecanismos centrais (DAVIS, 1995a; DAVIS & BAILEY, 1997).

PARRY-BILLINGS *et al.* (1990) e NEWSHOLME & BLOMSTRAND (1996) consideram cinco causas metabólicas principais da fadiga:

a) depleção muscular de fosfocreatina;
b) acúmulo de prótons no músculo (acidose);
c) depleção de glicogênio muscular;
d) diminuição da concentração de glicose sangüínea;
e) alteração na razão de aminoácidos específicos.

Dessas causas, as três primeiras estão relacionadas diretamente com o músculo (fadiga periférica), e as duas últimas provavelmente relacionadas com o cérebro (fadiga central).

As pesquisas na área de fadiga têm estudado principalmente a fadiga periférica, que envolve redução na capacidade de trabalho muscular por implicações nas transmissões neuromusculares. Entretanto, o estímulo para a contração muscular é iniciado no cérebro, portanto a fadiga central pode ocorrer se alterações dentro do SNC diminuem a capacidade de enviar voluntariamente um sinal para as junções neuromusculares (DAVIS & BAILEY, 1997).

2.3.1. Fadiga periférica

A contração muscular é um processo que pode ser abordado de diversas maneiras, como por exemplo: modo de estimulação, tipo de freqüência, intensidade, duração, tipo de músculo, características das fibras musculares e espécies (SAHLIN, 1992). Uma hipótese aceita para explicar a fadiga periférica envolve a insuficiência de energia para o trabalho muscular, conhecida também como "hipótese da depleção de glicogênio". A energia, proveniente de nossa alimentação, pode ser usada nos diversos trabalhos biológicos do organismo que necessitem energia, entre eles: contração muscular; síntese de macromoléculas celulares, transporte ou concentração de compostos na célula (Mc ARDLE, KATCH & KATCH, 1992).

O exercício prolongado acarreta em baixa concentração intramuscular de glicogênio, que também está associado com o aumento da deaminação de AMP, e pela enzima AMP deaminase, ocasiona aumento da concentração de IMP e amônia. A formação de IMP é inversamente relacionada com a concentração de glicogênio e parece estar associada ao estresse metabólico, uma vez que a concentração de IMP é relacionada ao aumento da concentração de lactato muscular e decréscimo de PCr

(fosfocreatina) (BIANCHI, GROSSI & BARGOSSI, 1997; SAHLIN, 1992). Outro fator ocasionado durante exercício prolongado é o acúmulo de lactato, que acarreta no músculo diminuição do pH, fato que está associado com a inibição da enzima fosfofrutoquinase (PFK) e redução da velocidade das reações envolvidas na glicólise. Este mecanismo de inibição da glicólise pelo decréscimo do pH previne a acidose intracelular, a qual poderia gerar uma fadiga precoce ao organismo (ROSSI & TIRAPEGUI, 1999) (figura 1).

Durante o exercício, o músculo esquelético ativo se torna a principal fonte de amônia pela deaminação do AMP a IMP, em um processo cíclico denominado Ciclo Nucleotídio Purina (CNP), que também é ativo no cérebro. A amônia produzida durante o exercício, que é influenciada pela relativa composição da fibra muscular, intensidade e duração do exercício, vai para circulação sangüínea e é distribuída a outros órgãos. No fígado, grande parte é detoxificada no ciclo da uréia, entretanto, devido à redução do fluxo sangüíneo hepático no exercício (FELIG & WAHREN, 1971; OKAMURA *et al.*, 1987), a formação de amônia pode ser maior que sua detoxificação. A amônia também pode atravessar a barreira hematoencefálica, gerando sintomas neurológicos por toxicidade de NH_3 no cérebro (BANISTER & CAMERON, 1990). Desse modo, a hiperamonemia induzida pelo exercício vem sendo associada tanto à fadiga periférica quanto à fadiga central (BANISTER, RAJENDRA & MUTCH, 1985; GUEZENNEC *et al.*, 1998 MITTLEMAN, RICCI & BAILEY, 1998) (figura 1).

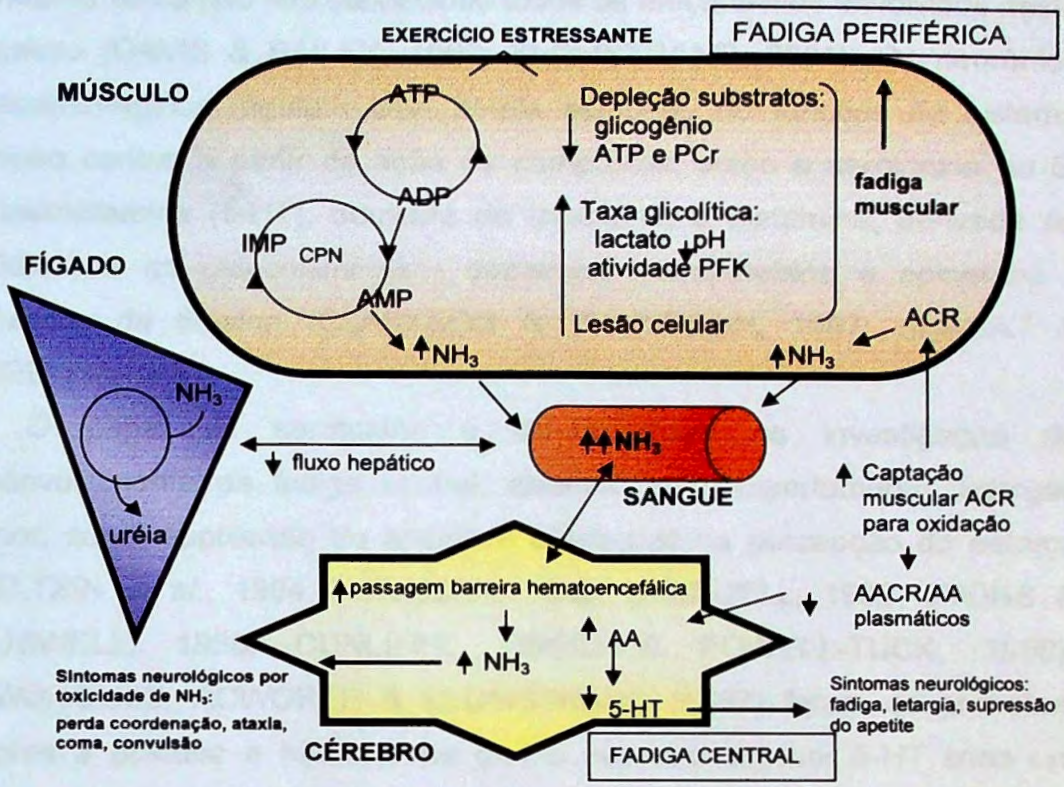


Figura 1. Hipótese de alguns mecanismos envolvidos na fadiga periférica e central. Modificado de BANISTER & CAMERON (1990)

Uma vez que o conteúdo de glicogênio no fígado e músculo é relacionado à capacidade de desempenho em exercícios prolongados (SALTIN & GOLLNICK, 1988), a suplementação com ACR poderia atuar no metabolismo do glicogênio, diminuindo sua degradação, e assim beneficiando o desempenho físico (CLARKSON, 1996; KREIDER, 1999; SHIMOMURA *et al.*, 2000).

2.3.2. Hipótese da fadiga central

Durante exercício prolongado supõe-se que certos neurotransmissores cerebrais influenciam nos sistemas monoaminérgicos e no desenvolvimento da fadiga (CHAOULOFF, 1997; DISHMAN, 1997),

entretanto ainda não são conhecidos todos os mecanismos envolvidos neste processo (DAVIS & BAILEY, 1997; BLOMSTRAND, 2001). Os neurônios monoaminérgicos regulam uma ampla extensão de funções do sistema nervoso central a partir da ação de compostos, como a serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), derivada do triptofano; a histamina, derivada da histidina; e as catecolaminas - dopamina, norepinefrina e epinefrina - derivadas da tirosina (CLARKSON & THOMPSON, 1997; BHAGAT & WHEELER, 1973).

O papel da serotonina é de interesse na investigação do desenvolvimento da fadiga central, atuando no comportamento, letargia, humor, sono, supressão do apetite e alterações na percepção do esforço (WELTZIN *et al.*, 1994; WELLMAN, 1992; BLUNDELL, 1992; LYONS & TRUSWELL, 1988; CUNLIFFE, OBEID & POWELL-TUCK, 1998). NEWSHOLME, ACWORTH & BLOMSTRAND (1987) foram os primeiros autores a postular a hipótese de que o neurotransmissor 5-HT seria um potente mediador da fadiga central. Outros estudos também consideram que o aumento na concentração de 5-HT no cérebro, durante o exercício prolongado, está diretamente relacionado ao prejuízo na função do SNC, associado ao desenvolvimento da fadiga e conseqüente diminuição do rendimento (CHAOULOFF *et al.*, 1985; CHAOULOFF, LAUDE & ELGHOZY, 1989; CHAOULOFF, 1989; BAILEY, DAVIS & AHLBORN, 1992; DAVIS, 1995b; NEWSHOLME & BLOMSTRAND, 1996).

Uma das explicações da hipótese da fadiga central se relaciona à forma livre do triptofano (TRP_L), precursor da serotonina (5-HT) no cérebro. Em primeiro lugar, durante o exercício prolongado, os ACR são captados pelo músculo esquelético e oxidados para fins energéticos (WAGENMAKERS *et al.*, 1991; DOHM *et al.*, 1981), desse modo, haveria uma diminuição dos mesmos no plasma (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1990). O triptofano (TRP) é o único aminoácido que circula ligado à albumina na corrente sangüínea (90%) (FERNSTRON, 1994; BAILEY, DAVIS & AHLBORN, 1993; CHAOLOUFF, 1989), embora uma pequena proporção (10%) circula na forma livre (JAKEMAN, 1998; SOARES, NAFFAH-

MAZZACORATTI & CAVALHEIRO, 1994; SALTER, KNOWLES & POGSON, 1989). Em segundo lugar, o aumento plasmático dos ácidos graxos livres (AGL), que competiriam com o triptofano pelos sítios de ligação com a albumina, gerariam por aumento de competição, maior quantidade de TRP_L (JAKEMAN, 1998; DAVIS, ANDERSON & WELSH, 2000). Desse modo, o aumento da razão TRP_L/ACR no sangue durante o exercício prolongado acarretaria maior influxo de triptofano para o cérebro, e conseqüentemente, maior síntese de serotonina e desenvolvimento precoce da fadiga (cansaço e letargia), mediada por componentes do SNC (NEWSHOLME & BLOMSTRAND, 1996; LYONS & TRUSWELL, 1988, BLOMSTRAND, 2001) (tabela 1 e figura 2).

Tabela 1: Causas para a hipótese da fadiga central durante o exercício

Captação dos ACR pelo músculo:	aumenta
Concentração plasmática de ACR:	diminui
Concentração de ácidos graxos livres:	aumenta
Concentração plasmática de TRP_L:	aumenta
Concentração plasmática TRP_L /ACR:	aumenta
Transporte de TRP_L para o cérebro:	aumenta
Síntese de 5-HT cerebral:	aumenta

Adaptado de BLOMSTRAND (2001)

O transporte de TRP_L pela barreira hematoencefálica ocorre através de receptores específicos de aminoácidos, dos quais o TRP_L compartilha com outros aminoácidos neutros, principalmente os ACR (DAVIS, ANDERSON & WELSH, 2000). Este sistema de transporte é regulado por competição e afinidade pelo aminoácido e é determinado pelas concentrações plasmáticas relativas dos aminoácidos neutros. Isto reflete, portanto, a porcentagem relativa de transporte para o cérebro de um aminoácido individual (FERNSTROM, 1994). O triptofano que é hidrolisado pela enzima triptofano hidrolase sofre logo em seguida uma descarboxilação e é finalmente metabolizado pelas enzimas aldeído desidrogenase e monoamina oxidase,

para seu principal metabólito, o ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA) (MEEUSEN & DeMEIRLEIR, 1995; DAVIS, 1995a).

Assim, ingestão dos aminoácidos de cadeia ramificada atuaria durante o exercício prolongado na diminuição da razão TRP_L/ACR, pela sua captação e oxidação pelos músculos esqueléticos, reduzindo a passagem de TRP_L pela barreira hematoencefálica, e desse modo, reduzindo a síntese de 5-HT cerebral, conseqüentemente retardando os sintomas de fadiga (PARDRIDGE & CHOI, 1986; DAVIS, ANDERSON & WELSH, 2000).

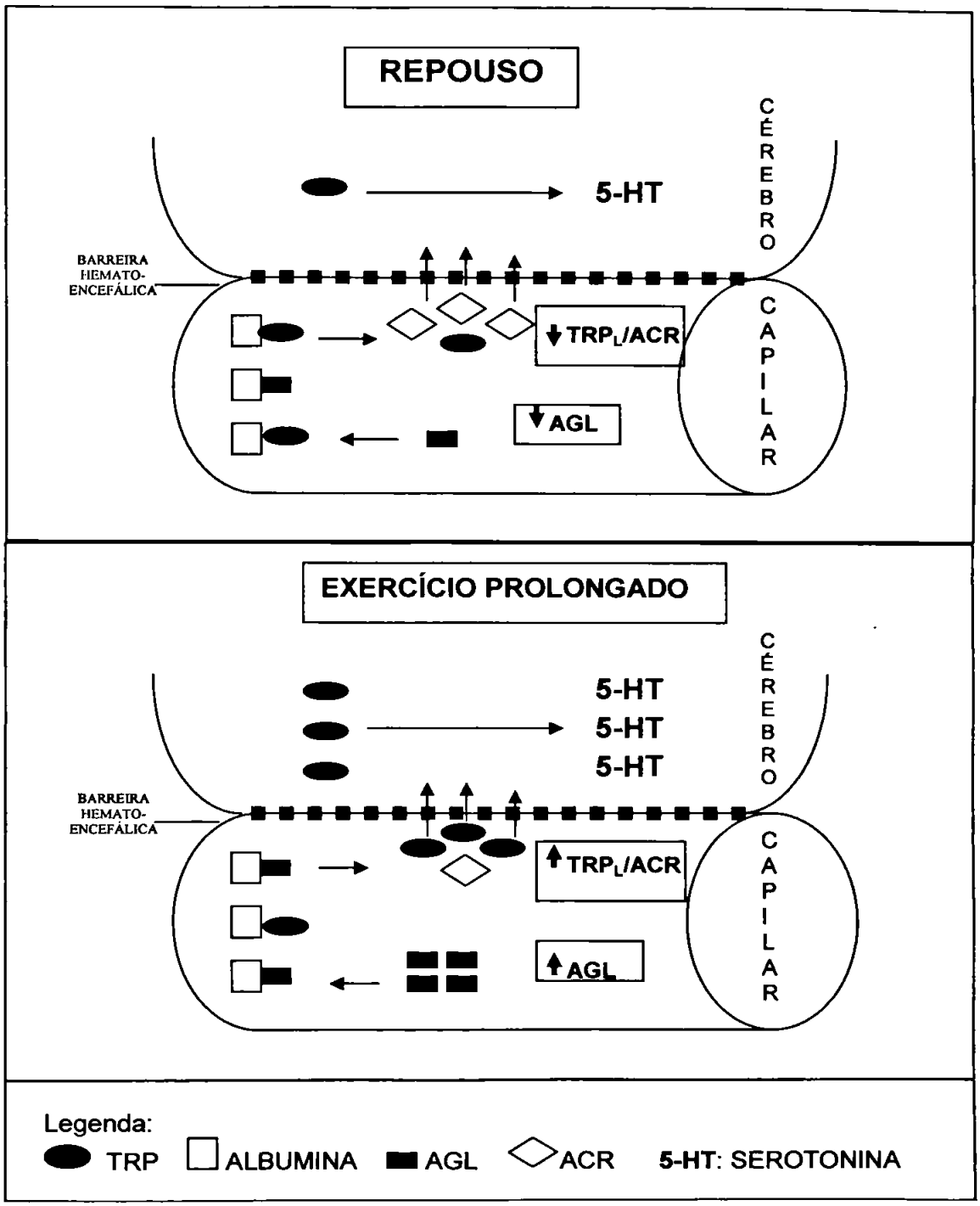


Figura 2. Alterações dos principais componentes envolvidos na hipótese da fadiga central durante o repouso e exercício prolongado. Adaptado de DAVIS, ANDERSON & WELSH (2000)

2.4. Efeitos da suplementação com ACR

O efeito da suplementação com ACR em relação ao desempenho durante o exercício físico prolongado é controverso, visto que muitos pesquisadores têm reportado benefícios, enquanto outros não têm observado efeitos.

2.4.1. Efeitos positivos da suplementação com ACR no rendimento

HEFLER *et al.* (1995) avaliaram os efeitos da suplementação de 16 g/dia de ACR (50% leucina, 30% valina, 20% isoleucina) ou placebo em ciclistas competitivos ($Vo_{2\ max} \approx 70\%$), durante 2 semanas, sendo que durante cada tratamento os indivíduos completaram 40 km em duas ocasiões: no segundo e décimo quarto dia. No grupo placebo, não foram observadas diferenças no tempo de exercício dos 40 km entre o primeiro e segundo teste, já o grupo que recebeu ACR, o tempo do segundo teste foi completado mais rapidamente que o primeiro. No primeiro teste, não foi observada diferença significante no tempo entre o grupo suplementado e placebo, ao contrário do segundo, onde o grupo suplementado apresentou menor tempo em relação ao placebo. Foi concluído pelos autores que a suplementação com ACR pode melhorar o desempenho em ciclistas competitivos.

MITLEMAN, RICCI & BAILEY (1998) avaliaram indivíduos do sexo masculino (n=7) e feminino (n=6) que receberam 5 mL/kg de ACR (5.88 g/L, sendo 54% leucina, 27% valina e 19% isoleucina) ou placebo (5.88 g/L de polidextrose) a cada 60 minutos durante repouso, e a cada 30 minutos durante exercício em ciclo-ergômetro a 40% do $vo_{2\ max}$ realizado em uma câmara com temperatura controlada para simular condição de calor. O tempo de exercício até exaustão foi maior com a ingestão de ACR (153,1 ± 13,3 min) do que placebo (137,0 ± 12,2 min) em ambos os sexos. As concentrações de ácidos graxos livres e amônia plasmática não foram influenciadas pela suplementação, mas aumentaram com o exercício.

Porém, houve uma tendência no aumento da amônia com a ingestão de ACR. As concentrações de ACR plasmáticos apresentaram aumento com a suplementação em relação ao placebo (1209 ± 119 *vs* 496 ± 44 μM), enquanto o triptofano livre (9,6 ± 0,9 *vs* 12,0 ± 1,3 μM) e a razão TRP_L/ ACR (0,009 ± 0,001 *vs* 0,024 ± 0,003) apresentou redução, em ambos sexos. Os autores concluíram que a suplementação com ACR é capaz de prolongar o desempenho em exercício moderado sob calor, podendo ser resultante da redução na razão TRP_L/ ACR.

BLOMSTRAND *et al.* (1991) constatou que a ingestão de ACR durante uma maratona proporcionou um efeito benéfico tanto na performance mental, quanto física, melhorando o desempenho físico dos corredores mais "lentos" (3,05 h - 3,30 h), embora não tenha causado efeitos significantes nos corredores mais "rápidos" (menos de 3.05 h).

BLOMSTRAND, HASSMÉN & NEWSHOLME (1991) avaliaram seis indivíduos do sexo feminino durante dois jogos de futebol (com intervalo de 1 semana entre cada) que receberam solução com 6% de carboidrato contendo 7,5 g/L de ACR (40% valina, 35% leucina e 25% isoleucina), ou solução placebo. O exercício ocasionou aumento na concentração plasmática de ACR no grupo suplementado, enquanto houve uma redução no grupo placebo. Não houve alteração, antes e após exercício, na concentração plasmática de TRP_L no grupo suplementado, entretanto, houve um aumento no grupo placebo. Foi aplicado um teste para avaliar a performance mental dos indivíduos, 2 horas antes do jogo, e dentro de 45 minutos após o término do jogo. Observou-se que os indivíduos suplementados apresentaram melhor performance nesse teste após o exercício, em relação à antes do exercício, sugerindo que a ingestão de ACR durante o exercício pode manter ou melhorar o estado mental dos atletas.

CALDERS *et al.* (1997) investigaram os efeitos da administração aguda de ACR, pré-exercício, por injeção intraperitoneal (10 mg de cada ACR dissolvidos em 1mL de NaCl 0.9%) em ratos Wistar (peso inicial de 150-180g), treinados em esteira e com alimentação *ad libitum*. Os grupos

experimentais (placebo ou ACR) foram divididos em: 1) sedentários (n=6); 2) 30 minutos de exercício submáximo (n=36); 3) exercício até exaustão (n=24). Os animais ficaram por 24 horas de jejum, antes do sacrifício, para garantir as mesmas condições metabólicas entre os tratamentos. Os animais do grupo 2 treinaram em esteira durante 3 semanas, 5 dias/semana, a 1.2 km/h e com 0% de inclinação por 15 minutos. Após esse período, foram treinados por mais 1 semana com as mesmas condições nos primeiros 4 dias, porém em 30 minutos, e o teste foi realizado no quinto dia, onde receberam ACR, por injeção intraperitoneal, 5 minutos antes da corrida (de 30 minutos, a 1,2 km/h e 2,5% de inclinação), e foram sacrificados após 35 minutos da injeção. Dos 36 ratos, 18 receberam placebo ou ACR, sendo que 9 de cada foram exercitados ou não. Os animais do grupo 3 foram treinados durante 5 semanas, 5 dias/semana, a 1,2 km/h e 0% de inclinação. Na primeira semana os ratos correram por 15 minutos, com aumento progressivo de 10 minutos a cada semana, até atingir 55 minutos na última. Após esse período, os animais foram treinados por mais 4 semanas, sendo que nos primeiros 4 dias de cada, exercitaram-se por 30 minutos, a 1,2% km/h e 0% de inclinação. No quinto dia de cada semana, os animais receberam a injeção placebo ou ACR, sendo que 12 ratos correram até exaustão a 1.2 km/h e 8% de inclinação, (totalizando 4 corridas até exaustão em ocasiões separadas) enquanto os outros 12 foram sacrificados em repouso. Os principais resultados dos grupos que receberam ACR comparados aos grupos placebo foram: maiores concentrações plasmáticas de ACR; menor concentração na razão TRP_L/ACR; maiores concentrações sangüíneas de amônia durante exercício e maior tempo de corrida até exaustão (ACR: 99 ± 9 min, e placebo: 76 ± 4 min). Os autores indicaram que a hiperamonemia provocada pelo exercício não foi a causa imediata da fadiga, visto que os animais tratados com ACR correram 23 minutos a mais, mesmo apresentando maiores concentrações de amônia. Além disso, sugeriram que o melhor desempenho dos grupos suplementados com ACR pode ser devido a um efeito central por redução da captação de TRP_L pelo cérebro, dessa forma reduzindo a formação de serotonina.

Outro estudo de CALDERS *et al.* (1999) avaliou os efeitos da administração aguda, pré-exercício, de ACR, glicose, e glicose com ACR. O protocolo de treinamento foi similar ao estudo anterior, exceto que os animais não foram submetidos ao jejum e utilizaram somente duas condições: 45 minutos de exercício submáximo (inclinação de 5% na esteira no dia do sacrifício (n=32)), e corrida até exaustão (n=24). Em cada condição, os animais foram divididos em 4 tratamentos (administração por injeção intraperitoneal): placebo (1 mL NaCl 0,9%), ACR (10 mg de cada ACR dissolvidos em 1mL de NacL 0,9%), glicose (100 mg) e glicose + ACR. Quanto aos resultados dos grupos de 45 minutos, a concentração de amônia sangüínea aumentou significantemente durante exercício no grupo ACR, e diminuiu no grupo glicose, em relação ao grupo placebo. As concentrações plasmáticas de ACR foram aumentadas pela administração de ACR e glicose + ACR, no exercício e repouso, comparadas à administração de placebo. Não houve diferenças significantes entre os grupos quanto às suplementações nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, triptofano livre e glicogênio muscular, sendo observadas diferenças somente entre exercício e repouso, onde houve aumento nos AGL, lactato, TRP_L, e redução no glicogênio. Nesse estudo não foram analisados parâmetros bioquímicos nos grupos que correram até exaustão. Os tempos até exaustão dos grupos submetidos aos 3 tratamentos (ACR, glicose, glicose + ACR) não foram diferentes entre si, porém foram significantemente maiores quando comparados ao placebo. Os autores indicam que os dados de amônia sangüínea, razão TRP_L/ACR e glicogênio muscular (sóleo) não esclarecem o melhor desempenho dos grupos suplementados, suportando a hipótese de que o efeito da administração de ACR no desempenho pode estar relacionado à disponibilidade de carboidratos durante o exercício.

ROSSI (2001) avaliou os efeitos da suplementação crônica com ACR, através da dieta (acrescida de 50% do conteúdo estimado dos ACR da formulação AIN-93M) em ratos submetidos à exaustão. O treinamento em natação teve duração de 6 semanas, 1 hora/dia, 5 vezes/semana, com sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal atada à cauda. Foi verificado

aumento significante de 29,7% no tempo até exaustão do grupo suplementado (345 ± 21 min) em relação ao grupo controle (266 ± 31 min). Esse grupo suplementado apresentou, em relação ao controle: aumento de 68% na concentração de glicogênio muscular (sóleo) e hepático; redução de 30% na concentração de amônia plasmática e de 33% na concentração de serotonina hipotalâmica. Nos grupos submetidos à exaustão em comparação aos sedentários houve: diminuição do glicogênio hepático e muscular, glicemia e insulinemia; aumento de lactato sangüíneo, amônia plasmática, ácidos graxos livres plasmáticos e serotonina do hipotálamo. Concluiu-se que a suplementação com ACR foi eficiente em aumentar o rendimento dos animais, relacionado com a menor concentração de serotonina no hipotálamo, diferentemente do grupo com dieta controle, que apresentou maiores concentrações de serotonina. Tal fato, pode ter desencadeado os sintomas de fadiga central e influenciado no seu menor rendimento.

2.4.2. Ausência de efeitos da suplementação com ACR no rendimento

VAN HALL *et al.* (1995) estudaram o efeito da ingestão de ACR e triptofano durante exercício prolongado, considerando a hipótese da fadiga central. Dez atletas do sexo masculino, durante ciclo ergômetro (70-75% da força máxima) receberam bebidas a cada 15 minutos, em quantidades de 2 mL/kg de peso, contendo: 1) 6% de sacarose (controle); 2) 6% de sacarose suplementada com 3 g/L de triptofano; 3) baixa dose de ACR (6 g/L, sendo 2 g/L de cada aminoácido); 4) alta dose de ACR (18 g/L, sendo 6 g/L de cada aminoácido). A ingestão de água durante o teste foi *ad libitum* (0-200 mL). Verificou-se que as concentrações de amônia plasmática apresentaram aumento após a exaustão em todos tratamentos, entretanto os valores foram maiores com os suplementos de ACR, em relação ao controle. A ingestão das bebidas com ACR causou aumento na concentração plasmática dos ACR, sendo que a bebida com alta dose de ACR provocou aumento de 3 vezes em relação à bebida de baixa dose. A concentração plasmática de triptofano diminuiu com o exercício quando foram ingeridas as bebidas com

ACR. O tempo de exercício até exaustão não foi diferente entre os tratamentos (122 ± 3 min). Foram utilizados parâmetros cinéticos de transporte (de capilares cerebrais humanos, medidos *in vitro*), sendo estimado que os suplementos com ACR reduziram a captação de triptofano cerebral na exaustão (8-12%), enquanto a ingestão de triptofano causou aumento de 7-20 vezes. Os autores concluíram que não houve efeito da ingestão de triptofano ou ACR em solução contendo carboidratos no tempo até exaustão em estudo controlado em laboratório, sendo que a atividade serotoninérgica cerebral durante exercício prolongado contribui pouco para os mecanismos de fadiga e exaustão (baseado na estimativa da taxa de influxo cerebral do triptofano).

PERTRUZZELO *et al.* (1992) verificaram o efeito da suplementação com ACR sobre indícios de fadiga psicológica e comportamental. Nove indivíduos do sexo masculino treinaram em exercício prolongado ($VO_{2\ max}$= 65%) após 2 semanas de suplementação de placebo ou ACR. As mudanças comportamentais foram avaliadas antes e após o exercício, bem como, o estímulo ao SNC e performance cognitiva obtidos antes e durante o exercício, através de testes específicos. As análises multivariadas não demonstraram efeito da suplementação com ACR em nenhuma medida psicológica, comportamental ou do SNC. O tempo total de exercício foi similar entre os grupos, sugerindo que a suplementação com ACR não é ergogênica. A fadiga psicológica para ambos grupos (placebo e ACR) aumentou antes e após exercício, e a performance cognitiva, assim como o estímulo ao SNC melhoraram durante o exercício.

GALIANO *et al.* (1991) avaliaram os efeitos da adição de ACR em típica bebida esportiva durante exercício prolongado, em oito ciclistas do sexo masculino a 70% do $VO_{2\ max}$, em duas ocasiões, com intervalo de 1 semana. Durante cada teste os indivíduos ingeriram 5 ml/kg, a cada 30 min, da bebida com carboidrato a 6% (C6) ou suplementada com ACR (C6 + ACR), sendo 395 mg/L de leucina, 140 mg/L de isoleucina, e 200 mg/L de valina. As amostras sangüíneas foram coletadas no repouso e durante o exercício, a cada 30 minutos. Os tempos de exercício até exaustão não

foram diferentes entre os tratamentos (C6: 220 ± 11 min; C6 + ACR: 235 ±10 min). As concentrações plasmáticas de ACR foram mantidas durante o exercício no grupo C6 + ACR, e reduziram levemente no final do exercício no grupo C6. Em ambos tratamentos, a concentração de triptofano plasmático não apresentou alterações, aumentando somente na exaustão, e uma resposta similar foi encontrada para cortisol, epinefrina e norepinefrina. Foi concluído que a adição de ACR em bebidas esportivas é capaz de manter as concentrações plasmáticas de ACR, entretanto não promove efeito nas respostas fisiológicas e endócrinas, ou na performance durante ciclismo prolongado.

DAVIS *et al.* (1999) também testaram os efeitos da ingestão de bebida com carboidratos com ou sem ACR, e água flavorizada como placebo, durante o exercício prolongado. Oito indivíduos realizaram 3 provas de exercícios de alta intensidade até a fadiga, ingerindo as bebidas 1 hora antes (5 mL/kg, 18% carboidrato) e durante o exercício (2 mL/kg, 6% carboidrato). A bebida suplementada continha 7 g de ACR, sendo 40% valina, 35% leucina e 25% isoleucina. Os indivíduos que consumiram as bebidas com ou sem ACR correram mais tempo do que os que consumiram o placebo, não havendo diferença entre as bebidas com ou sem ACR. Esses dois tratamentos também causaram aumento na glicemia e insulinemia, e redução nos ácidos graxos livres. Assim, os autores confirmaram um efeito benéfico das bebidas com carboidratos no desempenho durante exercício intenso e prolongado, entretanto, sem efeito da adição dos ACR nessas bebidas.

VERGER *et al.* (1994) utilizaram 34 ratos Wistar adultos, que treinaram em esteira com 5% de inclinação, com intensidade moderada (0.9 km/h) até a exaustão. A adaptação à esteira foi realizada dois dias antes do experimento, durante 15 minutos/dia. No dia do experimento, os animais receberam por gavagem, imediatamente antes do exercício, e a cada 30 min, até o momento de exaustão, 1 mL de três soluções diferentes: 1) água (controle); 2) glicose (5%); ou 3) ACR (valina: 1,6 g/100mL; leucina: 1,4 g/100mL; isoleucina: 0,9 g/100 mL). A densidade calórica das soluções com

glicose e ACR foi de 20 kcal/100 mL. Após a exaustão, foram coletadas amostras de sangue pelo seio retro-orbital e os animais foram devolvidos às gaiolas. Os tempos até exaustão foram: grupo controle: 191 ± 9 min; grupo glicose: 208 ± 11 min; grupo ACR: 179 ± 10 min, com diferença significante entre o grupo glicose e ACR. As concentrações plasmáticas de ACR foram maiores após tratamento com ACR, comparado com água e glicose. Não houve diferenças entre os tratamentos para glicemia. A insulinemia aumentou significantemente no grupo ACR comparado ao grupo glicose, sendo que este não diferiu em relação ao controle. Foi concluído que o tratamento com ACR diminuiu o rendimento, e que a secreção de insulina e inibição da glicogenólise ocorrem em resposta à ingestão de ACR.

2.4.3. Efeitos da suplementação com ACR em parâmetros bioquímicos

BLOMSTRAND & NEWSHOLME (1992) pesquisaram o efeito da suplementação com ACR nas concentrações de aminoácidos no plasma e músculo. Para tanto, 58 indivíduos receberam bebidas contendo uma mistura de ACR ou placebo (solução com carboidratos) durante dois tipos de exercício prolongado e intenso: corrida de longa distância de 30 km (7,5g ACR: 50% valina, 25% leucina e 15% isoleucina, em solução com 5% de carboidratos, administrada em 5 vezes) e maratona de 42,2 km (12g ACR: 40% valina, 35% leucina e 25% isoleucina, em solução com 6% de carboidratos, administrada em 14 vezes). As proporções de ACR foram alteradas do primeiro para o segundo exercício para garantir uma ingestão balanceada. Os grupos suplementados apresentaram aumento na concentração plasmática e muscular (*vastus lateralis*) de ACR, enquanto nos grupos placebo a concentração de ACR diminuiu no plasma e não se alterou no músculo. Nos dois tipos de exercício, o grupo placebo apresentou aumento de 20-40% na concentração muscular de aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina), sendo que a concentração plasmática desses aminoácidos foi aumentada na maratona. Como a tirosina e fenilalanina não são captadas e metabolizadas pelo músculo, os autores sugerem que o

aumento na sua concentração muscular pode indicar degradação protéica durante o exercício. Entretanto, com a suplementação, o aumento nas concentrações desses aminoácidos foi prevenido, tanto no plasma como no músculo. Portanto, foi concluído que a ingestão de ACR durante o exercício pode prevenir ou reduzir a taxa de degradação protéica causada pelo exercício mais intenso.

O estudo de BLOMSTRAND *et al.* (1995), entretanto, não apresentou a mesma conclusão. Cinco ciclistas do sexo masculino realizaram exercício exaustivo em ciclo ergômetro (75% $Vo_{2\ max}$) visando reduzir os estoques de glicogênio muscular. Durante o exercício, a cada 15 minutos, os indivíduos receberam 150 mL de solução contendo 6% de carboidrato (CHO) com adição de 7g/L de ACR (40% valina, 35% leucina e 25% isoleucina), solução contendo 6% carboidrato ou água flavorizada contendo sacarina. O desempenho físico foi aumentado em 4 dos 5 ciclistas que consumiram CHO + ACR e apenas CHO durante o exercício, quando comparados aos que receberam água flavorizada. Não foram encontradas diferenças no desempenho dos indivíduos que receberam CHO + ACR ou apenas CHO. Quando a solução com ACR foi administrada, as concentrações de ACR plasmáticas e musculares aumentaram após o exercício em 120 e 35%, respectivamente. Nas outras condições não houve alteração nas concentrações de ACR no plasma ou então foram levemente reduzidas, entretanto, estas foram diminuídas no músculo. A concentração plasmática de glutamina foi maior com CHO + ACR do que apenas CHO ou água, entretanto, sua concentração no músculo não foi alterada, e o glutamato diminuiu nas três condições, após exercício. A solução CHO + ACR ou apenas CHO não afetaram o aumento induzido pelo exercício nas concentrações plasmáticas e musculares de aminoácidos aromáticos, indicando que nem os ACR ou os CHO influenciaram na degradação protéica durante o exercício.

BLOMSTRAND, SONJA & NEWSHOLME (1996) avaliaram sete ciclistas que realizaram, em duas ocasiões sucessivas, uma prova de exercício exaustivo visando diminuir a reserva muscular de glicogênio.

Durante cada prova foi administrada uma bebida com ACR ou água flavorizada (placebo). A ingestão de ACR provocou aumento de 135% e 57% nas concentrações plasmáticas e musculares, respectivamente, destes aminoácidos. Com o placebo, essas concentrações não se modificaram ou reduziram ligeiramente no plasma, e no músculo diminuíram em 18%. A concentração de glicogênio muscular diminuiu significantemente com a administração do placebo, ao contrário da administração de ACR, indicando que a suplementação com ACR pode ter diminuído a degradação do glicogênio muscular durante o exercício.

SHIMOMURA *et al.* (2000) estudaram o efeito de dietas suplementadas com 4,75% e 6,175% de ACR, de forma crônica, sobre catabolismo dos ACR e no metabolismo de glicogênio em ratos, durante 4 semanas. Metade de cada grupo foi treinado em esteira por 30 min/dia, 5 vezes/semana, com inclinação de 6 °. Foi demonstrado aumento na concentração sérica de ACR e da atividade hepática do complexo enzimático desidrogenase de α-cetoácido de cadeia ramificada, a enzima limitante da taxa do catabolismo de ACR, sugerindo que as dietas suplementadas com ACR possivelmente promovem catabolismo dos ACR. Nos ratos em repouso, não foi verificada diferença significativa entre as dietas no conteúdo de glicogênio hepático e muscular (gastrocnêmio), entretanto, nos ratos submetidos à exaustão por exercício agudo, essas concentrações foram 2 a 4 vezes maiores nos ratos que receberam a dieta suplementada, em relação à controle. A atividade do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDH), que regula a oxidação da glicose, diminuiu no grupo suplementado em relação ao controle. Os autores concluíram que suplementação com ACR é capaz de poupar os estoques de glicogênio no fígado e no músculo esquelético durante o exercício, e que a redução, no grupo suplementado, da atividade do PDH nesses tecidos está envolvida nestes mecanismos.

BLOMSTRAND, CELSING & NEWSHOLME (1988) mediram as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, ACR e TRP total e livre, antes e após uma maratona. Foi observado que a concentração de AGL

aumentou, a de ACR diminuiu e a de TRP_L aumentou. Segundo os autores, o aumento do TRP_L, provavelmente causado pela elevação dos AGL durante o exercício, juntamente com a diminuição dos ACR, proporcionou um aumento na razão TRP_L/ACR que levaria ao aumento na passagem do TRP_L pela barreira hematoencefálica, e então à elevação na síntese de 5-HT. Assim, essa suposta elevação da concentração da serotonina em áreas específicas do cérebro poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelo desenvolvimento da fadiga física e/ou mental durante exercício prolongado.

2.5. Efeito do exercício na síntese de 5-HT cerebral

O primeiro estudo a demonstrar o aumento da síntese de 5-HT cerebral em resposta ao exercício foi publicado em 1963 por BARCHAS & FREEDMAN, que verificaram aumento na concentração de 5-HT no cérebro de ratos que nadaram até a exaustão.

BAILEY, DAVIS & AHLBORN (1992) examinaram os efeitos da atividade aumentada de 5-HT na performance e *turnover* da dopamina cerebral em ratos. Num experimento, foi administrada intraperitonealmente quatro doses de agonista da 5-HT (*m*-clorofenil piperazina, que resulta numa redução da atividade motora voluntária) ou uma dose de solução salina nos ratos submetidos à exaustão em esteira, em cinco ocasiões. Observou-se diminuição do tempo até exaustão, em resposta à administração das maiores doses do agonista. Em outro experimento, ratos foram sacrificados em repouso e após 1 hora de esteira, precedidos pela injeção intraperitoneal do agonista, ou da solução salina. A análise de dopamina foi feita em três regiões do cérebro: hipocampo, mesencéfalo e estriato; a análise de 5-HT foi realizada no mesencéfalo. As concentrações de dopamina aumentaram com o exercício nas três regiões cerebrais, assim como as concentrações de 5-HT no mesencéfalo, que aumentaram significantemente no exercício em relação ao repouso. Os autores concluíram que a atividade cerebral aumentada de 5-HT resulta na redução do desempenho.

BLOMSTRAND, PERRET & PARRY-BILLINGS (1989) analisaram o efeito do exercício prolongado nas concentrações plasmáticas de aminoácidos e nas concentrações de 5-HT em diferentes regiões cerebrais de ratos (córtex, cerebelo, hipocampo, estriato, tronco cerebral e hipotálamo). Os animais foram divididos em grupos sedentários e treinados, sendo que estes treinaram em esteira por 11 semanas e foram sacrificados na condição de repouso e após exaustão. A corrida até exaustão causou aumento nas concentrações plasmáticas de ACR, ácidos graxos livres e TRP_L, além de aumento na concentração de triptofano em todas regiões cerebrais analisadas. O exercício também causou aumento nas

concentrações de 5-HT e dopamina no mesencéfalo e hipotálamo, sendo que nas outras regiões analisadas não houve diferenças significantes entre a condição de exercício e de repouso para esses parâmetros. Segundo os autores, visto que as concentrações de 5-HT e dopamina aumentaram nas regiões do hipotálamo e tronco cerebral após exercício, tal fato evidencia que estas áreas do cérebro podem exercer importante papel nos efeitos centrais do exercício, incluindo a fadiga física e mental, e aspectos comportamentais.

GOMEZ-MERINO *et al.* (2001) avaliaram o efeito da administração de L-valina na atividade da 5-HT no hipocampo de ratos submetidos a exercício intenso e agudo. Foi realizada uma cirurgia nos animais para uma cateterização venosa (para administração do suplemento) e microdiálise cerebral, e após a recuperação cirúrgica, passaram por um período de adaptação à esteira. No dia do protocolo, dois grupos de 7 animais receberam 0,3 mL de solução salina (NaCl 0.9%) ou L-valina (2 mg/100g em solução salina), injetadas no catéter, e logo em seguida iniciaram o exercício (velocidade de 25 m/min), durante 120 minutos, tempo próximo à exaustão. As amostras de diálise foram coletadas no repouso, durante o exercício, e durante a recuperação (de 150 minutos). Outros dois grupos de 10 ratos foram submetidos ao mesmo protocolo de exercício, para verificar o efeito do exercício e da suplementação de valina em parâmetros plasmáticos. No grupo salina, as concentrações extracelulares de 5-HT, 5-HIAA e TRP no hipocampo aumentaram durante o exercício. Nos grupos suplementados, as concentrações de 5-HT foram mantidas próximas aos valores de repouso durante o exercício e recuperação, e o TRP cerebral diminuiu no final do exercício. Não houve mudanças entre os tratamentos com relação a 5-HIAA. As concentrações plasmáticas de valina aumentaram no grupo suplementado em relação ao controle durante o exercício e recuperação. Os autores evidenciaram que o exercício agudo e intenso estimulou o metabolismo de 5-HT no hipocampo de ratos, e que a administração de L-valina pré-exercício preveniu a síntese de 5-HT induzida pelo exercício.

SMRIGA *et al.* (2002) estudaram ratos em duas condições: 1) com livre acesso a atividade em gaiola rotatória, ração, água e solução composta de ACR adicionada de glutamina e arginina (solução baseada em ACR). Foi observada uma relação positiva entre o período escuro de atividade livre na gaiola rotatória e preferência pela solução baseada em ACR. Além disso, a menor síntese de serotonina no hipotálamo lateral caracterizou os ratos que consumiram a solução baseada em ACR; 2) outro grupo de ratos foi treinado em esteira, e uma solução baseada em ACR foi administrada antes da corrida, aumentando a razão plasmática ACR/TRP no final e após o exercício. Ocorreu diminuição na síntese da serotonina do hipotálamo lateral 80 min após a corrida. Os autores sugerem um efeito ergogênico, no estudo da primeira condição, pela correlação entre atividade livre e preferência pela solução baseada em ACR. Na segunda condição, foi demonstrado o envolvimento da região do hipotálamo lateral para os efeitos da solução baseada em ACR.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de dietas suplementadas com aminoácidos de cadeia ramificada sobre mecanismos de fadiga em ratos treinados.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar a influência das dietas suplementadas com diferentes concentrações de ACR, administradas de forma crônica, sobre parâmetros metabólicos indicativos de fadiga em ratos treinados;

- Avaliar o desempenho físico dos grupos experimentais que foram submetidos ao teste de tolerância ao esforço.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

O presente estudo foi realizado com ratos albinos Wistar machos, com peso médio inicial de 241 ± 15 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, em gaiolas individuais, obedecendo a um ciclo invertido 12 horas claro/escuro, com a luz acesa às 19:00 horas.

O acesso dos animais à alimentação e água foi *ad libitum*, sendo o consumo de ração e peso corpóreo determinados três vezes por semana. O peso final foi verificado no dia do sacrifício. Os grupos de animais foram acompanhados durante período total de 7 semanas, sendo a primeira de adaptação somente ao ambiente e à alimentação, e as demais semanas referentes ao treinamento físico.

4.2. Dietas experimentais

Foram formuladas três dietas:

Dieta controle (C): elaborada de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) para manutenção de roedores adultos (REEVES, NIELSEN & FAHEY, 1993).

Dieta suplementada 1 (S1): elaborada de acordo com a AIN-93M, com adição de 3,57% ACR.

Dieta suplementada 2 (S2): elaborada de acordo com a AIN-93M, com adição de 4,76% ACR.

Os aminoácidos utilizados foram doados pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda.

A tabela 2 apresenta a estimativa do conteúdo dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) da dieta controle.

Tabela 2. Estimativa do conteúdo dos ACR da dieta controle (g/kg dieta)

BCAA	AIN-93M
L-isoleucina	5,9
L-leucina	10,9
L-valina	7,0
Total	23,8

Na formulação das rações suplementadas retirou-se a quantidade de amido correspondente ao acréscimo dos ACR (em gramas), para que ficassem isocalóricas em relação à ração não suplementada, já que 1g de proteína e carboidrato correspondem a 4 kcal.

A tabela 3 apresenta a formulação das três dietas oferecidas, de acordo com REEVES, NIELSEN & FAHEY (1993)

Tabela 3. Formulação das dietas experimentais (g/kg dieta)

Ingredientes	C	S1	S2
Amido	620,692	608,792	596,892
Caseína (> 85% de proteína)	140,000	140,000	140,000
Sacarose	100,000	100,000	100,000
Óleo de soja	40,000	40,000	40,000
Fibra (celulose)	50,000	50,000	50,000
Mistura de minerais	35,000	35,000	35,000
Mistura de vitaminas	10,000	10,000	10,000
L-cistina	1,800	1,800	1,800
Bitartarato de colina (41,1% de colina)	2,500	2,500	2,500
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008
L-isoleucina*	-	8,85	11,8
L-leucina*	-	16,35	21,8
L-valina*	-	10,5	14,0
Total de ACR adicionados	-	35,7	47,6

* suplementação

As quantidades de minerais e vitaminas das dietas atendem às recomendações específicas para roedores, e sua composição detalhada está descrita no anexo 1.

A tabela 4 apresenta a estimativa da composição dos nutrientes da dieta controle.

Tabela 4. Estimativa da composição dos macronutrientes da dieta controle

Nutrientes	unidade/kg dieta
Energia total (kcal)	3772,4
Total de proteína (g)	125,8
Total de carboidrato (g)	727,3
Total de lipídios (g)	40
% de proteína	13,3
% de carboidrato	77,1
% de lipídios	9,5

Foi realizada a análise do conteúdo protéico dos três tipos de ração pelo método de Kjedahl (CECCHI, 1999), através da determinação do teor de nitrogênio de origem orgânica. Como o teor de nitrogênio dos diferentes tipos de proteína é aproximadamente o mesmo, em torno de 16%, multiplica-se a porcentagem de nitrogênio total encontrado pelo fator 6,25 para obter a porcentagem de proteína da amostra. Este método baseia-se na digestão da amostra com ácido sulfúrico, na presença do catalisador sulfato de cobre e do sulfato de potássio. Durante esse processo o nitrogênio da proteína é reduzido em sulfato de amônia. O sulfato de amônia é destilado com NaOH concentrado, onde ocorre a liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico, na presença de solução indicadora, formando borato de amônia, que é titulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N.

Para calcular a porcentagem de proteína na amostra de ração foi utilizado o peso equivalente do nitrogênio, a normalidade do ácido clorídrico, o peso da amostra e o fator de 6,25. A fórmula está representada abaixo:

$$\% N = (mL\ HCl\ am - mL\ HCl\ br) \times N\ HCl \times FC \times 14,007 \times 100 / mg\ am$$

mL = volume gasto
am = amostra
br = branco
N = normalidade
FC = fator de correção

Os resultados dessa análise estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de proteína e nitrogênio encontrada nas diferentes rações experimentais

Ração	% Proteína	% Nitrogênio
C	11,77	1,88
S1	14,41	2,31
S2	15,23	2,44

4.3. Protocolo de treinamento

O protocolo de treinamento teve duração de seis semanas (quadro 1), sendo que nas duas primeiras semanas de treinamento os animais foram adaptados ao meio líquido, e exercitados com aumento crescente de sobrecarga até atingir 5% do peso corpóreo total. Nas semanas subseqüentes, os animais foram submetidos à rotina de treinamento com esta carga fixa atada à cauda durante cinco vezes por semana, 1 hora por dia, com temperatura da água de 32 °C (LANCHA Jr. *et al.*, 1995), entre 9:00 e 12:00 horas. As sobrecargas foram confeccionadas com pedaços de chumbo, fio de náilon e elástico, e corrigidas semanalmente, de acordo com a variação de peso dos animais.

Quadro 1. Protocolo de treinamento do exercício moderado (% de carga e tempo de natação em minutos)

	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
Semana 1	0% por 15'	0% por 15'	1% por 15'	2% por 15'	3% por 15'
Semana 2	3% por 20'	3% por 20'	4% por 30'	4% por 30'	5% por 60'
Semana 3	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'
Semana 4	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'
Semana 5	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'
Semana 6	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	5% por 60'	Sacrifício

A eficiência do protocolo de treinamento foi avaliada pela atividade máxima da enzima citrato sintase.

Foi utilizado o sistema de natação desenvolvido por VIEIRA *et al.* (1988), que é constituído por dez tanques cilíndricos individuais de PVC com água circulante aquecida entre 29 e 32 °C por uma resistência elétrica central. O desenho esquemático do aparelho está representado no anexo 2.

4.4. Grupos experimentais

Os diferentes grupos experimentais são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Grupos experimentais

RAÇÃO	SEDENTÁRIO (n=6)	TREINADO (n=6)
AIN-93M	SED-C*	1H-C
Sem Suplementação (C)		EX-C
AIN-93M+3,57%ACR	SED-S1*	1H-S1
Suplementação 1 (S1)		EX-S1
AIN-93M+4,76%ACR	SED-S2*	1H-S2
Suplementação 2 (S2)		EX-S2

* valores de referência

SED = sedentário com dieta controle (C) ou suplementada (S1 e S2)
1H = treinado e submetido à 1 hora de natação, com dieta controle (C) ou suplementada (S1 e S2)
EX = treinado e submetido ao teste de tolerância ao esforço, com dieta controle (C) ou suplementada (S1 e S2)

Os grupos treinados apresentaram duas condições: 1H e EX, tendo o mesmo protocolo de treinamento durante o experimento. No dia do sacrifício um grupo pertencente a cada tipo de dieta foi sacrificado após 1 hora de natação e após o teste de tolerância ao esforço, onde nadaram até o esgotamento físico. Esse tempo foi definido pelo momento em que o animal mantinha-se submerso por aproximadamente 12 segundos (LANCHA, RECCO & ABDALLA, 1994).

Os animais do grupo sedentário não foram submetidos a treinamento durante o experimento, sendo manipulados de modo similar aos animais treinados, e sacrificados na condição de repouso.

4.5. Sacrifício dos animais e coleta das amostras

No último dia do protocolo, a ração foi retirada das gaiolas 2 horas antes dos procedimentos (início da atividade física para os grupos treinados, e o sacrifício em si para os grupos sedentários). Todos animais foram sacrificados por decapitação, entre 9:00 e 11:00 horas, com exceção dos que foram submetidos ao teste de tolerância ao esforço, os quais tiveram o tempo de natação anotado individualmente.

Foi realizada uma coleta de sangue imediatamente antes do sacrifício dos animais, através da extremidade da cauda (para análise de lactato). Em seguida à decapitação, o sangue foi coletado e centrifugado para obtenção das frações de plasma e soro. Ressalta-se que os animais treinados, após serem retirados da água, foram levemente secos com papel toalha, o suficiente para impedir que escoasse água, logo após a decapitação, para dentro dos tubos de coleta de sangue. Logo em seguida, foram extraídos: o hipotálamo, o fígado e os músculos gastrocnêmio e sóleo de ambas as patas, os quais foram pesados, embalados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Este processo demorou no máximo 4 minutos para cada animal, após sua morte. As amostras de soro, plasma e tecidos foram então mantidas em *freezer* a - 80 °C para posterior análise bioquímica.

4.6. Determinações experimentais

Parâmetros analisados:

- Biométricos: peso corpóreo, consumo de ração e estimativa do consumo de ACR;
- Rendimento: teste de tolerância ao esforço (ou teste de exaustão);

- Plasmáticos: glicose, ácidos graxos livres, amônia;
- Séricos: insulina e corticosterona;
- Sangüíneo: lactato;
- Teciduais: glicogênio hepático, glicogênio muscular (gastrocnêmio e sóleo) serotonina (hipotálamo) e atividade máxima da enzima citrato sintase (sóleo).

Parâmetros plasmáticos

4.6.1. Glicose

A glicose plasmática foi quantificada pelo Kit da Labtest Diagnóstica – Glicose PAP Liquiform, método cinético (GOD/POD). O ensaio é enzimático, consistindo na oxidação da glicose formando ácido glucônico e água oxigenada, pela ação da enzima glicose oxidase (GOD). Após ocorre a reação da água oxigenada com 4-aminoantipirina e fenol, pela ação da enzima peroxidase (POD), para resultar no composto antipirilquinonimina.

$$\text{Glicose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Ácido Glucônico} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-Aminoantipirina} + \text{fenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Antipirilquinonimina} + 4H_2O$$

A concentração de glicose foi inferida pela quantidade de antipirilquinonimina formada, e medida em comprimento de onda de 505 nm, em espectrofotômetro SHIMADZU UV VIS 1240.

4.6.2. Ácidos graxos livres

O método foi realizado segundo REGOUW *et al.* (1971) e FALHOLT, LUND & FALHOLT (1973) o qual se baseia em três etapas: extração, saponificação e leitura com reagente colorimétrico. Após a extração dos ácidos graxos livres das amostras com solvente seletivo (clorofórmio,

heptano e etanol), o extrato é tratado com nitrato de cobre, formando sabão de cobre. O metal assim ligado reage com a carbazida e carbazona, produzindo uma coloração violeta, que é lida em espectofotômetro (SHIMADZU) a 550 nm de comprimento de onda.

4.6.3. Amônia

A determinação da amônia plasmática foi realizada através do kit da Sigma Diagnostics, de acordo com o método de RATLIFF & HALL (1979), o qual se baseia no princípio da aminação redutiva do 2-oxoglutarato, através da enzima glutamato desidrogenase, com a redução da nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH). A diminuição na absorbância a 340 nm é proporcional à concentração de amônia plasmática.

Parâmetros séricos

4.6.4. Insulina

A insulina sérica foi dosada pelo método radioimunoensaio utilizando-se o kit Biotrak ™ (Amersham International). A leitura foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600).

4.6.5. Corticosterona

A corticosterona sérica foi dosada pelo método radioimunoensaio utilizando-se o kit Biotrak ™ (Amersham International). A leitura foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600). Previamente ao ensaio, as amostras de soro foram diluídas e aquecidas a 60 °C por 30 minutos em banho com água e resfriadas em temperatura ambiente. Este procedimento permite que a corticosterona seja deslocada da globulina ligante de corticosterona.

Parâmetro sangüíneo

4.6.6. Lactato

Para quantificação de lactato foram coletados 25 μL de sangue diretamente em capilares heparinizados, através da extremidade da cauda dos animais, que foi seccionada (aproximadamente 3 mm), poucos segundos antes do sacrifício. A dosagem foi realizada por técnica eletroquímica (Lactímetro Yellow Springs Instruments, modelo 1500), após estabilização da amostra com fluoreto de sódio a 2%.

Parâmetros teciduais

4.6.7. Glicogênio hepático e muscular

A determinação da concentração de glicogênio muscular e hepático foi realizada de acordo com o método descrito por HASSID & ABRAHAM (1957). As amostras de tecidos (fígado, gastrocnêmio e sóleo) foram digeridas durante 60 minutos em banho fervente com uma solução de KOH 30%. A extração final do glicogênio foi feita em duas etapas através da precipitação com etanol 70% em banho de água fervente, o qual foi então quantificado utilizando solução de antrona em ácido sulfúrico. O ácido promove a hidrólise do glicogênio à glicose, e a antrona reage com a glicose, produzindo uma coloração esverdeada. A leitura foi feita em espectrofotômetro (SHIMADZU) a 540 nm de comprimento de onda.

4.6.8. Serotonina - hipotálamo

Foi utilizado o método de HPLC com detecção eletroquímica descrita por RIBEIRO *et al.* (1993).

O hipotálamo foi pesado e sonicado em uma solução de 0,2 N $HClO_4$ contendo 0,5 nM de ácido ascórbico e 0,1 mg/ml de dihidroxibenzilamina

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

(DHBA), como padrão interno. O homogenato tecidual (padronizado para 100mg de peso/ml), foi depois centrifugado a 17.000 x g por 15 minutos a 25 °C. O fluído sobrenadante foi então transferido para centrifiltros com 0,2 μm e centrifugados novamente a 1.000 x g por 5 minutos com objetivo de remover pequenas partículas antes da injeção no HPLC (SARKISSIAN *et al.*, 1990). As amostras colhidas foram injetadas em sistema HPLC para determinar o teor de serotonina.

A fase móvel foi composta de fosfato de sódio (75 mM), ácido heptanosulfônico (0,63 mM), EDTA (0,27 mM), trietanolamina (100 μl/L) e metanol (12,5% v/v - pH 3,0). O fluxo foi de 1,0 ml/min e os potenciais aplicados aos eletrodos foram de 350 mV na célula protetora, e 250 mV na célula analítica, além de 50 mV na célula analítica, com o objetivo de diminuir o ruído dos outros reagentes.

4.6.9. Atividade máxima da enzima citrato sintase

A determinação da atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo foi realizada de acordo com o método de ALP, NEWSHOLME & ZAMMIT (1976), baseada no fato de que a reação do acetil CoA com o oxalacetato forma citrato e CoA, e o DTNB reage com a CoA produzindo cor amarelada, absorvido a 412 nm, em espectrofotômetro.

4.7. **Análise estatística**

Os resultados de todos grupos experimentais foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e, logo em seguida, ao Teste de Tukey com 5% de significância. Foi utilizado o programa Statistix for Windows 7.0.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

5. RESULTADOS

Parâmetros biométricos

5.1. Peso inicial

Os pesos iniciais dos animais estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Peso inicial (g) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle, suplementada 1 e 2

Grupos	C	S1	S2
SED	240 ± 8 [(a)]	241 ± 18 [(a)]	241 ± 4 [(a)]
1H	239 ± 17 [(a)]	243 ± 7 [(a)]	236 ± 30 [(a)]
EX	241 ± 14 [(a)]	241 ± 12 [(a)]	237 ± 27 [(a)]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 32
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

De acordo com a tabela 7, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em relação ao peso inicial.

5.2. Peso final

Os pesos finais dos animais estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Peso final (g) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	386 ± 7 [a]	383 ± 26 [a]	385 ± 12 [a]
1H	337 ± 10 [b]	341 ± 2 [b]	336 ± 21 [b]
EX	338 ± 27 [b]	340 ± 21 [b]	337 ± 23 [b]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 35
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

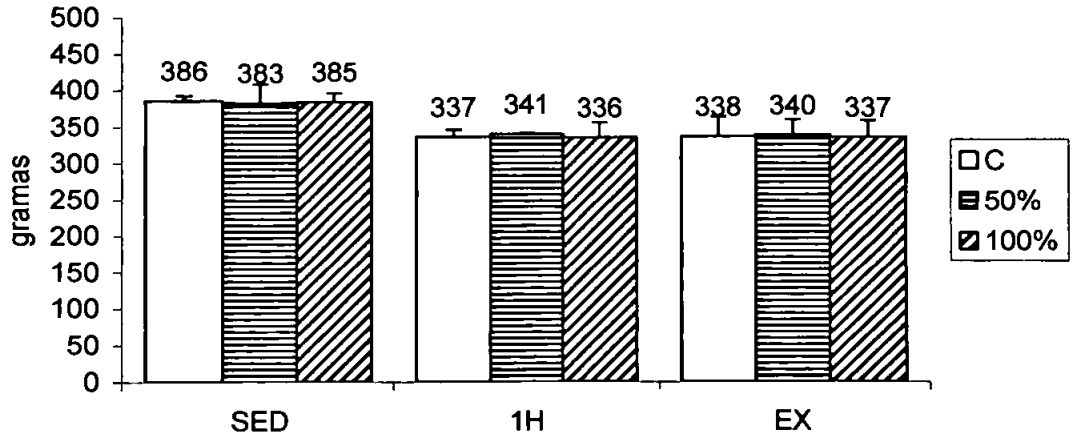


Figura 3. Peso final dos grupos experimentais

Conforme a tabela 8, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos treinados (1H x EX) em relação ao peso final, entretanto, estes foram significantemente menores (12%) em relação aos animais sedentários.

5.3. Consumo de ração

Os consumos diários de ração dos grupos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Consumo de ração (g/dia) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	21,3 ± 1,0 [(a)]	21,6 ± 0,8 [(a)]	21,4 ± 1,0 [(a)]
1H	21,6 ± 1,1 [(a)]	21,6 ± 1,0 [(a)]	20,7 ± 1,6 [(a)]
EX	21,1 ± 0,9 [(a)]	20,7 ± 2,0 [(a)]	21,5 ± 1,5 [(a)]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 2,3
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

De acordo com a tabela 9, o consumo diário de ração não apresentou diferença significativa entre os grupos quando comparados entre si.

Parâmetro de rendimento

5.4. Tempo de tolerância ao esforço

O tempo total de tolerância ao esforço dos grupos submetidos ao teste de exaustão é apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Tempo de tolerância ao esforço (minutos) dos grupos treinados submetidos à exaustão com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
EX	222 ± 47 [(a)]	304 ± 74 [(b)]	126 ± 32 [(c)]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 79
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

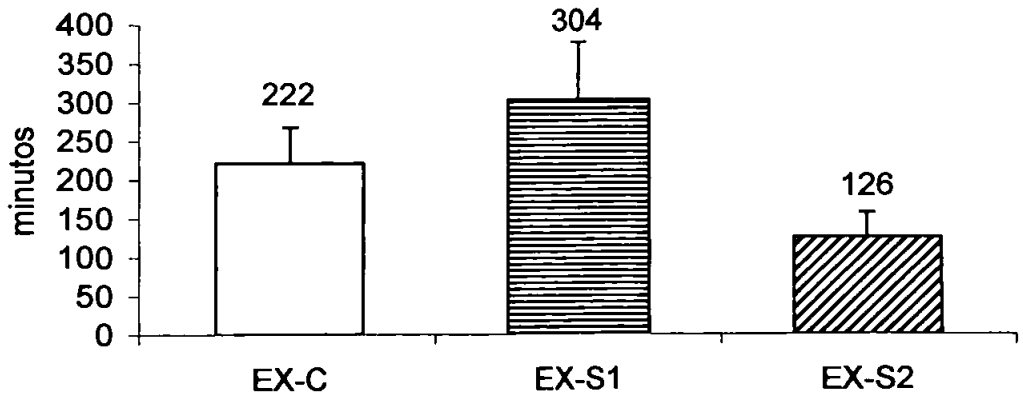


Figura 4. Tempo de tolerância ao esforço dos grupos treinados submetidos à exaustão

De acordo com a tabela 10 e a figura 4, observou-se diferenças significantes no rendimento entre os grupos submetidos à exaustão nas diferentes dietas. O grupo EX-S1 apresentou maior tempo de natação comparado ao EX-C, de 37%, enquanto que o grupo EX-S2 obteve menor tempo, de 43% e 59%, em relação aos grupos EX-C e EX-S1, respectivamente.

Parâmetros bioquímicos

5.5. Atividade máxima da enzima citrato sintase

A atividade máxima da enzima citrato sintase é apresentada na tabela 11.

Tabela 11. Atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo (µmol/min/g de tecido) nos grupos sedentários e treinados (1 hora e exaustão)

Grupo	SED	1H	EX
	3,37 ± 0,73 [a]	5,84 ± 1,33 [b]	5,95 ± 1,05 [b]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 1,60
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

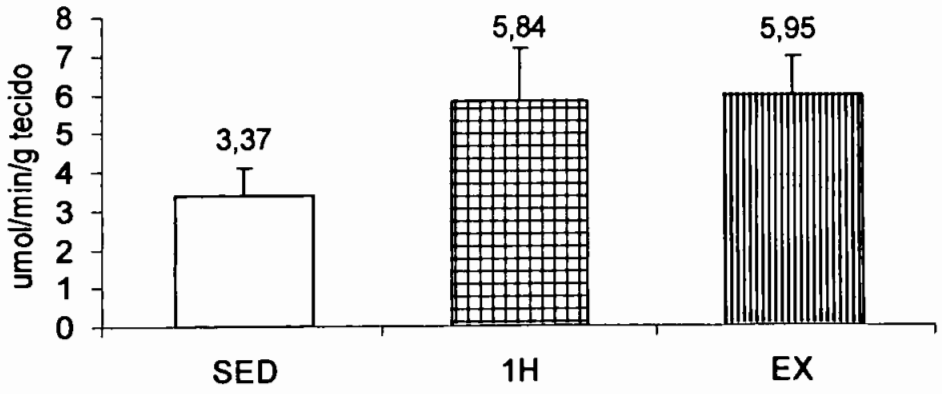


Figura 5. Atividade máxima da enzima citrato sintase nos grupos sedentários e treinados

Conforme a tabela 11 e a figura 5, os grupos treinados (1H e EX) apresentaram aumento significante na atividade da enzima citrato sintase (75%) em relação aos sedentários.

5.6. Glicose

As concentrações plasmáticas de glicose dos grupos estão apresentadas na tabela 12.

Tabela 12. Concentração plasmática de glicose (mg/dL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	141 ± 9 [(a)]	136 ± 13 [(a)]	140 ± 11 [(a)]
1H	145 ± 34 [(a)]	148 ± 13 [(a)]	144 ± 15 [(a)]
EX	56 ± 14 [(b)]	61 ± 13 [(b)]	55 ± 13 [(b)]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 31
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

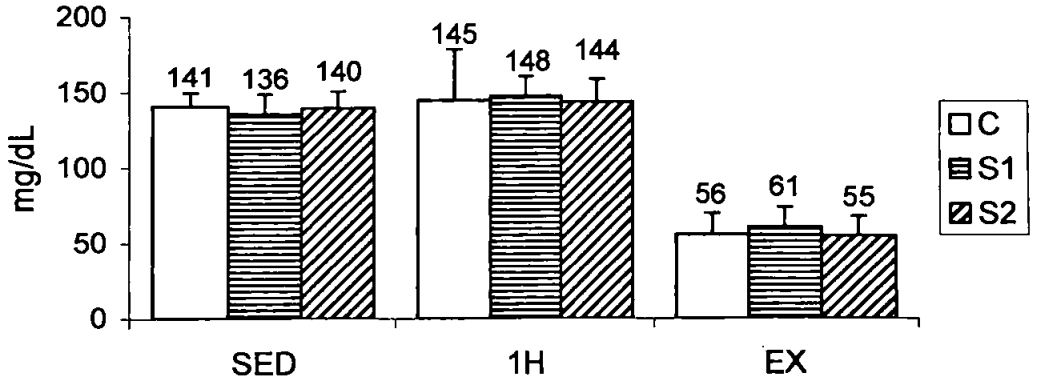


Figura 6. Concentração plasmática de glicose dos grupos experimentais

Conforme a tabela 12, não houve diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os grupos com relação às dietas.

Entretanto, verificou-se diminuição significante de 60% da glicemia nos grupos submetidos à exaustão quando comparados aos grupos com 1

hora de natação e sedentários, sendo que não ocorreram diferenças significantes entre estes dois grupos quando comparados entre si.

5.7. Insulina

As concentrações séricas de insulina dos grupos estão apresentadas na tabela 13.

Tabela 13. Concentração sérica de insulina (ng/mL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	7,89 ± 1,48 [(a)]	7,12 ± 0,66 [(a)]	7,99 ± 1,53 [(a)]
1H	3,03 ± 0,73 [(bc)]	2,89 ± 0,53 [(bcd)]	3,58 ± 0,35 [(b)]
EX	1,48 ± 0,30 [(cd)]	1,43 ± 0,28 [(d)]	2,14 ± 0,27 [(bcd)]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 1,55
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

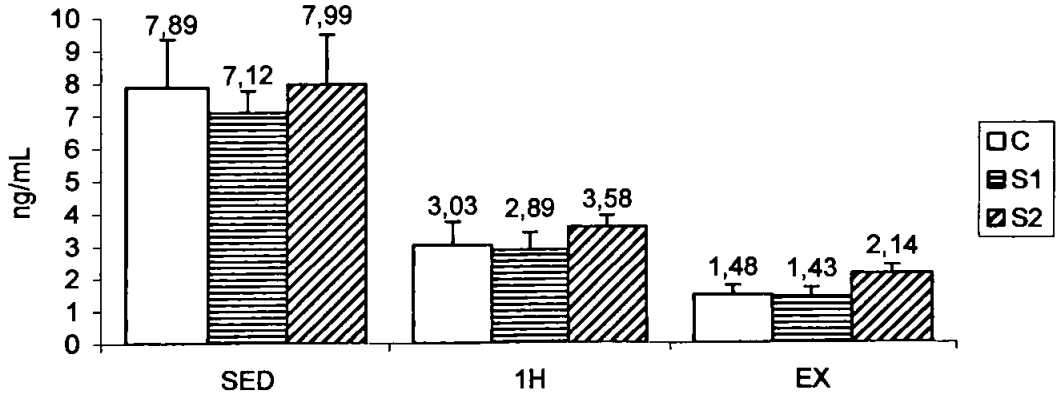


Figura 7. Concentração sérica de insulina dos grupos experimentais

De acordo com a tabela 13, não houve diferenças significantes entre os grupos com relação às dietas. Também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos treinados (1H x EX), todavia estes apresentaram

redução de aproximadamente 3,2 vezes quando comparados aos sedentários.

5.8. Índice glicose / insulina

Os índices glicose / insulina dos grupos estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Índices glicose / insulina dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	18 ± 3 (a)	19 ± 3 (a)	18 ± 3 (a)
1H	44 ± 9 (c)	53 ± 13 (c)	41 ± 7 (bc)
EX	40 ± 11 (bc)	46 ± 13 (c)	26 ± 7 (ab)

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança:
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

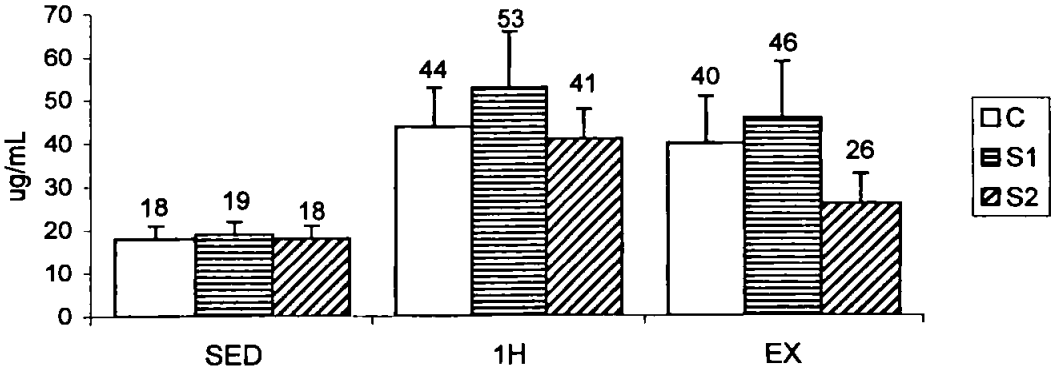


Figura 8. Índices glicose / insulina dos grupos experimentais

Conforme a figura 8, o grupo EX-S2 apresentou redução significante do índice glicose / insulina em relação ao EX-S1, e tendência de redução em relação ao EX-C. Nas condições SED e 1H, não houve alterações significantes entre os grupos quanto às dietas.

5.9. Corticosterona

As concentrações séricas de corticosterona dos grupos estão apresentadas na tabela 15.

Tabela 15. Concentração sérica de corticosterona (ng/mL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	59 ± 18 [a]	60 ± 17 [a]	65 ± 15 [a]
1H	126 ± 19 [bc]	123 ± 13 [bc]	188 ± 20 [d]
EX	152 ± 16 [c]	119 ± 15 [bc]	213 ± 26 [d]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 34
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

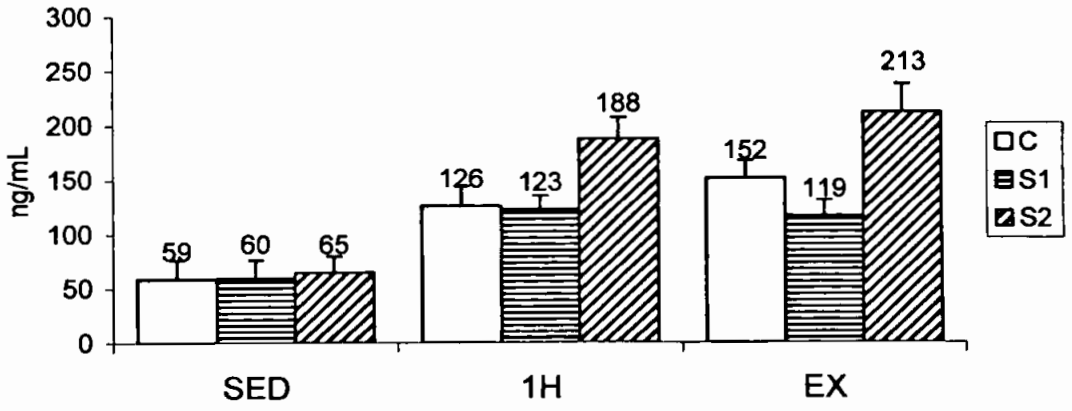


Figura 9. Concentração sérica de corticosterona dos grupos experimentais

Conforme os resultados da tabela 15, as concentrações séricas de corticosterona dos grupos treinados com dieta S2 apresentaram aumento significante em relação aos grupos com dietas C e S1 em ambas condições, de 51% para 1H, e de 57% para EX.

Verificou-se aumento significante de aproximadamente 2,5 vezes dos grupos treinados em comparação aos sedentários.

5.10. Amônia

As concentrações plasmáticas de amônia dos grupos estão apresentadas na tabela 16.

Tabela 16. Concentração plasmática de amônia (μg/mL) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	2,15 ± 0,10 [a]	2,17 ± 0,27 [a]	2,26 ± 0,14 [a]
1H	2,76 ± 0,52 [a]	2,56 ± 0,40 [a]	3,35 ± 0,82 [a]
EX	9,54 ± 2,03 [c]	6,28 ± 0,95 [b]	12,76 ± 0,92 [d]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 1,66
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

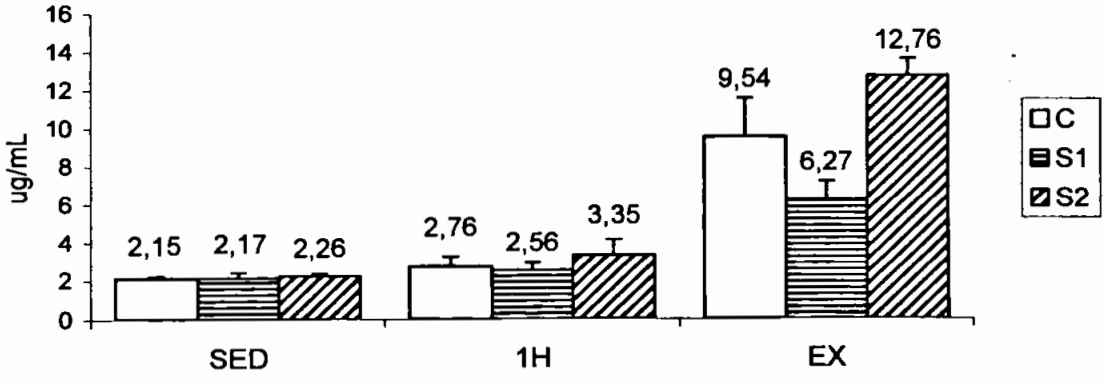


Figura 10. Concentração plasmática de amônia dos grupos experimentais

De acordo com a tabela 16, observou-se que os grupos SED e 1H não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de amônia com relação às dietas.

O grupo EX-S2 apresentou valores significantemente maiores em relação ao EX-C e S1, de 33,7% e 103,5% respectivamente, e o EX-S1 apresentou diminuição de 34,2% comparada ao C. Os grupos da condição

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

de exaustão apresentaram aumento significante de aproximadamente 4,3 vezes em relação aos sedentários.

5.11. Lactato

As concentrações sangüíneas de lactato dos grupos estão apresentadas na tabela 17.

Tabela 17. Concentração sangüínea de lactato (mmol/L) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	1,3 ± 0,2 [(a)]	1,3 ± 0,4 [(a)]	1,3 ± 0,2 [(a)]
1H	14,4 ± 1,3 [(b)]	14,0 ± 1,8 [(b)]	16,0 ± 3,2 [(b)]
EX	19,0 ± 2,6 [(b)]	18,6 ± 5,0 [(b)]	19,2 ± 4,8 [(b)]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 5,2
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

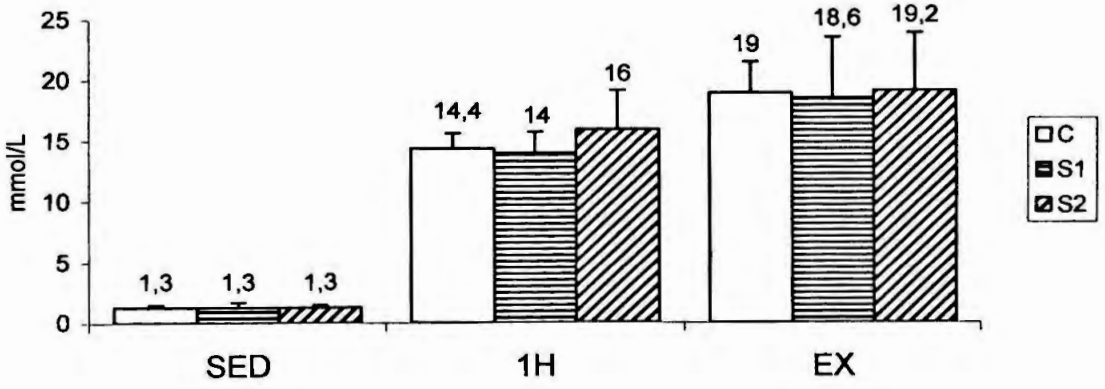


Figura 11. Concentração sangüínea de lactato dos grupos experimentais

Conforme a tabela 17, não houve diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de lactato sangüíneo entre os grupos experimentais quanto às dietas.

Os grupos treinados (1H e EX) não apresentaram alterações significantes entre si, entretanto apresentaram aumento significante de aproximadamente 13 vezes quando comparados aos sedentários.

5.12. Glicogênio hepático

As concentrações de glicogênio hepático dos grupos estão apresentadas na tabela 18.

Tabela 18. Concentração de glicogênio hepático (mg/100 mg de tecido) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	1,20 ± 0,24 [a]	1,37 ± 0,33 [a]	1,18 ± 0,31 [a]
1H	0,76 ± 0,16 [b]	0,72 ± 0,21 [b]	0,79 ± 0,15 [b]
EX	0,10 ± 0,02 [c]	0,33 ± 0,04 [c]	0,32 ± 0,03 [c]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 0,37
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

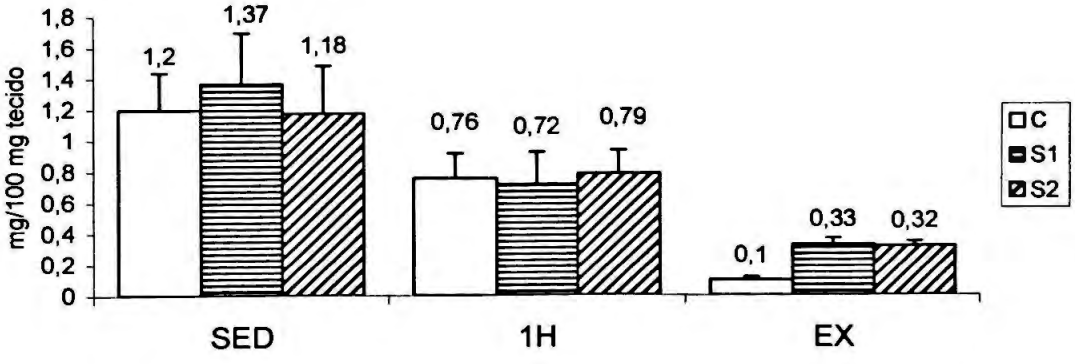


Figura 12. Concentração de glicogênio hepático dos grupos experimentais

De acordo com a tabela 18, não foram observadas diferenças significantes na concentração de glicogênio hepático entre os grupos quanto às dietas.

Houve redução significante nos grupos com condição de exaustão em relação aos de 1 hora, de 86,8%, 54,2% e 59,5% com dietas C, S1 e S2, respectivamente. Apesar de não significante, observou-se uma forte tendência dos grupos EX-S1 e S2 apresentarem aumento (225%) em relação ao EX-C.

Além disso, os grupos treinados apresentaram valores significantemente menores em relação aos sedentários.

5.13. Glicogênio muscular – gastrocnêmio

As concentrações de glicogênio do músculo gastrocnêmio dos grupos estão apresentadas na tabela 19.

Tabela 19. Concentração de glicogênio muscular - gastrocnêmio (mg/100 mg de tecido) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	0,22 ± 0,03 [(a)]	0,22 ± 0,04 [(a)]	0,22 ± 0,05 [(a)]
1H	0,20 ± 0,06 [(ab)]	0,24 ± 0,06 [(a)]	0,21 ± 0,05 [(a)]
EX	0,11 ± 0,03 [(c)]	0,13 ± 0,03 [(bc)]	0,10 ± 0,02 [(c)]

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 0,07
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

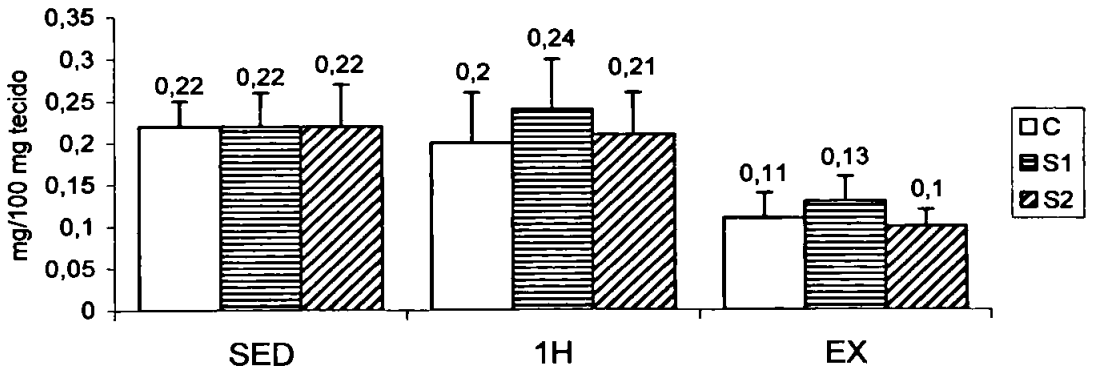


Figura 13. Concentração de glicogênio muscular (gastrocnêmio) dos grupos experimentais

De acordo com a tabela 19, não foram observadas diferenças significantes na concentração de glicogênio muscular entre os grupos quanto às dietas.

Nos grupos treinados foi verificada diminuição significante de 50% na condição de exaustão em relação à condição de 1 hora. Não foram

observadas diferenças significantes nos grupos 1H com relação aos sedentários, ao contrário dos EX.

5.14. Glicogênio muscular – sóleo

As concentrações de glicogênio do músculo sóleo dos grupos estão apresentadas na tabela 20.

Tabela 20. Concentração de glicogênio muscular - sóleo (mg/100 mg de tecido) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	0,29 ± 0,07 (bcd)	0,33 ± 0,02 (ab)	0,31 ± 0,03 (bcd)
1H	0,33 ± 0,08 (ab)	0,41 ± 0,02 (a)	0,34 ± 0,03 (ab)
EX	0,23 ± 0,05 (d)	0,33 ± 0,05 (abc)	0,24 ± 0,03 (d)

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 0,09
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

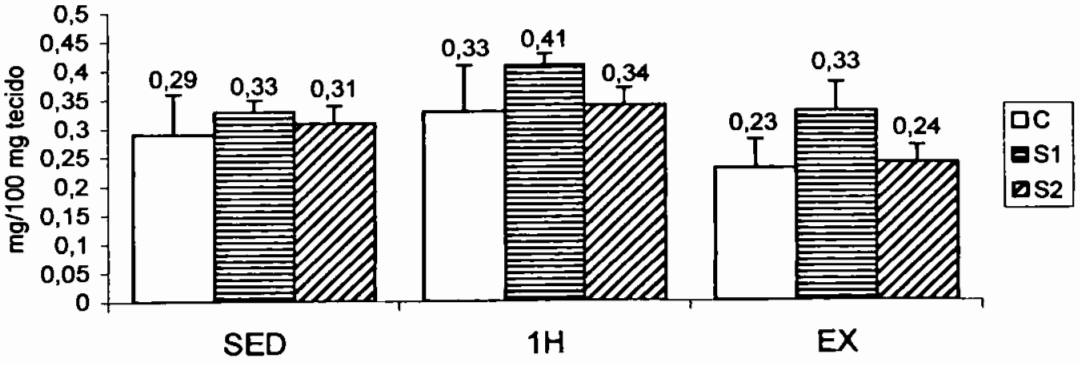


Figura 14. Concentração de glicogênio muscular (sóleo) dos grupos experimentais

Observou-se, conforme a tabela 20, que as concentrações de glicogênio do músculo sóleo na condição EX apresentaram aumento significante de 40% no grupo S1 em relação aos grupos C e S2. Na condição EX em relação à condição 1H, houve diminuição significante nos

grupos C e S2, de 30,3% e 29,4%, respectivamente. Os grupos treinados não apresentaram diferenças significantes em relação aos sedentários.

5.15. Taxa de degradação de glicogênio hepático e muscular

O cálculo da taxa de degradação de glicogênio dos tecidos foi efetuado a partir da diferença da concentração de glicogênio da condição 1H e da condição EX. O resultado dessa diferença foi então dividido pelo tempo total de natação da condição EX, sendo que desse tempo descontou-se 60 minutos. Dessa forma, se obteve a taxa de consumo do glicogênio de cada tecido a partir do período de 1 hora de natação até a exaustão, conforme apresentado na tabela 21.

Tabela 21. Taxa de degradação de glicogênio (10^{-4} mg/100mg tecido/min) nos diferentes tecidos dos grupos treinados com dieta controle (C) e suplementada (S1 e S2)

Grupos	Fígado	Gastrocnêmio	Sóleo
C	37 (b)	6 (b)	10 (b)
S1	15 (c)	6 (b)	3 (c)
S2	83 (a)	24 (a)	15 (a)

Dados expressos como média
Valores críticos de Tukey com 95% de confiança: 8 (fígado), 7 (gastrocnêmio) e 4 (sóleo)
Para cada coluna, médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

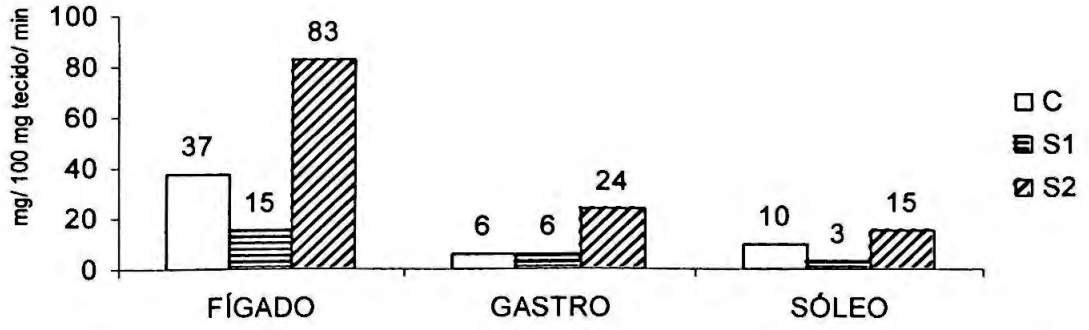


Figura 15. Taxa de degradação de glicogênio nos diferentes tecidos dos grupos experimentais treinados

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Conforme a tabela 21 e a figura 15, os grupos S2 de cada tecido apresentaram aumento significante da taxa de degradação de glicogênio em relação aos grupos S1 e C.

5.16. Ácidos graxos livres

As concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres dos grupos estão apresentadas na tabela 22.

Tabela 22. Concentração plasmática de ácidos graxos livres (mmol/L) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	0,15 ± 0,04 (a)	0,16 ± 0,03 (a)	0,16 ± 0,04 (a)
1H	0,27 ± 0,05 (b)	0,29 ± 0,07 (b)	0,25 ± 0,04 (b)
EX	0,26 ± 0,04 (b)	0,27 ± 0,05 (b)	0,26 ± 0,04 (b)

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 0,08
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

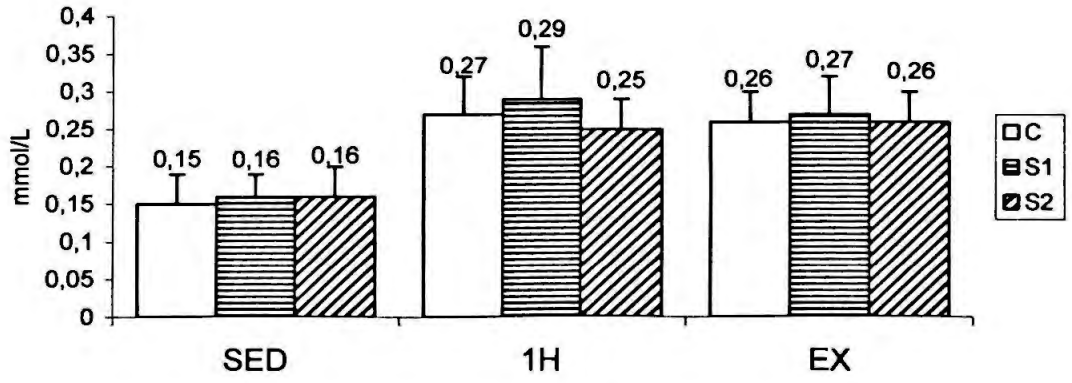


Figura 16. Concentração plasmática de AGL dos grupos experimentais

De acordo com a tabela 22, não houve diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres entre os grupos quanto às dietas e condições de exercício (1H e EX), porém houve aumento de 63% nos grupos treinados em relação aos sedentários.

5.17. Serotonina – hipotálamo

As concentrações de serotonina do hipotálamo dos grupos estão apresentadas na tabela 23.

Tabela 23. Concentração de serotonina do hipotálamo (pg/mg de tecido fresco) dos grupos experimentais sedentários e treinados nas condições de 1 hora e exaustão, com dieta controle e suplementada

Grupos	C	S1	S2
SED	152 ± 14 (ab)	142 ± 41 (a)	158 ± 41 (ab)
1H	242 ± 60 (abc)	256 ± 52 (abc)	273 ± 45 (bcd)
EX	330 ± 74 (cd)	322 ± 95 (cd)	385 ± 109 (d)

Dados expressos como média ± desvio padrão
Valor crítico de Tukey com 95% de confiança: 122
Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante para $p < 0,05$

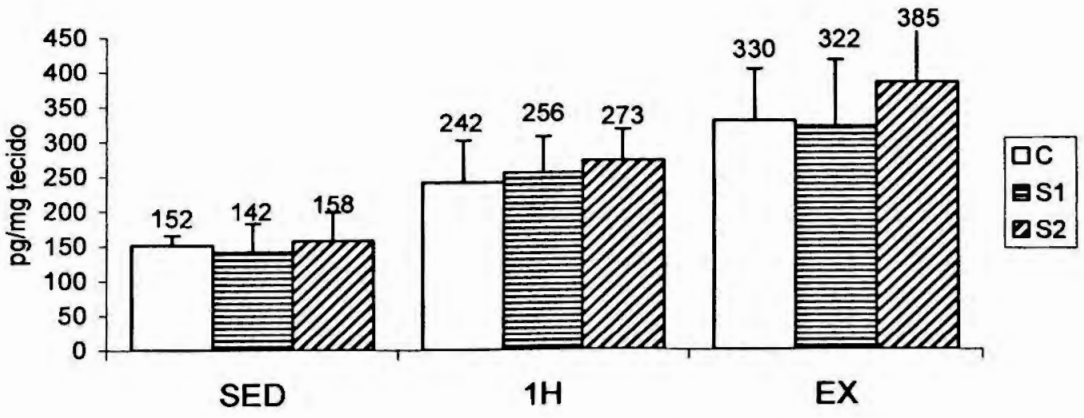


Figura 17. Concentração de serotonina dos grupos experimentais

Conforme os resultados da concentração de serotonina hipotalâmica descritos na tabela 23, não houve diferença significante entre os grupos quanto às dietas. Observou-se uma tendência de aumento (34%) nos grupos da condição de exaustão quando comparados aos da condição de 1 hora. Além disso, nos grupos submetidos à exaustão, houve aumento significante de 2,3 vezes em relação aos sedentários.

6. DISCUSSÃO

No presente experimento foram estudados os efeitos de dietas suplementadas com aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), de forma crônica, em ratos treinados em natação com atividade moderada, visando estabelecer sua relação com a fadiga. Os animais exercitados tiveram o mesmo protocolo de treinamento durante as seis semanas, sendo que no último dia do experimento foram sacrificados em duas condições: após 1 hora de natação e após o teste de tolerância ao esforço. Assim, foram pesquisados os mecanismos que levam à fadiga, bem como a relação destes com a fadiga periférica e/ou central.

6.1. Parâmetros biométricos

Todos os grupos apresentaram a mesma média de peso inicial (tabela 7), e ao término do experimento não houve diferença estatisticamente significante no peso final para os grupos treinados. Isso demonstra que as dietas suplementadas (S1 e S2) não interferiram no peso final desses grupos. Entretanto, os grupos treinados (1H e EX) apresentaram redução significante no peso final de aproximadamente 12% em relação aos sedentários (tabela 8), sendo que este resultado pode ser atribuído ao aumento no gasto energético provocado pelo exercício físico (CALLES-ESCANDON & HORTON, 1992).

O consumo de ração não se diferiu entre os grupos (tabela 9), indicando que as suplementações com ACR não modificaram o consumo alimentar dos ratos, assim como os resultados encontrados por ANDERSON, TEWS & HARPER (1990) e SHIMOMURA *et al.* (2000), que também administraram ACR em ratos através da dieta.

Na literatura pesquisada é possível constatar diferentes técnicas associadas à administração de suplementos a animais com ACR ou outros aminoácidos. Tais métodos podem ser: injeção intraperitoneal, segundo

CALDERS *et al.* (1997,1999); administração por gavagem, conforme MARQUEZI (2000) e MENEGUELLO *et al.* (2003); através da água do bebedouro, de acordo com LANCHA Jr. *et al.* (1995); através da ração, conforme ROSSI (2001) e SHIMOMURA *et al.* (2000), tais como no presente estudo. A suplementação via dieta seria uma forma fisiologicamente mais aceitável quando comparada às técnicas impostas, como gavagem e injeção intraperitoneal. A ração que foi utilizada contém a composição nutricional sugerida para roedores de laboratório, recomendada pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-93). Portanto, os ACR foram adicionados tendo como referência valores já estabelecidos (REEVES, NIELSEN & FAHEY, 1993).

6.2. Parâmetro de rendimento

O tempo de natação dos grupos submetidos ao teste de tolerância ao esforço é o principal parâmetro para avaliar os efeitos das suplementações com ACR em relação ao desempenho físico. Dessa forma, esses resultados também serão discutidos juntamente com os parâmetros bioquímicos, já que há interação de diversos fatores para o desenvolvimento da fadiga.

Os resultados demonstraram que o grupo EX-S1 foi o que apresentou o maior tempo de natação (37%) em relação ao EX-C, em média 82 minutos a mais. Entretanto, o grupo EX-S2 apresentou o menor tempo de natação, em relação ao EX-C e S1 (tabela 10). Desse modo, constatamos que a dieta S1 promoveu efeito benéfico com relação ao rendimento, enquanto a dieta S2 resultou em efeito negativo no desempenho dos ratos.

Em concordância com nosso resultado de aumento do rendimento no grupo EX-S1, ROSSI (2001), utilizando o mesmo protocolo de treinamento em animais, apresentou aumento de 29,7% no tempo até exaustão do grupo suplementado com ACR em relação ao controle. CALDERS *et al.* (1997) administrando 30 mg de ACR intraperitonealmente 5 minutos antes do teste de exaustão em esteira, em ratos alimentados, observaram aumento de 33,9% no tempo de rendimento no grupo suplementado em relação ao placebo, que recebeu somente solução salina. CALDERS *et al.* (1999), com

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

o mesmo protocolo citado anteriormente, porém em ratos com 24 h de jejum, encontraram aumento de 30,3% no grupo suplementado em comparação ao placebo. Estudos com humanos também verificaram efeitos benéficos da suplementação com ACR no rendimento, tais como HEFLER *et al.* (1995), MITLEMAN, RICCI & BAILEY (1998) e BLOMSTRAND *et al.* (1991).

6.3. Parâmetros bioquímicos

A eficiência do protocolo de treinamento utilizado foi avaliada pela atividade máxima da enzima citrato sintase, e como os resultados entre os grupos suplementados e controle foram homogêneos, estes foram agrupados nas condições SED, 1H e EX. Observou-se aumento de 75% na atividade da enzima citrato sintase nos grupos treinados em relação ao sedentário (tabela 11), o que indica que a natação realizada com sobrecarga de 5% do peso corpóreo aumentou a capacidade oxidativa da musculatura treinada (LANCHA Jr. *et al.*, 1995).

Quanto ao perfil glicêmico em nosso estudo, este não foi influenciado pelas suplementações, visto que não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos com relação às dietas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na condição de 1 hora e os sedentários (tabela 12), de acordo com os resultados de SHIMOMURA *et al.* (2000). Entretanto, ocorreu diminuição da glicemia na condição de exaustão em relação à condição de 1 hora de natação, em concordância com os resultados de LANCHA Jr. (1991).

Segundo SAHLIN (1992), a concentração da glicose plasmática diminui após exercício prolongado devido à depleção do glicogênio hepático, podendo prejudicar o sistema nervoso central (SNC). Sabe-se que o sistema nervoso central, ao contrário do tecido muscular, utiliza preferencialmente glicose sangüínea como substrato energético, e sua atividade pode ser prejudicada quando ocorre hipoglicemia (NEWSHOLME & LEECH, 1988). Deste modo, a manutenção da glicemia durante a atividade física, a partir da

gliconeogênese e glicogenólise hepáticas, é fundamental para a continuidade do esforço (HOLLOSZY, KOHRT & HANSEN, 1998).

A concentração de insulina sérica apresentou redução na condição EX em relação à 1H (tabela 13), o que pode estar relacionado à supressão da síntese protéica observada em exercícios prolongados (HARGREAVES, 1995). Além disso, o grupo EX-S2 apresentou redução do índice glicose/insulina em relação aos grupos EX-C e EX-S1 (tabela 14), o que pode indicar o possível desenvolvimento de resistência periférica à insulina (FLIER, 1983).

Segundo PASQUALE (1997), durante o exercício prolongado ocorre aumento nas concentrações plasmáticas de glucagon e glicocorticóides, os quais podem promover uma diminuição na síntese e aumento da degradação protéica. A resposta fisiológica decorrente da redução da glicemia e insulinemia causadas pelo teste exaustivo pode ocasionar aumento dos hormônios contra-regulatórios (glucagon, catecolaminas e cortisol) para não comprometer o funcionamento do cérebro e outros tecidos que utilizam a glicose como combustível (MAUGHAN, GLEESON & GREENHAFF, 2000). Sabe-se que a corticosterona é um hormônio relacionado com o estresse causado pelo exercício físico, uma vez que a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise resulta na secreção do hormônio adrenocorticotrófico, e posteriormente na liberação de glicocorticóides (KOYAMA *et al.*, 1998).

Observou-se aumento significativo na concentração de corticosterona sérica nos grupos S2 em condições de 1 hora e exaustão (tabela 15), sendo que no grupo EX-S2 houve menor tempo de natação em relação aos outros. Dessa forma, os grupos S2 poderiam estar mais sujeitos ao estresse causado pelo exercício, evidenciado pela fadiga mais precoce.

Assim, fatores comuns entre todos os estados de estresse fisiológico são representados pelo aumento das concentrações séricas de cortisol e glucagon, associados ao aumento da necessidade de precursores gliconeogênicos pelo fígado, tais como a glutamina (DOHM *et al.* 1985; VIRU, 1987; ARDAWI, 1988; MACKINNON & HOPPER, 1996). Além disso,

a diminuição dos estoques de glicogênio hepático, verificada no exercício físico aumenta a capacidade do fígado de sintetizar glicose e uréia a partir da glutamina sendo este mecanismo dependente, também, do aumento da concentração sangüínea de glicocorticóides e glucagon (BORBA-MURAD *et al.*, 1998).

Conforme KOYAMA *et al.* (1998), ratos submetidos ao exercício agudo (esteira) apresentaram elevação significativa das concentrações séricas de corticosterona (2,5 vezes) após 120 minutos de exercício. No estudo de ROGERO (2002), os animais submetidos ao teste de exaustão (natação) em atividade intensa apresentaram aumento da concentração de corticosterona sérica de 2,5 a 3,1 vezes, e diminuição média da insulina de 50%, em comparação aos seus respectivos grupos sedentários. SHIMOMURA *et al.* (2000), assim como em nosso estudo, suplementaram os animais com ACR através da dieta em duas doses diferentes, apresentaram diminuição média da insulina em 51% dos grupos treinados (esteira) em relação aos sedentários, também não encontrando diferenças significantes quanto às dietas. ROSSI (2001) também observou diminuição significativa de aproximadamente 57% na insulina sérica em ratos submetidos à exaustão (natação) em atividade moderada, em comparação aos sedentários. Dessa forma, os resultados desses estudos estão de acordo com os do presente trabalho, no qual houve aumento significativo, nos grupos exercitados, de aproximadamente 2,5 vezes na concentração de corticosterona sérica (tabela 15), e queda significativa de aproximadamente 3,2 vezes para a concentração de insulina sérica (tabela 13), em relação aos sedentários, reforçando as considerações assinaladas de que esses parâmetros são alterados no exercício físico.

Verificou-se uma forte relação entre os resultados da concentração de amônia e do tempo de tolerância ao esforço, visto que em ambos parâmetros houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos C, S1 e S2, constatando uma relevante influência da amônia no desempenho desses grupos treinados:

-EX-S2: maior concentração de amônia e menor rendimento;
-EX-S1: menor concentração de amônia e maior rendimento;
-EX-C: concentração de amônia e rendimento intermediários aos EX-S1 e S2.

ROSSI (2001) também encontrou menor concentração de amônia no grupo treinado submetido ao teste de exaustão e suplementado com ACR em comparação ao grupo controle, sendo que o mesmo também apresentou maior tempo de natação até exaustão em comparação ao controle. O estudo de CALDERS *et al.* (1997) apresentou maior tempo de corrida até exaustão no grupo suplementado com ACR em relação ao placebo, entretanto, em discordância com nossos dados, esse grupo apresentou maior concentração de amônia. A controvérsia entre os resultados de amônia plasmática desses estudos pode ser justificada pelas diferenças nos protocolos experimentais, tais como: a via de administração, a quantidade e o tempo de ingestão do suplemento com ACR. Ressalta-se que a forma de administração do suplemento utilizado por ROSSI (2001) e no presente experimento foi crônica e através da dieta, o que pode ter proporcionado um efeito adaptativo, uma vez que na maioria dos estudos com animais é de forma aguda e através de gavagem ou injeção intraperitoneal.

É fato conhecido que a amônia plasmática aumenta durante o exercício (BANISTER, RAJENDRA & MUTCH, 1985; ERIKSSON *et al.*, 1985 *apud* OKAMURA *et al.*, 1987) tanto de alta intensidade e curta duração como em exercícios prolongados (SAHLIN & BROBERG, 1990; SAHLIN, 1992), sendo que sua produção começa no início do exercício e aumenta progressivamente (HARGREAVES, 1995). A síntese de amônia no músculo pode se originar da atividade do Ciclo Purina Nucleotídeo, pela deaminação do AMP em IMP, ou pela maior captação muscular de BCAA para oxidação (BANISTER, RAJENDRA & MUTCH, 1985; BIANCHI, GROSSI & BARGOSSI, 1997). A amônia circulante é captada pelo fígado e uma grande parte é detoxificada no ciclo hepático da uréia. Entretanto, a formação acelerada de amônia tende a exceder a detoxificação hepática devido à diminuição do fluxo sangüíneo hepático, que diminui durante exercício

moderado cerca de 30%, e intenso cerca de 50-60 % (FELIG & WAHREN, 1971; OKAMURA *et al.*, 1987). A amônia também pode ser removida pela formação de glutamato, catalizada pela enzima glutamato desidrogenase; pela síntese de glutamina, catalizada pela glutamina sintetase; por reações de transaminação dos α- cetoácidos a aminoácidos, além da difusão de amônia do tecido para o sangue (BANISTER, RAJENDRA & MUTCH, 1985).

Assim, o fluxo da amônia produzida na musculatura esquelética exercitada faz com que o fígado atue na detoxificação, e o sangue como difusor e reservatório temporal da amônia circulante. Alguns pesquisadores afirmam que a concentração plasmática de amônia é o parâmetro mais adequado de avaliação da intensidade do exercício do que o lactato, já que sob condições de exercício estressante a produção de amônia é diretamente proporcional à atividade da musculatura (BANISTER, RAJENDRA & MUTCH, 1985). Portanto, esta hiperamonemia na musculatura pode levar à fadiga periférica, podendo comprometer outros órgãos, como fígado e cérebro, gerando fadiga central por excesso de amônia no cérebro e incapacidade de detoxificação dos órgãos periféricos. Fatores como: aumento na permeabilidade da barreira hemato-encefálica aos aminoácidos neutros, aumento plasmático dos AGL, corpos cetônicos e diminuição nos conteúdos de glicogênio hepático, muscular, cardíaco e cerebral, podem estar associados a hiperamonemia. Dessa forma, a hiperamonemia induzida pelo exercício prolongado é relacionada, na literatura, tanto à fadiga central como periférica (BIANCHI, GROSSI & BARGOSSI, 1997, BANISTER, RAJENDRA & MUTCH, 1985; MUTCH & BANISTER, 1983, BANISTER & CAMERON, 1990; MITTLEMAN, RICCI & BAILEY, 1998).

De acordo com os dados de diferentes autores, as concentrações sangüíneas de amônia em exercícios de intensidade moderada (< 50% $VO_{2\ max}$) não são alteradas de forma acentuada, enquanto um aumento mais evidente aparece em intensidades de 70-80% $VO_{2\ max}$, e um aumento desproporcional quando a intensidade é de 100% $VO_{2\ max}$. (SCHLICHT *et al.*, 1990; KATZ *et al.*, 1986). Além do exercício, tem sido demonstrado que a

ingestão de ACR aumenta a amônia plasmática (MacLEAN & GRAHAM, 1993; MacLEAN, GRAHAM & SALTIN, 1994; VAN HALL *et al.*, 1995; MITTLEMAN, RICCI & BAILEY, 1998), sendo também relatada uma produção elevada de amônia plasmática com suplementação de ACR associada a exercício prolongado (MacLEAN, GRAHAM & SALTIN, 1994; MacLEAN & GRAHAM, 1993; CALDERS, 1999; CALDERS *et al.*, 1997; OKAMURA *et al.*, 1987). Segundo BANISTER, RAJENDRA & MUTCH (1985) e BIANCHI, GROSSI & BARGOSSI (1997), a hiperamonemia indica menor ressíntese de ATP com aumento da atividade do Ciclo Purina Nucleotídeo, que está relacionado com a fadiga regional e periférica.

Conforme as considerações descritas, observamos em nossos resultados que o acentuado aumento de amônia no grupo EX-S2 pode ter sido altamente tóxico, induzindo à fadiga precoce, podendo estar relacionado tanto à fadiga muscular quanto à cerebral. Esse fato possivelmente está associado à maior quantidade de ACR consumida pelo grupo, que pode ter ocasionado uma limitação na capacidade de detoxificação de amônia. Entretanto, o oposto ocorreu no grupo EX-S1, que apresentou menor concentração de amônia. Esse resultado pode ter sido causado por um mecanismo de detoxificação de amônia mais eficiente (MENEGUELLO *et al.*, 2003), e desse modo, ter contribuído para o melhor desempenho desse grupo. Nesse caso, acreditamos que esse "nível" de suplementação tenha sido benéfico durante a atividade física, e dessa forma, retardou por mais tempo o processo de fadiga. Já para o grupo EX-C, supõe-se que o exercício físico prolongado *per se* seja o responsável por sua amonemia, já que esse grupo não recebeu suplementação com ACR.

Foram observados aumento significante nas concentrações de amônia plasmática nos grupos com condição de exaustão em relação aos sedentários, de aproximadamente 4,3 vezes (tabelas 16). ROGERO (2002), submetendo ratos ao teste de exaustão em atividade intensa, verificou aumento na concentração de amônia no plasma de aproximadamente 7 vezes em relação aos grupos sedentários. Resultados semelhantes também foram verificados por SAHLIN, KATZ & BROBERG (1990) quando

submeteram indivíduos ao exercício em ciclo ergômetro até a fadiga. Assim sendo, o aumento acentuado da concentração de amônia imediatamente antes do processo de fadiga está relacionado possivelmente ao aumento da deaminação do AMP intramuscular decorrente do déficit de energia, da depleção dos estoques de glicogênio e da redução das concentrações de piruvato e intermediários do Ciclo de Krebs.

Com relação às concentrações de lactato sangüíneo deste experimento, não foi demonstrada influência das suplementações sobre esse parâmetro. Alguns estudos mostram que exercícios de intensidade moderada causam apenas ligeiro aumento nas concentrações de lactato, bem como pequena redução nas concentrações plasmáticas de bicarbonato. Ao contrário, exercícios de alta intensidade causam acentuada redução no pH (SHARP *et al.*, 1986) associada à elevação nas concentrações de lactato e íons hidrogênio, este último apontado como a principal causa na redução do desempenho físico, geradora de fadiga (IBANEZ *et al.*, 1995). Entretanto, no presente estudo houve um aumento médio significativo de 13 vezes do grupo 1H em relação aos sedentários, demonstrando que o exercício moderado, no qual os grupos treinados foram submetidos, foi capaz de proporcionar uma elevação acentuada nesse parâmetro.

As concentrações de glicogênio hepático e muscular (gastrocnêmio) não diferiram entre os grupos quanto ao tipo de dieta, com exceção do glicogênio no músculo sóleo, onde o grupo EX-S1 apresentou maior concentração em relação aos EX-C e S2 (tabelas 18, 19 e 20). Todos os grupos treinados apresentaram valores significativamente menores de glicogênio hepático em relação aos sedentários, constatando a utilização desse substrato durante o exercício. Para o glicogênio muscular, no gastrocnêmio, apenas não houve diferença nos grupos 1H em relação aos sedentários, indicando que atividades com menor duração, como 1 hora de natação, consomem menos glicogênio nesse músculo. No sóleo, tanto os grupos 1H quanto os EX não apresentaram diferenças significativas em

relação aos sedentários, sugerindo que esse músculo poupou mais glicogênio em relação aos outros tecidos.

De uma forma geral, houve redução significativa nos grupos com condição de exaustão em relação aos com 1 hora de natação no glicogênio dos tecidos analisados. Isso demonstra que o glicogênio, após o período de 1 hora de natação, já começa ser degradado de forma acentuada, com exceção do glicogênio do músculo sóleo no grupo EX-S1, mostrando que a dieta S1 foi mais eficaz na preservação de glicogênio no sóleo até a exaustão em relação às outras dietas, o que possivelmente influenciou no seu maior rendimento. BLOMSTRAND, SONJA & NEWSHOLME (1996) também observaram que a suplementação com ACR, em humanos, pode diminuir a degradação de glicogênio muscular durante o exercício. Entretanto, o grupo EX-S2 apresentou redução significativa em relação ao EX-S1, indicando maior degradação de glicogênio no músculo sóleo durante o exercício.

As fibras musculares do tipo I, predominantes no músculo sóleo, possuem grande capacidade oxidativa, utilizando ácidos graxos livres como substrato. Já as fibras musculares do tipo IIa, predominantes no músculo gastrocnêmio possuem capacidade oxidativa e glicolítica moderadas podendo utilizar tanto ácidos graxos livres quanto glicogênio como substratos energéticos (SALTIN, HENRIKSSON & NYGAARD, 1977; ESSÉN-GUSTAVSSON & BLOMSTRAND, 2002).

Além disso, observou-se maior conteúdo de glicogênio hepático (tendência) nos grupos submetidos à exaustão que receberam as dietas S1 e S2, em relação ao grupo C (tabela 18). SHIMOMURA *et al.* (2000), que avaliaram o efeito da suplementação crônica de ACR em ratos através da dieta, também observaram os mesmo efeitos, sugerindo que as dietas suplementadas com ACR são capazes de preservar os estoques de glicogênio no fígado durante o exercício prolongado. É provável que esse efeito seja regulado pelo aumento da atividade hepática do complexo enzimático desidrogenase de α-cetoácido de cadeia ramificada, o que indica

que a dieta suplementada com BCAA aumenta o catabolismo dos BCAA no fígado. Além disso, tem sido reportado que a ressíntese de glicogênio hepático é promovida pela supressão da ativação do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDH) em ratos (HOLNESS, FRENCH & SUGDEN, 1986), portanto esse complexo exerceria um importante papel na síntese de glicogênio, embora se necessite de mais estudos para elucidar tal mecanismo.

Desse modo, no presente estudo as dietas suplementadas com BCAA (S1 e S2) apresentaram maior concentração de glicogênio hepático em relação à dieta controle, entretanto, apresentaram tempos de natação totalmente distintos (S1: 304 min e S2: 126 min). Para melhor entendimento do processo de utilização do glicogênio pelos grupos exercitados até a exaustão, foi realizado o cálculo da taxa de degradação de glicogênio. Assim, pode-se observar claramente (tabela 21) que o grupo S1 apresentou menores taxas de degradação de glicogênio hepático e muscular por minuto de natação em relação aos grupos C e S2, o que pode ter sido essencial para seu melhor desempenho. Em contrapartida, o grupo S2 apresentou maiores taxas de consumo de glicogênio hepático e muscular por minuto de natação em relação aos grupos C e S1, o que pode ter relação com seu menor desempenho.

Segundo WAGENMAKERS (1998), com a intenção de manter a atividade do metabolismo oxidativo, o fígado e a musculatura esquelética aumentam a utilização de aminoácidos circulantes para produção de energia. O tecido muscular, ao contrário do fígado, é capaz de oxidar somente seis aminoácidos: isoleucina, valina, leucina, aspartato, asparagina e glutamato. O catabolismo destes aminoácidos pelo tecido muscular mantém a atividade oxidativa, ao gerar intermediários para o ciclo de Krebs. No fígado, servem como substratos para síntese de glicose a partir da neoglicogênese. Durante exercício físico prolongado, o glicogênio muscular apresenta-se como o combustível primário, porém, a diminuição da sua concentração acarreta na diminuição do fluxo de substratos pela via glicolítica e diminuição da taxa de oxidação de ácidos graxos livres pelo ciclo

de Krebs. De acordo com os estudos sobre a participação da enzima alanina aminotransferase no processo anaplerótico de intermediários do ciclo de Krebs durante o exercício, a queda da concentração de glicogênio muscular leva a diminuição da capacidade de anaplerose e, conseqüente diminuição dos intermediários do ciclo de Krebs. Este fato acarreta na diminuição da atividade desse ciclo levando a diminuição no desempenho físico.

Esse processo de anaplerose de intermediários do ciclo de Krebs é dependente da disponibilidade de piruvato (derivado da glicólise), entretanto a redução dos estoques de glicogênio devido ao exercício prolongado leva a gradual ativação do complexo enzimático desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada, que exerce um papel chave na via de degradação de ACR (SAHLIN, KATZ & BROBERG, 1990; WAGENMAKERS, 1991). O aumento do catabolismo de ACR e a concentração sérica elevada de corticosteróides durante o exercício acarretam em liberação acentuada de glutamina pelo músculo. Conseqüentemente, ocorre diminuição das concentrações de intermediários do ciclo de Krebs, fato que pode ocasionar redução da taxa de síntese de glutamina e aumento da síntese de amônia (DOHM, 1986; GRAHAM *et al.*, 1990). Desse modo, as causas do menor rendimento do grupo EX-S2 podem ter relação com tais mecanismos, visto que esse grupo apresentou maior concentração de corticosterona, menor concentração de glicogênio muscular (sóleo), maior degradação de glicogênio por minuto de natação, além de hiperamonemia.

Não obstante, alterações metabólicas da célula muscular também estão envolvidas no desenvolvimento da fadiga, sendo que o dano é uma conseqüência da depleção de diferentes substratos (ATP, fosfocreatina, glicose e glicogênio) ou do maior acúmulo de metabólitos (amônia, lactato e íons H+), inibindo o funcionamento do sistema contrátil (ROBERTS & SMITH, 1989).

Durante o exercício prolongado, os ACR são captados pelo músculo esquelético e oxidados para fins energéticos (WAGENMAKERS *et al*, 1991; DOHM *et al*, 1981) havendo diminuição dos mesmos no plasma (PARRY-

BILLINGS *et al*, 1990). O triptofano é o único aminoácido que circula ligado à albumina no plasma, e a hipótese da fadiga central sugere que o exercício prolongado promove um aumento na concentração dos ácidos graxos livres (AGL) no plasma podendo ocasionar o deslocamento do triptofano da albumina. Como é a porção livre do triptofano que controla a taxa de captação pelo cérebro, seu aumento no plasma resultaria em transporte aumentado através da barreira hematoencefálica. Por conseqüência, haveria a elevação da síntese do neurotransmissor serotonina (5-HT), sendo este aumento associado à fadiga durante exercício prolongado (BLOMSTRAND, CELSING & NEWSHOLME, 1988; BAILEY, DAVIS & AHLBORN, 1992, 1993; NEWSHOLME & BLOMSTRAND, 1996; DAVIS, 1995; DAVIS *et al.*, 2000). Como o TRP_L e os ACR utilizam o mesmo mecanismo transportador para atravessar a barreira hematoencefálica, tem sido proposto que a razão TRP_L/ACR seja importante na determinação da taxa da síntese de serotonina (WURTMAN & FERNSTROM, 1975; ANDERSON, TEWS & HARPER, 1990; GRAHAN & MACLEAN, 1992; CUNLIFFE, OBEID & POWELL-TUCK, 1997; BLOMSTRAND, 2001).

Com o intuito de alterar o transporte de triptofano para o cérebro, diversas pesquisas têm sido empregadas para retardar a fadiga durante exercício prolongado utilizando suplementos de ACR (BLOMSTRAND *et al.*, 1991; HEFLER *et al.*, 1995; PERTRUZZELO *et al.*, 1992; VAN HALL *et al.*, 1995, 1998; CALDERS, 1999; ROSSI, 2001). Entretanto, os resultados tem sido controversos, provavelmente devido aos diferentes procedimentos metodológicos, como: diferenças na composição e na quantidade dos suplementos, tempo de oferta, via de administração, assim como o tipo e intensidade de exercício utilizado.

No presente estudo, não houve diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres com relação ao tipo de dieta e condições de exercício dos grupos experimentais, a não ser pelo aumento nos grupos treinados em relação aos sedentários (tabela 22), demonstrando somente o efeito do exercício exaustivo.

Como já relatado, houve diferenças significantes entre os tempos de tolerância ao esforço em relação às dietas, sendo que a dieta S1 promoveu aumento do tempo, enquanto a dieta S2 promoveu redução do tempo. Todavia, não houve diferença entre esses grupos quanto à concentração de serotonina no hipotálamo, indicando que não houve efeito das suplementações com ACR neste parâmetro. Dessa forma, os diferentes efeitos das suplementações sobre o desempenho estariam relacionados a outros aspectos indicativos de fadiga, discutidos anteriormente, e não pelo comprometimento do SNC induzido pelo aumento da serotonina hipotalâmica, associada à hipótese da fadiga central.

Entretanto, independentemente das dietas, os grupos submetidos ao teste de tolerância ao esforço apresentaram aumento significativo na concentração de serotonina de 2,5 vezes em relação aos grupos sedentários, além da tendência de aumento em relação aos grupos que nadaram 1 hora (tabela 23). Dessa maneira, esses resultados sugerem que existe associação entre exercício prolongado e maior síntese de serotonina no hipotálamo. Esse efeito também foi demonstrado por BARCHAS & FREEDMAN (1963), BLOMSTRAND, PERRET & PARRY-BILLINGS (1989), BAILEY, DAVIS & ALBORN (1992), e ROSSI (2001).

Portanto, os resultados das concentrações de serotonina hipotalâmica observados nos grupos submetidos ao teste de tolerância ao esforço não justificam a discrepância entre os desempenhos dos grupos suplementados. Não obstante, comprovou-se somente o efeito do exercício na síntese de serotonina. Entretanto, os mecanismos relacionados à fadiga central necessitam de mais esclarecimentos (BLOMSTRAND, 1991).

6.4. Considerações gerais: rendimento x parâmetros bioquímicos

A partir das diferenças observadas entre os tempos de natação dos grupos suplementados (EX-S1 x EX-S2), se estabelece uma relação entre

os fatores metabólicos que podem ter influenciado em resultados tão opostos no rendimento.

Apesar de não serem observadas alterações entre os grupos S1 e S2 nas concentrações de glicose plasmática, ácidos graxos livres plasmáticos, lactato sangüíneo, insulina sérica, glicogênio hepático e muscular (gastrocnêmio) e serotonina, alguns desses parâmetros apresentaram diferenças entre as condições (1H x EX). Dessa forma, fatores como: queda da glicose plasmática, diminuição dos estoques de glicogênio hepático e muscular, tendências na redução da insulina plasmática e aumento na serotonina hipotalâmica, foram resultados comuns aos grupos com dietas S1 e S2, causados pelo exercício exaustivo.

O desenvolvimento da fadiga no grupo EX-S1 provavelmente foi retardado por mais tempo devido a menor concentração de amônia plasmática, menor degradação de glicogênio hepático e muscular por minuto de natação, além da maior concentração de glicogênio do músculo sóleo, durante o exercício prolongado. Entretanto, no grupo EX-S2, verificou-se: maior concentração de amônia plasmática e corticosterona sérica; menor concentração de glicogênio muscular (sóleo); maior degradação de glicogênio hepático e muscular por minuto de natação. Assim, o quadro de fadiga desse grupo apresenta aspectos predominantes da fadiga periférica, a não ser pela hiperamonemia, que pode estar associada também à fadiga central.

Os quadros 2 e 3 apresentam um resumo dos resultados significantes, considerando o efeito das dietas (C, S1 e S2) e das condições (1H e EX) sobre os parâmetros analisados.

Parâmetros	EX-S1	EX-S2
Rendimento	↑	↓ <
Glicose	=	=
Amônia	↓	↑ >
Ácidos Graxos Livres	=	=
Insulina	=	=
Corticosterona	=	↑ >
Lactato	=	=
Glicogênio hepático	=	=
Glicogênio gastro	=	=
Glicogênio sóleo	↑	= <
Serotonina	=	=

Quadro 2 (dietas S1 e S2 x C)*: Resumo dos efeitos das suplementações nos parâmetros bioquímicos e de rendimento nos grupos submetidos ao teste de tolerância ao esforço, em relação à dieta controle

* representado por = (igual), ↑ (maior) ou ↓ (menor). As diferenças entre as suplementações (S1 x S2), quando existentes, estão representadas pelos símbolos > (maior) ou < (menor), dos grupos com dieta S2 em relação à S1.

Parâmetros	EX-C	EX-S1	EX-S2
Glicose	↓ <	↓ <	↓ <
Amônia	↑ >	↑ >	↑ >
Ácidos Graxos Livres	= >	= >	= >
Insulina	= <	= <	= <
Corticosterona	= >	= >	= >
Lactato	= >	= >	= >
Glicogênio hepático	↓ <	↓ <	↓ <
Glicogênio gastro	↓ <	↓ <	↓ <
Glicogênio sóleo	↓ ≈	= ≈	↓ ≈
Serotonina	= >	= >	= >

Quadro 3 (condição EX x 1H e SED)*: Resumo dos efeitos da condição exaustão em relação às condições de 1 hora e sedentário, nas três dietas experimentais

* as diferenças entre as condições EX e 1H estão representadas por = (igual), ↑ (maior) ou ↓ (menor); as diferenças entre EX e SED estão representadas pelos símbolos > (maior), < (menor) ou igual (≈)

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados, podemos concluir o seguinte:

Efeitos das dietas suplementadas com aminoácidos de cadeia ramificada (S1 e S2) sobre o desempenho dos grupos submetidos ao teste de tolerância ao esforço:

- A dieta S1 promoveu maior tempo de natação;
- A dieta S2 propiciou menor tempo de natação.

Desse modo, constatou-se que a dieta com menor concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (S1) promoveu um efeito benéfico no desempenho. Provavelmente este resultado tenha ocorrido pela preservação do glicogênio no músculo sóleo, pela menor degradação de glicogênio hepático e muscular por minuto de natação, além da menor concentração de amônia plasmática. Diferentemente, a dieta com maior concentração de ACR (S2) proporcionou um efeito negativo no desempenho físico, possivelmente devido a hiperamonemia e pela maior degradação de glicogênio hepático e muscular por minuto de natação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUMRAD, N.; ROBINSON, R.; GOOCH, B.; LACY, W. The effect of leucine infusion on substrate flux across the human forearm. **J. Surg. Res**. v.32, p.543-463, 1982.

ALP, P.R.; NEWSHOLME, E.A.; ZAMMIT, V.A. Activities of citrate synthase and NAD linked and NADP linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebates. **Biochem. J.** v.154, p.689-700, 1976.

ALVESTRAND, A.; HAGENFELDT, L.; MERLI, M.; OURESHI, A.; ERIKSSON, L.S. Influence of leucine infusion on intracellular amino acids in humans. **Eur. J. Clin Invest**. v.20, p.293-298, 1990.

ANDERSON, S.A.; TEWS, J.K.; HARPER, A.E. Dietary branched-chain amino acids and protein selection by rats. **J. Nutr.**, v.120, p.52-63, 1990.

ARDAWI, M.S.M. Skeletal muscle glutamine production in thermally injured rats. **Clin. Sci.** v.74, p.165-172, 1988.

BARCHAS, J.D.; FREEDMAN, D.X. Brain amines: response to physiological stress. **Biochem. Pharmacol**. v.12, p.1232-1235, 1963.

BANISTER, E.W.; CAMERON, B.J.C. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. **Int. J. Sports Med.** v.11, p.S129-S142, 1990.

BANISTER, E.W.; RAJENDRA, W.; MUTCH, B.J.C. Ammonia as an indicator of exercise stress: implications of recent findings to sports medicine. **Sports Med.** v.2, p.34-46, 1985.

BAILEY, S.P.; DAVIS, J.M.; AHLBORN, E.N. Effect of increased brain

sorotonergic activity on endurance performance in the rat. **Acta Physiol. Scand.** v. 145, p.75-76, 1992.

BAILEY, S.P.; DAVIS, J.M.; AHLBORN, E.N. Serotonergic agonists and antagonists affect endurance performance in the rat. **Int. J. Sports Med.** v.14, p.330-333, 1993.

BHAGAT, B.; WHEELER, N. Effect of amphetamine on the swimming enduramce of rats. **Neuropharmacology.** v.12, p.711-713, 1973.

BIANCHI, G.P.; GROSSI, G.; BARGOSSI, A.M. May peripheral and central fatigue be correlated? Can we monitor them by means of clinical laboratory tools? **J. Sports Med. Phys. Fitness.** v.37, p.194-199, 1997.

BLOMSTRAND, E. Amino acids and central fatigue. **Amino Acids**. v.20, p.25-34, 2001.

BLOMSTRAND, E.; ANDERSSON, S.; HASSMÉN, P.; EKBLOM, B.; NEWSHOLME, E.A. Effect of branched-chain amino acid and carbohydrate supplementation on the exercise-induced change in plasma muscle concentration of amino acids in human subjects. **Acta Physiol. Scand**. v.153, p. 87-96, 1995.

BLOMSTRAND, E.; CELSING, F.; NEWSHOLME, E. A. Changes in plasma concentrations of aromatic and branched-chain amino acids during sustained exercise in man and their possible role in fatigue. **Acta Physiol. Scand.** v.133, p 115-121, 1988.

BLOMSTRAND, E.; HASSMÉN, P.; EKBLOM, B.; NEWSHOLME, E.A. Administration of branched-amino acids during sustained exercise: effects on performance and on plasma concentrations of some amino acids. **Eur. J. Appl. Physiol.** v. 63, p.83-88, 1991.

BLOMSTRAND, E.; HASSMÉN, P.; NEWSHOLME, E.A. Effect of branched-chain amino acid supplementation on mental performance. **Acta Physiol. Scand**. v.143, p. 225-226, 1991.

BLOMSTRAND, E.; NEWSHOLME, E. A. Effect of branched-chain supplementation on the exercise-induced change in aromatic amino acid concentration in human muscle. **Acta Physiol. Scand**. v.146, p.293-298, 1992.

BLOMSTRAND, E.; PERRET, D. PARRY-BILLINGS, M. Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions in the rat. **Acta Physiol. Scand.** v.136, p. 473-481, 1989.

BLOMSTRAND, E.; SONJA, E.K.; NEWSHOLME, E.A. Influence of ingesting a solution of branched-chain amino acids on plasma and muscle concentrations of amino acids during prolonged submaximal exercise. **Nutrition.** v.12, p.7-8, 1996.

BLUNDELL, J.E. Serotonin and the biology of feeding. **Am. J. Clin. Nutr.** v.55, p.S155-S159, 1992.

BOOTH, F.W.; NICHOLSON, W.F.; WATSON, P.A. Influence of muscle use on protein synthesis and degradation. **Sports Sci. Rev.** v.10, p.27-48, 1982.

BORBA-MURAD, G.R.; SOUZA, H.M.; LOPES, G.; FERREIRA, E.B.; DAMBROSO, D.; BAZOTTE, R.B. Changes in glicemia induced by exercise in rats: contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** v.102, p.113-123, 1998.

BROOKS, G. A. Amino acid and protein metabolism during exercise and recovery. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.19, p.S150-S156, 1987.

CALDERS, P.; PANNIER, J.P.; MATTHYS, D.M., LACROIX, E.M. Pre-exercise branched-chain amio acid administration increases endurance performance in rats. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.29, p.1182-1186, 1997.

CALDERS, P.; MATTHYS, D.; DERAVE, W.; PANNIER, J.-L. Effect of branched-chain (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.31, n.1, p.583-587, 1999.

CALLES-ESCANDON, J.; HORTON, E.S. The thermogenic role of exercise in the treatment of morbid obesity: a critical evaluation. **Am. J. Clin. Nutr.** v.55, p.S533-S537, 1992.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: UNICAMP, 1999. p.37-77, 87-96.

CHAOULOFF, F. Physical exercise and brain monoamines: a review. **Acta Physiol. Scand.** v.137, p.1-13, 1989.

CHAOULOFF, F. Effects of acute physical exercise on central serotonergic systems. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 29, p.58-62, 1997.

CHAOULOFF, F.; ELGHOZY, J.L.; GUEZENNEC, Y.; LAUDE, D. Effects of conditioned running on plasma, liver and brain tryptophan and on brain 5-hydroxytryptamine metabolism of the rat. **Br. J. Pharmac.** v.86, p.33-41, 1985.

CHAOULOFF, F.; LAUDE, D.; ELGHOZY, J.L. Physical exercise: evidence for differential consequences of tryptophan on 5-HT synthesis and metabolism in central serotonergic cell bodies and terminals. **J. Neural Transm.** v.78, p.121-130, 1989.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Drugs and sports: research findings and limitations. **Sports Med.** v.24, p.366:384, 1997.

CLARKSON, P.M. Nutrition for improved sports performance. **Sports Med.** v.21, p.393-401, 1996.

CUNLIFFE, A.; OBEID, O.A.; POWELL-TUCK, J. Post-prandial changes in measures of fatigue: effect of a mixed or a pure carbohydrate our pure fat meal. **Eur. J. Clin. Nutr.** v.51, p.831-838, 1997.

CUNLIFFE, A.; OBEID, O.A.; POWELL-TUCK, J. A placebo controlled investigation of the effects of tryptophan or placebo on subjective and objective measures of fatigue. **Eur. J. Clin. Nutr.** v.52, p.425-430, 1998.

DAVIS, J.M. Central and peripheral factors in fatigue. **J. Sports Sci.** v.13, p.S49:S53, 1995a.

DAVIS, J.M. Carbohydrates, branched-chain amino acids, and endurance: the central fatigue hypothesis. **Int J Sport Nutr.** v.5, p.S29-S38, 1995b.

DAVIS, J.M.; BAILEY, S.P.; WOODS, J.A.; GALIANO, F.J.; HAMILTON, M.T.; BARTOLI, W.P. Effects of carbohydrate feedings on plasma free tryptophan and branched-chain amino acids during prolonged cycling. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.65, n.6, p.213-9, 1992.

DAVIS, J.M.; BAILEY, S.P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.29, p.45-57, 1997.

DAVIS, J.M.; ALDERSON, N.A.; WELSH, R.S. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 72, p. S563-S568, 2000.

DAVIS, J.M.;.WELSH, R.S.; DE VOLVE, K.L.; ALDERSON, N.A. Effects of branched-chain amino acids and carbohydrate in fatigue during intermittent, high-intensity running. **Int. J. Sports. Med.** v.20, p.309-314, 1999.

DISHMAN, R.K. Brain monoamines, exercise and behavioral stress: animal models. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.29. p.63-74, 1997.

DOHM, G. L. Protein as a fuel for endurance exercise. **Exerc. Sports Rev.** v.14, p.43-173, 1986.

DOHM, G.L.; BEECHER, G.R.; WARREN, R.Q.; WILLIAMS, R.T. Influence of exercise on free amino acid concentrations in rat tissues. **J. Appl. Physiol.** v.50, p.41-44, 1981.

DOHM, G.L.; KASPEREK, G.J.; TAPSCOTT, E.B.; BARAKAT, H.A. Protein metabolism during endurance exercise. **Fed. Proc.** v.44, p.348-352, 1985.

ERIKSSON, L.S.; BROBERG, S.; BJORKMAN, O.; WAHREN, J. Ammonia metabolism during exercise in man. **Clin. Physiol.** v.5, p.325-336, 1985.

ESSÉN-GUSTAVSSON, B. & BLOSMTRAND, E. Effect of exercise on concentrations of free amino acids in pools of type I and type II fibres in human muscle with reduced glycogen stores. **Acta Physiol Scand**. v.174, p.275-281, 2002.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, T.W. An easy calorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. **Clin. Chim. Acta.** v.45, p.105-111, 1973.

FELIG & WAHREN. J. Amino acid metabolism in exercising man. **J. Clin. Invest.** v. 50, p.2703-2714, 1971.

FERRANDO, A.A.; WILLIAMS, B.D.; STUART, C.A.; LANE, H.W.; WOLFE,

R.R. Oral branched-chain amino acids decrease whole-body proteolysis. **J. Parenteral Enteral Nutr**. v.19, p. 47-54, 1995.

FERNSTROM, J.D. Dietary amino acids and brain function. **J. Am. Diet. Assoc.** v.94, p.71-77, 1994.

FLIER, J.S. Insulin receptor and insulin resistance. **Ann. Rev. Med**. v.34, p.145-160, 1983.

FREUND, H.; HOOVER, H.; ATAMIAN, S.; FISHER, J. Infusion of branched chain amino acids in postoperative patients. **Ann. Surg.** v.190, p.18-23, 1979.

GALIANO, F.J., DAVIS, J.M.; BAILEY, S.P.; WOODS, J.A.; HAMILTON, M.; BARTOLI, W.P. Physiological, endocrine and performance effects of adding branched chain amino acids to a 6% carbohydrate-electrolyte beverage during prolonged cycling (Abstract) **Med. Sci. Sports Exerc**. v. 23, p.S14, 1991.

GANDEVIA, S.C. Some central and peripheral factors affecting human motoneural output in neuromuscular fatigue. **Sports Med.** v.13, p.93-98, 1992.

GOLLNICK, P.D. Metabolism of substrates: energy substrate metabolism during exercise and as modified by training. **Fed. Proc.** v.44, p.353-357, 1985.

GOMEZ-MERINO, D.; BEQUET, F.; BETHELOT, M.; RIVERAIN, S.; CHENNAOUI, M.; GUEZENNEC, C.Y. Evidence that the branched-chain amino acid L-valine prevents exercise-induced release of 5-HT in rat hippocampus. **Int J Sports Med**. v. 5, p.317-322, 2001.

GOODMAN, M.N. & RUDERMAN, N.B. Influence of muscle use on amino acid metabolism. **Exerc. Sports Rev.** v.10, p.1-26, 1982.

GRAHAM, T.E.; McLEAN, D.A. Ammonia and amino acid metabolism in human skeletal muscle during exercise. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.70, p.132-141, 1992.

GRAHAM, T.E., BANGSBO, J., GOLLNICK, P.D., JUEL, C., SALTIN, B. Ammonia metabolism during intense dynamic exercise and recovery in humans. **Am. J. Physiol.** v.259, p.E170-E176, 1990.

GUEZENNEC, C.Y.; ABDELMALKI, B.; SERRURIER, B.; MERINO, D.; BIGARD, X.; BERTHELOT, M.; PIERARD, C.;PERES, M. Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids. **Int.J. Sports Med.** v. 19, p.323-327, 1998.

HASSID, W.Z. & ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods. Enzymol.** v.3, p.34-50, 1957.

HARGREAVES, M. **Exercise Metabolism**. U.S.A. Human Cinetics, 1995, 263p.

HARRIS, R.A.; HAWES, J.W.; POPOV, K.M. Studies on regulation of the mitochondrial alpha-ketoacid dehydrogenase complexes and their kinases. **Adv. Enzyme Reg**. v.37, p.271-293, 1997.

HEFLER, S.K; WIDEMAN, L.; GAESSER, G.A.; WELTMAN, A. Branched-chain amino acid supplementation improves endurance performance in competitive cyclists (Abstract). **Med. Sci. Sports Exerc. v**. 27, p. S5, 1995.

HOLLOSZY, J.O.; KOHRT, M.; HANSEN, P.A. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. **Frontiers in**

Bioscience. v.3, p.1011-1027, 1998.

HOLNESS, M.J.; FRENCH, T.J.; SUGDEN, M.C. Hepatic glycogen synthesis on carbohydrate re-feeding after starvation. **J. Biochem.** v.235, p.441-445, 1986.

HOOD, D.A. & TERJUNG, R.L. Amino acid metabolism during exercise and following endurance training. **Sports Med.**, v.9, p. 23-35, 1990.

IBANEZ, J.; PULLINEN, T.; GOROSTIAGA, E.; POSTIGO, A.; MERO, A. Blood lactate and ammonia in short-term anaerobic work following induced alkalosis. **J. Sports Med Physical Fitness.** v.35, p.187-193, 1995.

JAKEMAN, P.M. Amino acid metabolism, branched-chain amino acid feeding and brain monoamine function. **Proc. Nutr. Soc.** v.57, p.37-41, 1998.

KATZ, A.; BROBERG, S.; SAHLIN, K.; WAHREN, J. Muscle ammonia and amino acid metabolism during exercise in man. **Clin. Physiol.** v.6, p.365-379, 1986.

KOYAMA, K.; KAYA, M.; TSUJITA, J.; HORI, S. Effects of decrease plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.77, p.25-31, 1998.

KREIDER, R.B. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. **Sports Med.** v.27, p.97-110, 1999.

LANCHA Jr, A.H. **Resistência ao esforço físico: efeito da suplementação com asparagina, aspartato e carnitina**. São Paulo, 1991. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

LANCHA Jr, A.H.; RECCO, M.B.; ABDALLA, D.S.P.; CURI, R. Effect of aspartate, asparagine and carnitine supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a moderate exercise. **Phys. Behav.** v.57, n.2, p.367-371, 1995.

LANCHA Jr, A.H.; RECCO, M.B.; ABDALLA, D.S.P.; CURI, R. Pyruvate carboxilase activity in the heart and skeletal muscles of the rat. Evidence for a stimulating effect of exercise. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.** v. 32, p.483-189, 1994.

LEHMANN, M.; FOSTER,C.; KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.25, p.854-862, 1993.

LOUARD, R.J.; BARRETT, E.J.; GELFAND, R.A. Overnight branched-chain amino acids infusion causes sustained suppression of muscle proteolysis. **Metab. Clin. Exp**. v.44, p.424-429, 1995.

LYONS, P.M. & TRUSWELL, A.S. Serotonin precursor influenced by type of carbohydrate meal in heatlhy adults. **Am. J. Clin. Nutr.** v.47, p.433-439, 1988.

MACKINNON, L.T.; HOOPER, S.L. Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. **Med. Sci. Sports Exercise**. v.28, p.285-290, 1996.

MARQUEZI, M.L. **Efeito da suplementação de aspartato e asparagina sobre os determinantes da fadiga em ratos submetidos a exercício agudo de natação de intensidade supra-limiar anaeróbio metabólico até a exaustão**. São Paulo, 1999. Dissertação de Mestrado – Escola de Educação Física e Esporte – USP.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P. **Bioquímica do Exercício**.

1.ed. São Paulo: Manole, 2000. 240p.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 3ª. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1992. 510p.

McLEAN, D.A. & GRAHAM, T.E. Branched-chain amino-acid supplementation augments plasma ammonia response during exercise in humans. **J. Appl. Physiol.** v. 74, p.2711-2717, 1993.

McLEAN, D.A.; GRAHAM, T.E.; SALTIN, B. Branched-chain amino-acid supplementation augments ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. **Am. J. Physiol.** v.267, p.E1010-E1022, 1994.

MEEUSEN, R.; De MEIRLEIR, K. Exercise and brain neurotransmission. **Sports Med.** v.20, p.160-188, 1995.

MENEGUELLO, M.O.; MENDONÇA, J.R.; LANCHA Jr., A.H.; COSTA ROSA, L.F.B.P. Effect of arginine, ornithine and citrulline supplementation upon performance and metabolism of trained rats. **Cell Biochem Funct.** v.21, p.85-91, 2003.

MITTLEMAN, K.D.; RICCI, M.R.; BAILEY, S.P. Branched-chain amino acids prolong exercise during heat stress in men and women. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.30, p.83-91, 1998.

MUTCH, B.J.; BANISTER, E.W. Ammonia metabolism in exercise and fatigue: a review. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.15, p.41-50, 1983.

NEWSHOLME, E.A.; ACWORTH, I.N; BLOMSTRAND, E. Amino acids, brain neurotransmitters and a functional link between muscle and brain that is important in sustained exercise. In: **Advances in myochemistry**. London.

John Libbey Eurotext, p.127-133, 1987.

NEWSHOLME, E.A. & BLOMSTRAND, E. The plasma level of some amino acids and physical and mental fatigue. **Experientia.** v.52, p.413-415, 1996.

NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R.; **Biochemistry for the medical sciences**. 2.ed. New York, John Willey, 1988.

OKAMURA, K.; MATSUBARA, F.; YOSHIOKA, N.; KIKUCHI, Y.; KOHRI, H. Exercise-induced changes in branched-chain amino acid / aromatic amino acid ratio in the rat brain and plasma. **Japan J. Pharmacol.** v.45, p.243-148, 1987.

PARDRIDGE, W.M.; CHOI, T.B. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. **Fed. Proc.** v.45, p. 2073-2078, 1986.

PARRYS-BILLINGS, M.; BLOMSTRAND, E.; McANDREW, M.; NEWSHOLME, E.A. A communicational link between skeletal muscle, brain and cells of the immune system. **Int. J. Sports Med.** v.11, p.S122-S128, 1990.

PASQUALE, D.P. **Amino acids and proteins for the athlete: the anabolic edge**. Boca Raton: CRC Press, 1997. 257p. (Nutrition in exercise and sport).

PERTRUZZELLO, S.J.; LANDERS, D.M.; PIE, J.; BLILIE, J. Effect of branched-chain amino acid supplements on exercise-related mood and performance. **Med. Sci, Sports Exerc** (Abstract). v. 24, p.2 ,1992.

PLATELL, C.; KONG, S.E.; McCAULEY, R.; HALL, J.C. Branched-chain amino acids. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v.15, p.706-717, 2000.

POPOV, K.M.; ZHAO, Y.; SHIMOMURA, Y.; KUNTZ, M.J.; HARRIS, R.A. Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. Molecular cloning, expression, and sequence similarity with histidine protein kinases. **J. Biol. Chem**. v.267, p.13127-30, 1992.

RATLIFF, C.R., HALL, F.F. Blood ammonia returns to the laboratory. **Lab. Manage.** v.15, p.16, 1979.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr; G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.** v.123, p.1939-1951, 1993.

REGOUW, B.J.M.; CORNELISSEN, P.J.H.C.; HELDER, R.A.P.; SPIJKERS, J.B.F.; WEEBER, Y.M.M. Specific determination of free fatty acid in plasma. **Clin. Chim. Acta.** v.31, p.187-198, 1971.

RIBEIRO, E.B.; BETTIKER, R.L.; BOGDANOV, M.; WURTMAN, R.J. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. **Brain Res.** v.621, p.311-318, 1993.

ROBERTS, D.; SMITH, D.J. Biochemical aspects of peripheral muscle fatigue: a review. **Sports Med.** v.7, p.125-138, 1989.

ROGERO, M.M. **Efeitos do exercício e da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina sobre as concentrações de glutamina no plasma, músculo e fígado em ratos**. São Paulo, 2002. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

ROSSI, L.M. **Efeito da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada e sua relação com a fadiga periférica e central**. São Paulo, 2001. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas –

USP.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Rev. Paul Educ. Fís.** v.13, n.1, p.67-82, 1999.

SAHLIN, K. Metabolic factors in fatigue. **Sports Med.** v.13, p.99-107,1992.

SAHLIN, K.; BROBERG, S. Adenine nucleotide depletion in human muscle during exercise: casuality and significance of AMP deamination. **Int. J. Sports Med.** v.2, p.S62-S67, 1990.

SAHLIN, K.; KATZ, A.; BROBERG, S. Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise. **Am. J. Physiol.** v.259, p.C834-C841, 1990.

SALTER, M.; KNOWLES, R.G.; POGSON, C.I. How does displacement of albumin-bound tryptophan cause sustained increases in the free tryptophan concentration in plasma and 5-hydroxytryptamine synthesis in brain? **Biochem. J.** v.262, p.365-368, 1989.

SALTIN, B.; GOLLNICK, P.D. **Fuel for muscular exercise: role of carbohydrate**. In: Exercise, Nutrition, and Energy Metabolism (HORTON, E.S.; TERJUNG, R.L.) Macmilliam, New York. p.45-71, 1998.

SALTIN. B.; HENRIKSSON, J.; NYGAARD, E. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. **Annually New York Academy Sciences.** v.301, p.3-29, 1977.

SARKISSIAN, C.F.; WURTMAN, R.J.; MORSE, A.N.; GLEASON, R. Effects of fluoxetine or D-fenfluramine on serotonin release from, and level in, rat frontal cortes. **Brain Res.** v.529, p.294-301, 1990.

SHINNICK, F.L., HARPER, A.E. Branched-chain amino acid oxidation by isolated rat tissue preparations. **Biochim. Biophys. Acta**. v.437, p.477-486, 1976.

SCHLICHT, W.; NARETZ, W.; WITT, D.; RIEKERT, H. Ammonia and lactate: differential information on monitoring training load in sprint events. **Int. J. Sports Med.** v.11, p.585-90, 1990.

SEENE, T.; ALEV, K.; PEHME, A. Effect of muscular activity on the turnover rate of actin and myosin heavy and light chains in different types of skeletal muscle: changes in the turnover rate of myosin and actin during and after single-bout physical activity. **Int. J. Sports Med.** v.7, p.287-290, 1986.

SHARP, R.L..; COSTILL, D.L.; FINK, W.J.; KING, D.S. Effects of eight weeks of bicycle ergometer sprint training on human muscle buffer capacity. **Int. J. Sports Med.** v.7, p.13-17, 1986.

SHIMOMURA, Y.; MURAKAMI, T.; NAKAI, N.; NAGASAKI, M.; OBAYASHI, M.; LI, Z.; XU, M.; SATO, Y.; KATO, T.; SHIMOMURA, N.; FUJITSUKA, N.; TANAKA, K.; SATO, M. Supression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats. **J. Nutr. Sci. Vitamol (Tokyo)**, v.46, n.2, p.71-77, 2000.

SMRIGA, M.; KAMEISHI, M.; TANAKA, T.; KONDOH, T.; TORII, K. preference for a solution of branched-chain amino acids plus glutamine and arginine correlates with free running activity in rats: involvement of serotonergic-dependent process of lateral hypothalamus. **Nutr. Neurosci.** v.3, p.189-199, 2002.

SOARES, J.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A. Increased serotonin levels in physically trained men. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v.27, p.1635-1638, 1994.

VAN HALL, G.; RAAYMAKERS, J.S.H.; SARIS, W.H.M.; WAGENMAKERS, A.J.M. Ingestion of branched-chain amino acids and tryptophan during sustained exercise in man: failure to affect performance. **J. Physiol.** v. 486, p.789-794, 1995.

VERGER, P.H.; AYMARD, P.; CYNOBERT, L.; ANTON, G.; LUIGI, R. Effects of administration of branched-chain amino acids versus glucose during acute exercise in the rat. **Physiol. Behav.** v. 55, p.523-526, 1994.

VIEIRA, R.; HAEBISCH, H.; KOKUBUN, E.; HELL, N.S.; CURI, R. Swimming system for physical exercise of rats. **Arq. Biol. Tecnol.** v.31, p.387-394, 1988.

VIRU, A. Mobilization of structural proteins during exercise. **Sports Med.** v.4, p.95-128, 1987.

WAGENMAKERS, A.J.M.; BECKERS, E.J.; BROUNS, F.; KUIPERS, H.; SOETERS, P.B.; VAN DER VUSSE, G.J.; SARIS, W.H.M. Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. **Am. J. Physiol.** v.260, p.E883-E890, 1991.

WAGENMAKERS, A.J.M. Muscle amino acid metabolism at rest ad during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exerc. Sports Rev.** v.26, p.287-314, 1998.

WELLMAN, P.J. Overview of adrenergic anoretic agents. **Am. J. Clin. Nutr.** v.55, p.S193-S198, 1992.

WELTZIN, T.E.; FERNSTRON, J.D.; McCONAHA, C.; KAYE, W.H. Acute tryptophan depletion in bulimia: effects on large neutral amino acids. **Biol. Psychiatry.** v.15, n.35, p.388-397, 1994.

WURTMAN, R.J.; FERNSTROM, J.D. Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids. **Am. J. Clin. Nutr.** v.28, p.638-647, 1975.

XU, M.; NAGASAKI, M.; OBAYASHI, M.; SATO, Y.; TAMURA, T.; SHIMOMURA, Y. Mechanism of activation of branched-chain α-keto acid dehydrogenase complex by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.287, p.752-756, 2001.

ANEXO 1

Tabela A. Mistura de minerais *

Ingredientes	g/kg de mistura
Carbonato de cálcio anidro	357,00
Fosfato de potássio monobásico	250,00
Citrato de potássio, tripotássio monohidratado	28,00
Cloreto de sódio	74,00
Sulfato de potássio	46,60
Óxido de magnésio	24,00
Citrato férrico	6,06
Carbonato de zinco	1,65
Metasilicato de sódio	1,45
Carbonato de manganês	0,63
Carbonato de cobre	0,30
Sulfato de cromo potássio	0,275
Ácido bórico	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318
Cloreto de lítio	0,0174
Selenato de sódio anidro	0,01025
Iodato de potássio	0,01
Paramolibidato de amônio	0,00795
Vanadato de amônio	0,0066
Sacarose	209,806

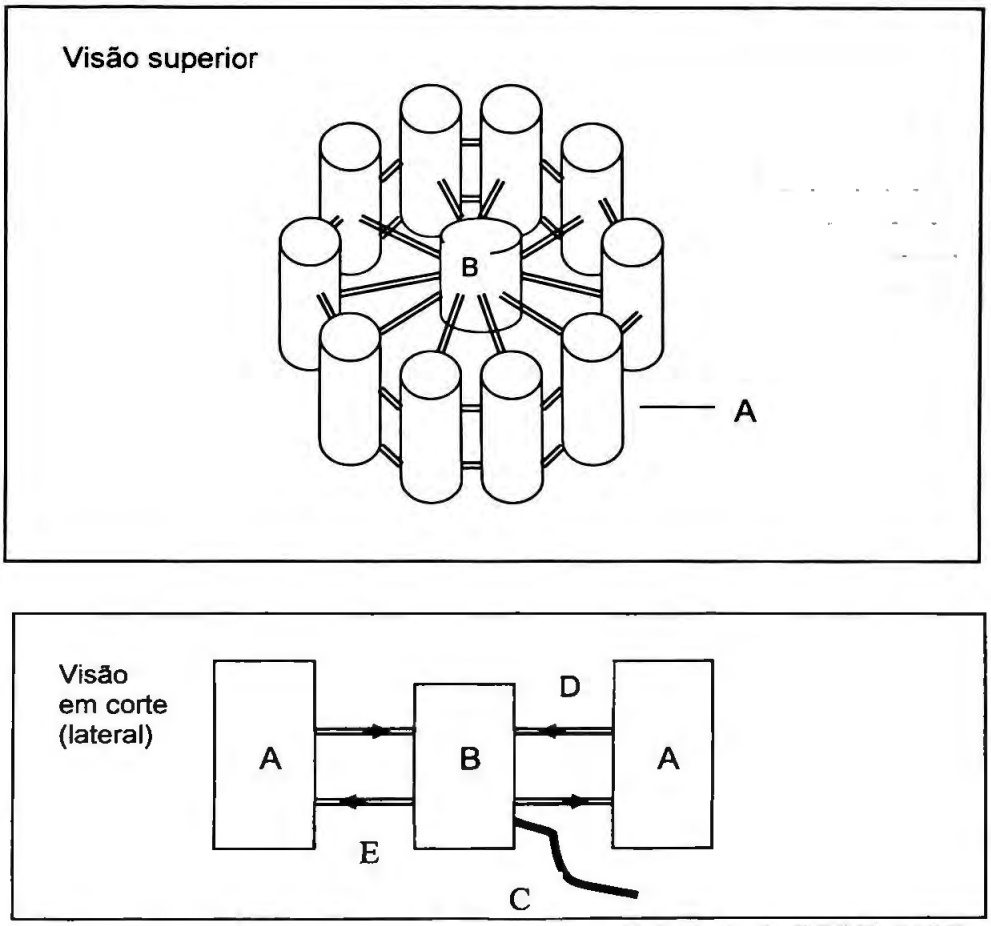
Tabela B. Mistura de vitaminas *

Ingredientes	g/kg de mistura
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina - HCl	0,700
Tiamina - HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
Biotina	0,020
Vitamina B_{12}	2,500
Vitamina E	15,000
Vitamina A	0,800
Vitamina D_3	0,250
Vitamina K_1	0,075
Sacarose	974,655

* Conforme a formulação da AIN-93M (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993)

ANEXO 2

Desenho esquemático do aparelho de natação



(Adaptado de ROSSI, 2001)

A: tanques ou cubas de natação de PVC com 250 mm de diâmetro;
B: central de bombeamento, dividido em dois compartimentos (PVC);
C: mangueira para enchimento e esvaziamento do aparelho;
D: Tubo de controle de nível e retorno;
E: tubo de distribuição e recirculação;
(C, D e E são mangueiras transparentes de polietileno com 0,5 polegadas de diâmetro).

Condições ideais do uso do aparelho e manuseio dos animais:

- água na temperatura de 29 a 33°C;
- secagem dos animais após a sessão de exercícios;
- troca de água diária e limpeza do aparelho de natação;
- tratamento da água com hipoclorito de sódio.