



MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA EM RATOS COM TREINAMENTO RESISTIDO E SUPLEMENTAÇÃO DE AMÔNIA

Marcelle Karyelle Montalvão Gomes¹
Bruna Moreira²
Vanessa Alves Lima¹
Lucicleide Nascimento da Cruz¹
Nathália Maria Resende³
Anibal Monteiro de Magalhães Neto⁴

Resumo

Durante o exercício físico do treinamento esportivo, a demanda energética é aumentada exigindo adaptações no metabolismo. O objetivo foi estudar as respostas dos biomarcadores plasmáticos de lesão hepática em ratos com treinamento resistido com suplementação de amônia. Nos resultados, a ALT do grupo GA aumentou 17% comparado com o controle, e diminuiu 38% e 18% dos grupos GCT e GAT, respectivamente. Já a AST do grupo GA e GAT aumentou 285% e 57% respectivamente, e diminuiu 9% no grupo GCT quando comparados ao controle. Assim, as enzimas transaminase são possíveis indicadores sensíveis de dano hepático.

Palavras-chaves: Treinamento físico; AST; ALT; Dano hepático; Ratos.

¹ Acadêmica do Curso de Educação Física do Campus Universitário do Araguaia da Universidade Federal do Mato Grosso.

² Acadêmica do Curso de Enfermagem do Campus Universitário do Araguaia da Universidade Federal do Mato Grosso.

³ Professora mestre auxiliar do Curso de Educação Física do Campus Universitário do Araguaia da Universidade Federal do Mato Grosso.

⁴ Professor mestre assistente do Curso de Educação Física do Campus Universitário do Araguaia da Universidade Federal do Mato Grosso.



Introdução

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

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

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

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

Tem sido descrito que a alta concentração de amônia induzida pelo exercício físico pode gerar distúrbios momentâneos no funcionamento do sistema nervoso central (CNS) semelhantes àqueles encontrados em fases iniciais de diversas doenças relacionadas a hiperamonemia e/ou doenças neuro-degenerativas (Nybo, 2010; Nybo et al., 2005).

A desintoxicação da amônia é interrompida quando há falência hepática ou em deficiências congênitas nas enzimas do ciclo de uréia. Durante a falência hepática, a hiperamonemia e as funções cerebrais deterioram levando ao aparecimento de encefalopatia hepática (Albrecht e Jones, 2000).

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

As alterações na performance do atleta devido a diminuição do rendimento muscular podem estar associados ao surgimento da fadiga. Dois mecanismos de resposta relacionados ao aumento das concentrações de amônia têm sido postulados como responsáveis pelo surgimento da fadiga: 1) a elevação da síntese de glutamina como sistema de desintoxicação provocando o desequilíbrio do *pool* de neurotransmissores e 2) a alteração do metabolismo energético do conjunto neurônios pré-sináptico/pós-sináptico-astrócito, provocando a diminuição da capacidade regenerativa do ATP (Hellsten et al., 1999; Wilkinson et al., 2010; Hilgier et al., 2009). Baseado nestas hipóteses é possível



postular que um exercício físico intenso e prolongado seja capaz de induzir um estado tóxico de anemia agudo e sub-clínico. Este estado pode ser suficientemente severo a regiões críticas do CNS para afetar a continuidade de uma atividade coordenada.

É proposto que a produção de amônia relacionada ao exercício físico pode ser um fator responsável pela diminuição da capacidade cognitiva/física em atletas saudáveis e afeta o processo de continuidade do exercício, podendo prejudicar os resultados finais em um esporte olímpico.

Objetivo

Estudar as respostas dos biomarcadores plasmáticos de lesão hepática (aspartato aminotransferase – AST e alanina aspartato aminotransferase – ALT) em ratos com treinamento resistido com suplementação de amônia.

Material e Métodos

- **Animais**

Vinte e quatro ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram utilizados neste estudo, com idade inicial de 10 semanas e peso médio de 276 ± 17 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com temperatura mantida a 22°C e em ciclo de claro-escuro (7:00 a.m. luz e às 7:00 p.m. escuro). Os ratos receberam alimentos e água *ad libitum*.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro e está de acordo com o Guia de princípios para pesquisa envolvendo animais e seres humanos da *The American Physiological Society*.

- **Adaptação dos animais**

Para o experimento utilizou-se os procedimentos para manter o bem-estar dos animais. Foram escolhidos apenas três pesquisadores para o transporte entre salas e manipulação de animais. Os pesquisadores não podiam falar uns com os outros e nem usar qualquer tipo de perfume durante o experimento. Estas adaptações dos animais foram feitas para diminuir as respostas odor-alarme e para minimizar o estresse induzidos aos animais (Burn, 2008; Mackay-Sim, 1979).

- **Preparação e administração das soluções de suplementação**

Os animais foram divididos em quatro grupos com 6 animais para o treinamento do exercício físico e para a suplementação de amônia que foi injetada intraperitoneal. A divisão dos grupos foi: 1) GC: Grupo que só recebeu a suplementação de cloreto de sódio [0,9%] e não treinou; 2) GA: Grupo que só recebeu a suplementação de amônia [0,1mmol/g] e não treinou; 3) GCT: Grupo que recebeu suplementação de cloreto de sódio [0,9%] e realizou o treinamento do exercício físico; e 4) GAT: Grupo que recebeu a suplementação de amônia [0,1mmol/g] e realizou o treinamento do exercício físico.

- **Protocolo de treinamento com exercício físico resistido**



Todos os animais dos grupos GTA e GTC realizaram uma semana de exercícios para a familiarização com aparelho de agachamento guiado e o eletroestimulador, ambos adaptados do equipamento apresentado por Tamaki e colaboradores (1992). Por fim, os animais dos grupos GTA e GTC realizaram um conjunto de 15 repetições com carga de trabalho de 300% do seu peso corporal por dia durante três dias.

- **Coleta do material biológico**

Os animais foram eutanasiados por decaptação na guilhotina e o sangue coletado em tubo com heparina (Vacuette, Greiner Bio-One – Germany), centrifugado (3,000 x g; 10 minutos), aliquoteado e armazenado em freezer -80°C até a análise.

As análises foram feitas automaticamente pelo analisador bioquímico ADVIA® 1200 Chemistry System (Siemens – USA) e o método utilizado para a análise dos biomarcadores foi o enzimático.

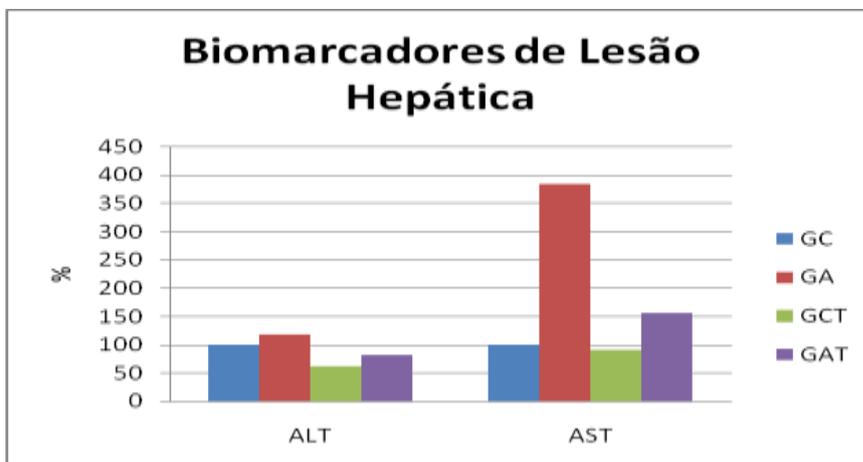
- **Análise estatística**

Todos os dados estão representados em valores normalizados em relação aos valores do grupo GC (100%).

Resultados e Conclusões

As enzimas transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), são indicadores sensíveis de dano hepático sendo liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito. Nos experimentos em seres humanos submetidos a exercícios físico de curta duração, ambas as enzimas, ALT e AST, aumentaram no final do protocolo de exercício físico escolhido. Uma possível explicação para estas alterações estão relacionadas a diversos fatores, dentre eles: temperatura, altitude e a intensidade do exercício (Kim et al., 2007; Wu et al., 2004).

A intensidade do protocolo de exercício físico escolhido nesse estudo pode ter sido um dos fatores para também ter apresentado as mesmas modificações em ambas as enzimas transaminases. No gráfico abaixo, podemos observar que a ALT do grupo GA aumentou 17% comparado com o controle, e diminuiu 38% e 18% dos grupos GCT e GAT, respectivamente, quando comparado com o controle. Já, a AST do grupo GA e GAT aumentou 285% e 57% respectivamente quando comparados ao controle, e diminuiu 9% no grupo GCT comparado com o controle. Ainda não está claro do porque e nem como ocorreu lesões no hepatócito provocados pelo exercício físico realizado. No entanto, nosso resultado pode indicar possíveis lesões sinalizadas de forma sistêmica através destas enzimas plasmáticas.



Kilgore e colaboradores (2002) estudaram a relação de seis semanas de exercício físico intenso em seres humanos. Eles demonstraram que algumas modificações ocorreram em alguns biomarcadores plasmáticos, dentre eles: ALT (428%) e AST (440%) após este período. Os resultados encontrados com estudo em ratos submetidos à sessão aguda de exercício intenso podem também sofrer as alterações enzimáticas.

Nos estudos com atletas submetidos a corrida acima de 246 km encontraram alterações em ambas as enzimas, AST (4824%) e ALT (1320%), imediatamente após a corrida comparados com os respectivos valores basais. Estas alterações estão diretamente relacionadas a lesões hepáticas e musculares (Skenderi et al., 2006). Poucos trabalhos enfatizaram o estudo destas enzimas em ratos submetidos ao exercício físico. Nossos resultados corroboram com estes resultados em seres humanos e atletas indicando que o protocolo de exercício físico foi capaz de aumentar estas variáveis atribuídas a lesões hepáticas.

Sobre a suplementação de amônia pouco se sabe. O aumento de 17% da ALT no grupo GA sugere uma possível modificação no hepatócito através da enzima alanina aminotransferase mensurada no plasma após a suplementação de amônia. As reduções nos níveis plasmáticos de ALT nos grupos GCT (38%) e GAT (18%) podem ter minimizado o impacto da suplementação de amônia pelo exercício físico. Isto sugere um possível efeito protetor acentuado pelo exercício físico. Entretanto, as vias metabólicas deste processo ainda não estão completamente elucidadas, futuros trabalhos são necessários para o entendimento deste processo.



Referências

- Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci.* 1999 Nov 30;170(2):138-46.
- Burn CC. What is it like to be a rat? Rat sensory perception and its implications for experimental design and rat welfare. *Appl Animal Behav Sci.* 112:1–32, 2008.
- Hellsten Y, Richter EA, Kiens B, Bangsbo J. AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol.* 1999 Nov 1;520 Pt 3:909-20.
- Hilgier W, Freško I, Klemenska E, Beresewicz A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J, Zielińska M. Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis. *Neurobiol Dis.* 2009 Jul;35(1):75-81.
- Kilgore JL, Pendlay GW, Reeves JS, Kilgore TG. Serum chemistry and hematological adaptations to 6 weeks of moderate to intense resistance training. *J Strength Cond Res.* 2002 Nov;16(4):509-15.
- Kim HJ, Lee YL, Kim CK. Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200km run. *Eur J Appl Physiol.* 2007 99:443–447.
- Mackay-Sim AaL DG. Discrimination of Odors from Stressed Rats by Non-Stressed. *Rats Phys & Behav*, vol. 24: pp. 699-704, 1979.
- Nybo L, Dalsgaard MK, Steensberg A, Møller K, Secher NH. Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *J Physiol.* 2005 Feb 15;563(Pt 1):285-90.
- Nybo L, Secher NH. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. *Prog Neurobiol.* 2004 Mar;72(4):223-61.
- Nybo L. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010 Jan 1;2:779-92.
- Skenderi KP, Kavouras SA, Anastasiou CA, Yiannakouris N, Matalas AL. Exertional Rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Jun;38(6):1054-7.
- Tamaki T, Uchiyama S, Nakano S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc.* 24:881-886, 1992.



CONCOCE / CONDICE 2010
IV Congresso Centro-Oeste de Ciências do Esporte
I Congresso Distrital de Ciências do Esporte
22 a 25 de setembro de 2010 - Brasília, DF
ISSN 2178-485X



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

Wu HJ, Chen KT, Shee BW, Chang HC, Huang YJ, Yang RS. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J Gastroenterol.* 2004 10(18):2711-2714.