

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

SAULO RODRIGO ALVES E SILVA CAMERINO

***EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CETOANÁLOGOS E ESTADO DE
HIDRATAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E COGNITIVO-MOTOR DE
CICLISTAS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO SOB AMBIENTE COM BAIXO
ESTRESSE AO CALOR***

MACEIÓ-2015

SAULO RODRIGO ALVES E SILVA CAMERINO

***EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CETOANÁLOGOS E ESTADO DE
HIDRATAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E COGNITIVO-MOTOR DE
CICLISTAS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO SOB AMBIENTE COM BAIXO
ESTRESSE AO CALOR***

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição, sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Seixas Prado.

MACEIÓ-2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

C182e	<p>Camerino, Saulo Rodrigo Alves e Silva. Efeito agudo da suplementação de cetanoálogos e estado de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor de ciclistas submetidos a exercício físico sob ambiente com baixo estresse ao calor / Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino. – 2015. 114 f. : il.</p> <p>Orientador: Eduardo Seixas Prado. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2015.</p> <p>Inclui bibliografia. Apêndices: f. 95-98. Anexos: f. 99-114.</p> <p>1. Ciclistas – Exercícios físicos. 2. Desidratação. 3. Fadiga. 4. Metabolismo. 5. Amônia. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.398</p>
-------	---



**MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**



Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO**

**“EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CETOANÁLOGOS
E ESTADO DE HIDRATAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO
E COGNITIVO-MOTOR DE CICLISTAS SUBMETIDOS A
EXERCÍCIO FÍSICO SOB AMBIENTE COM BAIXO ESTRESSE
AO CALOR”**

por

Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino

A Banca Examinadora, reunida aos 27 dias do mês de março do ano de 2015, considera o(a) candidato(a) **APROVADO(A)**.

Prof. Dr. Eduardo Seixas Prado
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima Silva
Departamento de Educação Física e Ciência do Esporte
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador)

Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araújo
Departamento de Educação Física
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho contou com o envolvimento e apoio crucial de uma grande equipe que buscou intervir de forma eficaz, visando uma produção científica de qualidade, ficando em débito com todos eles.

Ao Professor Dr. Eduardo Seixas Prado pela orientação durante todo o processo de produção, desde o início dos estudos até agora, contribuindo com as análises, críticas construtivas, dúvidas, encorajamento e apoio, à escrita do trabalho e às coletas de dados, nos momentos mais precisos.

Ao Professor. MSc. Marcos Guilherme de Sousa Gouveia e Daniela Souza Araújo Rodrigues pela contribuição na análise dos dados sanguíneos coletados durante a pesquisa, de ambos.

Ao meu amigo José Cleiton da Conceição Alves por todo o seu empenho e disponibilidade para realizar as coletas de sangue, pois sem a sua presença esse projeto não poderia ter dado continuidade.

À nossa equipe de alunos do Curso de Educação Física Bacharelado e de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, os quais se disponibilizaram a participar das coletas antropométricas e análise do estado de hidratação. Do mesmo modo, aos ciclistas que se dispuseram a participar como amostra da pesquisa em prol do desenvolvimento científico local.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis durante todo esse processo, sem deixar que meu ânimo e vontade diminuíssem, dando o apoio necessário para que fosse dada continuidade aos meus trabalhos em busca da minha realização através de encorajamento e aconselhamento.

Minhas Amigas Rafaela Carvalho Pereira Lima, Thássia Casado Lima França e Natally Monteiro de Oliveira pelo apoio em todos os momentos os quais busquei seus auxílios. Mais umas vez ao Professor Dr. Eduardo Seixas Prado o qual foi o maior responsável, pois sem o incentivo e a oportunidade dada por ele para a entrada em um grupo de pesquisa e participar de todo o processo de desenvolvimento de trabalhos e do próprio grupo, a produção desse trabalho não seria possível.

Esse trabalho obteve grandes benefícios trazidos pela equipe envolvida. Em cada coleta realizada foi posto todo o conhecimento e experiência obtida ao longo do projeto. Por fim, expresso meu maior apreço a todos os discentes, docentes, voluntários e sujeitos que estão envolvidos com esta pesquisa oferecendo todo o potencial disponível para sua realização.

RESUMO

A nutrição esportiva tem o objetivo de fornecer ajustes às necessidades energéticas e de nutrientes, tendo em vista o melhor desempenho esportivo. No entanto, atletas frequentemente não adotam dietas balanceadas, não alcançando a ingestão ideal de nutrientes e líquidos, que resulta em possível redução de desempenho. Estudos sugerem que altas concentrações sanguíneas de amônia, induzida pelo exercício associado à dieta com baixas proporções de carboidratos (CHO), aqui denominada de cetogênica, além da desidratação e /ou hipertermia, podem promover alterações no metabolismo neuronal que estão associadas a danos no desempenho motor e cognitivo. Contudo, têm sido realizadas buscas por recursos que possam atenuar as altas concentrações da amonemia para favorecer o desempenho atlético. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito agudo da suplementação de cetoanálogos (KAAA) e o estado de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor, em ciclistas submetidos a exercício sob baixo estresse térmico. Essa dissertação é composta por três capítulos, constituídos por um artigo de revisão e dois artigos de resultados. O primeiro artigo "Hiperamonemia induzida pelo exercício e sua relação com a fadiga", teve o objetivo de fornecer informações sobre metabolismo da amônia e sua relação com o exercício, fadiga, e o uso de cetoanálogos como uma proteção para o metabolismo e desempenho atlético. Neste primeiro estudo, foram demonstradas evidências de que a amônia produzida em altas concentrações é um metabólito tóxico, que o exercício é capaz de exacerbar essa produção e que a suplementação de cetoanálogos possa proteger o desempenho de atletas. O segundo artigo, "Keto analogues and amino acid supplementation and its effects on ammonemia and performance under thermoneutral conditions", o qual avaliou a suplementação de KAAA no metabolismo da amônia e desempenho cognitivo-motor após exercício de alta intensidade sob condições de baixo estresse térmico. Foi demonstrado que, a suplementação de KAAA reduziu as concentrações de amônia, mas não afeta o desempenho físico e cognitivo-motor dos atletas. O terceiro artigo, "Efeito de diferentes estados de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor de atletas submetidos a exercício em ambiente de baixo estresse ao calor" avaliou diferentes estados de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor de atletas submetidos a exercício em ambiente de baixo estresse ao calor. Foi apresentado que uma perda de até 3 % da MC, parece não afetar o desempenho físico e cognitivo-motor em atletas aclimatados ao calor e alterações da MC não deve ser utilizada com parâmetro único para análise de prejuízos ao desempenho.

Palavras-chave: Metabolismo. Amônia. Exercício. Desidratação. Fadiga.

ABSTRACT

Sports nutrition has aim to adjust the energy and nutrient needs to better performance. However, athletes often adopt unbalanced diet ingesting drinking fluids and nutrients in inappropriate manner which can reduce performance. Studies suggest that high blood concentrations of ammonia exercise-induced associated to diet with low proportions of carbohydrate (CHO), here called the ketogenic, dehydration and / or hyperthermia, cause alterations in neuronal metabolism that are associated with damage to the motor and cognitive activity. Nevertheless, searches for resources that can mitigate the high concentrations of blood ammonia to promote and protect the performance has been made. The aim this study was evaluated the acute effect of keto analogues supplementation (KAAA) and status of hydration on physical and cognitive-motor performance in cyclists undergoing to exercise under low heat stress environment. This work comprises three chapters, consisting of one review and two original articles. The first article, "Exercise-induced hyperammonemia and its relationship with fatigue" aimed to provide information on ammonia metabolism and its relationship with exercise, fatigue, and the use of keto analogues as a protection for the metabolism and athletic performance. This article showed that the ammonia produced in high concentrations is a toxic metabolite that exercise may exacerbate this production and the KAAA supplementation may protect the performance of athletes. The second article, " Keto analogues and amino acid supplementation and its effects on ammonemia and performance under thermoneutral conditions" evaluated KAAA supplementation on ammonia metabolism after high intensity exercise and cognitive-motor performance under low heat stress environment. It was showed that KAAA supplementation reduced concentrations of ammonia, but does not affect physical performance and cognitive-motor athletes. The third article, " Effect of differents hydration status on physical and cognitive-motor performance of athletes submittes to exercise under low heat stress enviroment" evaluated the differents hydration status on cognitive-motor performance of athletes submitted exercise on low heat stress environment. It was showed that a loss of up to 3% of body mass, did not affect physical performance and cognitive-motor athletes acclimated to heat and changes of body mass should not be used with single parameter for the performance loss analysis.

Keywords: Metabolism. Ammonia. Exercise. dehydration. Fatigue.

LISTA DE FIGURAS

1º artigo: artigo de revisão

- Figura 1 - Processo de produção de amônia através do catabolismo dos nucleotídeos purínicos..... 25
- Figura 2 - Metabolismo de AACR dentro da mitocôndria da célula musculoesquelética..... 27
- Figura 3 - Processo de transaminação entre aminoácidos e cetoanálogos..... 31

2º artigo: artigo de resultados

- Figura 1 - Environmental conditions, body temperature, and thermal and comfort sensations were similar throughout the experimental protocol..... 57
- Figura 2 - Acute keto analogue and amino acid (KAAA) supplementation affects the ammonia, urea and urate metabolism..... 59
- Figura 3 - KAAA supplementation affects glucose but does not change lactate metabolism..... 60

3º artigo: artigo de resultados

- Figura 1 - Condições ambientais, temperatura corporal e sensações térmicas e de conforto durante o protocolo experimental..... 81
- Figura 2 - Concentrações de creatinina, hemoglobina e hematócrito durante o protocolo..... 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL - adenilsuccinato liase

AK - Adenilato kinase

AACR – Aminoácidos de cadeia ramificada

ADP – Adenosina difosfato

ALT - Alanina aminotransferase

AMP – Adenosina monofosfato

AMPD – AMP Desaminase

ATCR - Aminotransferase de cadeia ramificada

AS - adenilsuccinato sintetase

ATP – Adenosina trifosfato

BM - Body mass

°C - Graus centígrados

CHO – Carboidrato

Cre – Creatinina

DACCR - Desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada

FC – Frequência cardíaca

FC_{Max} - Frequência cardíaca máxima

GABA - γ -aminobutirato

GE – Gravidade específica

GLDH - glutamato desidrogenase

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

GS - Glutamina sintetase

HCT – Hematócrito

HGB - Hemoglobina

IBUTG - Índice de bulbo úmido temperatura de globo

IMP – Inosina monofosfato

KAAA – Cetoanálogos

MIT - Maximum incremental test

MK - Mioquinase

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NMDA – N-metil-D-aspartato

TIM – Teste incremental máximo

TIMn - Novo Teste Incremental

USG - Urine specific gravity

SNC – Sistema nervoso central

VO₂ – Consumo de oxigênio

VO_{2máx} – Consumo máximo de oxigênio

VPM - Volume plaquetário médio

W - Potência

WBGT - Wet Bulb Globe Temperature

W_{máx} – Potência máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	17
2.1	1º artigo: artigo de revisão: Hiperamonemia induzida pelo exercício e sua relação com a fadiga.....	18
2.2	2º artigo: artigo de resultados: Keto analogues and ammino acid supplementation and its effect on ammonemia and performance under thermoneutral conditions.....	43
2.3	3º artigo: artigo de resultados: Efeito de diferentes estados de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor de atletas submetidos a exercício em ambiente de baixo estresse ao calor.....	70
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	90
	APÊNDICES.....	95
	ANEXOS.....	99

O treinamento físico promove mudanças no perfil bioquímico, especialmente, no atleta (GLEESON; BISHOP, 2000; RIETJENS et al, 2005). A compreensão dessas alterações tem demonstrado que um cuidado nutricional é fundamental para um adequado fornecimento de substratos energéticos, imposto pelo metabolismo (GLEESON; BISHOP, 2000; COYLE, 2000; VENKATRAMAN; PENDERGAST, 2002; NOGUEIRA; COSTA, 2004). Um objetivo importante da nutrição para o atleta é fornecer ajustes das necessidades energéticas e de nutrientes, para que seja alcançado um melhor desempenho (BURKE; KIENS; IVY, 2004).

O equilíbrio do estado nutricional é essencial para o desempenho máximo de atletas, pois uma prática alimentar ideal para melhorar o desempenho no exercício envolve o balanço entre macronutrientes e micronutrientes, os quais influenciam no condicionamento físico, recuperação de fadiga após o exercício e prevenção de lesões. (AOI *et al.* 2006; LUKASKI, 2004). Embora, atletas frequentemente adotem dietas não balanceadas não alcançando a ingestão ideal de alguns nutrientes que são de difícil obtenção aos níveis normais. Quando a ingestão energética é limitada o corpo usa gordura e tecido magro como fonte de energia resultando em perda de força e desempenho (RAY; FOWLER, 2004). Assim, a utilização de suplementos contendo macro e micronutrientes é amplamente usada em vários esportes para dar suporte às necessidades nutricionais (AOI *et al.* 2006). Um aumento recente no uso de suplementos dietéticos tem sido observado em vários esportes em busca de melhora no desempenho, prevenção de doenças e compensação de uma dieta inadequada (HUANG; JOHNSON; PIPE, 2006).

Existe o reconhecimento de que uma avaliação nutricional, a partir de inquéritos dietéticos, seguida de uma intervenção, é importante para que o atleta tenha melhores possibilidades de desempenho (RAY; FOWLER, 2004; DIRETRIZ DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA DO ESPORTE, 2003, 2009). Principalmente, se estiver associada a uma avaliação do perfil bioquímico, considerados como ferramentas para a análise do metabolismo durante o estresse imposto pelo exercício fornecendo informações importantes, de forma que possibilita a identificação de alterações fisiológicas prevenindo situações que prejudicaria o desempenho de atletas submetidos a um estresse físico (SMITH; ROBERTS, 1994; SILVA; PEIXOTO; CAMERON, 2006).

Um bom estado nutricional e de hidratação pode atenuar o processo de fadiga pela redução da toxicidade da amônia em altas concentrações sanguíneas induzidas pelo exercício (BANISTER; CAMERON, 1990). Estudos sugerem que uma hiperamonemia induzida pelo exercício promove fadiga periférica e central, e um melhor controle de seus níveis sanguíneos durante o exercício, favorece um melhor desempenho (BANISTER; CAMERON, 1990; COLLOMP *et al.*, 2000; SNOW *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2012; NYBO, 2010; FALAVIGNA *et al.*, 2012). No entanto, atletas que realizam seus treinamentos e/ou competições em ambiente quente, com uma ingestão inadequada de carboidrato, sofrem um aumento do catabolismo de aminoácidos e/ou aumento da desaminação de AMP, que são as principais vias para produção de amônia durante a prática de exercício, produzindo níveis sanguíneos elevados desse metabólito (MONFORT *et al.*, 2002; CARVALHO-PEIXOTO; ALVES; CAMERON, 2007; BASSINI-CAMERON *et al.*, 2008; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010; NYBO, 2010; MOUADIL *et al.*, 2012). Seu acúmulo em altas concentrações é altamente tóxico para seres humanos, à medida que pode cruzar a barreira hematoencefálica e reduzir a função cerebral, levando a desordens neuropsiquiátricas e morte (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002; NYBO, *et al.*, 2005).

Níveis elevados de amônia no sangue durante exercício podem desencadear alterações no sistema nervoso central por promover: desequilíbrio na atividade de neurotransmissores (glutamato e o γ -aminobutirato – GABA); hiperatividade dos receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) ; inibição dos transportadores de glutamato de volta aos astrócitos; e alterações no GMPc pós-sináptico (MONFORT *et al.* 2002; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010). Essas alterações estão associadas a danos na atividade motora e cognitiva traduzidas em sintomas neurológicos agudos como: letargia, ataxia (perda da coordenação motora) e estupor (consciência parcial; dificuldade de reações motoras) (NYBO; SECHER, 2004; NYBO *et al.*, 2005; WILKINSON; SMEETON; WATT, 2010).

Estudos prévios têm realizado busca por recursos ergogênicos que possam minimizar a hiperamonemia induzida pelo exercício e, ao mesmo tempo favorecer e proteger o desempenho (COLLOMP *et al.*, 2000; CARVALHO-PEIXOTO; ALVES; CAMERON, 2007; BASSINI-CAMERON *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2012; KIM; KIM, 2013;). Prado *et al.*, (2011), De Almeida *et al.*, (2010) e Liu *et al.*, (2012) verificaram que uma suplementação aguda de uma mistura de

cetoanálogos (KAAA), reduz a amonemia durante diferentes tipos de exercício tanto em ratos como em humanos, além de aumentar a tolerância ao exercício em humanos.

Além do mais, sabe-se que as condições ambientais quentes, hipertermia e desidratação podem afetar o desempenho cognitivo e motor, como prejuízos na coordenação motora, tempo de reação e memória através de processos similares aos apresentados pela hiperamonemia (BINKLEY *et al.*, 2002; MAUGHAN, 2003; BRISSWALTER; COLLARDEAU; RENÉ, 2002; SHARMA, 2007; GANIO *et al.*, 2011).

Visto que, há ausência de evidências científicas sobre a relação entre a hiperamonemia causada pelo exercício, dieta e desempenho físico e cognitivo-motor, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito agudo da suplementação de KAAA no metabolismo da amônia, estado de hidratação e desempenho físico e cognitivo-motor, em ciclistas treinados, após exercício de alta intensidade sob baixo estresse térmico. Nós hipotetizamos que quando o exercício é realizado em ambiente termoneutro, a suplementação de KAAA reduz a amônia produzida pelo exercício, mas não melhora o desempenho físico e cognitivo-motor.

1º artigo: artigo de revisão

CAMERINO, SRAS; PRADO, ES. Hiperamonemia induzida pelo exercício e sua relação com a fadiga.

Artigo escrito para a revista: Acta Brasileira do Movimento Humano.

Artigo de revisão

Hiperamonemia induzida pelo exercício e sua relação com a fadiga.
Exercise-induced hyperammonemia and its relationship with
fatigue.

Hiperamonemia induzida pelo exercício.

Exercise-induced hyperammonemia.

Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino¹ - Levantamento bibliográfico, montagem, análise e interpretação e, elaboração do manuscrito.

Eduardo Seixas Prado² - Concepção e desenho do estudo, análise e interpretação, elaboração, revisão e aprovação da versão final do manuscrito.

¹Mestrando em Nutrição - Programa de Mestrado em Nutrição - Universidade Federal de Alagoas. Maceió/AL. Brasil.

²Doutor em Genética e Bioquímica - Laboratório de Fisiologia do Exercício – Curso de Educação Física Bacharelado - Universidade Federal de Alagoas. Maceió/AL. Brasil.

Universidade Federal de Alagoas. Campus A.C. Simões; Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins. CEP: 57.072-970. Maceió/AL. Brasil.
Correspondência para: E. S. Prado - espradoo@ig.com.br

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo a Pesquisa de Alagoas - FAPEAL

Edital Nº 001/2013; Processo PEB 20130603-002-0040-0046.

RESUMO

A amônia produzida durante o exercício tem sido associada com o início de fadiga central. Tal produção ocorre através dos catabolismos de purinas nucleotídeos e de aminoácidos de cadeia ramificada. Essa produção pode ser exacerbada quando os estoques de glicogênio são reduzidos e/ou durante exercício no calor associado a hipertermia e/ou desidratação. Assim, quando os sistemas de remoção desse metabólito estão saturados, órgãos vitais ficam expostos a toxicidade da hiperamonemia, tal como o sistema nervoso central. Alta concentração de amônia no sangue pode levar a perturbações metabólicas, prejudicando mecanismos de neurotransmissores, possibilitando assim, uma queda de desempenho físico e cognitivo. Se essa hiperamonemia estiver associada, a um ambiente quente que promova hipertermia e desidratação com redução superior a 2% da massa corporal em exercícios prolongados, parecem potencializar os prejuízos cognitivos-motores. Dessa forma, parece que a hiperamonemia é uma das causas para fadiga durante o exercício. Contudo, a utilização do exercício associado com dieta cetogênica fornece um excelente modelo para estudar esses fatores para a importância da fadiga central. Estudos demonstram que a manipulação dietética e/ou uso de suplementação a base de cetoanálogos, é capaz de reduzir a hiperamonemia induzida pelo exercício. Então, o uso de cetoanálogos pode levar à melhora do desempenho em atletas durante a prática de exercício prolongado.

Palavras-chave: hiperamonemia, exercício, fadiga, desempenho atlético.

ABSTRACT

Ammonia produced during exercise has been associated with the onset of central fatigue. This occurs through purine nucleotide and branched-chain amino acids catabolism. This production can be exacerbated when glycogen stores are reduced and/or during exercise in the heat associated with hyperthermia and/or dehydration. Thus, when the removal systems of this metabolite are saturated vital organs are exposed to toxicity of hyperammonemia, such as the central nervous system. High concentration of ammonia in the blood can lead to metabolic disorders, impairing mechanisms of neurotransmitters, thus enabling a reduction of physical and cognitive performance. When hyperammonemia is associated with warm environment that promotes hyperthermia and dehydration with reduction of more than 2% of body mass during prolonged exercise, seem to potentiate the cognitive-motor impairments. Thus, it seems that hyperammonemia is a cause for fatigue during exercise. However, the use of the ketogenic diet associated with exercise provides an excellent model to study factors for the importance of central fatigue. Studies have shown that dietary manipulation and / or use of the keto analogues supplementation is able to reduce exercise-induced hyperammonemia. So the use of keto analogues can lead to improved performance in athletes during prolonged exercise practice.

Keywords: hyperammonemia, exercise, fatigue, athletic performance.

1. Introdução

A amônia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) é um composto nitrogenado, presente na circulação sistêmica, que é produzida por diversas fontes (intestino, músculo, rins e cérebro), a partir de várias vias metabólicas do corpo ¹. O aumento de suas concentrações pode ser causado por alterações patológicas no metabolismo e no sistema de remoção, tornando-se altamente tóxico para seres humanos, à medida que pode cruzar a barreira hematoencefálica e reduzir a função cerebral, levando a desordens neuropsiquiátricas e morte ²⁻⁵. No entanto, estudos também têm demonstrado que a amonemia aumenta durante e após a prática de vários tipos de exercício ⁶⁻⁸ e que tais concentrações estão associadas com a fadiga, podendo desencadear letargia, ataxia e estupor, que ocorrem durante e após o exercício em atletas ⁹. Tais sintomas assemelham-se aos de indivíduos acometidos com doenças hepáticas ¹⁰.

A produção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ durante o exercício ocorre através da combinação de ambas desaminação de adenosina monofosfato (AMP) e aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), processos que são ativados em uma maneira dependente da intensidade e duração do exercício ^{4, 11}. Essa produção pode ser exacerbada quando o exercício é associado a uma redução dos estoques de glicogênio, deixando os sistemas corporais (principalmente o sistema nervoso central - SNC), susceptíveis à toxicidade da $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, possibilitando redução do desempenho esportivo ¹²⁻¹⁴. Além da redução do glicogênio, alguns estudos também relatam que a desidratação induzida pelo exercício também é capaz de exacerbar a produção da $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ e causar redução de desempenho cognitivo ¹⁵. Tais informações sugerem que a hiperamonemia induzida pelo exercício pode ser uma das causas para a origem da fadiga ^{16, 17}.

Dentro desse contexto, formas diferenciadas de intervenção que possam atenuar a hiperamonemia induzida pelo exercício pode ser uma ferramenta útil para a obtenção de benefícios ao desempenho esportivo. Estudos têm demonstrado o uso de várias substâncias, no sentido de reduzir a hiperamonemia induzida pelo exercício, seja em ratos ou seres humanos ¹⁸⁻²². Talvez, a mais promissora seja a manipulação através do uso agudo de

cetoanálogos, os quais interferem no metabolismo da $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ e que conseqüentemente pode aumentar a tolerância ao treinamento e reduzir seus efeitos de fadiga²³⁻²⁵.

Portanto, esta revisão tem o objetivo de fornecer informações sobre metabolismo da $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ e sua relação com o exercício e fadiga, tendo em vista apresentar discussões sobre o uso de cetoanálogos como uma proteção para o metabolismo e desempenho atlético.

2. Amonemia durante o exercício.

Uma hiperamonemia induzida pelo exercício está associada à fadiga central e/ou periférica, indicando que isso pode ser consequência do compartilhamento de tal metabólito, por órgãos vitais, tendo em vista a manutenção das funções fisiológicas^{4, 9}. Independente de qual seja a fonte ou o destino da $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ produzida, ela sempre será transportada para a corrente sanguínea e afetar todos os órgãos pela circulação sistêmica⁹. A produção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ durante a prática de exercício físico ocorre através de duas fontes predominantes, o ciclo das purinas nucleotídeos (desaminação de AMP) e a desaminação AACR. Assim, os músculos tornam-se a maior fonte de produção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ⁺²⁶⁻²⁸.

2.1 Desaminação de AMP

Esse processo ocorre através da hidrólise da AMP pela enzima AMP desaminase (AMPD) formando $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ e inosina monofosfato (IMP) (figura 1), a qual tem uma relação entre a formação de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ no músculo e trabalho anaeróbico^{29, 30}.

Além disso, essa reação foi identificada como parte do processo do ciclo das purinas nucleotídeos que envolvem mais três reações interligadas e controladas pelas enzimas AMPD, adenilsuccinato sintetase (AS) e adenilsuccinato liase (AL)³¹.

Em condições fisiológicas normais tais processos se equilibram para manter níveis adequados de adeninas, além de produzir intermediários do Ciclo de Krebs capazes de produzir energia celular e ressintetizar adenosina trifosfato (ATP)^{12, 32-35}. Esse ciclo também está ativo nos tecidos neuronais^{36, 37} e pode acometer o SNC à exposição de concentrações elevadas de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, já que o cérebro não possui o ciclo da uréia para metabolizá-la, dependendo assim, da formação de glutamina a partir do glutamato como processo de remoção^{3, 38}.

Aproximadamente, 90% da AMPD está presente no sarcoplasma do músculo esquelético, na sua forma inativa³⁹. No entanto, quando há a prática de exercício, causando estresse fisiológico, existe uma modificação nas características cinéticas das enzimas que participam de cada passo do processo, onde a ação da AMPD depende do tipo de fibra, intensidade do exercício e a taxa de ATP/AMP⁹. A atividade aumentada da AMPD causa uma taxa de degradação de AMP elevada gerando um desequilíbrio na reação da adenilato kinase (AK) para gerar ATP com o intuito de manter a carga energética celular e contração muscular, aumentando assim, a produção de AMP³⁴.

Ainda, a desaminação de AMP depende da taxa de AMPD, a qual varia de acordo com a capacidade oxidativa do músculo^{40, 41}. O controle da desaminação de AMP no músculo é complexo, além de ser uma consequência da tentativa de manter a contração muscular durante o exercício intenso. Para garantir que as fontes de energia sejam adequadas para a contração muscular, altos níveis de AMP devem ser desaminados e grandes quantidades de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ serão produzidas⁴. Langfort et al⁴², sugerem que a formação de amônia durante o exercício submáximo pode ser resultado do aumento do ciclo das purinas nucleotídeos, pois ocorre o recrutamento progressivo de fibras musculares com baixa capacidade oxidativa que possuem maior atividade de AMPD. O exercício será interrompido devido à fadiga, o que coincide com os altos níveis de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ reduzidos durante o exercício¹³.

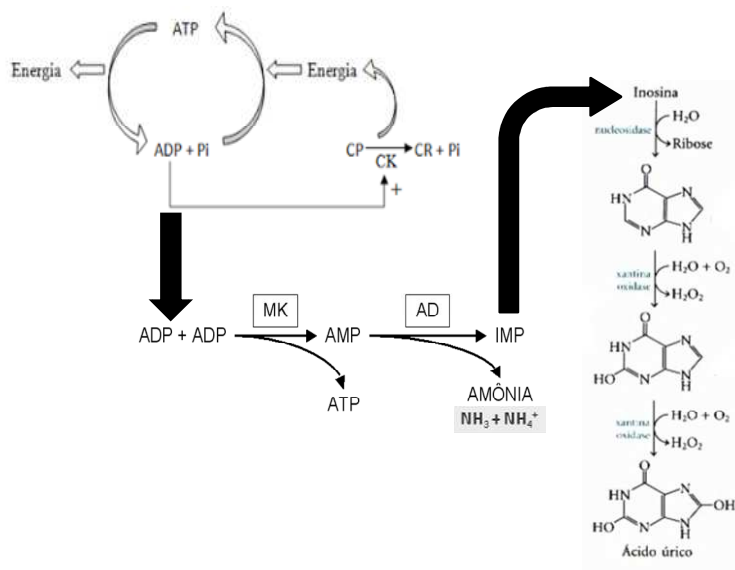


Figura 1. Processo de produção de amônia através do catabolismo dos nucleotídeos purínicos (desaminação da AMP). Quando há hidrólise de ATP o ADP produzido sofre uma ação de uma miokinase, resintetizando ATP e produzindo AMP. Depois, o AMP sofre o processo de desaminação produzindo amônia e IMP que consequentemente é metabolizado em ácido úrico (urato).

2.2 Desaminação de AACR

O músculo esquelético tem uma capacidade de captação de aproximadamente 40% dos aminoácidos essenciais dietéticos, o qual favorece o catabolismo de AACR, principalmente leucina, isoleucina e valina⁴³. Esse catabolismo de aminoácidos no músculo pode ser intensificado pelo exercício, que consequentemente, contribui para a produção elevada de NH₃ + NH₄⁺ no sangue e aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica^{9, 44}. Este processo ocorre através das reações da aminotransferase de cadeia ramificada (ATCR) e desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada (DACCR) formando intermediários do ciclo de Krebs utilizados para produção oxidativa de energia⁴⁵. Inicialmente, o aminoácido sofre ação da ATCR onde grupo amino do AACR é transferido para o 2-oxoglutarato para formar glutamato, o qual pode ser usado para sintetizar glutamina via glutamina sintetase (GS) ou formar alanina através da combinação com o piruvato. Na ausência de piruvato

o glutamato pode sofrer a ação do co-fator NAD^+ através da reação da glutamato desidrogenase (GLDH) formando NH_4 em sua forma livre⁴⁶ (figura 2).

Durante o exercício, as ações dessas enzimas podem aumentar 4 a 10 vezes em humanos e ratos, respectivamente^{47, 48}, aumentando a degradação de AACR e produzindo $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ em concentrações elevadas. Por outro lado, quando há disponibilidade de glicogênio suficiente para ocorrer produção de piruvato, o grupo amino doado pelo glutamato será incorporado ao piruvato para formação de alanina e transportá-lo para o fígado e ser metabolizado. Assim, a produção sistêmica de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, originada do catabolismo de AACR, está relacionada à disponibilidade reduzida de piruvato em consequência da depleção dos estoques de glicogênio^{46, 49}. Isso sugere que o acúmulo de altas concentrações de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ durante o exercício prolongado, ocorre pela depleção dos estoques de glicogênio que reduz a produção de piruvato levando à maior ativação da GLDH para produção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ livre. A utilização de uma dieta com baixo consumo de carboidratos (dieta cetogênica) associada com o exercício físico pode reduzir os estoques de glicogênio antes do exercício e exacerba a produção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ^{42, 50} através dos processos citados anteriormente.

Estudos têm demonstrado que há relação entre a produção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ durante exercício intermitente (30 % - 50 % do $\text{VO}_{2\text{máx}}$) e exercício submáximo e prolongado (75 % - 85% FC_{Max} e 2 h de ciclismo) com a redução dos estoques de glicogênio, sugerindo que a $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ foi produzida pelo catabolismo de AACR^{13, 24}. Langfort et al⁴², relatou que durante exercício de carga progressiva e intenso e o uso de uma dieta com baixas proporções de carboidrato, as concentrações de amônia se elevaram (~ 128 μM), gradualmente a cada carga imposta e esse efeito pode ter ocorrido pela redução da disponibilidade de carboidratos aumentando o catabolismo de aminoácidos. Isso indica que o catabolismo de aminoácidos no músculo pode ser importante para a produção de energia na ausência de substratos energéticos suficientes com o intuito de manter a contração muscular por um maior período de tempo. No entanto, outros estudos relatam que a suplementação de cetoanálogos antes do exercício pode reduzir a produção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ durante o exercício^{23, 24}.

O aumento excessivo das concentrações $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ nos sangue também é encontrado em indivíduos acometidos com quadros patológicos, tal como na encefalopatia hepática. No exercício prolongado e intenso, os níveis séricos de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ podem ser semelhantes aos níveis produzidos durante a encefalopatia hepática. Nessas condições de exercício ou patológica, uma hiperamonemia pode levar a distúrbios metabólicos e de neurotransmissores¹⁰,
51 .

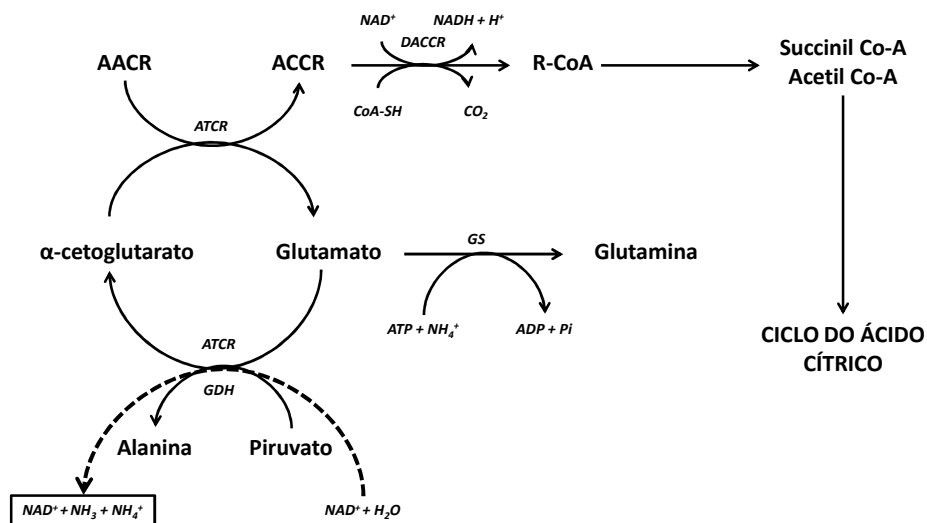


Figura 2. Metabolismo de AACR dentro da mitocôndria da célula musculoesquelética. Os AACR durante o exercício submáximo e prolongado podem ser utilizados como substratos energéticos adicionais, que tem como produto intermediários do ciclo do ácido cítrico para o metabolismo energético celular. Mas, também fornece substratos para a produção de amônia em sua forma livre dentro do músculo.

3. Padrão de intoxicação aguda da amônia e redução de desempenho esportivo

A $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ produzida a altos níveis séricos é tóxica e pode levar a distúrbios funcionais do SNC, causando coma, ou até mesmo a morte. Para evitar que esse quadro seja alcançado, humanos dispõem do ciclo da uréia, presente apenas no fígado, que funciona como um mecanismo de desintoxicação da $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, transformando-a em uréia. Mas, quando esse

mecanismo é prejudicado, os níveis de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ no sangue aumentam proporcionando a exposição de órgãos vitais à toxicidade desse metabólito.

Altas concentrações arteriais de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ têm sido correlacionadas com o desenvolvimento de edema cerebral, que é causa de morte em indivíduos acometidos com encefalopatia hepática ou falha aguda do fígado⁵¹,⁵². Talvez, o aumento da $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ sérica acima dos níveis críticos sinalize o início de sintomas no SNC o bastante para reduzir o desempenho motor e/ou cognitivo, através da fadiga central em humanos e animais⁹. Distúrbios semelhantes também estão presentes em indivíduos acometidos com encefalopatia hepática, ou seja, apresentam os mesmos sintomas de desordens neurotransmissoras e neuromusculares que podem prejudicar a coordenação motora e alterações nos padrões de sono e cognição, porque nesse quadro a capacidade de desintoxicação/remoção de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ é reduzida, deslocando esse metabólito para o sistema muscular e para o astrócito no SNC⁵³.

Isso ocorre porque o tecido neuronal não tem ciclo da uréia e as altas concentrações sanguíneas de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ captadas através da barreira hematoencefálica são desintoxicadas pelo processo da formação de glutamina através da reação da GS². A $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ através de sua incorporação à glutamina tem um papel importante na neurotransmissão, pois ela se constitui como o único precursor para a biossíntese de glutamato e GABA, dois aminoácidos neurotransmissores, devido ao fato da GS ser expressa exclusivamente nos astrócitos, quando se trata de tecidos neuronais⁴,⁵⁴. O glutamato é formado a partir da ação da glutaminase e a interação malato-aspartato, onde sofre a ação da glutaminase na membrana mitocondrial tendo acesso à matriz mitocondrial, onde ele transfere o seu grupo amino ao oxaloacetato gerando aspartato e α -cetoglutarato, é translocado para o citoplasma e sofre uma segunda transaminação para produzir glutamato⁵⁴. O GABA é gerado, inicialmente, através do processo acima citado para produzir glutamato, o qual sofre a ação da enzima glutamato descarboxilase produzindo GABA⁵⁴.

Um maior desequilíbrio desses neurotransmissores pode ser visto quando há aumento nos níveis de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ devido à falha do sistema de desintoxicação através da formação glutamina presente nos astrócitos⁴.

Receptores NMDA são afetados pela intoxicação de altas concentrações de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, onde foi encontrada uma super estimulação desses receptores e da formação de GMPc que induziu a produção de espécies reativas de oxigênio e prejuízos na manipulação das concentrações de glutamato extracelular pelos transportadores e excitotoxicidade de glutamato⁵⁵⁻⁵⁸. Além disso, os níveis de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4$ aumentam acima de dez vezes em indivíduos com falha aguda do fígado⁵⁹.

Dessa mesma maneira, o exercício é um estímulo metabólico que causa hiperamonemia^{12, 13, 60, 61} o que pode levar aos possíveis distúrbios apresentados anteriormente. Prado *et al.*²⁴, relataram que atletas de ciclismo submetidos ao exercício prolongado aumentaram os níveis de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ em relação aos valores de repouso em 35%. Além disso, De Almeida *et al.*²³ encontraram um aumento de duas vezes mais nas concentrações de NH_4 em ratos submetidos ao exercício resistido. Em outro estudo, Carvalho-Peixoto *et al.*⁷ observaram um aumento de aproximadamente 70% dos valores de NH_4 em comparação com os valores de repouso em corredores de resistência. Além disso, parece que a condição ambiental pode afetar as concentrações de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ durante o exercício⁶². Mohr *et al.*⁶, demonstraram que os níveis circulantes de NH_4 foram 30% maiores durante o exercício realizado sobre estresse do calor comparado ao ambiente termoneutro. Esses resultados sugerem que o exercício é capaz de produzir altos níveis de NH_4 , aumentar a captação cerebral contínua, devido à saturação da capacidade de remoção da NH_4 que causa o desenvolvimento e a aceleração da fadiga central.

Contudo, estudos prévios também relatam uma redução de desempenho cognitivo quando há a prática de exercício prolongado acima de duas horas de exercício associado com desidratação, como sugere Grego *et al.*⁶³. Esse estudo verificou que 20 ciclistas habituados a treinamentos prolongados, submetidos a um exercício com 3 h de duração, um prejuízo na velocidade do processamento de informação após 2 h de exercício. Alguns aspectos da cognição causados por fatores como estresse por calor, desidratação ou hipoglicemia estão frequentemente associados com o aparecimento de fadiga central e possível redução do desempenho cognitivo e físico. Grego *et al.*⁶⁴, avaliaram o efeito do exercício submáximo prolongado (3 h) sobre desempenho cognitivo de oito ciclistas treinados. Os resultados desse estudo mostraram um

aumento no desempenho cognitivo após 1 h de teste, mas após 2 h de teste esse desempenho reduz à medida que a duração do exercício aumenta. Já no estudo de Ganio *et al.*¹⁵, uma desidratação aguda (perda de 1,59 % da massa corporal) sem a presença de hipertermia induziu mudanças adversas na função cognitiva, aumentou a tensão/ansiedade e fadiga que são tipicamente associadas à redução do desempenho. Esse resultado sugere que a redução de desempenho pode ter ocorrido por distúrbios originados pela desidratação, além da alta produção de NH_4 ocorrida durante todo o exercício.

Existem evidências que, somente, a hipertermia também promove fadiga central através de distúrbios na habilidade do cérebro manter a ativação de músculos esqueléticos, assim prejudicando o desempenho cognitivo-motor⁶⁵. Walters *et al.*⁶⁶, relatou que uma redução no desempenho de corrida a temperaturas retais entre 39.7 e 40.3°C. Esse efeito pode ser aumentado pelas condições ambientais em que o exercício é realizado e quando a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar são altas, a capacidade de sustentar o exercício é reduzida⁶⁷.

Tais estudos associam os altos níveis séricos de NH_4 , exercícios de longa duração, hipertermia e desidratação à possíveis alterações metabólicas-cerebrais como influência no início de sintomas de fadiga central e redução de desempenho físico e cognitivo.

Portanto, esses estudos sugerem que indivíduos em hiperamonemia induzida pelo exercício podem estar susceptíveis a comprometimentos nas suas funções fisiológicas neuronais, possibilitando uma redução do seu desempenho cognitivo e motor. Por outro lado, deve ser considerado que não há evidências científicas de estudos relacionando, diretamente, hiperamonemia induzida pelo exercício e desempenho físico e cognitivo. Essa condição gera um novo tema a discussões científicas e produção de estudos com o objetivo de elucidar tal questão.

4. Cetoanálogos como recurso de proteção contra a hiperamonemia induzida pelo exercício e recurso ergogênico

Por muitos anos têm sido relatado que cetoanálogos são capazes de reduzir a nefrotoxicidade atrasando a necessidade para diálises em pacientes com nefropatias⁶⁸. O aumento dos níveis de NH_4 no sangue em resposta ao exercício pode ser manipulado através do uso de aminoácidos e cetoanálogos que interferem no metabolismo da NH_4 ⁷. Durante a produção de energia através de aminoácidos como substrato, ocorrem desaminações ou trasaminações para formar cetoanálogos e liberar o grupo amino para ser metabolizado⁶⁹. Essas reações são reversíveis e o uso de cetoanálogos pode reduzir as concentrações de NH_4 no sangue resultando na produção de aminoácidos⁷⁰ (figura 3).

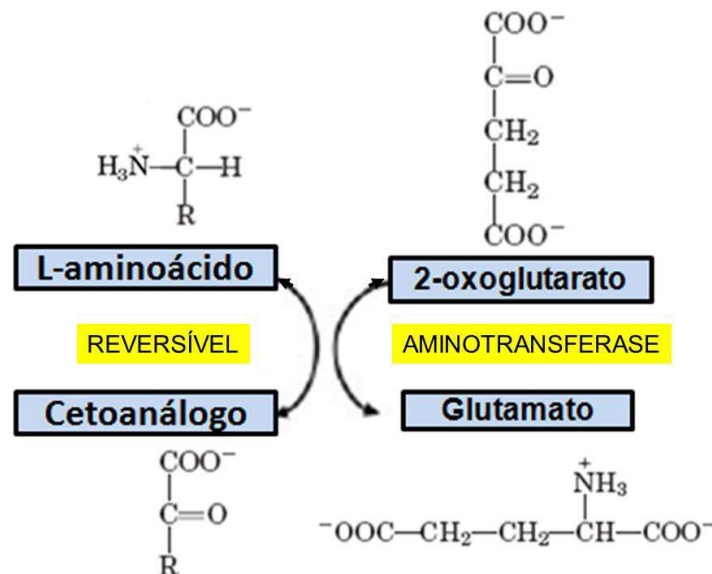


Figura 3. Processo de transaminação entre aminoácidos e cetoanálogos. Um L-aminoácido pode doar o grupo amino para um cetoanálogo ou cetoácido presente, originando um novo L-aminoácido e um cetoanálogo. Esse processo é reversível. O L-aminoácido produzido pode doar o grupo amino para o cetoanálogo e produzir novamente o L-aminoácido e cetoanálogo anterior.

Para nosso conhecimento, não existem estudos anteriores investigando o efeito da suplementação de cetoanálogos no desempenho de atletas. No entanto, três estudos publicados recentemente relatam que a utilização de cetoanálogos em humanos e animais tem efeitos metabólicos positivos²³⁻²⁵. Em um estudo com ratos adultos submetidos ao exercício resistido e suplementação aguda de cetoanálogos, De Almeida *et al.*²³, relatou um aumento de duas vezes nos níveis de NH_4 (ratos exercitados) comparados com o grupo controle e aumentou significativamente em 17% a produção de uréia no sangue. Porém, a suplementação aguda de cetoanálogos foi capaz de reduzir os níveis elevados de NH_4 causados pelo exercício resistido. Além disso, a suplementação foi capaz de aumentar em 10% os níveis de glicose comparados com o grupo controle, fornecendo novas moléculas de glicose para manutenção do exercício através da gliconeogênese originada por reações anapleróticas no ciclo de Krebs.

Esse resultado foi suportado pelo estudo de Prado *et al.*²⁴ os quais submeteram ciclistas a duas horas de exercício prolongado e dieta cetogênica para induzir a elevação dos níveis de NH_4 objetivando determinar o efeito da suplementação aguda de cetoanálogos. A amonemia induzida pelo exercício aumentou em 35% no grupo controle, mas no grupo suplementado não houve aumento significativo. Esse resultado confirma que a suplementação com cetoanálogos é capaz de reduzir as altas concentrações de NH_4 produzidas durante o exercício.

Liu *et al.*²⁵, submeteram 33 adultos saudáveis e não treinados a quatro semanas de treinamento e suplementação de cetoanálogos para investigar os efeitos dessa suplementação na tolerância ao treinamento. Neste estudo foram encontrados maiores valores na potência máxima e torque muscular. Já o estresse geral e a exaustão emocional após o protocolo de treinamento foram reduzidos no grupo suplementado com cetoanálogos comparados com o grupo controle. Assim, os sujeitos foram capazes de alcançar um maior volume de treino acompanhado por um melhor estado de recuperação. Isso sugere que a suplementação de cetoanálogos aumenta a tolerância ao exercício e os efeitos do treinamento. No entanto, deve-se considerar que este estudo foi realizado com indivíduos não treinados e que os resultados obtidos podem não ser

causados apenas pela suplementação, mas também pelo efeito do treinamento.

De acordo com os estudos supracitados, a suplementação de cetoanálogos pode reduzir esse acúmulo de NH_4 no sangue possibilitando proteger a homeostase neurotransmissora e o desempenho físico e cognitivo de atletas. Dessa forma, a utilização de cetoanálogos como recurso de proteção para atletas submetidos ao exercício prolongado deve ser considerada. No entanto, devem ser realizados estudos associando diretamente a suplementação de cetoanálogos com medidas de desempenho físico e cognitivo para verificar se essa suplementação é capaz de proteger o desempenho de atletas.

5. Conclusão

Essa revisão apresenta evidências de que a $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ produzida em altas concentrações é um metabólito tóxico para praticantes de exercício físico. O exercício é um estímulo capaz de exacerbar sua produção na circulação sistêmica, através de fatores externos e internos, deixando órgãos vitais susceptíveis à sua toxicidade. Entre os danos associados a $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ estão os distúrbios metabólicos que comprometem a homeostase neurotransmissora com possível redução de desempenho físico e cognitivo. Estudos têm demonstrado o uso de várias substâncias e/ou suplementações, tal como os cetoanálogos, para minimizar uma hiperamonemia induzida pelo exercício e, conseqüentemente, maximizar o desempenho de atletas. Mas, ainda não há evidências de estudos associando o desempenho físico e cognitivo com a utilização da suplementação de cetoanálogos como recurso ergogênico e como fator de proteção para o desempenho de atletas. Assim, conclui-se que há a necessidade da realização de mais estudos com o objetivo de elucidar tal questão.

REFRÊNCIAS

1. Olde Damink SW, Deutz NE, Dejong CH, Soeters PB, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int.* 2002 Aug-Sep;41(2-3):177-88.
2. Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol.* 2002 Jul;67(4):259-79.
3. Nybo L, Dalsgaard MK, Steensberg A, Moller K, Secher NH. Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *J Physiol.* 2005 Feb 15;563(Pt 1):285-90.
4. Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol.* 2010 Jul;91(3):200-19.
5. Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipo V. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochem Int.* 2002 Aug-Sep;41(2-3):95-102.
6. Mohr M, Rasmussen P, Drust B, Nielsen B, Nybo L. Environmental heat stress, hyperammonemia and nucleotide metabolism during intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2006 May;97(1):89-95.
7. Carvalho-Peixoto J, Alves RC, Cameron LC. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007 Dec;32(6):1186-90.
8. Mouadil A, Debout C, Read MH, Morello R, Allouche S, Chapon F. Blood metabolite data in response to maximal exercise in healthy subjects. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2012 Jul;32(4):274-81.

9. Banister EW, Cameron BJ. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med.* 1990 May;11 Suppl 2:S129-42.
10. Takuma Y, Nouse K, Makino Y, Hayashi M, Takahashi H. Clinical trial: oral zinc in hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Nov;32(9):1080-90.
11. Bachini F, Werneck-de-Castro JPS, Moretzsohn LC, Bassini-Cameron A, Cameron L-C. Moderate-intensity exercise associated with ketogenic diet. A model for the study of ammonia metabolism? *Fit Perf J.* 2009;9(3):226-32.
12. Czarnowski D, Langfort J, Pilis W, Gorski J. Effect of a low-carbohydrate diet on plasma and sweat ammonia concentrations during prolonged nonexhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995;70(1):70-4.
13. Greenhaff PL, Leiper JB, Ball D, Maughan RJ. The influence of dietary manipulation on plasma ammonia accumulation during incremental exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1991;63(5):338-44.
14. Winnick JJ, Davis JM, Welsh RS, Carmichael MD, Murphy EA, Blackmon JA. Carbohydrate feedings during team sport exercise preserve physical and CNS function. *Med Sci Sports Exerc.* 2005 Feb;37(2):306-15.
15. Ganio MS, Armstrong LE, Casa DJ, McDermott BP, Lee EC, Yamamoto LM, et al. Mild dehydration impairs cognitive performance and mood of men. *Br J Nutr.* 2011 Nov;106(10):1535-43.
16. Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev.* 2001 Oct;81(4):1725-89.
17. Bassini A, Cameron LC. Sportomics: Building a new concept in metabolic studies and exercise science. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Mar 21;445(4):708-16.

18. Bassini A, Magalhaes-Neto AM, Sweet E, Bottino A, Veiga C, Tozzi MB, et al. Caffeine decreases systemic urea in elite soccer players during intermittent exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2013 Apr;45(4):683-90.
19. Kim DI, Kim KS. Walnut extract exhibits anti-fatigue action via improvement of exercise tolerance in mice. *Lab Anim Res.* 2013 Dec;29(4):190-5.
20. Matthys D, Calders P, Pannier JL. Inhaled salbutamol decreases blood ammonia levels during exercise in normal subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998 Dec;79(1):110-3.
21. Tsintzas OK, Williams C, Singh R, Wilson W, Burrin J. Influence of carbohydrate-electrolyte drinks on marathon running performance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995;70(2):154-60.
22. Wu RE, Huang WC, Liao CC, Chang YK, Kan NW, Huang CC. Resveratrol protects against physical fatigue and improves exercise performance in mice. *Molecules.* 2013;18(4):4689-702.
23. de Almeida RD, Prado ES, Llosa CD, Magalhaes-Neto A, Cameron LC. Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. *Br J Nutr.* 2010 Nov;104(10):1438-42.
24. Prado ES, de Rezende Neto JM, de Almeida RD, Doria de Melo MG, Cameron LC. Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions. *Br J Nutr.* 2011 Feb 16:1-5.
25. Liu Y, Lange R, Langanky J, Hamma T, Yang B, Steinacker JM. Improved training tolerance by supplementation with alpha-Keto acids in

untrained young adults: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012;9(1):37.

26. Babij P, Matthews SM, Rennie MJ. Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1983;50(3):405-11.

27. Banister EW, Allen ME, Mekjavic IB, Singh AK, Legge B, Mutch BJC. The time course of ammonia and lactate accumulation in blood during bicycle exercise. *Eur J Appl Physiol.* 1983;51:195-202.

28. Cardelli-Cangiano P, Cangiano C, James JH, Ceci F, Fischer JE, Strom R. Effect of ammonia on amino acid uptake by brain microvessels. *J Biol Chem.* 1984;259:5295-300.

29. Fox IH. Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation. *Metabolism.* 1981 Jun;30(6):616-34.

30. Kinugawa T, Fujita M, Ogino K, Kato M, Osaki S, Igawa O, et al. Catabolism of adenine nucleotides favors adenosine production following exercise in patients with chronic heart failure. *J Card Fail.* 2006 Dec;12(9):720-5.

31. Lowenstein JM. The purine nucleotide cycle revisited [corrected]. *Int J Sports Med.* 1990 May;11 Suppl 2:S37-46.

32. Sutton JR, Toews CJ, Ward GR, Fox IH. Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man. *Metabolism.* 1980 Mar;29(3):254-60.

33. Sahlin K, Katz A. Purine nucleotide metabolism. *Principles of exercise biochemistry. Med Sport Sci.* 1988;27:120-39.

34. Hisatome I, Morisaki T, Kamma H, Sugama T, Morisaki H, Ohtahara A, et al. Control of AMP deaminase 1 binding to myosin heavy chain. *Am J Physiol.* 1998 Sep;275(3 Pt 1):C870-81.
35. Demura S, Morishita K, Yamada T, Yamaji S, Komatsu M. Effect of L-ornithine hydrochloride ingestion on intermittent maximal anaerobic cycle ergometer performance and fatigue recovery after exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2011 Nov;111(11):2837-43.
36. Schultz V, Lowenstein JM. Purine nucleotide cycle. Evidence for the occurrence of the cycle in brain. *J Biol Chem.* 1976 Jan 25;251(2):485-92.
37. Schultz V, Lowenstein JM. The purine nucleotide cycle. Studies of ammonia production and interconversions of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides by rat brain in situ. *J Biol Chem.* 1978 Mar 25;253(6):1938-43.
38. Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int.* 2002 Aug-Sep;41(2-3):123-42.
39. Rundell KW, Tullson PC, Terjung RL. AMP deaminase binding in contracting rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1992 Aug;263(2 Pt 1):C287-93.
40. Bockman EL, McKenzie JE. Adenosine production in skeletal muscle of different fiber types, in Baer H., Drummond G. I. (eds). *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides* 1979:145-53.
41. Meyer RA, Dudley GA, Terjung RL. Ammonia and IMP in different skeletal muscle fibers after exercise in rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1980 Dec;49(6):1037-41.

42. Langfort J, Czarnowski D, Zendzian-Piotrowska M, Zarzeczny R, Gorski J. Short-term low-carbohydrate diet dissociates lactate and ammonia thresholds in men. *J Strength Cond Res.* 2004 May;18(2):260-5.
43. Lemon PW, Nagle FJ. Effects of exercise on protein and amino acid metabolism. *Med Sci Sports Exerc.* 1981;13(3):141-9.
44. Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr.* 2006 Jan;136(1 Suppl):207S-11S.
45. Hutson SM, Islam MM, Zaganas I. Interaction between glutamate dehydrogenase (GDH) and L-leucine catabolic enzymes: Intersecting metabolic pathways. *Neurochemistry International.* 2011;59:518-24.
46. Wagenmakers AJ, Coakley JH, Edwards RH. Metabolism of branched-chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. *Int J Sports Med.* 1990 May;11 Suppl 2:S101-13.
47. Kasperek GJ, Dohm GL, Snider RD. Activation of branched-chain keto acid dehydrogenase by exercise. *Am J Physiol.* 1985 Feb;248(2 Pt 2):R166-71.
48. Wagenmakers AJ, Brookes JH, Coakley JH, Reilly T, Edwards RH. Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1989;59(3):159-67.
49. Wagenmakers AJ. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. *Exerc Sport Sci Rev.* 1998;26:287-314.
50. Snow RJ, Carey MF, Stathis CG, Febbraio MA, Hargreaves M. Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2000 May;88(5):1576-80.

51. Lee WM. Recent developments in acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012 Feb;26(1):3-16.
52. Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):648-53.
53. Perazzo JC, Tallis S, Delfante A, Souto PA, Lemberg A, Eizayaga FX, et al. Hepatic encephalopathy: An approach to its multiple pathophysiological features. *World J Hepatol.* 2012 Mar 27;4(3):50-65.
54. Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:102.
55. Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med.* 1999 Jun;26(11-12):1369-74.
56. Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology.* 2000 Mar;31(3):709-15.
57. Bender AS, Norenberg MD. Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res.* 1996 May;21(5):567-73.
58. Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia.* 1997 Sep;21(1):124-33.

59. Lockwood AH, Yap EW, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991 Mar;11(2):337-41.
60. Graham TE, Bangsbo J, Gollnick PD, Juel C, Saltin B. Ammonia metabolism during intense dynamic exercise and recovery in humans. *Am J Physiol.* 1990 Aug;259(2 Pt 1):E170-6.
61. Calvert LD, Steiner MC, Morgan MD, Singh SJ. Plasma ammonia response to incremental cycling and walking tests in COPD. *Respir Med.* 2009 May;104(5):675-81.
62. Nybo L. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010;2:779-92.
63. Grego F, Vallier JM, Collardeau M, Bermon S, Ferrari P, Candito M, et al. Effects of long duration exercise on cognitive function, blood glucose, and counterregulatory hormones in male cyclists. *Neurosci Lett.* 2004 Jul 1;364(2):76-80.
64. Grego F, Vallier JM, Collardeau M, Rousseu C, Cremieux J, Brisswalter J. Influence of exercise duration and hydration status on cognitive function during prolonged cycling exercise. *Int J Sports Med.* 2005 Jan-Feb;26(1):27-33.
65. Nybo L, Secher NH. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. *Prog Neurobiol.* 2004 Mar;72(4):223-61.
66. Walters TJ, Ryan KL, Tate LM, Mason PA. Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. *J Appl Physiol (1985).* 2000 Aug;89(2):799-806.
67. Brisswalter J, Collardeau M, Rene A. Effects of acute physical exercise characteristics on cognitive performance. *Sports Med.* 2002;32(9):555-66.

68. Savica V, Santoro D, Ciolino F, Mallamace A, Calvani M, Savica R, et al. Nutritional therapy in chronic kidney disease. *Nutr Clin Care*. 2005 Apr-Jun;8(2):70-6.
69. Furst P. Amino acid metabolism in uremia. *J Am Coll Nutr*. 1989 Aug;8(4):310-23.
70. Walser M. Nutritional effects of nitrogen-free analogues of essential amino acids. *Life Sci*. 1975 Oct 10;17(7):1011-20.

2º artigo: artigo de resultados

KETO ANALOGUES AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION AND ITS
EFFECTS ON AMMONEMIA AND PERFORMANCE UNDER
THERMONEUTRAL CONDITIONS

Artigo submetido na revista: Food & Function.

KETO ANALOGUES AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION AND ITS
EFFECTS ON AMMONEMIA AND PERFORMANCE UNDER
THERMONEUTRAL CONDITIONS

^{1,8}Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino

^{2,8}Rafaela Carvalho Pereira Lima

^{1,8}Thássia Casado Lima França

^{3,8}Edla de Azevedo Herculano

⁴Daniela Souza Araújo Rodrigues

^{5,8}Marcos Guilherme de Sousa Gouveia

^{6,7,#}L. C. Cameron

^{1,2,8,#}Eduardo Seixas Prado

¹Graduate Program in Nutrition; Federal University of Alagoas; Maceio, Alagoas, Brazil.

²Graduate Program in Health Sciences; Federal University of Alagoas; Maceio, Alagoas, Brazil.

³Institute of Chemistry and Biotechnology; Federal University of Alagoas; Maceio, Alagoas, Brazil.

⁴Health Hospital Foundation; Aracaju, Sergipe, Brazil.

⁵Faculty of Sergipe; Aracaju, Sergipe, Brazil.

⁶Laboratory of Protein Biochemistry; Federal University of State of Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁷Department of Biochemistry and Sportomics; Olympic Laboratory; Brazil Olympic Committee; Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁸Exercise and Metabolism Research Group; Federal University of Alagoas; Maceio, Alagoas, Brazil.

#To whom correspondence should be addressed.

Journal's section: paper.

Corresponding authors:

L. C. Cameron

Laboratory of Protein Biochemistry – Center of Innovation in Mass Spectrometry

Federal University of State of Rio de Janeiro - UNIRIO

Av. Pasteur, 296 - Urca

Rio de Janeiro – RJ - Brazil

CEP 22290-240

Phone +55 21 2542 5204

cameron@unirio.br

Eduardo Seixas Prado

Laboratory of Biochemistry and Physiology of Exercise - Exercise and

Metabolism Research Group

Federal University of Alagoas.

Campus A.C. Simões; Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins,

Maceió – AL; Brazil

CEP: 57072-970

Phone: +55 82 32141032.

eduseipra@gmail.com

Abstract

Alterations of cerebral function, fatigue and disturbance in cognitive-motor performance can be caused by hyperammonemia and/or hot environmental conditions during exercise. Exercise-induced hyperammonemia can be reduced through supplementation with either amino acids or combined keto analogues and amino acids (KAAA) to improve exercise tolerance. In the present study, we evaluated KAAA supplementation on ammonia metabolism and cognitive-motor performance after high-intensity exercise under a low heat stress environment. Sixteen male cyclists received a ketogenic diet for 2 d and were divided in two groups, KAAA (KEx) or placebo (CEx) supplementation. The athletes performed a 2 h cycling session followed by a maximum test (MAX), and blood samples were obtained at rest and during exercise. Cognitive-motor tasks were performed before and after the protocol, and exhaustion time was used to evaluate physical performance. The CEx group showed a significant increase (~70%) in ammonia concentration at MAX, which did not change in the KEx group. The non-supplemented group showed a significant increase in uremia. Both of the groups had a significant increase in blood urate levels at 120 min, and an early significant increase from 120 min was observed in the CEx group. There was no change in the glucose levels of the two groups. There was not a significant difference in the exhaustion times between the groups. No changes were observed in the cognitive-motor tasks after the protocol. We suggest that KAAA supplementation decreases ammonemia after high-intensity exercise but does not affect physical or cognitive-motor performances under thermoneutral conditions.

Introduction

Ammonia is a base (NH_3) that forms a conjugated pair with the ammonium ion (NH_4^+). The pKa of the reversible reaction $\text{NH}_3 + \text{NH}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ is near 9.3. Thus, in the human body, most ammonia is protonated (ammonium). Henceforth, we will refer to ammonia as the sum of both its forms ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) for clarity. Ammonia is a toxic metabolite, and increased concentrations of ammonia in the blood can lead to cerebral function impairment, altering glutamatergic neurotransmission¹⁻⁴. Hyperammonemia affects intellectual function, personality, and conscious and neuromuscular coordination to various degrees³⁻⁶.

We have been use Sportomics as an approach to study metabolism, specially ammonia metabolism^{7, 8}. During exercise, ammonia production occurs via both amino acid deamination and other nitrogenated compound deamination (as AMP). These deamination pathways are activated in an intensity- and duration-dependent manner⁹. Furthermore, ammonemia during exercise depends on carbohydrate availability¹⁰. The consumption of a low-carbohydrate diet (herein referred to as a ketogenic diet) combined with exercise has been shown to reduce glycogen stores and induce hyperammonemia^{11, 12}.

It has been suggested that increased ammonemia during exercise causes both central and peripheral fatigue by altering cerebral function, which manifest as ataxia, lethargy and stupor, similar to the symptoms of hepatic encephalopathy¹³. In addition, hyperammonemia may have a significant impact during exercise and can disturb cognitive performance (termed cognitive-motor

performance)^{14, 15}. It is believed that controlling the increase of ammonemia will improve exercise performance^{16, 17}. Previous studies performed by our group demonstrated that amino acids and ketoanalogues supplementation (KAAA) can reduce ammonemia concentration during moderate prolonged exercise^{18, 19}. In addition, the use of the branched-chain keto acids (BCKA), 2-ketoisocaproate (KIC), 2-ketoisovalerate (KIV), 2-keto-3-methylvalerate (KMOV) and 2-keto glutarate (AKG), which are keto acids of the branched-chain amino acids (BCAA) leucine, valine, isoleucine and glutamate, respectively, in our KAAA supplementation has been shown to improve blood ammonia levels and various exercise performance indicators and to alter the stress and recovery of the subjects^{20, 21}.

It is known that hot environmental conditions, hyperthermia or dehydration may impair cognitive-motor performance, such as motor coordination, reaction time and memory²²⁻²⁵. Likewise, an increase in body temperature can promote metabolic alterations, including high-energy demand and protein catabolism, which impair exercise performance and appear to exacerbate exercise-induced hyperammonemia^{9, 26, 27}. However, it is important to highlight that the magnitude of this response is dependent on body temperature changes and that factors such as exercise itself (including thermoneutral conditions, termed a low heat stress environment) and acclimation status can affect the body temperature responses^{28, 29}.

To the best of our knowledge, there is no information available about the effect of short-term KAAA supplementation on ammonia metabolism and cognitive-motor performance after high-intensity exercise, under low heat stress conditions controlled in acclimatized athletes. Therefore, in the present study,

we evaluated the acute effect of KAAA supplementation on ammonia metabolism and cognitive-motor performance after high-intensity exercise under low body temperature and heat stress conditions.

Methods

Subjects

Sixteen male endurance-trained cyclists were divided into two groups of eight athletes each as follows: the KAAA experimental group – KEx, $n = 8$ (33.2 ± 2.6 years; 67.1 ± 2.3 kg; 1.71 ± 0.03 m; and $10.3 \pm 0.8\%$ of body fat); and the control group – CEx, $n = 8$ (33.1 ± 2.4 years; 66.53 ± 3.72 kg; 1.70 ± 0.02 m; $9.5 \pm 2.0\%$ body fat). The groups showed similar levels of maximal oxygen consumption (VO_{2max}) (60.3 ± 2.3 mL.kg⁻¹.min⁻¹ and 57.8 ± 2.5 mL.kg⁻¹.min⁻¹, KEx and CEx, respectively). All subjects had a mean of at least three years of training and often participated in competitions. Diseases or the use of ergogenic aids were exclusion criteria. The athletes were acclimatized to training in a hot environment and participated as volunteers. The subjects were informed previously about the study, and written informed consent was obtained. All the procedures were performed in accordance with the ethical standards of the Ethics Committee for Human Research at the Federal University of Alagoas, Brazil.

Study design and protocols

A week before the experimental protocol, the athletes came to the laboratory for a first visit and anthropometric variables and body fat percentages were determined³⁰. After familiarization with the cycle ergometer and the determination of the VO_{2max} , a maximum incremental test (MIT) was performed at the same thermal conditions as those of the experimental protocol (Wet Bulb Globe Temperature (WBGT) Index $\sim 19,5^{\circ}C$). The MIT consisted of a three-minute warm up with an initial power output of 25 W with free cadence. The power output was set to 50 W at a cadence of 80 rpm immediately after the warm up. The power output was increased at $25 W \cdot min^{-1}$ until the subject reported voluntary exhaustion or the inability to maintain the pace established for more than five consecutive seconds. The VO_{2max} was determined by an automatic gas analyzer (Cosmed[®] Quark CPET's, Rome, Italy) and was calibrated before each test, and a VO_2 increase greater than $2.1 mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ by increasing the intensity was used to represent VO_{2max} ³¹.

After MIT, the athletes received an individualized ketogenic diet plan as described previously¹⁹. Briefly, 35% of the recommended energy intake was from protein, 55% of the recommended energy intake was from lipids, and 10% of the recommended energy intake was from carbohydrates. The association of both normal training and a ketogenic diet were used to reduce muscle glycogen stores and to induce a higher increase in ammonemia. The ketogenic diet was started two days before and maintained during the experimental protocol. The subjects were also asked to maintain their normal training schedule ($\sim 60 km \cdot d^{-1}$) until 24 h before the experimental protocol day and to maintain a fluid intake of $\sim 3 L \cdot d^{-1}$, avoiding the use of caffeinated beverages.

One week later, the subjects reported to the laboratory for a second visit in a fasting state and received a ketogenic breakfast with ~ 200 mL of water. One hour after breakfast, the KEx group received five tablets of a KAAA mixture (Ketosteril[®]; Fresenius, Bad Homburg, Germany), and the CEx group five 200 mg tablets of lactose, which served as a placebo (Farmaderm[®], Alagoas, Brazil) in a randomized double-blind manner. The composition of the KAAA tablet was as follows: a-keto analogues of isoleucine (335 mg), leucine (505 mg), phenylalanine (430 mg) and valine (340 mg); a-hydroxy analogue of methionine (295 mg); L-lysine acetate (75 mg L-lysine); L-threonine (265 mg); Ltryptophan (115 mg); L-histidine (190 mg); and L-tyrosine (150 mg). Both of the supplements were provided as indistinguishable tablets with ~ 300 mL of water. We rigorously controlled the liquid intake to avoid bias from temperature differences caused by water intake.

The athletes were tested to evaluate their cognitive-motor performances using measures of immediate memory, motor coordination and simple reaction time 30 minutes after supplementation, as follows:

Immediate memory was evaluated as described by McCrory *et al*³². A list of five words (a word per second) was given, and the athlete was asked to repeat as many words as possible in any order. The same list was repeated three times in ten second intervals.

Motor coordination was evaluated using the ***finger-to-nose test*** adapted from McCrory *et al*³². Briefly, while seated and facing the examiner (having their dominant arm laterally extended at a 90° angle in relation to the body and their eyes open), the athletes were asked to touch the tip of their nose with their extended index finger and return to the initial position. They were asked to

repeat this procedure as quickly and as accurately possible five times. The cognitive tests were filmed for analysis at a later time by five independent evaluators. Reaction time was measured within a 0.01 sec accuracy.

The simple reaction time, as described by Eckner *et al*³³, was obtained immediately after the finger-to-nose test. While seated, the athletes had their dominant arm flexed and abducted to 90°, rested on a flat surface with their outstretched hand in a neutral position, also forming the same angle perpendicular to the thumb. The zero mark of the apparatus was positioned inside the open hand of the athlete. Thus, the examiner (standing) vertically suspends the apparatus, allowing the spacer portion of the device to rest inside the open hand of the test participant. When the examiner drops the apparatus, the test participant catches it as quickly as possible. The athletes were tested in 8 trials and the test average was determined. The fall distance was measured from the superior surface of the weighted disk to the most superior aspect of the athlete's hand and was converted into a reaction time using the formula for a body falling under the influence of gravity ($d = \frac{1}{2}gt^2$), where d (cm) is distance, g is acceleration due to gravity and t is time (in milliseconds – ms).

Immediately after the cognitive-motor performances tests, hydration status was assessed by evaluating a change in body weight (Δ %), urine color and specific gravity (USG). Urine color was evaluated according to Armstrong *et al*³⁴, and USG was measured using a manual refractometer (Biobrix[®], São Paulo, Brazil). Hydration status was classified according with Casa *et al*³⁵. Urine samples were also used for the ketonuria analysis by qualitative reagent strips for urinalysis (Biocolor/Bioeasy[®], Belo Horizonte, Minas Gerais). We considered the presence of ketonuria to be a positive test for ketosis.

One hour after supplementation, the athletes stretched, followed by a 10 min warm up at 50% maximum heart rate. The athletes started a 120 min cycling session at 80 rpm, following a power output from 75% to 85% of the estimated maximum heart rate. Heart rate was recorded throughout the exercise protocol using a heart rate monitor (Polar[®] FT1, Kempele, Finland). Before the cycling session, a catheter was also placed into the median cubital vein. Blood samples were obtained at rest (0 min) and throughout the exercise period (30; 60; 90 and 120 min). The athletes did not receive fluids during the trial.

The blood samples were analyzed in duplicate after collection. The blood samples were immediately centrifuged (3000 x g) to avoid the loss of volatile compounds. The serum was aliquot and stored at 4 °C. To prevent loss, seric ammonia was measured immediately, and the other biochemical analyses were performed within a 24 h period. Glucose, urea and urate were measured using commercial spectrophotometric assays (Labtest[®], Minas Gerais, Brazil). Lactate and ammonia were measured using an enzymatic UV method (Randox, Crumlin UK) on a Dade Model Dimension RXL Automated Chemistry Analyzer (Dade Behring[®], Eschborn, Germany).

Two hours after the cycling session, new MIT (without gas analysis), blood evaluations, cognitive-motor performance and hydration status tests were performed. The voluntary exhaustion time or the inability to maintain the pace established for more than five consecutive seconds in both groups obtained after the new MIT was used to evaluate physical performance. Moreover, sweat rate (SR) was obtained and calculated according to Casa *et al*³⁵, as described below:

$$SR = ((BMb - BMa) + Ft - VUt)/T$$

where BMb is the body mass (kg) before the cycling session, BMa is the body mass (kg) after the new MIT, Ft is the total fluid intake consumed in the experimental protocol (zero because there was no fluid intake), VUt is the total urine volume (L) after the new TIM, and T is time (h).

During the experimental protocol, we used the ambient temperature, the relative humidity, the air movement and the solar radiation to calculate the WBGT Index (Instrutemp[®], São Paulo, Brazil). We considered a WBGT up to 22.2° C to be a low heat stress environment ³⁶.

Body temperature was measured using a tympanic thermometer (GeniusTM 2[®], Minnesota, USA). The tympanic temperature values were used to calculate an equivalent rectal temperature ³⁷. Furthermore, thermal and comfort sensations were evaluated during the experimental protocol ³⁸.

Statistical analyses

After testing for normality (Kolmogorov–Smirnov) and equality test variance (Levene median), the changes in ambient temperature and body temperature and the biochemistry between the time points were analyzed by a one-way ANOVA (treatments), and the group changes were evaluated by a two way ANOVA (treatments x time) for repeated measures. Tukey's test was used as a *post hoc* analysis.

Physical and cognitive-motor performances and markers of hydration status were analyzed by an unpaired and/or paired Student's *t* test. The area under the curve (AUC) for the blood ammonia data from each individual in each treatment was determined using the following equation:

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

Assuming that the ammonia level at baseline corresponds to the resting ammonia level, and the AUC is the area under the curve, *A* is ammonia ($\mu\text{mol/L}$) and *T* is time (min). When the sample showed a non-normal distribution, nonparametric test correspondents were used. For all of the measurement differences, $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. The data are expressed as the means \pm SE.

Results

We used a 120 min cycling session followed by an MIT to drive the athletes to voluntary exhaustion and to evaluate the acute effects of KAAA supplementation on both physical and cognitive-motor performances. The ketonuria analyses revealed that the subjects in both groups were under ketosis before the cycling session. There was no difference in the hydration status between the groups according to the pre and post-cycling session. In addition, urine color and USG values were elevated prior to the start of the cycling session and showed that the athletes were dehydrated to a degree that was classified between minimal and significant (table 1).

Table 1. Hydration status did not change during the protocol. Hydration markers from the groups KEx and CEx were measured before (Pre) and after (Post) the cycling session.

Groups	Moment	% Body Weight Change (Δ %)	Urine Color	Urine specific gravity (USG)	Sweat Rate ($L \cdot h^{-1}$)
KEx	Pre	-2.47 ± 0.30	4.0 ± 0.9	1019.4 ± 3.4	0.63 ± 0.08
	Post		4.4 ± 0.4	1024.4 ± 1.9	
CEx	Pre	-2.59 ± 0.46	3.8 ± 0.8	1017.7 ± 3.1	0.84 ± 0.10
	Post		5.0 ± 0.5	1023.3 ± 2.0	

There was no significant difference in the rectal temperature-equivalent body temperature values with regard to time or supplement condition (figure 1A). The thermal stress measurement by WBGT increased above baseline levels in response to the similar low heat stress exercise conditions in both groups (figure 1B). The perception investigation obtained from the thermal sensation (figure 1C) and the comfort sensation (figure 1D) showed no differences between the groups. However, the thermal and comfort sensations increased from 0 min within the groups.

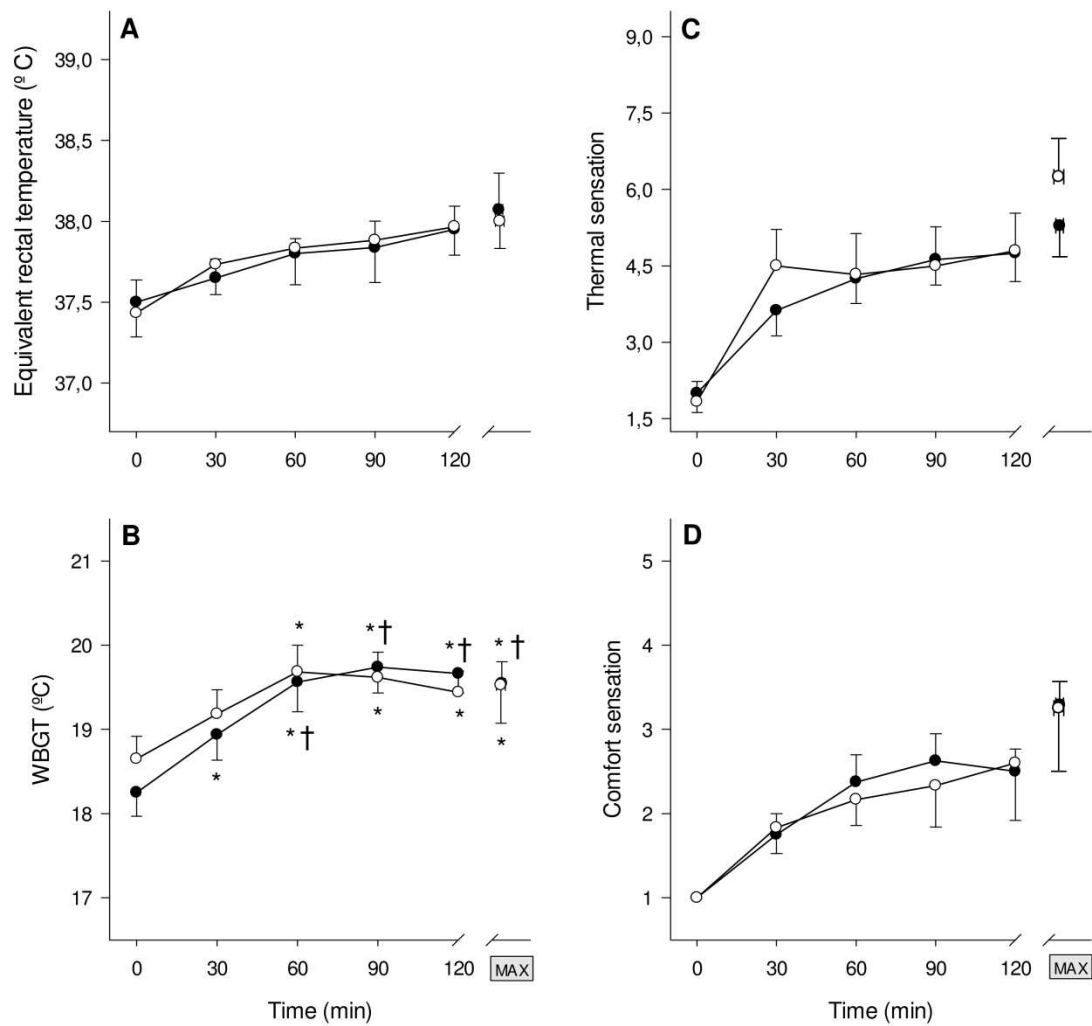


Figure 1. Environmental conditions, body temperature, and thermal and comfort sensations were similar throughout the experimental protocol. The athletes exercised for 2 h followed by a new maximum incremental test (new MIT) to drive the athletes to a reported voluntary exhaustion (MAX) after KAAA supplementation (experimental group - KEx, ●) or control supplementation (CEx, ○). The values are the means and the standard errors. (A) Equivalent rectal temperature: resting values were KEx 37.5 ± 0.1 °C and CEx: 37.4 ± 0.1 °C; (B) WBGT: resting values were KEx 18.2 ± 0.2 °C and CEx 18.6 ± 0.2 °C; (C) Thermal sensation: resting values were KEx 2.0 ± 0.3 and CEx 1.8 ± 0.4 ; (D) Comfort sensation: resting values were KEx 1.0 ± 0.0 and CEx 1.0 ± 0.0 . The MAX moment varied for each athlete in a range from 124.1-128.4 min (125.6 ± 0.5). The error bars are not visible because they are inside the symbols. * The mean values were significantly different from 0 min within the group. † The mean values were significantly different from 30 min within the group ($P < 0.05$).

To investigate the effect of KAAA on metabolism, we measured the concentration of urea, urate (serum) and ammonia (plasma). The blood ammonia concentrations were not significantly different between the groups

(figure 2A). On the other hand, there was significant increase at MAX in the CEx group compared with the resting values within the group. In contrast, the ammonia concentration was not increased in the KEx group at any time within the group. In addition, when measured by the percentage change, we observed reductions from 30, 60, 90, and 120 min (~ 8%, 14%, 22%, 16%, respectively) or delay at MAX (~ 19%) in the ammonia concentrations in the KEx group compared with the baseline values within the group. The CEx group showed an increase in ammonia concentrations at 60, 90, 120 min and MAX (~ 18%, 20%, 37% and 73%, respectively) compared with the baseline values within the group (figure 2C). Furthermore, the AUC of ammonia for the KEx group was ~20% lower than that for the CEx group.

To discriminate the ammonia produced by amino acid deamination from that produced by AMP deamination, we measured blood urea and urate levels. There was no significant difference in the blood concentrations of urea (figure 2B) or urate (figure 2D) between groups. However, the CEx group showed an early significant increase in urea levels from 90 min compared with the baseline values within the group. The KEx group showed maintenance of urea concentrations at 120 min. The urate levels also showed an early significant increase from 120 min in the CEx group, whereas the KEx group showed a significant increase only at 120 min compared with the baseline values within the group.

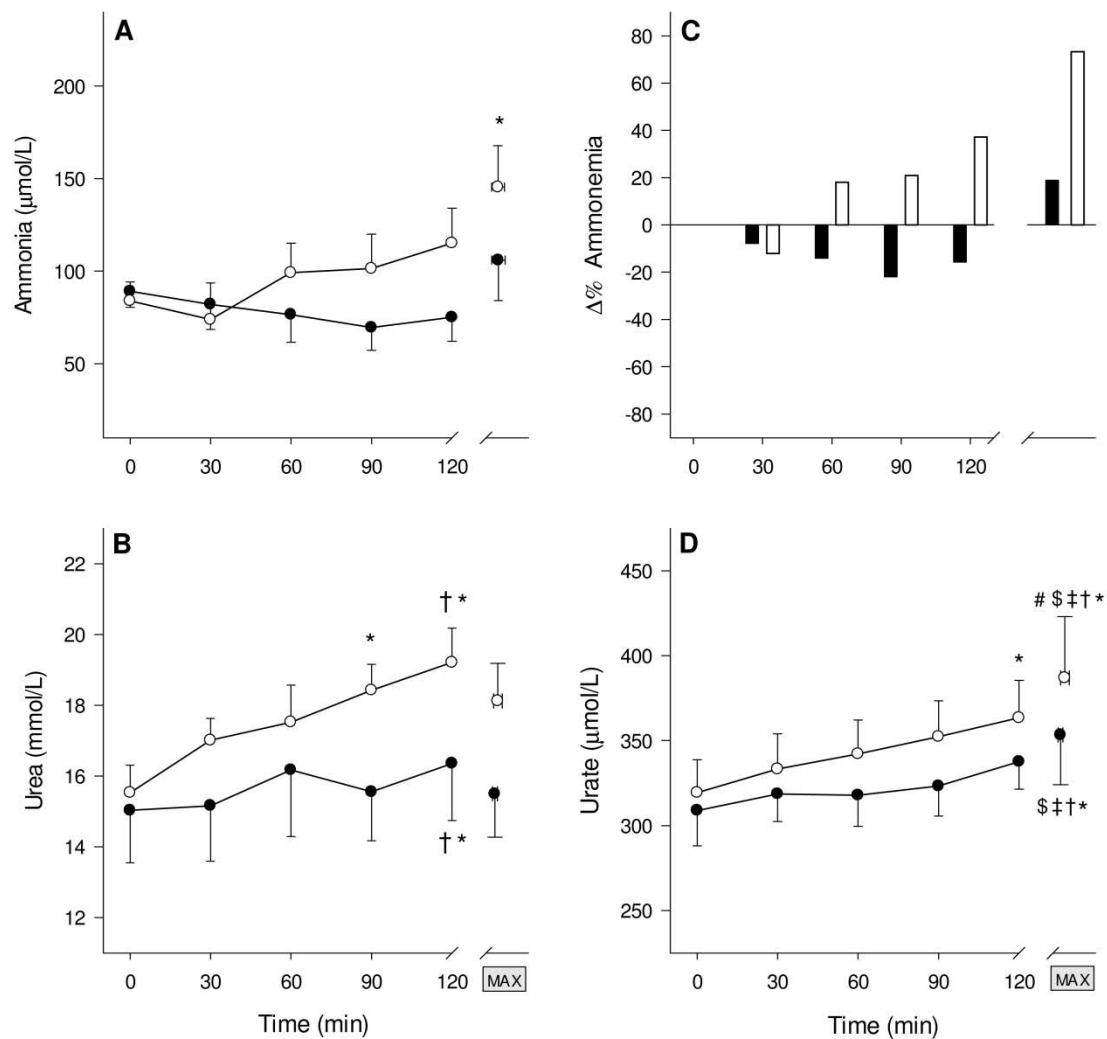


Figure 2. Acute KAAA supplementation affects ammonia, urea and urate metabolism. The athletes exercised for 2 h followed by a new maximum incremental test (new MIT) to drive the athletes to exhaustion (MAX) after KAAA supplementation (experimental group - KEx, ●) or control supplementation (CEx, ○). The values are the means and standard errors. (A) Ammonia: resting values were KEx $89.12 \pm 8.59 \mu\text{mol/L}$ and CEx $83.90 \pm 10.19 \mu\text{mol/L}$; (B) urea: resting values were KEx $15.02 \pm 1.47 \text{mmol/L}$ and CEx $15.38 \pm 0.64 \text{mmol/L}$; (C) urate: resting values were KEx $308.83 \pm 20.68 \mu\text{mol/L}$ and CEx $317.66 \pm 16.56 \mu\text{mol/L}$. MAX moment varied for each athlete in a range from 124.1-128.4 min (125.6 ± 0.5). The error bars are not visible because they are inside the symbols. * The mean values were significantly different from 0 min within the group; † The mean values were significantly different from 30 min within the group; ‡ The mean values were significantly different from 60 min within the group; § The mean values were significantly different from 90 min within the group; # The mean values were significantly different from 120 min within the group ($P < 0.05$). The values of the three metabolites did not significantly differ between the treatments ($P > 0.05$). Inset of figure 2(A) shows the data normalized ($\Delta\%$) to the resting values.

To understand the role of KAAA in gluconeogenesis, we measured blood glucose levels during the cycling session and the MIT. No significant difference

in blood glucose levels was found during the trial time between the groups. However, the KEx group showed a significant increase at MAX from 0 min and 120 min (Figure 3A). In addition, we evaluated the blood lactate levels, an indicator of consistent glucose metabolism during exercise. No difference in blood lactate levels was observed between the groups. However, there was a significant increase at the MAX moment in both of the groups compared with all of the exercise moments (figure 3B).

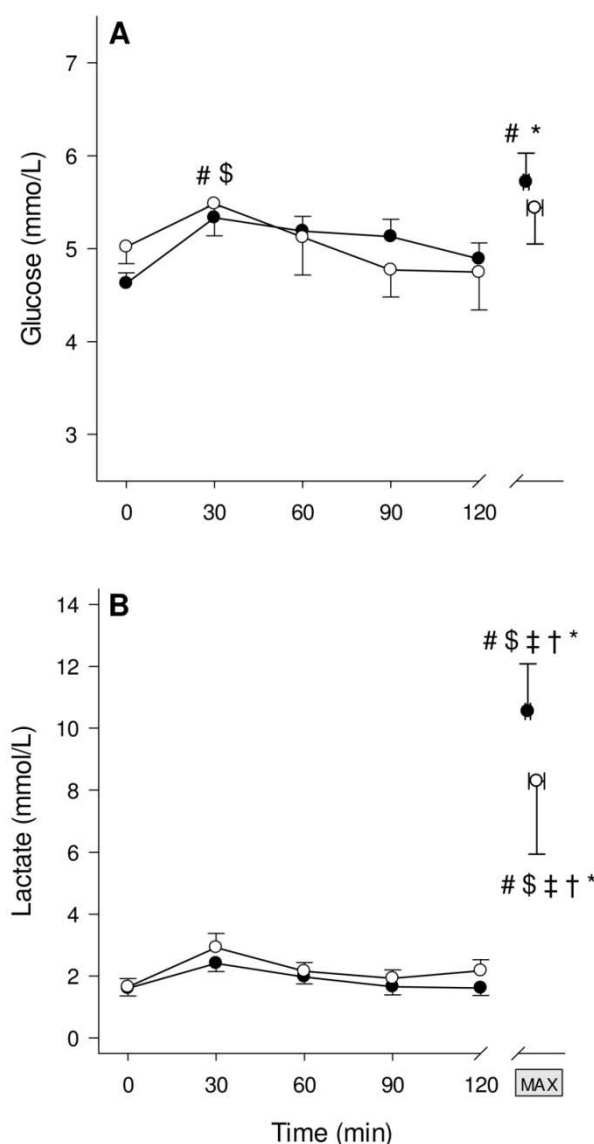


Figure 3. KAAA supplementation affects glucose but does not change lactate metabolism. The athletes exercised for 2 h followed by a new maximum incremental test (new MIT) to drive the athletes to exhaustion (MAX) after KAAA supplementation (experimental group - KEx, ●) or control supplementation (CEx, ○). The values are the means and the standard errors (SEM). (A) Glucose: resting values were KEx 4.62 ± 0.11 mmol/L and CEx 5.01 ± 0.18 mmol/L; (B) Lactate: resting values were KEx 1.60 ± 0.24 mmol/L and CEx 1.64 ± 0.26 mmol/L. The MAX moment varied for each athlete in a range from 124.1-128.4 min

(125.6 ± 0.5). The error bars are not visible because they are inside the symbols. * The mean values were significantly different from 0 min within the group; † The mean values were significantly different from 30 min within the group; ‡ The mean values were significantly different from 60 min within the group; § The mean values were significantly different from 90 min within the group; # The mean values were significantly different from 120 min within the group.

After the 120 min cycling session, the new MIT was employed to induce voluntary exhaustion in both groups and to evaluate the participants' physical (exhaustion time) and cognitive-motor performances. Our assumption that this test generated a similar intensity in the two studied groups was confirmed by measuring the blood lactate concentration at the MAX moment. The groups showed similar exhaustion times at the end of the new MIT (KEx 5.13 ± 0.34 min versus CEx 6.23 ± 0.72 min). In addition, we were not able to measure any significant KAAA-induced difference in the groups' cognitive-motor performances. No significant differences in the finger-to-nose test, simple reaction time or immediate memory were found before and/or after the new MIT (data not shown).

Discussion

The aim of this study was to evaluate the acute effects of KAAA supplementation on ammonia metabolism after high-intensity exercise and physical and cognitive-motor performance under low heat stress conditions. The acute use of a mixture of KAAA supplementation reduced the increase in ammonemia caused by high-intensity exercise, but we were not able to measure any significant KAAA supplementation-induced difference in the athletes' physical or cognitive-motor performances under the low heat stress conditions.

It has been suggested that alterations in cerebral function that result from liver failure, such as HE, lead to different cerebral and neurological alterations, and under these conditions, ammonia accumulates and is suggested as a main contributor to these cerebral alterations ¹⁵. Patients with clinical HE show various neuropsychiatric symptoms, including impairment in cognitive and intellectual function and motor activity and coordination, as well as alterations ^{3, 4, 39}.

Exercise-induced hyperammonemia can not only impair physical performance but also affect cognitive-motor functions ⁴⁰. Ammonemia accumulation during exercise leads to impairment in both neuronal and astrocyte mechanisms with consequent damage to the activities of neurotransmitters, such as glutamate and gamma-aminobutyric acid, that are involved in cognitive-motor disturbances ^{6, 8, 13}.

In the present study, we used a ketogenic diet plus a prolonged exercise followed by high-intensity exercise to drive the athletes to exhaustion, to

decrease the availability of glycogen in the liver and muscle and to increase the availability of amino acids to supply energy^{12, 41, 42}. Prolonged exercise followed by high-intensity exercise increases both amino acid catabolism and AMP deamination, leading to the release of more ammonia into the bloodstream⁹. Even under a ketogenic diet and previous training, both studied groups were normo-ammonemic at the beginning of the protocol (~ 80 µmol/L)⁴³.

Elevated blood ammonia levels can be reduced through the use of amino acids or carbohydrate supplementation because they interfere with ammonia metabolism⁴⁴. Previous studies have shown that KAAA supplementation can effectively decrease blood ammonia, urea and urate levels during exercise^{18, 19}. Additionally, KAAA supplementation has been widely accepted and used as a therapeutic agent for liver failure and hepatic encephalopathy⁴⁵⁻⁴⁷. Ammonemia increased in response to high-intensity exercise in the CEx group, and this effect was reduced by the administration of KAAA in the KEx group. In the present study, acute KAAA supplementation delayed the increase in blood urea and urate concentrations during prolonged exercise and high-intensity exercise, respectively. Our data suggest that the effect of KAAA during exercise is primarily due to ammonia removal via the synthesis of urea during the final phase of prolonged exercise, whereas AMP deamination appears to be inhibited during high-intensity exercise with decreased blood urate levels in the KEx group. KAAA supplementation increased glucose availability via gluconeogenesis, especially in the KEx group after high-intensity exercise compared with that in the CEx group. On the other hand, the blood lactate concentration fluctuated similarly in both groups. These results are consistent with our previous findings¹⁹.

A recent study showed that the supplementation with α -keto acids in healthy, untrained subjects significantly improved exercise tolerance, training effects, and stress-recovery state ²¹. In our study, KAAA supplementation reduced the exercise-induced increase in blood ammonia concentrations by ~20% compared with those of the non-supplemented group, but we did not identify changes in the tested cognitive-motor tasks or exhaustion time between the groups.

There is evidence that hyperthermia, *per se*, promotes a central fatigue state from disturbances in the brain's ability to sustain the activation of skeletal muscles, thus impairing cognitive-motor performance ¹⁶. Walters *et al* ⁴⁸ indicated reduced running performance at rectal temperatures between 39.7 and 40.3 °C. This negative effect can be enhanced by environmental conditions under which the exercise is performed, and when the ambient temperature and humidity are high, the capacity to sustain prolonged exercise is reduced ²³. It is possible to postulate that the controlled environmental conditions at the laboratory ameliorate the negative effect to the central nervous system, which is a consequence of a synergetic increase in both temperature and ammonemia. This hypothesis needs to be further studied.

In this study, the subjects were in a state of dehydration (loss of ~ 2.5% of body mass), but there was no change in either physical or cognitive-motor performance. It is recognized that cognitive-motor performance is impaired when there is excessive loss of 1% - 3% of body weight during exercise in the heat ³⁵. Cian *et al* ⁴⁹, reported a reduction in cognitive function in dehydrated subjects after a 2% loss of body mass due to heat and exercise. Our study can point to different metabolic and cognitive effects in either physical or cognitive-

motor performances. This may occur due to the low thermal stress caused by the controlled laboratory conditions, where it was maintained at a WBGT of ~ 19.5 ° C and equivalent rectal temperatures of ~ 38 ° C, during the final phase of exercise.

In our study, we measured a low increase of ammonemia even after a ketogenic diet. It is also possible that dehydration in athletes who are acclimated to exercise in the heat with no significant increase in body temperature does not induce increased blood ammonia sufficient to impair the athletes' cognitive-motor performance. It has been suggested that a hot environment associated with elevated body temperatures contributes to exacerbated exercise-induced hyperammonemia ⁴⁰. Exacerbated exercise-induced hyperammonemia was demonstrated in individuals undergoing prolonged exercise in the heat (40 ° C) compared those undergoing prolonged exercise at 20 ° C ⁵⁰. Ammonemia was higher in the hot trials (30 °C, 55% and 35 °C, 62%) than in the control trials (22 °C; 65%), where the participants of both had rectal temperatures of ~ 37.2 °C after a 30-s sprint cycle exercise ⁵¹. Similar to hyperammonemia, hyperthermia can also induce CNS dysfunction by causing an imbalance of neurotransmitters associated with cognitive impairments ²⁴. Both hyperammonemia and hyperthermia can act synergistically to impair CNS function. In future studies, we will evaluate this possibility.

Conclusion

To our knowledge, this study is the first investigation to evaluate the acute effect of KAAA supplementation on ammonia metabolism after high-intensity exercise and cognitive-motor performance under low heat stress conditions. Our data suggest that KAAA supplementation might decrease ammonemia after high-intensity exercise. On the other hand, no effects were observed in physical or cognitive-motor performances because of KAAA supplementation under low heat stress conditions. We were not able to find differences in cognitive function due to KAAA supplementation under our conditions.

References

1. C. Hermenegildo, C. Montoliu, M. Llansola, M. D. Munoz, J. M. Gaztelu, M. D. Minana and V. Felipo, *Eur J Neurosci*, 1998, **10**, 3201-3209.
2. P. Monfort, E. Kosenko, S. Erceg, J. J. Canales and V. Felipo, *Neurochem Int*, 2002, **41**, 95-102.
3. V. Felipo, J. F. Ordone, A. Urios, N. El Mlili, C. Gimenez-Garzo, C. Aguado, O. Gonzalez-Lopez, R. Giner-Duran, M. A. Serra, A. Wassel, J. M. Rodrigo, J. Salazar and C. Montoliu, *Hepatology*, 2012, **55**, 530-539.
4. V. Felipo, A. Urios, E. Montesinos, I. Molina, M. L. Garcia-Torres, M. Civera, J. A. Olmo, J. Ortega, J. Martinez-Valls, M. A. Serra, N. Cassinello, A. Wassel, E. Jorda and C. Montoliu, *Metab Brain Dis*, 2012, **27**, 51-58.
5. C. A. Stewart and J. Cerhan, *Metab Brain Dis*, 2005, **20**, 193-204.
6. P. Monfort, O. Cauli, C. Montoliu, R. Rodrigo, M. Llansola, B. Piedrafita, N. El Mlili, J. Boix, A. Agusti and V. Felipo, *Neurochem Int*, 2009, **55**, 106-112.
7. N. L. Bragazzi, in *Genomics, Proteomics and Metabolomics in Nutraceuticals and Functional Foods*, eds. D. Bagchi, A. Swaroop and M. Bagchi, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, Second Edition, 2015, 47, 609-621.
8. A. Bassini and L. C. Cameron, *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **445**, 708-716.
9. D. J. Wilkinson, N. J. Smeeton and P. W. Watt, *Prog Neurobiol*, 2010, **91**, 200-219.
10. D. Czarnowski, J. Langfort, W. Pilis and J. Gorski, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1995, **70**, 70-74.
11. R. J. Snow, M. F. Carey, C. G. Stathis, M. A. Febbraio and M. Hargreaves, *J Appl Physiol*, 2000, **88**, 1576-1580.
12. J. Langfort, D. Czarnowski, M. Zendzian-Piotrowska, R. Zarzeczny and J. Gorski, *J Strength Cond Res*, 2004, **18**, 260-265.
13. E. W. Banister and B. J. Cameron, *Int J Sports Med*, 1990, **11 Suppl 2**, S129-142.
14. P. Ott and H. Vilstrup, *Metab Brain Dis*, 2014, **29**, 901-911.
15. V. Felipo, *Nat Rev Neurosci*, 2013, **14**, 851-858.
16. L. Nybo and N. H. Secher, *Prog Neurobiol*, 2004, **72**, 223-261.
17. L. Nybo, M. K. Dalsgaard, A. Steensberg, K. Moller and N. H. Secher, *J Physiol*, 2005, **563**, 285-290.
18. R. D. de Almeida, E. S. Prado, C. D. Llosa, A. Magalhaes-Neto and L. C. Cameron, *Br J Nutr*, 2010, **104**, 1438-1442.
19. E. S. Prado, J. M. de Rezende Neto, R. D. de Almeida, M. G. Doria de Melo and L. C. Cameron, *Br J Nutr*, 2011, **105**, 1729-1733.
20. Y. Liu, T. Spreng, M. Lehr, B. Yang, A. Karau, H. Gebhardt and J. M. Steinacker, *Food Funct*, 2015, **6**, 2224-2230.
21. Y. Liu, R. Lange, J. Langanky, T. Hamma, B. Yang and J. M. Steinacker, *J Int Soc Sports Nutr*, 2012, **9**, 37-46.
22. H. M. Binkley, J. Beckett, D. J. Casa, D. M. Kleiner and P. E. Plummer, *J Athl Train*, 2002, **37**, 329-343.
23. J. Brisswalter, M. Collardeau and A. Rene, *Sports Med*, 2002, **32**, 555-566.

24. H. S. Sharma, *Prog Brain Res*, 2007, **162**, 295-317.
25. M. S. Ganio, L. E. Armstrong, D. J. Casa, B. P. McDermott, E. C. Lee, L. M. Yamamoto, S. Marzano, R. M. Lopez, L. Jimenez, L. Le Bellego, E. Chevillotte and H. R. Lieberman, *Br J Nutr*, 2011, **106**, 1535-1543.
26. M. A. Febbraio, *Sports Med*, 2001, **31**, 47-59.
27. D. M. Linnane, R. M. Bracken, S. Brooks, V. M. Cox and D. Ball, *Eur J Appl Physiol*, 2004, **93**, 159-166.
28. M. A. Febbraio, R. J. Snow, C. G. Stathis, M. Hargreaves and M. F. Carey, *Exp Physiol*, 1996, **81**, 685-693.
29. J. M. Buono, S. Avila, L. Garnerio, L. Fader and F. W. Kolkhorst, *J Therm Biol*, 2011, **36**, 157-159.
30. A. S. Jackson and M. L. Pollock, *Br J Nutr*, 1978, **40**, 497-504.
31. E. T. Howley, D. R. Bassett, Jr. and H. G. Welch, *Med Sci Sports Exerc*, 1995, **27**, 1292-1301.
32. P. McCrory, W. H. Meeuwisse, M. Aubry, B. Cantu, J. Dvorak, R. J. Echemendia, L. Engebretsen, K. Johnston, J. S. Kutcher, M. Raftery, A. Sills, B. W. Benson, G. A. Davis, R. G. Ellenbogen, K. Guskiewicz, S. A. Herring, G. L. Iverson, B. D. Jordan, J. Kissick, M. McCrea, A. S. McIntosh, D. Maddocks, M. Makdissi, L. Purcell, M. Putukian, K. Schneider, C. H. Tator and M. Turner, *Br J Sports Med*, 2013, **47**, 250-258.
33. J. T. Eckner, J. S. Kutcher and J. K. Richardson, *J Athl Train*, 2011, **46**, 409-414.
34. L. E. Armstrong, C. M. Maresh, J. W. Castellani, M. F. Bergeron, R. W. Keriefick, K. E. LaGasse and D. Riebe, *Int J Sport Nutr*, 1994, **4**, 265-279.
35. D. J. Casa, L. E. Armstrong, S. K. Hillman, S. J. Montain, R. V. Reiff, B. S. Rich, W. O. Roberts and J. A. Stone, *J Athl Train*, 2000, **35**, 212-224.
36. L. E. Armstrong, D. J. Casa, M. Millard-Stafford, D. S. Moran, S. W. Pyne and W. O. Roberts, *Med Sci Sports Exerc*, 2007, **39**, 556-572.
37. A. J. Cathcart, S. R. Murgatroyd, A. McNab, L. J. Whyte and C. Easton, *Eur J Appl Physiol*, 2011, **111**, 2051-2061.
38. A. P. Gagge, J. A. Stolwijk and B. Saltin, *Environ Res*, 1969, **2**, 209-229.
39. J. C. Perazzo, S. Tallis, A. Delfante, P. A. Souto, A. Lemberg, F. X. Eizayaga and S. Romay, *World J Hepatol*, 2012, **4**, 50-65.
40. L. Nybo, *Front Biosci*, 2010, **2**, 779-792.
41. P. L. Greenhaff, J. B. Leiper, D. Ball and R. J. Maughan, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1991, **63**, 338-344.
42. J. J. Winnick, J. M. Davis, R. S. Welsh, M. D. Carmichael, E. A. Murphy and J. A. Blackmon, *Med Sci Sports Exerc*, 2005, **37**, 306-315.
43. J. Bangsbo, B. Kiens and E. A. Richter, *Am J Physiol*, 1996, **270**, 101-106.
44. J. Carvalho-Peixoto, R. C. Alves and L. C. Cameron, *Appl Physiol Nutr Metab*, 2007, **32**, 1186-1190.
45. W. C. Maddrey, F. L. Weber, Jr., A. W. Coulter, C. M. Chura, N. P. Chapanis and M. Walser, *Gastroenterology*, 1976, **71**, 190-195.
46. M. Walser, *Kidney Int*, 1990, **38**, 595-604.
47. S. Mou, J. Li, Z. Yu, Q. Wang and Z. Ni, *J Int Med Res*, 2013, **41**, 129-137.

48. T. J. Walters, K. L. Ryan, L. M. Tate and P. A. Mason, *J Appl Physiol*, 2000, **89**, 799-806.
49. C. Cian, P. A. Barraud, B. Melin and C. Raphel, *Int J Psychophysiol*, 2001, **42**, 243-251.
50. M. Mohr, P. Rasmussen, B. Drust, B. Nielsen and L. Nybo, *Eur J Appl Physiol*, 2006, **97**, 89-95.
51. A. C. Lacerda, F. Gripp, L. O. Rodrigues, E. Silami-Garcia, C. C. Coimbra and L. S. Prado, *Eur J Appl Physiol*, 2007, **99**, 87-93.

3º artigo: artigo de resultados

EFEITO DE DIFERENTES ESTADOS DE HIDRATAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E COGNITIVO-MOTOR DE ATLETAS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EM AMBIENTE DE BAIXO ESTRESSE AO CALOR

Artigo submetido na revista: Andaluza de Medicina del Deporte.

Categoria do artigo: artigo original.

EFEITO DE DIFERENTES ESTADOS DE HIDRATAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E COGNITIVO-MOTOR DE ATLETAS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EM AMBIENTE DE BAIXO ESTRESSE AO CALOR.

EFFECTO DE DISTINTOS ESTADOS DE HIDRATACIÓN ANTE EL RENDIMIENTO FÍSICO Y COGNITIVO-MOTOR DE ATLETAS SOMETIDOS A EJERCÍCIO EN AMBIENTE DE BAJO ESTRÉS TÉRMICO

EFFECT OF DIFFERENTS HYDRATION STATUS ON PHYSICAL AND COGNITIVE-MOTOR PERFORMANCE OF ATHLETES SUBMITTED TO EXERCISE UNDER LOW HEAT STRESS ENVIRONMENT

^{1,5}Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino

^{2,3}Estélio Henrique Martin Dantas

^{4,5}Rafaela Carvalho Pereira Lima

^{1,5}Thássia Casado Lima França

^{1,5}Natally Monteiro de Oliveira

^{1,2,5}Eduardo Seixas Prado

¹Universidade Federal de Alagoas (UFAL); Programa de Pós-graduação em Nutrição; Maceió, Alagoas, Brasil;

²Laboratório de Biociências da Motricidade Humana (LABIMH) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, Brasil;

³Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, Sergipe, Brasil;

⁴Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde; Maceió, Alagoas, Brasil;

⁵Grupo de Pesquisa em Exercício Físico e Metabolismo (GEPEFIM).

Autor correspondente:

Prof. Eduardo Seixas Prado

Grupo de Pesquisa em Exercício Físico e Metabolismo (GEPEFIM)

Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Campus A.C. Simões; Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins

CEP: 57.072-970. Maceió/AL

Telefone: +55 82 3214-1873

eduseipra@gmail.com

O manuscrito teve o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)/CNPq, para execução do projeto (Processo nº 20110831-011-0025-0029)

Resumen

Objetivo: Verificar el efecto de diferentes estados de hidratación sobre el rendimiento físico y cognitivo-motor de atletas sometidos a ejercicios en ambientes de bajo estrés térmico.

Métodos: Dieciséis atletas, divididos en dos grupos de ocho atletas (G2%: 34.1 ± 2.3 años; y G3%: 32.5 ± 2.2 años), realizaron 2 h de ciclismo y un teste incremental máximo, acompañado de extracciones sanguíneas y cálculo del índice de estrés térmico WBGT (del inglés: Wet Bulb Globe Temperature Index). Antes y después del protocolo, los grupos fueron sometidos a una evaluación del estado de hidratación, mediante el cálculo de la pérdida porcentual de masa corporal ($\Delta\%$ MC), coloración y gravedad específica (GE) urinarias; además de evaluaciones de los rendimientos físico (por el tiempo hasta el agotamiento) y cognitivo-motor (por los testes de memoria inmediata, índice-nariz y tiempo de reacción simples).

Resultados: El WBGT máximo registrado fue de ~ 20 °C. Hubo una diferencia significativa entre el $\Delta\%$ MC del G3% (-3.29 ± 0.23 %) y G2% (-1.87 ± 0.12 %) ($P < 0,001$), y un aumento en la GE en ambos grupos después del ciclismo. No hubo diferencia significativa en la coloración urinaria entre los grupos. En estas condiciones no fueron observadas diferencias significativas en el parámetros sanguíneos, tiempo hasta el agotamiento y en los testes cognitivo-motores entre los grupos.

Conclusión: Se sugiere que una deshidratación con reducción de hasta ~ 3 % de masa corporal, no afecta negativamente el rendimiento físico y cognitivo-motor.

Palabras-clave: Rendimiento Atlético; Deshidratación; Cognición; Fatiga.

Abstract

Objective: To verify the effect of different hydration status on physical and cognitive-motor performance of athletes submitted to exercise under low heat stress environment.

Methods: Sixteen athletes, divided into two groups with eight athletes each (G2%: 34.1 ± 2.3 years; and G3%: 32.5 ± 2.2 years), performed 2 h of cycling session and an maximum incremental test, accompanied by blood collections and calculation of the heat stress index WBGT (Wet Bulb Globe Temperature Index). Before and after the protocol, the groups underwent an assessment of hydration status by percentage of body mass loss ($\Delta\%$ BM), color and specific gravity (SG) urinary; as well as assessments of physical performances (by time to exhaustion) and cognitive-motor (by immediate memory tests, finger-to-nose and simple reaction time).

Results: The maximum recorded WBGT was ~ 20 °C. There was a significant difference between $\Delta\%$ BM G3% ($- 3.29 \pm 0.23$ %) and G2 % ($- 1.87 \pm 0.12$ %) ($P < 0.001$), and an increased SG after cycling in both groups. There was no significant difference in urinary coloration between the groups. Under these conditions, there were no significant differences in the blood parameters, time to exhaustion and cognitive-motor tests between groups.

Conclusion: It is suggested that dehydration with reduction of up to ~ 3 % of the MC not impairs physical and cognitive-motor performances.

Keywords: Athletic performance; Dehydration; Cognition; Fatigue.

Resumo

Objetivo: Verificar o efeito de diferentes estados de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor de atletas submetidos a exercício em ambiente de baixo estresse térmico.

Métodos: Dezesesseis atletas, divididos em dois grupos de oito atletas (G2%: $34,1 \pm 2,3$ anos; e G3%: $32,5 \pm 2,2$ anos), realizaram 2 h de ciclismo e um teste incremental máximo, acompanhado de coletas sanguíneas e cálculo do índice de estresse térmico WBGT (do inglês: Wet Bulb Globe Temperature Index). Antes e após o protocolo, os grupos foram submetidos a uma avaliação do estado de hidratação, através do cálculo da perda percentual de massa corporal ($\Delta\%$ MC), coloração e gravidade específica (GE) urinárias; além de avaliações dos desempenhos físico (pelo tempo de exaustão) e cognitivo-motor (pelos testes de memória imediata, dedo-nariz e tempo de reação simples).

Resultados: O WBGT máximo registrado foi de ~ 20 °C. Houve diferença significativa entre o $\Delta\%$ MC do G3% ($- 3,29 \pm 0,23$ %) e G2% ($- 1,87 \pm 0,12$ %) ($P < 0,001$), e um aumento na GE após ciclismo em ambos os grupos. Não houve diferença significativa na coloração urinária entre os grupos. Nestas condições, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos, tempo de exaustão e testes cognitivo-motores entre os grupos.

Conclusão: Sugere-se que uma desidratação com redução de até ~ 3 % da MC, não causa prejuízos no desempenho físico e cognitivo-motor.

Palavras-chave: Desempenho atlético; Desidratação; Cognição; Fadiga.

Introdução

A manutenção do estado de hidratação é fundamental para o desenvolvimento de um bom desempenho atlético em várias modalidades esportivas¹, especialmente, para atletas que realizam atividades intensas e prolongadas no calor². Por outro lado, a desidratação induzida pela prática de exercícios físicos em ambiente quente pode causar prejuízos na função cognitiva e motora³ do atleta (aqui denominada de função cognitiva-motora).

Sabe-se que o desempenho ótimo no esporte depende da função cognitiva-motora (tais como: coordenação motora, tempo de reação simples e memória) para a tomada de decisão e execução de habilidades complexas⁴. E além do desempenho cognitivo-motor ser afetado pelas condições de ambiente quente, hipertermia e/ou desidratação, a capacidade de manutenção do exercício (desempenho físico) também pode ser prejudicada^{5, 6}.

O desempenho cognitivo-motor é avaliado quando ocorre perturbações no funcionamento cerebral (concussão), que podem ser resultantes de vários sinais e/ou sintomas não específicos, tal como em comportamentos físicos anormais⁷. Esses prejuízos no desempenho cognitivo-motor parecem ocorrer quando 1 % ou mais da massa corporal (MC) é perdida devido à restrição de líquidos, não aclimatação ao calor, desidratação e/ou esforço físico, com repercussões no desempenho físico³. Parece que a perda de apenas 1 % da MC, é o suficiente para reduzir o desempenho cognitivo-motor³⁻⁵.

No entanto, ainda existe a necessidade de mais investigações acerca dos efeitos da desidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor, independentemente do ambiente de realização do exercício, visto que muitas dessas informações são baseadas em evidências^{8, 9}. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes estados de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor de atletas submetidos a exercício em ambiente de baixo estresse ao calor.

Método

Amostra

Dezesseis ciclistas treinados e voluntários, do sexo masculino, participaram do estudo. Estes foram divididos em dois grupos de oito atletas cada: grupo com perda inferior a 2 % da MC, denominado grupo G2 % ($34,1 \pm 2,3$ anos; $69,6 \pm 2,7$ kg; $1,73 \pm 0,02$ m; $11,4 \pm 1,8$ % de gordura corporal - % G; e, $58,01 \pm 52,17$ ml.kg⁻¹.min⁻¹ de consumo máximo de oxigênio - VO₂máx); e, grupo com perda superior a 3 % da MC, denominado grupo G3 % ($32,5 \pm 2,2$ anos; $66,6 \pm 12,1$ kg; $1,67 \pm 0,02$ m; $9,2 \pm 0,5$ % G; $62,21 \pm 0,83$ ml.kg⁻¹.min⁻¹ de VO₂máx).

Os ciclistas tinham uma média de três anos de treinamento (especialmente em ambiente quente, e assim reconhecidos como aclimatados ao calor). Eles não apresentaram qualquer tipo de doença ou uso de recursos ergogênicos que pudessem interferir nos resultados da pesquisa. De acordo com a resolução 466/12 e a Convenção de Helsinque¹⁰ todos os sujeitos foram informados sobre os procedimentos do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, sob protocolo: 017640/2011-61.

Procedimentos

Uma semana antes do dia do experimento, os atletas visitaram o laboratório para coleta da: MC, altura e dobras cutâneas (para determinar o % G). Em seguida, realizaram um teste incremental máximo (TIM), para determinação do VO₂máx através de um analisador de gases automático (Quark CPET Cosmed®, Roma, Itália). Todos foram orientados a manter seu cronograma de treinamento habitual, e consumir líquidos (~ 3 L.d⁻¹, sem uso de bebidas cafeínadas) 2 d antes do experimento.

No dia do experimento, foi fornecido ~ 500 mL de água aos ciclistas, antes de iniciar o protocolo experimental, para maior homogeneidade da hidratação. Em

seguida, após breve aquecimento, iniciaram uma sessão de 2 h de ciclismo a 80 rpm, com intensidade entre 75% a 85% da frequência cardíaca máxima estimada, acompanhado por frequencímetro (FT1 Polar[®], Kempele, Finlândia). Imediatamente, após as 2 h de ciclismo, os atletas foram submetidos a um novo TIM (TIMn) (sem análise gasosa) para induzir à exaustão (MAX) e avaliar os desempenhos físico e cognitivo-motor.

Análise sanguínea

Sangue foi obtido em repouso (0 min), a intervalos de 30 min durante o ciclismo (30, 60, 90 e 120 min) e após o TIMn. Parte da coleta foi usada para análise da creatinina (método colorimétrico, Jaffé modificado; reagente Labtest[®], Minas Gerais, Brasil), através de um analisador automático (Dade Behring[®], Eschborn, Alemanha). Outra parte do sangue foi usada para análise da hemoglobina e hematócrito, através de um analisador hematológico (Human[®], Hessen, Alemanha). Esses dados serviram como marcadores sanguíneos do estado de hidratação.

Avaliação do desempenho físico e cognitivo-motor

O desempenho físico foi avaliado pelo tempo de exaustão imediatamente após o TIMn (momento Pós). Já o desempenho cognitivo-motor foi avaliado tanto antes de iniciar o protocolo de ciclismo (momento Pré) quanto no momento Pós, através da: memória imediata, como descrita por McCrory et al.⁷; coordenação motora, utilizando o teste dedo-nariz adaptado de McCrory et al.⁷; e, o tempo de reação simples, como descrito por Eckner et al.¹¹.

Avaliação do estado de hidratação

O estado de hidratação foi avaliado pela variação percentual da MC (Δ % MC) e por amostras de urina (aqui denominados de marcadores simples do estado de hidratação), também coletados nos momentos Pré e Pós. A urina foi usada para

análise da sua coloração e gravidade específica (GE). A coloração urinária foi determinada através da escala de cores proposta por Armstrong et al.¹². A GE foi analisada por um refratômetro manual (Biobrix®, São Paulo, Brasil). De posse desses marcadores, o estado de hidratação foi classificado de acordo com Casa et al.³.

A taxa de sudorese também foi calculada de acordo Casa et al.³, onde: taxa de sudorese = MC do momento Pré - MC do momento Pós + total de líquidos ingeridos durante o protocolo (contado como zero, pois não houve ingestão de líquidos) - volume total urinário no momento Pós/tempo do protocolo em horas.

Durante todo o experimento, foram registradas a temperatura ambiente, umidade relativa do ar, movimento do ar e radiação para calcular o Índice Bulbo Úmido Temperatura Globo (IBUTG), através de um monitor de estresse ao calor (Instrutemp®, São Paulo, Brasil). Além disso, a temperatura corporal foi registrada através de um termômetro timpânico (Genius™ 2®, Minnesota, USA), determinando a temperatura retal equivalente, oferecido pelo próprio termômetro. Durante todos os momentos de coleta, também foram registradas as sensações térmicas e de conforto dos atletas¹³.

Análise estatística

Os dados são expressos como média e erro padrão. Após aplicação de testes de normalidade e/ou de igualdade de variância, os dados do IBUTG, sensações (térmica e conforto) e sanguíneos, foram analisados por ANOVA one-way; e, as mudanças no grupo foram analisadas por ANOVA two-way por medidas repetidas, usando o teste de Tukey como *post hoc*. Os desempenhos físico, cognitivo-motor e os marcadores simples do estado de hidratação foram analisados por teste *t* student pareado e não-pareado. Em qualquer condição, um nível de significância de $P < 0,05$ foi adotado.

Resultados

Houve diferença significativa apenas quanto ao Δ % MC entre G3 % e G2 % ($P < 0,001$), e na GE urinária entre os momentos Pré e Pós ciclismo, em ambos os grupos (G2 %, $P = 0,016$; G3 %, $P = 0,008$). Apesar disso, os valores iniciais da coloração e GE urinárias demonstraram que os grupos já estavam desidratados antes do início da sessão de ciclismo (Tabela 1).

Tabela 1. Marcadores simples do estado de hidratação dos grupos G2 % e G3 %, antes (pré) e após (pós) a sessão de ciclismo e TIMn.

Grupos/momentos		% Mudança da massa corporal (Δ % MC)	Cor da urina	Gravidade específica da urina (GE)	Taxa de sudorese (L/h)
G2 %	Pré		$4,5 \pm 0,7$	$1019,4 \pm 2,8$	
	Pós	$- 1,87 \pm 0,12$	$5,2 \pm 0,4$	$1024,4 \pm 1,5^*$	$0,61 \pm 0,10$
G3 %	Pré		$3,3 \pm 0,5$	$1016,4 \pm 2,8$	
	Pós	$- 3,29 \pm 0,23^\dagger$	$4,3 \pm 0,3$	$1021,0 \pm 2,4^*$	$0,86 \pm 0,11$

† Diferença significativa entre os grupos.* Diferença significativa em relação ao momento pré do mesmo grupo.

Apesar de o IBUTG aumentar em ambos os grupos ($P < 0,001$), este indicou um baixo estresse térmico. No momento MAX, o IBUTG atingiu $19,8 \pm 0,1$ ° C e $19,6 \pm 0,2$ ° C, em G2 % e G3 %, respectivamente, sem diferença entre os grupos (Figura 1A). Não houve diferença significativa nos valores equivalentes para temperatura retal em nenhum momento (Figura 1B). O mesmo ocorreu para a sensação térmica (Figura 1C) e sensação de conforto (Figura 1D), apesar do aumento dessas variáveis no decorrer do ciclismo, em ambos os grupos.

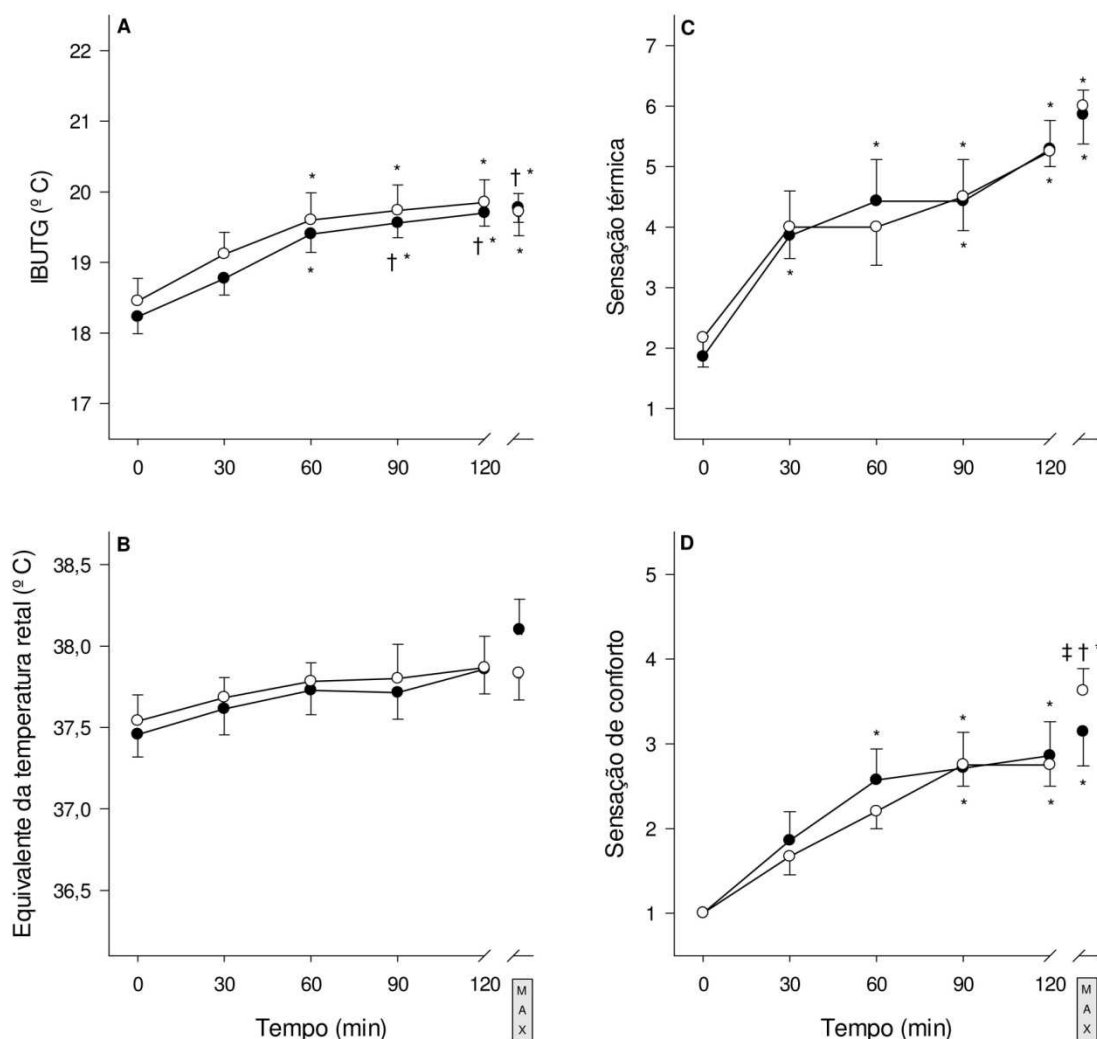


Figura 1. Condições ambientais, temperatura corporal e sensações térmicas e de conforto durante o protocolo experimental. Todos os atletas tiveram condições ambientais, temperaturas corporais e sensações similares. Atletas se exercitaram por 2 h seguido por um novo teste incremental máximo (TIMn) para levá-los à exaustão (MAX) (grupo G2 %, ●) (grupo G3 %, ○). Valores estão como médias e erros padrões. (A) IBUTG: valores de repouso: G2% $18,2 \pm 0,2$ °C e G3 % $18,4 \pm 0,3$ °C; (B) Temperatura retal equivalente: valores de repouso: G2 % $37,4 \pm 0,1$ °C e G3 %: $37,5 \pm 0,1$ °C; (C) Sensação térmica: valores de repouso: G2 % $1,8 \pm 0,3$ e G3 % $2,1 \pm 0,4$; (D) Sensação de conforto: valores de repouso: G2 % $1,0 \pm 0,0$ e G3 % $1,0 \pm 0,0$. * Valores de médias que foram diferentes significativamente de 0 min dentro do grupo. † Valores de médias que foram diferentes significativamente de 30 min dentro do grupo ($P < 0,05$).

As concentrações de creatinina não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 2A), apesar do seu aumento ocorrer durante o protocolo nos grupos. Os valores de hemoglobina demonstraram um aumento significativo a partir do momento 30 no G2 % ($P = 0,006$), e o G3 % aumentou apenas no MAX, dentro do

grupo ($P < 0,05$) (Figura 2B). Os hematócritos também não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$), apesar do aumento significativo dentro do G3 %, no momento MAX ($P < 0,05$) (Figura 2C).

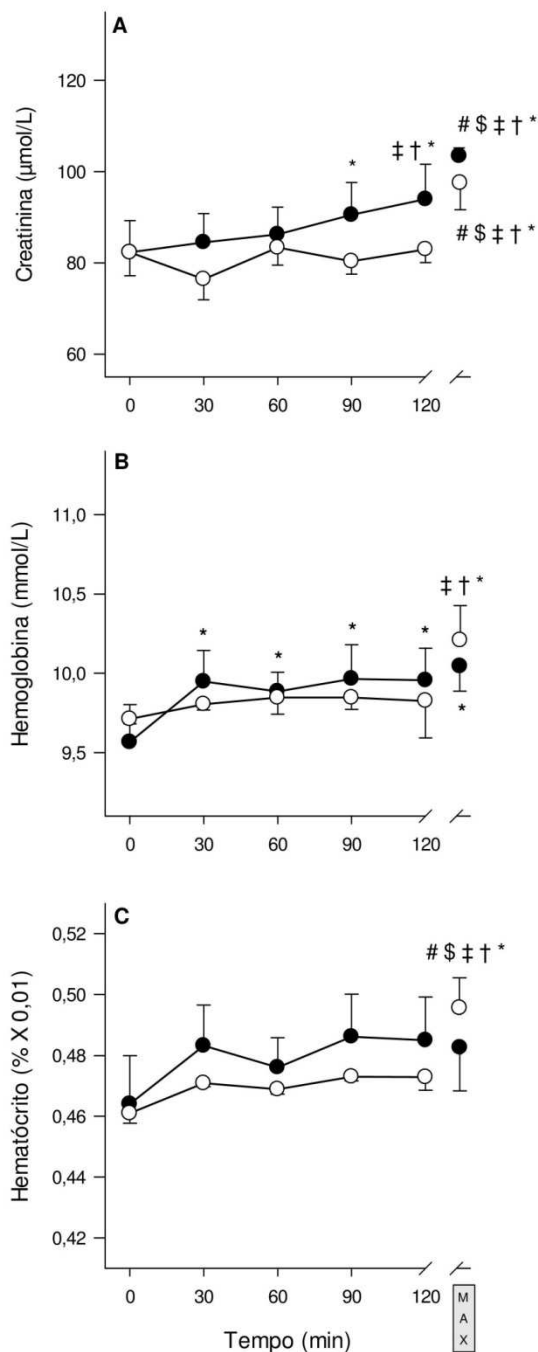


Figura 2. Concentrações de creatinina, hemoglobina e hematócrito durante o protocolo. Atletas se exercitaram por 2 h seguido por um novo teste incremental máximo (TIMn) para levá-los à exaustão (MAX) (grupo G2 %, ●) (grupo G3 %, ○).

o). Valores são médias e erros padrões. (A) Creatinina: valores de repouso : G2 % $82,3 \pm 6,8$ $\mu\text{mol/L}$ e G3 % $82,3 \pm 5,1$ $\mu\text{mol/L}$; (B) Hemoglobina: valores de repouso : G2 % $9,5 \pm 0,2$ mmol/L e G3 %: $9,7 \pm 0,0$ mmol/L ; (C) Hematócrito: valores de repouso: G2 % $0,4 \pm 0,0$ % x 0,01 e G3 % $0,4 \pm 0,0$ % x 0,01. * Valores de médias que foram diferentes significativamente de 0 min dentro do grupo. † Valores de médias que foram diferentes significativamente de 30 min dentro do grupo ($P < 0.05$). ‡ Valores de médias que foram diferentes significativamente de 60 min dentro do grupo ($P < 0.05$). § Valores de médias que foram diferentes significativamente de 90 min dentro do grupo ($P < 0.05$). # Valores de médias que foram diferentes significativamente de 120 min dentro do grupo ($P < 0.05$).

Nestas condições, ambos os grupos apresentaram tempo de exaustão similares, e não foram observadas alterações significativas no desempenho cognitivo-motor induzidas pela desidratação (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenhos físico e cognitivo-motor dos grupos G2 % e G3 %, antes (pré) e após (pós) a sessão de ciclismo e TIMn.

Grupos/momentos		Tempo de exaustão (min)	Memória imediata (pontos)	Teste dedonariz (pontos)	Tempo de reação simples (ms)
G2 %	Pré		$13,8 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,1$	$235,8 \pm 10,4$
	Pós	$5,99 \pm 0,39$	$14,3 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	$233,7 \pm 9,3$
G3 %	Pré		$14,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$228,8 \pm 10,1$
	Pós	$5,33 \pm 0,36$	$14,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$216,7 \pm 8,5$

Discussão

Os desempenhos físico e cognitivo-motor podem ser prejudicados na desidratação causados pelo exercício em ambientes quentes^{14, 15}. Esse estudo observou um estado de desidratação nos grupos, tanto antes quanto após o ciclismo, corroborando com outros estudos^{1, 16}. Armstrong et al.¹², avaliando tenistas durante jogos no calor, observaram um estado de desidratação antes de iniciarem as partidas. Casa et al.¹⁷, também observaram alterações na coloração urinária (~ 6) e GE (~ 1025) após corrida no calor.

Além disso, acredita-se que a perda de MC entre 1 % e 3 % pode causar prejuízos no desempenho físico e cognitivo-motor³. No estudo de Ganio et al.⁵, a perda de 1,6 % da MC, em ambiente sem estresse térmico, induziu prejuízos cognitivos-motores. Mas, parece que esse prejuízo não depende somente do grau de desidratação (perda de 2 % da MC), mas também da hipertermia e aclimação^{3, 18}. E, apesar do ACSM⁸ sugerir que uma perda da MC superior a 2 % prejudica o desempenho cognitivo-motor, alerta que a evidência é mais forte para um efeito negativo de hipertermia.

Esses argumentos corroboram com os resultados obtidos nesta pesquisa, levando em consideração que o ambiente foi de baixo estresse térmico, os atletas eram aclimatados, não estavam sob hipertermia e não alteraram os marcadores sanguíneos de hidratação^{19, 20}. Talvez, os prejuízos físicos e cognitivos-motores só ocorram em condições de não aclimação e hipertermia, mais do que na desidratação com redução de 2 % da MC.

A hipertermia, por si, promove distúrbios cerebrais e causa prejuízos aos desempenhos físico e cognitivo-motor²¹. Walters et al.²², demonstraram que o desempenho de corrida foi reduzido, quando atingidas temperaturas retais de ~ 39 ° C. No presente estudo, as temperaturas corporais dos atletas se situaram abaixo de 39 °C, em ambiente de baixo estresse térmico (IBUTG ~ 19 ° C).

Os efeitos negativos da desidratação sobre o desempenho cognitivo-motor parecem ser realmente contraditórios¹⁴. Bandelow et al.⁹, não encontraram prejuízos causados pela desidratação no desempenho cognitivo-motor de jogadores, durante atividade no calor. Grego et al.²³ não encontraram efeitos do estado de hidratação sobre o desempenho cognitivo-motor em 1 h de exercício.

Serwah e Marino²⁴, também relataram, que exercício em condições quentes o tempo de reação não foi comprometido pela perda de ~ 1,7 Δ % da MC. Ely et al.²⁵, avaliaram o desempenho cognitivo-motor em indivíduos submetidos a perda de MC ~ 4 Δ %, em diferentes temperaturas ambientais e, também, não observaram alterações no tempo de reação. Esses estudos corroboram com o presente trabalho, onde os atletas não apresentaram quaisquer alterações no desempenho físico e cognitivo-motor, após 2 h de ciclismo e um esforço até exaustão, em estado de desidratação.

Os dados sugerem que níveis de desidratação com perda de MC de até 3 %, não é suficiente para causar alterações no desempenho físico e cognitivo-motor em atletas aclimatados ao calor e sem hipertermia, após exercício realizado em ambiente de baixo estresse térmico.

Referências

1. Armstrong LE, Pumerantz AC, Fiala KA, Roti MW, Kavouras SA, Casa DJ, et al. Human hydration indices: acute and longitudinal reference values. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2010;20(2):145-53.
2. Grandjean AC, Grandjean NR. Dehydration and cognitive performance. *J Am Coll Nutr.* 2007;26(5):549-54.
3. Casa DJ, Armstrong LE, Hillman SK, Montain SJ, Reiff RV, Rich BSE, et al. National athletic trainers' association position statement: fluid replacement for athletes. *J Athl Train.* 2000;35(2):212-24.
4. Lieberman HR. Hydration and cognition: a critical review and recommendations for future research. *J Am Coll Nutr.* 2007;26(5):555-61.
5. Ganio MS, Armstrong LE, Casa DJ, McDermott BP, Lee EC, Yamamoto LM, et al. Mild dehydration impairs cognitive performance and mood of men. *Br J Nutr.* 2011;106(10):1535-43.
6. Binkley HM, Beckett J, Casa DJ, Kleiner DM, Plummer PE. National Athletic Trainers' Association Position Statement: Exertional Heat Illnesses. *J Athl Train.* 2002;37(3):329-43.
7. McCrory P, Meeuwisse WH, Aubry M, Cantu B, Dvořák J, Echemendia RJ, et al. Consensus statement on concussion in sport: the 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012 *Br J Sports Med.* 2013;47:250-8.
8. Sawka MN, Burke LM, Eichner ER, Maughan RJ, Montain SJ, Stachenfeld NS. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and fluid replacement. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(2):377-90.
9. Bandelow S, Maughan R, Shirreffs S, Ozgunen K, Kurdak S, Ersoz G, et al. The effects of exercise, heat, cooling and rehydration strategies on cognitive function in football players. *Scand J Med Sci Sports.* 2010;20(3):148-60.
10. World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. WMA General Assembly 59th, Seoul, October, 2008.
11. Eckner JT, Kutcher JS, Richardson JK. Between-seasons test-retest reliability of clinically measured reaction time in national collegiate athletic association division I athletes. *J Athl Train.* 2011;46(4):409-14.
12. Armstrong LE, Maresh CM, Castellani JW, Bergeron MF, Keriefick RW, LaGasse KE, et al. Urinary indices of hydration status. *Int J Sport Nutr.* 1994;4:265-79.
13. Gagge AP, Stolwijk JAJ, Saltin B. Comfort and thermal sensations and associated physiological responses during exercise at various ambient temperatures. *Environ Res.* 1969;2:209-29.
14. Barroso SS, de Almeida RD, Gonzaga WS, Camerino SRAS, Lima RCP, Prado ES. Estado de hidratação e desempenho cognitivo-motor durante uma prova de fast-triathlon no calor. *Rev Educ Fís/UEM.* 2014;25(4):639-50.
15. Bergeron MF, Bahr R, Bartsch P, Bourdon L, Calbet JA, Carlsen KH, et al. International Olympic Committee consensus statement on thermoregulatory and altitude challenges for high-level athletes. *Br J Sports Med.* 2012;46(11):770-9.
16. Silva RP, Mundel T, Altoe JL, Saldanha MR, Ferreira FG, Marins JC. Preexercise urine specific gravity and fluid intake during one-hour running in a

thermoneutral environment - a randomized cross-over study. *J Sports Sci Med*. 2010;9(3):464-71.

17. Casa DJ, Stearns RL, Lopez RM, Ganio MS, McDermott BP, Walker Yeargin S, et al. Influence of hydration on physiological function and performance during trail running in the heat. *J Athl Train*. 2010;45(2):147-56.

18. Cian C, Barraud PA, Melin B, Raphel C. Effects of fluid ingestion on cognitive function after heat stress or exercise-induced dehydration. *Int J Psychophysiol*. 2001;41:243-51.

19. Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic markers in sports medicine. *Adv Clin Chem*. 2012;56:1-54.

20. Armstrong LE. Assessing hydration status: the elusive gold standard. *J Am Coll Nutr*. 2007;26(5):575-84.

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

22. Walters TJ, Ryan KL, Tate LM, Mason PA. Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. *J Appl Physiol*. 2000;89(2):799-806.

23. Grego F, Vallier JM, Collardeau M, Rousseu C, Cremieux J, Brisswalter J. Influence of exercise duration and hydration status on cognitive function during prolonged cycling exercise. *Int J Sports Med*. 2005;26(1):27-33.

24. Serwah N, Marino FE. The combined effects of hydration and exercise heat stress on choice reaction time. *J Sci Med Sport*. 2006;9(1-2):157-64.

25. Ely BR, Sollanek KJ, Cheuvront SN, Lieberman HR, Kenefick RW. Hypohydration and acute thermal stress affect mood state but not cognition or dynamic postural balance. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(4):1027-34.

Agradecimentos

Agradecemos o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)/CNPq, o qual foi essencial para execução do projeto.

O presente estudo, para nosso conhecimento, foi o primeiro a avaliar o efeito da suplementação de KAAA no metabolismo da amônia e desempenho físico e cognitivo-motor sob condições de baixo estresse térmico. Observamos que a suplementação de KAAA foi capaz de reduzir a produção de amônia durante a sessão. Sugerimos que, esse resultado ocorreu pela capacidade do KAAA (mistura de cetoanálogos e aminoácidos) quelar a amônia produzida. Entretanto, tal suplementação, não afetou o desempenho físico e cognitivo-motor. Possivelmente, as concentrações de amônia produzidas durante o exercício e/ou ausência de aumento na temperatura corporal, não foram suficientes para causar prejuízos ao desempenho.

Ainda, demonstramos que, uma perda de até 3 % da MC, parece não afetar o desempenho físico e cognitivo-motor em atletas aclimatados ao calor, após exercício realizado em ambiente de baixo estresse térmico. Além disso, a avaliação do estado de hidratação apenas pela alteração da MC, não deve ser o único parâmetro para análise de prejuízos físicos e cognitivos-motores, e outras variáveis como aclimação ao calor, hipertermia e alterações metabólicas devem ser consideradas.

AOI, W; NAITO, Y; YOSHIKAWA, T. Exercise and functional foods. **Nutrition Journal**, v. 5, n. 15, jun, 2006.

BANISTER, E. W.; CAMERON, B. J. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. **Int J Sports Med**, v. 11, n.2, p. 129-142, 1990.

BASSINI-CAMERON, A *et al.* Glutamine protects against increases in blood ammonia in football players in an exercise intensity-dependent way. **Br J Sports Med**, v.42, n.4, p.260-266, 2008.

BINKLEY, H. M. *et al.* National athletic trainers' association position statement: exertional heat illnesses. **Journal of Athletic Training**. v. 37, n. 3, p. 329-343, 2002.

BRISWALTER, J; COLLARDEAU, M; RENÉ, A. effects of acute physical exercise characteristics on cognitive performance. **Sports Med**, v. 32, n. 9, p. 555-556, 2002.

BURKE, L.M.; KIENS, B.; IVY, J.L. Carbohydrates and fat for training and recovery. **J Sports Sci**, v.22, n.1, p.15-30, 2004.

CARVALHO-PEIXOTO, J.; ALVES, R.C.; CAMERON, L.C. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonia increase during endurance field exercise. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32, n.6, p.1186-90, 2007.

CASA, Douglas J *et al.* National athletic trainers' association position statement: fluid replacement for athletes. **Journal of Athletic Training**, v.35, n. 2, p. 212-224, jun. 2000.

COLLOMP, K. R. *et al.* Effects of short-term oral salbutamol administration on exercise endurance and metabolism. **J Appl Physiol**, v. 89, n. 2, p. 430-436, 2000.

COYLE, E.F. Physical activity as a metabolic stressor. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2, p. 512- 520, 2000.

DE ALMEIDA, R. D. *et al.* Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. **Br J Nutr**, v. 104, n. 10, p. 1438-1442, 2010.

DIRETRIZ DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA DO ESPORTE. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Rev Bras Med Esporte**, v. 9, n. 2, p. 1-13, 2003.

DIRETRIZ DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA DO ESPORTE. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 3, p. 2-12, 2009.

FALAVIGNA, G. *et al.* Effects of diets supplemented with branched-chain amino acids on the performance and fatigue mechanisms of rats submitted to prolonged physical exercise. **Nutrients**, v. 4, n. 11, p. 1767-1780, 2012.

FELIPO, V; BUTTERWORTH, R . F. Neurobiology of ammonia. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 4, p. 259-279, 2002.

GANIO, M. S. *et al.* Mild dehydration impairs cognitive performance and mood of men. **Br J Nutr**, v. 106, p. 1535-1543, 2011.

GLEESON, M.; BISHOP, N. C. Elite athlete immunology: importance of nutrition. **Int J Sports Med**. v. 21, n. 1, p.S44-50, 2000.

GONÇALVES, L. C. *et al.* A sportomics strategy to analyze the ability of arginine to modulate both ammonia and lymphocyte levels in blood after high-intensity exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v. 9, n. 30, 2012.

HUANG, S.H.; JOHNSON, K.; PIPE, A.L. The use of dietary supplements and medications by Canadian athletes at the Atlanta and Sydney Olympic Games. **Clin J Sport Med**, v. 16, n. 1, p. 27-33, 2006.

KIM, D; KIM, K. Walnut extract exhibits anti-fatigue action via improvement of exercise tolerance in mice. **Lab Anim Res**, v. 29, n. 4, p. 190-195, 2013.

LIU, Y *et al.* Improved training tolerance by supplementation with α -Keto acids in untrained young adults: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 9, n. 1, 2012.

LUKASKI, Henry, C. Vitamin and mineral status: Effects on Physical Performance. **Nutrition**, v. 20, n. 7-8, p. 632-644, 2004.

MONFORT, P. *et al.* Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. **Neurochemistry International**, v. 41, n. 2-3, p. 95-102, 2002.

MOUADIL, A. *et al.* Blood metabolite data in response to maximal exercise in healthy subjects. **Clin Physiol Funct Imaging**, v. 32, n. 4, p. 274-281, 2012

NOGUEIRA, J.A; DA COSTA, T.H. Nutrient intake and eating habits of triathletes on a Brazilian diet. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 14, n. 6, p. 684-97, 2004.

NYBO, L.; SECHER, N.H. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. **Prog Neurobiol**, v. 72, n. 4, p. 223-261, 2004.

NYBO, L. *et al.* Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. **J Physiol**, v. 15, n. 563(Pt 1), p. 285-290, 2005.

NYBO, Lars. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 2, p. 779-792, jan. 2010.

PRADO, E. S. *et al.* Keto analogue and amino acid supplementation affects the ammoniaemia response during exercise under ketogenic conditions. **Br J Nutr**, v. 105, n. 12, p. 1729-1733, 2011.

RAY, T.R.; FOWLER, R. Current issues in sports nutrition in athletes. **South Med J**. v. 97, n. 9, p. 863-866, 2004.

RIETJENS, G. J. *et al.* Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue. **Int J Sports Med**. v. 26, n. 1, p. 16-26, 2005.

SHARMA, H. S. *et al.* Interaction between amino acid neurotransmitters and opioid receptors in hyperthermia-induced brain pathology. **Progress in Brain Research**. v. 162, p. 295-317, 2007.

SILVA, L.M.L.; PEIXOTO, J.C.; CAMERON, L. C. Respostas hematológicas, bioquímicas e de indicadores do perfil nutricional de atletas fundistas após intervenção dietética. **Fit Perf J**, v. 5, n. 1, p. 11-17, 2006.

SMITH, D. J; ROBERTS, D. Effects of high volume and/or Intense exercise on selected blood chemistry parameters. **Clinical Biochemistry**, v. 27, n. 6, p. 435-440, 1994.

SNOW, R. J. *et al.* Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. **J Appl Physiol**. V. 88, n. 5, p. 1576–1580, 2000.

VENKATRAMAN, J.T.; PENDERGAST, D.R. Effect of dietary intake on immune function in athletes. **Sports Med**. v. 32, n. 5, p. 323-337, 2002.

WILKINSON, D.J.; SMEETON, N.J.; WATT, P.W. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. **Prog Neurobiol**. v. 91, n. 3, p. 200-219, 2010.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em duas vias, firmado por cada participante-voluntário(a) da pesquisa e pelo responsável)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu, _____

_____ tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo **AValiação e intervenção nutricional-metabólica em atletas alagoanos de diferentes modalidades esportivas**, recebi do(a) Sr.(a) **PROFESSOR DOUTOR EDUARDO SEIXAS PRADO**, do **DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- * Que atletas considerados de menor (idade inferior a 18 anos), terão que apresentar uma autorização dos pais ou responsáveis para participação na pesquisa.
- * Que o estudo se destina a obter dados experimentais para avaliação do desempenho, da cognição, do metabolismo e da atividade cardíaca de atletas alagoanos de diferentes modalidades esportivas, através de procedimentos nutricionais e metabólicos, supervisionada por profissionais capacitados.
- * Que a importância deste estudo é demonstrar sua contribuição social, no sentido de melhorar o desempenho na prática esportiva de atletas locais, esclarecendo seu estado nutricional e metabólico e ao mesmo tempo, oferecendo oportunidade para uma melhor orientação em como se alimentar e hidratar, no sentido dos atletas se cuidarem mais eficientemente, beneficiando seu desempenho.
- * Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: espera-se que a dieta e o estado de hidratação, além do perfil bioquímico e hematológico dos atletas alagoanos, obtidos na primeira etapa do estudo, estejam irregulares. Através do plano de intervenção (orientação), todos os aspectos nutricionais e metabólicos, reavaliados na segunda etapa, serão melhorados, permitindo assim, um melhor desempenho físico destes. Na terceira etapa da pesquisa, espera-se que haja uma melhora do desempenho físico, do metabolismo (devido a redução da amonemia), do estado cognitivo e da resposta cardíaca, tanto em temperatura ambiente quanto no calor, com o uso de algumas substâncias e/ou procedimentos.
- * Que esse estudo começará no terceiro trimestre (em julho) de 2012 e terminará no segundo trimestre (em junho) de 2016.
- * Que o estudo será feito da seguinte maneira: vinte e oito atletas de modalidades esportivas diferentes serão estudados em três etapas diferentes. A primeira etapa terá como objetivo traçar um perfil da dieta e do metabolismo e também realizar um plano de orientação nesse aspecto. A segunda etapa terá como objetivo realizar uma reavaliação nutricional e metabólica após seis meses da intervenção e comparar com o perfil traçado na primeira etapa. Todos os atletas participarão da primeira e

segunda etapas, mas apenas alguns atletas, através de sorteio, participarão da terceira etapa. Nas duas primeiras etapas, serão utilizados inquéritos alimentares e avaliações do estado de hidratação como avaliação nutricional, enquanto que análises sanguíneas (bioquímica e hematológica) servirão como avaliação metabólica. Na terceira etapa serão realizados experimentos para verificar seu efeito agudo no desempenho físico, no estado cognitivo, nas alterações cardíacas e no metabolismo. Para tal, alguns atletas serão divididos em dois grupos: experimental (atletas que receberão uma substância ou sofrerá ação de um procedimento fisiológico) e controle (atletas que não vão ingerir substâncias ou sofrer ação de procedimentos fisiológicos). Os grupos serão constituídos a partir de aspectos do modelo experimental adotado, como: simulação de exercício físico específico da modalidade esportiva; esquemas alimentares; uso de substâncias; e condições de temperatura diferenciadas. Sangue será obtido no experimento. Frequência Cardíaca (FC), Percepção Subjetiva de Esforço (PSE), testes cognitivos (coordenação motora e tempo de reação) e tempo de exaustão, também serão obtidos.

* Que eu participarei das seguintes etapas: primeira e segunda. Após sorteio, existe a possibilidade de participar da terceira etapa.

* Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: talvez, algum desconforto possa ocorrer nos atletas na execução da coleta sanguínea (que será feita na veia, com material esterilizado e descartável) e na realização de exercícios físicos no calor. Caso isto ocorra, o voluntário será assistido por profissional competente e os pesquisadores no mesmo local, podendo desistir do estudo. A coleta de sangue poderá resultar em um pequeno hematoma no local (mancha roxa e dolorosa), contudo todos os cuidados serão tomados para que isto não ocorra.

* Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: este estudo não apresenta riscos, de nenhuma natureza, para os envolvidos (voluntários e pesquisadores), seja como consequência imediata ou tardia da participação na pesquisa.

* Que deverei contar com a seguinte assistência: de todos os pesquisadores, sendo responsável(is) por ela: Professor Eduardo Seixas Prado, residente na Rua José Soares Sobrinho, 136, Jatiúca, Maceió, AL, tel: 9105-5301.

* Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: receber melhor orientação nutricional para melhor desempenho físico.

* Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: haverá acompanhamento integral de alunos, pesquisadores e colaboradores capacitados no momento do experimento.

* Que, sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

* Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.

* Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

* Que eu não terei despesas com a minha participação nesse estudo.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do(a) participante-voluntário(a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto)
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Endereço dos(as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
 Endereço: CAMPUS A.C. SIMÕES; AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N
 Bloco: /Nº: /Complemento: DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
 Bairro: /CEP/Cidade: TABULEIRO DO MARTINS; 57.072-970; MACEIÓ.
 Telefones p/contato: 9105-5301

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:
Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:
Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
Telefone: 3214-1041

Maceió,

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 15/08/2012

Senhor(a) Pesquisador(a), Eduardo Seixas Prado, Emiliano de Oliveira Barreto, Divanise Suruagy Correia, Sandra Mary Lima Vasconcelos, Bruna Merten Padilha, Catherine Cavalcanti Padilha, Jamille Nunes de Souza Ferro, Rafael Vital dos Santos, Cibelle Rodrigues Calheiros, Rafaela Carvalho Pereira Lima, Saulo Rodrigues Alves e Silva Camerino.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 14/08/2012 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 017640/2011-61 sob o título, **AVALIAÇÃO E INTERVENÇÃO NUTRICIONAL-METABÓLICA EM ATLETAS ALAGOANOS DE DIFERENTES MODALIDADES ESPORTIVAS**, vem por meio deste instrumento comunicar a renovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o (a) pesquisador (a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Resolução CNS 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra-referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais

Válido até: Agosto de 2016

Prof.ª Denise Juliana Francisco
Coordenadora do Comitê de
Ética em Pesquisa -UFAL

ANEXO B - Artigo publicado na Revista da Educação Física/UEM "Estado de hidratação e desempenho cognitivo-motor durante uma prova de fast-triathlon no calor".

DOI: 10.4025/reveducfis.v25i4.22459

ESTADO DE HIDRATAÇÃO E DESEMPENHO COGNITIVO-MOTOR DURANTE UMA PROVA DE FAST TRIATHLON NO CALOR

HYDRATION STATUS AND COGNITIVE-MOTOR PERFORMANCE DURING A FAST TRIATHLON RACE IN THE HEAT

Sheilla da Silva Barroso
Rosemeire Dantas de Almeida
Wendell da Silva Gonzaga
Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino
Rafaela Carvalho Pereira Lima
Eduardo Seixas Prado

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o estado de hidratação e desempenho cognitivo-motor em atletas durante uma prova de fast triathlon no calor. Doze triatletas ($34 \pm 2,7$ anos) participaram do trabalho. O estado de hidratação foi mensurado pela perda de massa corporal (MC), coloração e gravidade específica (GE) urinárias. O desempenho cognitivo-motor foi verificado pela coordenação motora (CM) e tempo de reação simples (TRS). Após a prova houve uma diminuição significativa da MC (1,8 %; $P < 0,001$). Um aumento significativo entre pré e pós-competição foi observado para o índice de coloração da urina ($P < 0,001$) e GE ($P < 0,001$), respectivamente. O TRS foi melhor após a prova. Porém, demonstraram dismetria, prejudicando sua CM. Conclui-se que níveis de desidratação foram observados entre os atletas após a prova. Alterações opostas foram encontradas quanto ao desempenho cognitivo-motor. Atletas demonstraram uma maior descoordenação motora, mas melhoraram seu tempo de reação.

Palavras-chave: Desempenho atlético. Desidratação. Tempo de reação.

INTRODUÇÃO

O triathlon é um esporte formado pela combinação de três tipos de exercícios (natação, ciclismo e corrida), que pode ser realizado sob vários formatos, dependendo das distâncias adotadas (RAY; FLOWLER, 2004). Sabe-se que a manutenção do estado de hidratação adequado é fundamental para o bom desempenho atlético em várias modalidades esportivas (COELHO et al., 2012). Isso deve ser levado em consideração no triathlon, especialmente, porque a desidratação é a causa mais comum de tratamento médico em provas dessa modalidade (MAUGHAN; SHIRREFFS, 2012; RAY; FLOWLER, 2004). Assim, o monitoramento do

estado de hidratação é importante e pode ser realizado através de marcadores simples como alteração da massa corporal (MC) e amostras urinárias, que constituem ferramentas de fácil aplicação, baixo custo e de resultados confiáveis (PRADO et al., 2009; SHIRREFFS, 2003; ARMSTRONG et al., 1994).

O bom desempenho no esporte também depende da função cognitiva e motora (no presente estudo denominado como cognitivo-motor) para a tomada de decisão e boa execução de habilidades complexas (CHANG et al., 2012; SULLIVAN et al., 2011; LIEBERMAN, 2007). Frequentemente, a função cognitivo-motora é avaliada em situações de perturbações no funcionamento cerebral (concussão), que podem

* Mestre. Fundação Estadual de Saúde, Aracaju-SE, Brasil.

** Doutora. Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, Brasil.

*** Mestre. Departamento de Educação Física da Faculdade de Sergipe, Aracaju-SE, Brasil.

**** Mestrando. Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, Brasil.

***** Mestranda. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Maceió-AL, Brasil.

***** Doutor. do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, Brasil.

ser resultantes de vários sinais e/ou sintomas não específicos, tal como em comportamentos físicos anormais (SCAT3, 2013).

Descuidos no consumo de líquidos, por atletas que se exercitam em locais quentes e úmidos, comuns em provas de triathlon, podem provocar danos fisiológicos e neuropsicológicos, desfavorecendo o desempenho cognitivo-motor (GRANDJEAN; GRANDJEAN, 2007; LIEBERMAN, 2007; SZINNAI et al., 2005). Decréscimos no desempenho cognitivo-motor podem ocorrer quando 2% ou mais da MC é perdida devido à restrição de líquidos, calor e/ou esforço físico (GRANDJEAN; GRANDJEAN, 2007). Embora tenha sido sugerido que uma redução de 2 % a 3 % da MC reduz o desempenho cognitivo-motor, parece que a perda de apenas 1 % da MC já seria o suficiente para tal efeito (LIEBERMAN, 2007). Dependendo do aspecto a ser mensurado, o prejuízo físico e cognitivo-motor podem ser aparentes depois de uma perda de MC entre 1% a 10% (MAUGHAN; SHIRREFFS, 2010). Porém, os efeitos do estado de hidratação na função cognitiva-motora ainda permanecem obscuros e carecem de maior investigação (BANDELOW et al., 2010).

Parece que, independentemente do estado de desidratação, o desempenho cognitivo-motor pode ser afetado em exercícios físicos realizados em ambientes quentes e, nessas condições, sinais e sintomas incluem prejuízos, entre outros aspectos, na coordenação motora (CM) e tempo de reação simples (TRS) (BINKLEY et al., 2002; MAUGHAN, 2003). Assim, testes para mensurar a CM e o TRS, tornam-se ferramentas úteis quando a função cognitiva-motora pode ser prejudicada a partir de situações de exercício no calor e/ou na desidratação (LINDINGER, 1999; NYBO, 2010; BENEFER et al., 2013; McCRORY et al., 2013).

A investigação realizada em ambientes naturais (campo) fornece um cenário real para estudar a relação entre exercício no calor e estado de hidratação (STACHENFELD, 2014). Embora existam pesquisas realizadas com frequência em várias modalidades esportivas em ambientes de laboratório, poucos estudos de campo são desenvolvidos, na área da hidratação e cognição-motora. Nossa hipótese é de que o estado de desidratação, induzido pela prova

de fast triathlon em ambiente quente, possa prejudicar funções cognitivas-motoras (CM e TRS) dos atletas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o nível de hidratação e o desempenho cognitivo-motor de atletas durante uma prova de fast triathlon no calor.

MÉTODOS

Após divulgação durante o congresso técnico de uma prova de fast triathlon, quinze triatletas, do gênero masculino, se voluntariaram para participar do estudo. Destes, doze atletas ($34 \pm 2,7$ anos) compuseram a amostra por atenderem aos seguintes critérios de inclusão: ter idade entre 18 e 45 anos, média de três anos de prática na modalidade, com participação frequente em competições estaduais e/ou nacionais, e não apresentar qualquer tipo de doença ou uso de medicamentos que pudessem interferir no trabalho. Atletas que não se enquadraram nesses critérios foram excluídos do estudo. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo atendeu às normas para a realização de pesquisa em seres humanos, resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas sob o número 017640/2011-61.

Procedimentos de coleta de dados

Os atletas foram submetidos a testes para avaliar o estado de hidratação e desempenho cognitivo-motor, antes e depois de uma prova de fast triathlon que consistiu de três baterias de: 250 m de natação, 4 km de ciclismo e 1,5 km de corrida. Para determinação do estado de hidratação, os seguintes marcadores foram coletados: MC e amostras de urina. Já a avaliação cognitivo-motora foi determinada através de testes de CM e TRS. Todos foram instruídos sobre os procedimentos de coleta de dados e orientados a manter sua rotina de dieta e hidratação, antes e durante o experimento.

Mensuração dos marcadores do estado de hidratação

A mensuração da MC foi realizada pelos próprios pesquisadores, antes (pré) e após (pós) a prova de triathlon. Para tal, foi utilizada uma balança/estadiômetro (Welmy[®], Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo) com precisão de 100 g e 0,5 cm, respectivamente. As amostras urinárias foram coletadas pelos atletas, imediatamente pré e pós competição, em recipientes transparentes para determinação do índice de coloração e gravidade específica (GE) urinárias. O índice de coloração da urina foi determinada pela escala de Armstrong et al. (1994). Essa escala adota oito cores diferentes de urina, variando entre amarelo claro (cor nível 1) e verde acastanhado (cor nível 8), para definição do índice de coloração urinária. A GE foi mensurada através de fitas reagentes para uroanálises (Biocolor/Bioeasy[®], Belo Horizonte, Minas Gerais) e de um refratômetro manual (Biobrix[®], São Paulo, São Paulo), obtendo-se uma média geral a partir dessas duas formas de mensurações. De posse dos dados, foram determinados os valores absolutos e as diferenças percentuais (Δ %), pré e pós competição, da MC (Δ % MC), índice de coloração urinária (Δ % Índice de coloração urinária) e GE (Δ % GE).

Os resultados obtidos dos marcadores supracitados, também foram utilizados para classificar o estado de hidratação (eu-hidratado, desidratação mínima, significativa ou severa), perante a tabela proposta por Casa et al. (2000). Tal classificação foi definida quando pelo menos dois dos três marcadores acusassem o mesmo *status*, assim usado como critério de desempate. Além disso, foi registrado o tempo inicial e final da competição em horas, o volume e o tipo de líquidos ingeridos, individualmente pelos atletas, para calcular a taxa de sudorese, também conforme Casa et al. (2000), onde: taxa de sudorese = MC pré competição – MC pós competição + ingestão total de líquidos ingeridos na competição – volume total de urina pós competição/tempo de competição em horas.

Determinação do desempenho cognitivo-motor: CM e TRS

A CM foi avaliada pelo teste dedo-nariz adaptado de Porto (2010) e Sanvito (1996). O teste foi iniciado, imediatamente, após a conclusão da prova de fast triathlon, e antes da coleta dos marcadores do estado de hidratação. Assim, de frente e olhando para o avaliador, com braço dominante estendido lateralmente e formando um ângulo de 90° com o corpo, o atleta em pé, usando seu dedo indicador estendido, no comando "vai", tocava a ponta do seu nariz e retornava à posição inicial. Eles foram instruídos a repetir este procedimento com a maior rapidez e precisão possível, adotando-se quatro repetições: uma de olhos abertos e três com os olhos fechados. Todos os procedimentos do teste foram filmados e analisados posteriormente por cinco avaliadores. A determinação da capacidade de CM foi obtida a partir da seguinte classificação estabelecida por Porto (2010): sem dismetria (o dedo tocava precisamente a ponta do nariz) e com dismetria (o dedo não tocava precisamente a ponta do nariz). Essa classificação foi determinada quando pelo menos três dos cinco avaliadores acusassem o mesmo *status*, assim usado como critério de desempate (sem dismetria ou com dismetria).

Já o TRS foi obtido, imediatamente após o teste do dedo-nariz, através do teste da régua como descrito por Benefer et al. (2013). O indivíduo em pé com o braço dominante flexionado, formava um ângulo de 90° junto ao corpo lateralmente. Sua mão espalmada na posição neutra, também formava o mesmo ângulo, perpendicularmente, ao polegar. A marca zero da régua (medindo 60 cm com precisão em mm) foi posicionada no plano sagital e, após o comando "vai", em um intervalo de tempo, entre dois e cinco segundos, para minimizar a habilidade de antecipação do atleta, a régua era liberada e todos os participantes tinham que segurá-la no menor tempo possível. Em uma ação antecipada do atleta, antes da régua ser liberada, o avaliador reiniciava o teste. Se o atleta deixasse a régua cair, essa tentativa foi contabilizada e não foi usada para calcular o TRS. Desta forma, foi medida a distância (em

cm) que a régua percorreu desde o momento em que o avaliador a soltou até o momento em que o participante conseguiu segurá-la, no nível do plano horizontal que passa pela parte superior dos dedos polegar e indicador. Cada atleta executou duas vezes o teste como prática inicial e, imediatamente após, realizou o teste mais oito vezes para que fosse registrado seu desempenho através da média aritmética obtida. Além disso, também foi obtida a diferença percentual, pré e pós competição, da TRS (Δ % TRS).

CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

Dados referentes às condições climáticas também foram obtidas através de um monitor de estresse ao calor (*Instrutemp*[®], São Paulo, São Paulo). Dados foram registrados no início, meio e fim da competição, para cálculo do índice de bulbo úmido temperatura de globo, através da temperatura do ar, temperatura global e a umidade relativa. Porém, uma média geral dos registros foi usada para determinação do índice de estresse pelo calor.

Análise estatística

Os dados referentes ao estado de hidratação e o TRS foram expressos como média e erro padrão (EP). Para estes dados, foi aplicado o teste *Shapiro-Wilk*, objetivando determinar o grau de homogeneidade da amostra. Quando a distribuição apresentou normalidade, foi utilizado um teste *t* pareado para verificação das diferenças entre médias da MC, índice da coloração e GE urinárias e TRS pré e pós-competição. Nos casos de distribuição anormal, foi utilizado o teste não paramétrico de *Wilcoxon*. A análise da capacidade de CM foi expressa em termos percentuais (%) por nível de classificação. Além disso, foi aplicado o teste de correlação de *Pearson* (*r*) para verificar o grau de associação das alterações percentuais, pré e pós competição, entre: Δ % TRS e Δ % MC;

Δ % TRS e Δ % Índice de coloração urinária; Δ % TRS e Δ % GE. Em qualquer condição de teste estatístico o nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

As características da amostra quanto a MC, altura e as condições climáticas (Índice de bulbo úmido temperatura de globo - IBUTG, temperatura do ar - TA, temperatura global - TG e a umidade relativa - UR), durante a prova de fast triathlon, são apresentadas na Tabela 1. Os dados climáticos demonstraram que a competição foi realizada em um ambiente considerado como quente.

Tabela 1 - Caracterização da amostra pela MC, estatura e condições climáticas durante a competição.

	Mínimo	Máximo	Média \pm EP
MC (kg)	62,2	93,1	76,2 \pm 3,2
Altura (m)	1,68	1,86	1,76 \pm 0,02
IBUTG (°C)	27,1	28,9	28,2 \pm 0,5
TA (°C)	29,9	31,2	30,3 \pm 0,4
TG (°C)	31,7	48,2	40,7 \pm 4,8
UR (%)	60	61,9	61,1 \pm 0,6

MC - Massa corporal; IBUTG - Índice de bulbo úmido temperatura de globo; TA - Temperatura do ar; TG - Temperatura global; UR - umidade relativa.

Foram encontradas alterações em todos os marcadores do estado de hidratação. Houve redução significativa da MC dos atletas de 76,2 \pm 3,2 kg para 74,9 \pm 3,3 kg após a competição ($P < 0,001$), gerando diferença absoluta da MC de - 1,3 \pm 0,2 kg e um Δ % da MC de - 1,8 \pm 0,3 (Figura 1).

O índice de coloração da urina aumentou significativamente ($P < 0,001$) entre o momento pré (3,3 \pm 0,5) e pós competição (6,6 \pm 0,3) (Figura 2A). O mesmo ocorreu com os valores da GE que também aumentaram de maneira significativa após a prova (1005,0 \pm 2,5 versus 1024,2 \pm 2,4; $P < 0,001$) (Figura 2B).

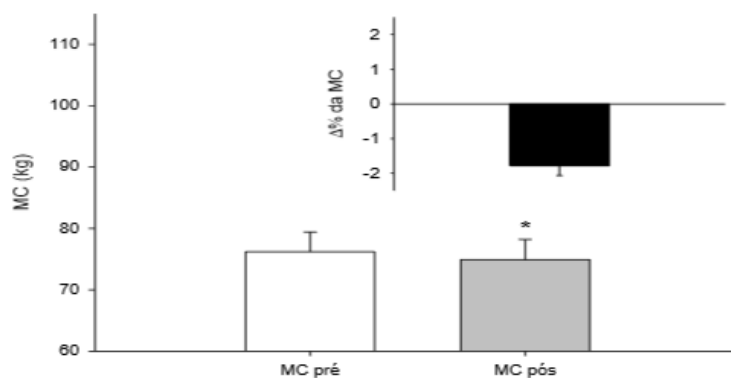


Figura 1 - Variação da MC e $\Delta\%$ da MC durante a prova de fast triathlon. * Diferença significativa da MC entre os momentos pré e pós competição.

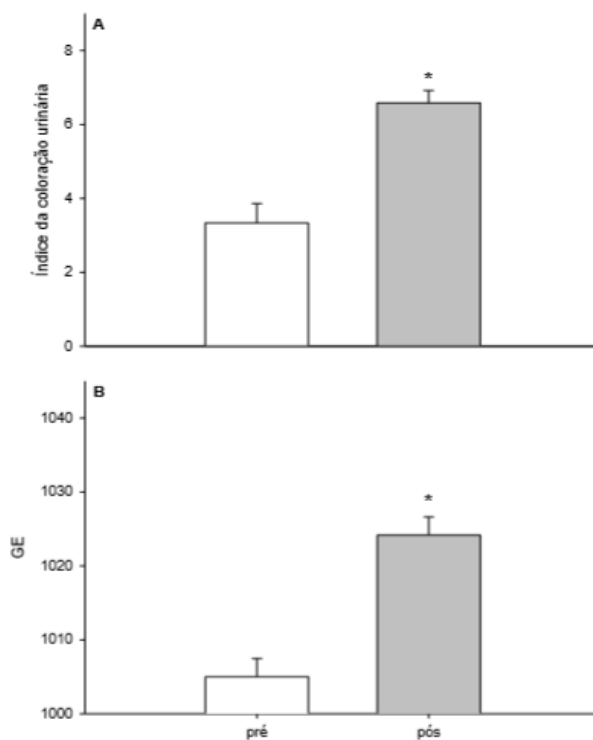


Figura 2 - (A) índice da coloração da urina e (B) gravidade específica (GE) pré e pós competição. * Diferença significativa ($P < 0,05$).

As mudanças observadas nos marcadores do estado de hidratação quanto a MC, índice de coloração e GE urinárias, demonstraram que os atletas estavam com um estado de desidratação classificado como significativo após a competição, induzido por uma taxa de sudorese de ~ 1,2 L/h.

Quanto ao desempenho cognitivo-motor, a capacidade de CM dos atletas, sem dismetria, foi reduzida de 100 % do momento pré para ~ 66 % pós competição (Figura 3A). Por outro lado, o TRS melhorou

significativamente após a competição. A distância obtida pelo teste da régua, antes da prova, foi de $26,1 \pm 1,9$ cm e reduziu para $21,5 \pm 1,5$ cm ao final ($P = 0,016$) (Figura 3B).

A Figura 4 demonstra as correlações das diferenças percentuais entre o TRS (Δ % TRS) e os marcadores do estado de hidratação, pré e pós competição (Δ % MC; Δ % Índice de coloração urinária e Δ % GE). Foi verificada uma correlação significativa entre Δ % TRS e Δ % GE (Figura 4C).

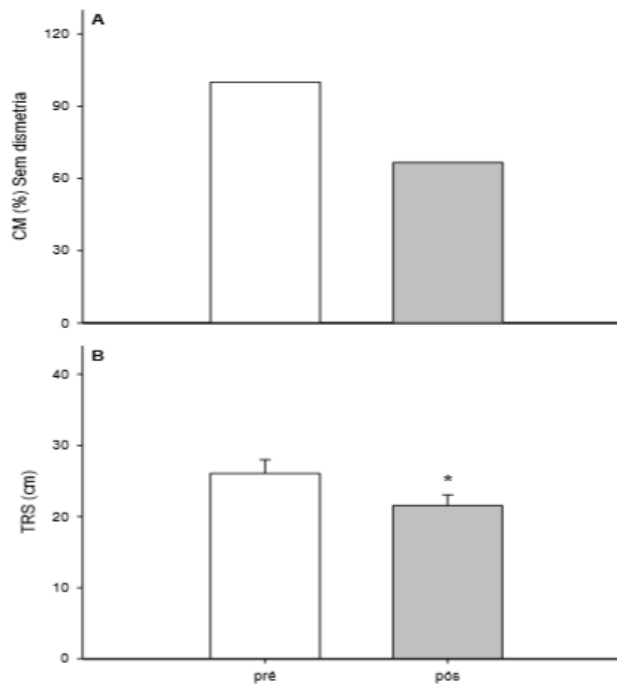


Figura 3 - (A) Coordenação motora (CM) e (B) Tempo de reação simples (TRS) pré e pós competição. *Diferença significativa ($P < 0,05$).

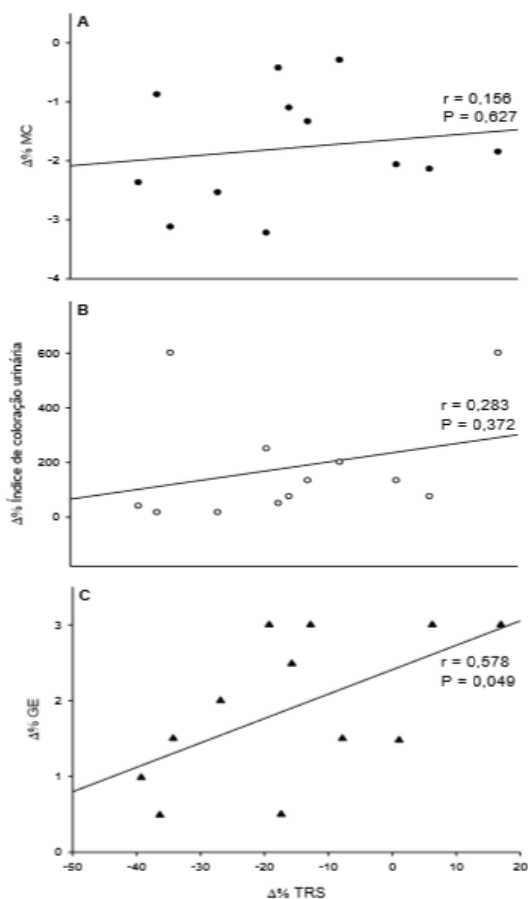


Figura 4 - Correlação entre as diferenças percentuais do TRS e os marcadores do estado de hidratação (A - ●: Δ % TRS e Δ % MC; B - ○: Δ % TRS e Δ % Índice de coloração urinária; C - ▲: Δ % TRS e Δ % GE).

DISCUSSÃO

A proposta deste estudo foi avaliar o estado de hidratação e o desempenho cognitivo-motor de atletas durante uma prova de fast triathlon. Para nossa surpresa, o principal achado desse estudo foi verificar um melhor

TRS após a competição, especialmente, com os atletas desidratados. Sabe-se que, dependendo do nível de desidratação ocasionada pelo treinamento e/ou competição esportiva em ambientes quentes, esta pode prejudicar não somente o desempenho físico no exercício, mas também, funções cognitivas-motoras (BERGERON et al., 2012).

Ficou evidente no presente estudo que os atletas estavam desidratados ao final da prova quando analisados pela variação da MC, cor da urina e GE. A desidratação pode ser avaliada a partir da variação da MC e, postula-se que a perda de MC entre 1 % e 2 % influencia negativamente o desempenho (PRADO et al., 2009; CASA et al., 2000). O presente estudo verificou uma perda de 1,8 % da MC nos triatletas. Assim como a MC, a cor da urina e a GE, também, constituem formas de avaliação do nível de hidratação (SHIRREFFS, 2003; ARMSTRONG et al., 1994). Casa et al. (2010), investigando a influência da hidratação no desempenho de dezessete corredores de longa distância no calor, verificaram alterações na cor da urina (índice da coloração urinária de ~ 6 após corrida), em participantes hidratados, semelhantes ao do presente trabalho. O mesmo ocorreu com os valores da GE, que apresentou um valor de ~ 1025 após a competição, corroborando com valores obtidos em outros estudos (ROSE; PETERS-FUTURE, 2010; YEARGIN et al., 2006). GE urinária entre 1021 e 1030 é classificada como desidratação significativa (CASA et al., 2000).

A desidratação observada nos atletas foi exacerbada pelas condições climáticas registradas e quantidade de suor produzido durante a competição. Um IBUTG de ~ 28 °C representou um nível de risco elevado por estresse ao calor (BERGERON et al., 2012). Inclusive, neste caso, o evento poderia ser adiado e/ou remarcado (BINKLEY et al., 2002). Também foi observada uma taxa de sudorese de ~ 1,2 L/h após a prova. De acordo com Sawka e Montain (2000), atletas que realizam exercícios de alta intensidade no calor, apresentam, comumente, taxas de sudorese entre 1,0 L/h a 2,5 L/h.

Em relação ao desempenho cognitivo-motor, os atletas participantes desse estudo, apresentaram prejuízos quanto a CM, mas por outro lado, demonstraram uma melhora no TRS. Estudos sugerem que a desidratação, com perda de ~ 2 % ou mais da MC, é capaz de prejudicar a função cognitivo-motora (LIEBERMAN, 2007; BENTON, 2011; GANIO et al., 2010; CIAN et al., 2001).

Como já descrito, o presente estudo verificou uma redução da MC de ~ 1,8 %. Talvez isso explique a dificuldade na CM de ~ 34 % dos atletas após a competição. Neste aspecto, nossos resultados são semelhantes ao de Smith, Newell e Baker (2012) em que uma desidratação leve prejudicou o desempenho cognitivo-motor de jogadores de golfe. Ganio et al. (2010) comparando o desempenho cognitivo-motor entre indivíduos eu-hidratados e desidratados (1,6 % de perda de MC), tanto em repouso quanto durante o exercício, observaram prejuízos em funções cognitivas-motoras desencadeadas pela desidratação, tal como a vigilância visual e tempo de resposta da memória operacional visual.

Porém, os efeitos negativos da desidratação sobre o desempenho cognitivo-motor parecem ser contraditórios entre diversos aspectos cognitivos-motores. Bandelow et al. (2010) não demonstraram efeitos negativos da desidratação leve a moderada nas diferentes funções cognitivas-motoras, avaliadas em atletas de futebol, durante atividade no calor. Por outro lado, um estudo com militares induzidos a desidratação, após 53 horas de treinamento intenso no calor, observou prejuízos em vários parâmetros cognitivos-motores: vigilância, tempo de reação, atenção, memória e raciocínio. No entanto, o mesmo estudo destaca que outros fatores estressores, além da desidratação, como o sono e má nutrição, podem ter influenciado no desempenho cognitivo-motor avaliado (LIEBERMAN et al., 2005). Armstrong et al. (2012) avaliando voluntárias desidratadas, com perda de 1,4 % da MC, em situação de repouso ou durante exercício, notaram que o desempenho na maioria dos aspectos cognitivos-motores avaliados (vigilância psicomotora, tempo de reação e raciocínio) não foi afetada.

Uma recente revisão concluiu que não há comprovação de que a desidratação, por si só, tenha um efeito prejudicial sobre a função cognitivo-motora (BENTON, 2011). Grego et al. (2005) não encontraram quaisquer efeitos do estado de hidratação sobre o desempenho cognitivo-motor, apesar de observarem um efeito benéfico do exercício aeróbico sobre o

processamento cognitivo-motor, na primeira hora de atividade.

Assim, talvez um dos aspectos cognitivos-motores que não são prejudicados, na realização de exercício físico associada à desidratação, seja o tempo de reação (SZINNAI et al., 2005). Serwah e Marino (2006) observaram que, em até 90 min de exercício em condições quentes e úmidas, o tempo de reação não foi comprometido por diferentes níveis de desidratação (perda de ~ 1,7 Δ % da MC). D'anci et al. (2009), estudando o desempenho cognitivo em atletas de ambos os sexos, após exercício e desidratação (perda de MC ~ 1,8 Δ %), não observaram alterações no tempo de reação. Ely et al. (2013) avaliando testes cognitivos em indivíduos submetidos a desidratação (perda de MC ~ 4 Δ %), em diferentes temperaturas ambientais (10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C), também não observaram nenhum efeito no tempo de reação, independentemente do ambiente ou estado de hidratação. Esses estudos não corroboram com o presente trabalho, onde atletas melhoraram o TRS após a competição de fast triathlon, com duração de ~ 108 min, em estado de desidratação. E isto foi reforçado, parcialmente, pela sua correlação com as alterações observadas na GE. No entanto, também é possível que o número de execuções adotado para o teste de TRS neste estudo, tenha sido insuficiente para minimizar o efeito de aprendizagem, favorecendo assim um melhor desempenho dos atletas no teste.

Contudo, Benefer et al. (2013), investigaram o consumo de água e o desempenho cognitivo após exercício em um grupo de corredores amadores e, apesar de não verificarem alterações no TRS (também realizado pelo teste da régua), observaram uma tendência de melhora deste teste após o exercício. Vale ressaltar que a realização de exercício físico, por si só, favorece um melhor tempo de reação (LIEBERMAN, 2007; JOYCE et al., 2013). Ozyemisci-Taskiran et al. (2008) investigando o tempo de reação por eletromiografia após uma única sessão de exercício aeróbico, com intensidade moderada

em indivíduos saudáveis não desidratados, concluíram que o exercício melhorou o tempo de reação da fração pré-motora, sinalizando um benefício da atividade nessa função cognitiva-motora. Talvez, essas melhoras observadas no tempo de reação induzidas pelo exercício, também possam ocorrer em situações climáticas e de estado de desidratação semelhantes ao presente estudo.

É importante notar que os resultados aqui apresentados são limitados e carecem de novas investigações. Outros estudos de campo devem ser realizados, oferecendo melhor treinamento prévio na realização do teste de TRS, minimizando a possibilidade de uma melhora no seu desempenho devido ao efeito da aprendizagem, e incluindo grupos experimentais adicionais (atletas hidratados, voluntários e com alterações de comportamento na ingestão de líquidos). Contribuições de outras variáveis (nível de treinamento, aclimatação e dieta) também devem ser consideradas. Assim, as interpretações e resultados aqui reportados não podem ser atribuídos, exclusivamente, a desidratação. Portanto, futuros estudos devem ser conduzidos para suprir tais lacunas.

Por outro lado, o ponto forte desse trabalho foi à interpretação dos dados baseados em informações obtidas durante uma prova de fast triathlon no calor (estudo de campo), onde o comportamento de hidratação e as condições climáticas foram reais, gerando respostas cognitivas-motoras mais próximas da realidade de um evento competitivo e não controladas em ambiente de laboratório.

CONCLUSÃO

Os triatletas apresentaram um estado de desidratação significativa. Este nível de desidratação, observado nos atletas, foi acompanhado por resultados opostos quanto as funções cognitivas-motoras avaliadas. Houve prejuízo na capacidade de CM, porém, o TRS foi melhorado.

HYDRATION STATUS AND COGNITIVE-MOTOR PERFORMANCE DURING A FAST TRIATHLON RACE IN THE HEAT

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the hydration status and cognitive-motor performance in athletes during a fast triathlon race. Twelve triathletes (34 ± 2.73 years) participated in the study. Hydration status was measured by body mass (BM) loss, urine color and urine specific gravity (SG). The cognitive-motor performance was determined by motor coordination (MC) and simple reaction time (SRT). There was a significant decrease of BM (1.8 %; $P < 0.001$). A significant increase from pre race to post race was observed in urine color ($P < 0.001$) and SG ($P < 0.001$), respectively. The SRT was faster after race. However, athletes demonstrated dysmetria, impairing MC. It was concluded that dehydration levels were observed among athletes after race. Adverse changes were found on the cognitive-motor performance. Athletes demonstrated greater motor incoordination, but improved the reaction time.

Keywords: Athletic performance. Dehydration. Reaction time.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, L. E.; MARESH, C. M.; CASTELLANI, J. W.; BERGERON, M. F.; KENEFICK, R. W.; LAGASSE, K. E.; RIEBE, D. Urinary indices of hydration status. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, London, v. 4, n. 3, p. 265-279, 1994.
- ARMSTRONG, L. E.; GANIO, M. S.; CASA, D. J.; LEE, E. C.; McDERMOTT, B. P.; KLAU, J. F.; JIMENEZ, L.; Le BELLEGO, L.; CHEVILLOTTE, E.; LIEBERMAN, H. R. Mild dehydration affects mood in healthy young women. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 142, n. 2, p. 382-388, 2012.
- BANDELOW, S.; MAUGHAN, R.; SHIRREFFS, S.; OZGÜNEN, K.; KURDAK, S.; ERSÖZ, G.; BINNET, M.; DVORAK, J. The effects of exercise, heat, cooling and rehydration strategies on cognitive function in football players. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, Malden, v. 20, n. 3, p. 148-160, 2010.
- BENEFER, M. D.; CORFE, B. M.; RUSSELL, J. M.; SHORT, R.; BARKER, M. E. Water intake and post-exercise cognitive performance: an observational study of long-distance walkers and runners. *European Journal of Clinical Nutrition*, London, v. 52, n. 2, p. 617-624, 2013.
- BENTON, D. Dehydration influences mood and cognition: a plausible hypothesis? *Nutrients*, Basel, v. 3, n. 5, p. 555-573, 2011.
- BERGERON, M. F.; BAHR, R.; BÄRTSCH, P.; BOURDON, L.; CALBET, J. A.; CARLSEN, K. H.; CASTAGNA, O.; GONZÁLEZ-ALONSO, J.; LUNDBY, C.; MAUGHAN, R. J.; MILLET, G.; MOUNTJOY, M.; RACINAIS, S.; RASMUSSEN, P.; SINGH, D. G.; SUBUDHI, A. W.; YOUNG, A. J.; SOLIGARD, T.; ENGBRETSSEN, L. International Olympic Committee consensus statement on thermoregulatory and altitude challenges for high-level athletes. *British Journal of Sports Medicine*, London, v. 46, n. 11, p. 770-779, 2012.
- BINKLEY, H. M.; BECKETT, J.; CASA, D. J.; KLEINER, D. M.; PLUMMER, P. E. National Athletic Trainers' Association Position Statement: Exertional Heat Illnesses. *Journal of Athletic Training*, Dallas, v. 37, n. 3, p. 329-343, 2002.
- CASA, D. J.; ARMSTRONG, L. E.; HILLMAN, S. K.; MONTAIN, S. J.; REIFF, R. V.; RICH, B. S.; ROBERTS, W. O.; STONE, J. A. National athletic trainers' association position statement: fluid replacement for athletes. *Journal of Athletic Training*, Dallas, v. 35, n. 2, p. 212-224, 2000.
- CASA, D. J.; STEARNS, R. L.; LOPEZ, R. M.; GANIO, M. S.; McDERMOTT, B. P.; WALKER YEARGIN, S.; YAMAMOTO, L. M.; MAZEROLLE, S. M.; ROTI, M. W.; ARMSTRONG, L. E.; MARESH, C. M. Influence of hydration on physiological function and performance during trail running in the heat. *Journal of Athletic Training*, Dallas, v. 45, n. 2, p. 147-156, 2010.
- CHANG, Y. K.; LABBAN, J. D.; GAPIN, J. I.; ETNIER, J. L. The effects of acute exercise on cognitive performance: a meta-analysis. *Brain Research*, Amsterdam, v. 9, n. 1453, p. 87-101, 2012.
- CIAN, C.; BARRAUD, P. A.; MELIN, B.; RAPHEL, C. Effects of fluid ingestion on cognitive function after heat stress or exercise-induced dehydration. *International Journal of Psychophysiology*, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 243-251, 2001.
- COELHO, D. B.; PEREIRA, E. R.; GOMES, E. C.; COELHO, L.; SOARES, D. D.; SILAMI-GARCIA, E. Evaluation of hydration status following soccer matches of different categories. *Revista Brasileira Cineantropometria e Desempenho Humano*, Florianópolis, v. 14, n. 3, p. 276-286, 2012.
- D'ANCI, K. E.; VIBHAKAR, A.; KANTER, J. H.; MAHONEY, C. R.; TAYLOR, H. A. Voluntary dehydration and cognitive performance in trained college athletes. *Perceptual and Motor Skills*, Missoula, v. 109, n. 1, p. 251-269, 2009.
- ELY, B. R.; SOLLANEK, K. J.; CHEUVRON, S. N.; LIEBERMAN, H. R.; KENEFICK, R. W. Hypohydration and acute thermal stress affect mood state but not cognition or dynamic postural balance. *European Journal of Applied Physiology*, Berlin, v. 113, n. 4, p. 1027-1034, 2013.
- GANIO, M. S.; ARMSTRONG, L. E.; CASA, D. J.; McDERMOTT, B. P.; LEE, E. C.; YAMAMOTO, L. M.; MARZANO, S.; LOPEZ, R. M.; JIMENEZ, L.; Le BELLEGO, L.; CHEVILLOTTE, E.; LIEBERMAN, H. R. Mild dehydration impairs cognitive performance and mood of men. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, v. 106, n. 10, p. 1535-1543, 2010.
- GRANDJEAN, A. C.; GRANDJEAN, N. R. Dehydration and cognitive performance. *Journal of the American*

- College of Nutrition, New York, v. 26, n. 5, p. 549-554, 2007.
- GREGO, F.; VALLIER, J. M.; COLLARDEAU, M.; ROUSSEU, C.; CREMIEUX, J.; BRISWALTER, J. Influence of exercise duration and hydration status on cognitive function during prolonged cycling exercise. *International Journal of Sports Medicine*, Stuttgart, v. 26, n. 1, p. 27-33, 2005.
- JOYCE, J.; SMYTH, P. J.; DONNELLY, A. E.; DAVRANCHE, K. The Simon task and aging: does acute moderate exercise influence cognitive control? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Indianapolis, v. 46, n. 3, p. 630-639, 2013.
- LIEBERMAN, H. R. Hydration and cognition: a critical review and recommendations for future research. *Journal of the American College of Nutrition*, New York, v. 26, supl. 5, p. S555-S561, 2007.
- LIEBERMAN, H. R.; BATHALON, G. P.; FALCO, C. M.; KRAMER, F. M.; MORGAN, C. A. III; NIRO, P. Severe decrements in cognition function and mood induced by sleep loss, heat, dehydration, and undernutrition during simulated combat. *Biological Psychiatry*, New York, v. 57, n. 4, p. 422-429, 2005.
- LINDINGER, M. I. Exercise in the heat: thermoregulatory limitations to performance in humans and horses. *Canadian Journal of Applied Physiology*, Ottawa, v. 24, n. 2, p. 152-163, 1999.
- MAUGHAN, R. J. Impact of mild dehydration on wellness and on exercise performance. *European Journal of Clinical Nutrition*, London, v. 57, n. 2, p. 19-23, 2003.
- MAUGHAN, R. J.; SHIRREFFS, S. M. Dehydration and rehydration in competitive sport. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, Malden, v. 20, n. 3, p. 40-47, 2010.
- MAUGHAN, R. J.; SHIRREFFS, S. M. Nutrition for sports performance: issues and opportunities. *Proceedings of the Nutrition Society*, London, v. 71, n. 1, p. 112-119, 2012.
- McCRORY, P.; MEEUWISSE, W. H.; AUBRY, M.; CANTU, B.; DVORÁK, J.; EHEMENDIA, R. J.; ENGBRETSSEN, L.; JOHNSTON, K.; KUTCHER, J. S.; RAFTERY, M.; SILLS, A.; BENSON, B. W.; DAVIS, G. A.; ELLENBOGEN, R. G.; GUSKIEWICZ, K.; HERRING, S. A.; IVERSON, G. L.; JORDAN, B. D.; KISSICK, J.; McCREA, M.; McINTOSH, A. S.; MADDOCKS, D.; MAKDISSI, M.; PURCELL, L.; PUTUKIAN, M.; SCHNEIDER, K.; TATOR, C. H.; TURNER, M. Consensus statement on concussion in sport: the 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012. *British Journal of Sports Medicine*, London, v. 47, n. 5, p. 250-258, 2013.
- NYBO, L. CNS fatigue provoked by prolonged exercise in the heat. *Frontiers in Bioscience (Elite ed)*, Irvine, v. 1, n. 2, p. 779-792, 2010.
- OZYEMISCI-TASKIRAN, O.; GUNENDI, Z.; BOLUKBASI, N.; BEYAZOVA, M. The effect of a single session submaximal aerobic exercise on premotor fraction of reaction time: an electromyographic study. *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)*, Bristol, v. 23, n. 2, p. 231-235, 2008.
- PORTO, C. C. *Examen clínico: bases para la práctica médica*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- PRADO, E. S.; BARROSO, S. S.; GÓIS, H. O.; REINERT, T. Estado de hidratação em nadadores após três diferentes formas de reposição hídrica na cidade de Aracaju-SE. *Fitness & Performance Journal*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p. 218-225, 2009.
- RAY, T. R.; FOWLER, R. Current issues in sports nutrition in athletes. *Southern Medical Journal*, Birmingham, v. 97, n. 9, p. 863-866, 2004.
- ROSE, S.; PETERS-FUTRE, E. M. Ad libitum adjustments to fluid intake during cool environmental conditions maintain hydration status during a 3-day mountain bike race. *British Journal of Sports Medicine*, London, v. 44, n. 6, p. 430-436, 2010.
- SANVITO, W. L. *Propedêutica neurológica básica*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- SAWKA, M. N.; MONTAIN, S. J. Fluid and electrolyte supplementation for exercise heat stress. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 72, n. 2, p. 564-572, 2000.
- SCAT3. *British Journal of Sports Medicine*, London, v. 47, n. 5, p. 259-262, 2013.
- SERWAH, N.; MARINO, F. E. The combined effects of hydration and exercise heat stress on choice reaction time. *Journal of Science and Medicine in Sports*, Belconnen, v. 9, n. 1-2, p. 157-164, 2006.
- SHIRREFFS, S. M. Markers of hydration status. *European Journal of Clinical Nutrition*, London, v. 57, n. 2, p. 6-9, 2003.
- SMITH, M. F.; NEWELL, A. J.; BAKER, M. R. Effect of acute mild dehydration on cognitive-motor performance in golf. *Journal of Strength and Conditioning Research*, Champaign, v. 26, n. 11, p. 3075-3080, 2012.
- STACHENFELD, N. S. The interrelationship of research in the laboratory and the field to assess hydration status and determine mechanisms involved in water regulation during physical activity. *Sports Medicine*, Auckland, v. 44, supl. 1, p. S97-S104, 2014.
- SULLIVAN, S. J.; SCHNEIDERS, A. G.; HANDCOCK, P.; GRAY, A.; McCRORY, P. R. Changes in the timed finger-to-nose task performance following exercise of different intensities. *British Journal of Sports Medicine*, London, v. 45, n. 1, p. 46-48, 2011.
- SZINNAI, G.; SCHACHINGER, H.; ARNAUD, M. J.; LINDER, L.; KELLER, U. Effect of water deprivation on cognitive-motor performance in healthy men and women. *American Journal Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, Bethesda, v. 289, n. 1, p. R275-R280, 2005.
- YEARGIN, S. W.; CASA, D. J.; ARMSTRONG, L. E.; WATSON, G.; JUDELSON, D. A.; PSATHAS, E.;

650

Barroso et al.

SPARROW, S. L. Heat Acclimatization and hydration status of american football players during initial summer workouts. *Journal of Strength and Conditioning Research*, Champaign, v. 20, n. 3, p. 463-470, 2006.

Recebido em 16/07/2014
Revisado em 04/09/2014
Aceito em 15/10/2014

Endereço para correspondência: Eduardo Seixas Prado. Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Departamento de Educação Física –Bacharelado; Campus A.C. Simões; Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió-AL, CEP: 57.072-970. E-mail: espradoo@ig.com.br

ANEXO C - Comprovante de submissão do artigo Artigo submetido na Revista Food & Function "Keto analogues and amino acid supplementation and its effects on ammonemia and performance under thermoneutral conditions".

Food & Function



**Food &
Function**

**KETO ANALOGUES AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION
AND ITS EFFECTS ON AMMONEMIA AND PERFORMANCE
UNDER THERMONEUTRAL CONDITIONS**

Journal:	<i>Food & Function</i>
Manuscript ID:	FO-ART-09-2015-001054
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	02-Sep-2015
Complete List of Authors:	<p>Camerino, Saulo; Federal University of Alagoas, Graduate Program in Nutrition; Federal University of Alagoas, Exercise and Metabolism Research Group</p> <p>Lima, Rafaela; Federal University of Alagoas, Graduate Program in Health Sciences; Federal University of Alagoas, Exercise and Metabolism Research Group</p> <p>França, Thássia; Federal University of Alagoas, Graduate Program in Nutrition; Federal University of Alagoas, Exercise and Metabolism Research Group</p> <p>Herculano, Edla; Federal University of Alagoas, Institute of Chemistry and Biotechnology; Federal University of Alagoas, Exercise and Metabolism Research Group</p> <p>Rodrigues, Daniela; Health Hospital Foundation, Gouveia, Marcos; Faculty of Sergipe, ; Federal University of Alagoas, Exercise and Metabolism Research Group</p> <p>Cameron, Luiz; Federal University of State of Rio de Janeiro, Laboratory of Protein Biochemistry; Brazil Olympic Committee, Department of Biochemistry and Sportomics; Olympic Laboratory</p> <p>Prado, Eduardo; Federal University of Alagoas, Graduate Program in Nutrition; Federal University of Alagoas, Graduate Program in Health Sciences; Federal University of Alagoas, Exercise and Metabolism Research Group</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO C - Comprovante de submissão do artigo Artigo submetido na Revista Andaluza de Medicina del Deporte " Efeito de diferentes estados de hidratação sobre o desempenho físico e cognitivo-motor de atletas submetidos a exercício em ambiente de baixo estresse ao calor"

Elsevier Editorial System(tm) for Revista
Andaluza de Medicina del Deporte
Manuscript Draft

Manuscript Number: RAMD-D-15-00051R2

Title: EFECTO DE DISTINTOS ESTADOS DE HIDRATACIÓN ANTE EL RENDIMIENTO FÍSICO Y COGNITIVO-MOTOR DE ATLETAS SOMETIDOS A EJERCICIO EN AMBIENTE DE BAJO ESTRÉS TÉRMICO EFFECT OF DIFFERENTS HYDRATION STATUS ON PHYSICAL AND COGNITIVE-MOTOR PERFORMANCE OF ATHLETES SUBMITTED TO EXERCISE UNDER LOW HEAT STRESS ENVIRONMENT

Article Type: Original

Keywords: Rendimiento Atlético; Deshidratación; Cognición; Fatiga.
Desempenho atlético; Desidratação; Cognição; Fadiga.
Athletic performance; Dehydration; Cognition; Fatigue.

Corresponding Author: Dr. Eduardo Prado, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Alagoas

First Author: Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino, M.Sc.

Order of Authors: Saulo Rodrigo Alves e Silva Camerino, M.Sc.; Estélio Henrique M Dantas, Ph. D.; Rafaela C Pereira Lima, M. Sc.; Thássia C Lima França; Natally M de Oliveira; Eduardo S Prado, Ph. D.

Abstract: Objetivo: Verificar el efecto de diferentes estados de hidratación sobre el rendimiento físico y cognitivo-motor de atletas sometidos a ejercicios en ambientes de bajo estrés térmico.
Métodos: Dieciséis atletas, divididos en dos grupos de ocho atletas (G2%: 34.1 ± 2.3 años; y G3%: 32.5 ± 2.2 años), realizaron 2 h de ciclismo y un teste incremental máximo, acompañado de extracciones sanguíneas y cálculo del índice de estrés térmico WBGT (del inglés: Wet Bulb Globe Temperature Index). Antes y después del protocolo, los grupos fueron sometidos a una evaluación del estado de hidratación, mediante el cálculo de la pérdida porcentual de masa corporal ($\Delta\%$ MC), coloración y gravedad específica (GE) urinarias; además de evaluaciones de los rendimientos físico (por el tiempo hasta el agotamiento) y cognitivo-motor (por los testes de memoria inmediata, índice-nariz y tiempo de reacción simples).
Resultados: El WBGT máximo registrado fue de ~ 20 °C. Hubo una diferencia significativa entre el $\Delta\%$ MC del G3% (- 3.29 ± 0.23 %) y G2% (-1.87 ± 0.12 %) (P<0,001), y un aumento en la GE en ambos grupos después del ciclismo. No hubo diferencia significativa en la coloración urinaria entre los grupos. En estas condiciones no fueron observadas diferencias significativas en el parámetros sanguíneos, tiempo hasta el agotamiento y en los testes cognitivo-motores entre los grupos.
Conclusión: Se sugiere que una deshidratación con reducción de hasta ~ 3 % de masa corporal, no afecta negativamente el rendimiento físico y cognitivo-motor.

Objective: To verify the effect of differents hydration status on physical and cognitive-motor performance of athletes submitted to exercise under low heat stress environment.
Methods: Sixteen athletes, divided into two groups with eight athletes each (G2%: 34.1 ± 2.3 years; and G3%: 32.5 ± 2.2 years), performed 2 h of