

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Thiago Onofre Freire**

Influência da Suplementação de Creatina na Modulação da  
Captação de Glicose em Ratos Submetidos ou não à Atividade  
Física

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
THIAGO ONOFRE FREIRE  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção  
do título de Mestre em Biologia Funcional e  
Molécula. Área de Bioquímica*

Orientador: Antonio Herbert Lancha Jr

CAMPINAS – SP  
2006

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F883i
V	EX
TOMBO BC/	40223
PRGC.	16.P.0012306
c	<input type="checkbox"/>
	d <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	05/10/06
Nº CPD	

Bib ID 388887

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**F883i**

Freire, Thiago Onofre

Influência da suplementação de creatina na modulação da captação de glicose em ratos submetidos ou não à atividade física / Thiago Onofre Freire. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Antônio Herbert Lancha Junior.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Creatina. 2. Glicose. 3. Exercícios físicos. 4. Diabetes. 5. Metabolismo. I. Lancha Junior, Antônio Herbert. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Influence of creatine supplementation on glucose uptake in rats submitted or not to physical activity.

**Palavras-chave em inglês:** Creatine; Glucose; Exercise; Diabetes; Metabolism.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Antônio Herbert Lancha Júnior, Eivor Martins Júnior, Marília Cerqueira Leite Seelaender.

**Data da defesa:** 18/01/2006.

Data da Defesa: 18 de Janeiro de 2006

**BANCA EXAMINADORA**

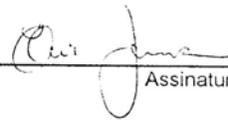
Prof.Dr. Antônio Herbert Lancha Jr.  
(Orientador)



---

Assinatura

Prof.Dr. Eivor Martins Junior



---

Assinatura

Prof.Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender



---

Assinatura

Prof.Dr. Antônio Boschero

---

Assinatura

Prof.Dra. Ione Salgado

---

Assinatura

## **Dedicatória**

Agora que está no final é importante olhar para trás e reconhecer quantos obstáculos foram vencidos para se chegar aqui. O cotidiano e as dificuldades do caminho foram muito mais fáceis de serem superados por eu estar cercado de pessoas que acreditavam em mim e nos meus ideais. Por isso, tenho o maior prazer em dedicar esse trabalho aos meus pais, Maria das Graças Onofre Freire e Neidson Mario Costa Freire, por estarem presentes e apoiando todo o processo desde o início, quando tudo não passava de um mero desejo; e a minha namorada Aline Lyrio Burgos Soares, que mudou sua vida para estar ao meu lado. Foram eles que me incentivaram em cada momento de fraqueza no decorrer do processo.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Antônio Herbert Lancha Jr., pela confiança e crença em minhas idéias. Agradeço também por ser um grande exemplo, muito antes de ser meu orientador, e me receber de braços abertos em sua equipe.

Aos membros do Laboratório de Nutrição Aplicado à Atividade Motora da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, pela recepção, presteza e convívio diário no dia-dia e durante os experimentos. Agradeço em especial à Viviane Polacow, Hamilton Hoschel, Patrícia Vieira, Patrícia Campos e Patrícia Oliveira por, principalmente no início, sempre me indicarem os caminhos que eu deveria seguir; ao Bruno Gualano, por sua alta capacidade de assimilar os conhecimentos científicos e ser um grande debatedor dos assuntos dessa tese; ao Marco Leme, Fabiana Benatti, Desire Coelho, André Costa e à Viviane Polacow pela ajuda constante nos dias de experimento. Agradeço ainda ao Guilherme Artioli, Rafael Baptista e a Fernanda Scagliusi que sempre se dispuseram a ajudar quando lhes era solicitado.

Ao Prof. Dr. Julio Tirapegue por permitir o uso do seu laboratório para que eu aprendesse a realizar as dosagens de glicogênio e a Ivanir Pires que sempre se dispôs a ensinar a metodologia com paciência e eficácia inigualáveis, cuidando dos detalhes como o se o trabalho fosse seu.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Armindo Alves (jamais esquecerei seu relatório), Profa. Dra. Dora Grassi Kassisse e Profa. Dra. Carmem Veríssima, pelas sugestões e principalmente pelas críticas e conselhos em relação à tese.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr. Eivor Martins Junior e Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender, pela atenção e debate do conteúdo da tese.

Agradeço às secretárias Andréia Vigilato (IB-UNICAMP) e Shirley Bernardino de Oliveira (EEFE-USP) pela atenção e suporte na hora de resolver todos os problemas burocráticos que envolvem o desenvolvimento do curso de Mestrado.

Aos amigos e familiares que me encorajaram a seguir os meus sonhos e sempre prezaram por minha felicidade. Agradeço em especial aos amigos Manuel Freaza e Lucas Gonçalves que não poupam esforço e paciência em me socorrer quando eu tive problemas no computador. Agradeço ainda ao meu amigo e colega Diego Stéfani por sempre se colocar a disposição para me auxiliar a resolver pendências na Unicamp e ao amigo Leonardo Macedo Souza por todo o auxílio na análise estatística do trabalho.

Agradeço a Alessandra Moreira, Paulo Marcelo Moreira e Maria Victoria Serbeto de Barros por toda a ajuda, inclusive por me emprestar o seu computador pessoal para que eu pudesse reescrever e editar essa tese após um vírus ter danificado todos os arquivos do meu computador.

Aos funcionários do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP por sempre me fornecerem os restos de ração utilizadas durante o experimento.

Respeito muito os animais e peço desculpas à natureza por tê-los utilizados como cobaias. O fiz por acreditar num bem maior para a evolução da humanidade. Farei o possível que para que suas vidas não sejam desperdiçadas.

## Sumário

Lista de Abreviaturas .....	IX
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XII
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
1 – Introdução.....	1
1.1 Metabolismo da creatina.....	2
1.2 Efeitos da suplementação de creatina na homeostasia da glicose em ratos.....	6
1.3 Efeito da suplementação de creatina na homeostasia da glicose em humanos.....	11
1.4 Possíveis mecanismos que explicam os efeitos da suplementação de creatina na homeostasia da glicose.....	17
2 – Objetivos.....	20
3 - Material e Métodos.....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Protocolo Experimental.....	21
3.3 Treinamento dos animais.....	23
3.4 Pesagem dos animais.....	24
3.5 Suplementação de creatina.....	24
3.6 Teste de tolerância oral a glicose (OGTT).....	25

3.7 Sacrifício.....	25
3.8 Análise do glicogênio muscular e hepático.....	26
<u>3.8.1 Extração</u> .....	26
<u>3.8.2 Leitura</u> .....	27
3.9 Análise estatística.....	28
4 – Resultados.....	29
4.1 Peso dos animais.....	29
4.2 Glicogênio muscular e hepático.....	31
4.3 Correlações entre peso dos animais e as concentrações de glicogênio muscular e hepático.....	33
4.4 Análise do teste oral de tolerância à glicose.....	36
5 – Discussão.....	38
6 – Conclusões.....	46
7 - Referências Bibliográficas.....	47
8 – Anexos.....	53

## Lista de Abreviaturas

1. [PCr] / [Cr] – Relação entre a concentração entre fosfocreatina e creatina
2. ADP – Adenosina difosfato
3. AGAT - Arginina-Glicina amidinotransferase
4. AICAR - 5-Aminoidazole – 4 – Carboximide – 1 Beta –D – Ribofuranoside
5. AMP- Adenosina Monofosfato
6. AMPK - Proteína quinase ativada por AMPc
7. ATP- Adenosina Trifosfato
8. CK - Creatina quinase
9. Cr - Creatina
10. CREAT – proteína transportadora de creatina
11. CS - Controle sedentário
12. CT - Controle treinado
13. EEFEUSP - Escola da Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo
14. GAMT - S-adenosilmetionina-ganidinoacetato N-metiltransferase
15. GLUT – proteína transportadora de glicose
16. IGF-1 - Fator de crescimento similar a insulina
17.  $K_m$  - constante de Michaelis-Menten
18. MEF2 – fator de facilitação de crescimento de miócitos 2
19. OGTT - teste de tolerância oral a glicose
20. PCr - Fosfocreatina
21. SS - Suplementado sedentário
22. ST - Suplementado treinado

**23.** T3 - Triiodotironina

**24.** ZMP - 5-Aminimidazole - 4 - Carboximide - 1 Beta -D - Ribofuranotide

## Lista de Figuras

1. Metabolismo da Creatina.....	3
2. Desenho Experimental.....	23
3. Cubas de treinamento.....	23
4. Peso e treinamento do animal.....	24
5. Média de peso entre os grupos no início do experimento.....	30
6. Ganho de peso médio entre os grupos.....	30
7. Variação de ganho de peso entre os grupos.....	31
8. Concentração de glicogênio muscular nos diferentes grupos.....	32
9. Concentração de glicogênio hepático nos diferentes grupos.....	33
10. Dispersão entre peso e glicogênio muscular nos grupos 4.....	34
11. Dispersão entre peso e glicogênio hepático nos grupos 4.....	34
12. Dispersão entre peso e glicogênio muscular nos grupos 8.....	35
13. Dispersão entre peso e glicogênio hepático nos grupos 8.....	35
14. Área sob a curva dos diferentes grupos.....	36
15. Análise entre os grupos 4 nos diferentes tempos do OGTT.....	36
16. Análise entre os grupos 8 nos diferentes tempos do OGTT.....	37
17. Média da glicemia para todos os grupos do experimento.....	37

## Lista de Tabelas

1. Grupos Experimentais.....	22
2. Novos grupos de animais.....	29
3. Valores de glicogênio .....	32

## Resumo

A creatina é um dos produtos mais consumidos entre os praticantes de atividade física. Seus benefícios se associam ao aumento de massa muscular, força e desempenho principalmente em atividades esportivas que têm como característica principal a alta intensidade e a curta duração. Recentemente alguns estudos têm demonstrado a capacidade da creatina em alterar a homeostasia da glicose, promovendo uma maior captação nos tecidos periféricos. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito da suplementação de creatina na tolerância à glicose e estoques de glicogênio muscular e hepático, em ratos submetidos ou não à atividade física por 4 e 8 semanas. Oitenta ratos Wistar foram divididos em 2 grupos, que variavam de acordo com o tempo do experimento, 4 e 8 semanas. Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos: controle sedentário (CS); controle treinado (CT); suplementado sedentário (SS); e suplementado treinado (ST). Os animais tiveram livre acesso à água e a ração, sendo que o grupo suplementado recebeu a ração contendo 2% de creatina monohidratada. O treinamento foi realizado 4 vezes por semana durante 40 minutos de atividade aeróbia (Natação). Para controle da intensidade do exercício, os animais tiveram pesos (2 a 5% do peso corporal) ataxados ao tórax. Após 4 e 8 semanas foram feitos testes de tolerância oral à glicose (OGTT) e análise do conteúdo de glicogênio muscular (gastrocnêmio) e hepático. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos estoques de glicogênio (muscular e hepático), na glicemia e área sob a curva analisados após o OGTT. A suplementação de creatina não foi capaz de alterar a homeostasia da glicose em ratos submetidos ou não a atividade aeróbia por 4 e 8 semanas

## Abstract

Creatine is one of the most used dietary supplement among athletes and physical active people. The benefits of creatine intake are related to increase muscle mass, power and performance, especially in high intensity, short term exercises. Recently studies have suggested that creatine supplementation can modulate glucose homeostasis by increasing glucose uptake in peripheral tissues. The aim of this study was to investigate the effects of creatine supplementation on muscle and hepatic glycogen and glucose tolerance in rats submitted or not to physical activity for 4 and 8 weeks. Eighty male, Wistar, rats were divided in two groups: 4 and 8 weeks. Then each group was subdivided in 4 subgroups, according to supplement intake and submission to exercise: Sedentary Control (CS); Trained Control (CT); Supplemented Sedentary (SS); and Supplemented Trained (ST). The animals had free access to water and chow, supplemented groups had 2% of their diet as creatine monohydrated. The exercise groups swam for 40 min / day for 4 days / week with 2 to 5% of their body weight attached to the chest. After 4 and 8 weeks, oral glucose tolerance tests were performed. On the subsequent day rats were killed and muscle and liver were collected and stored in liquid nitrogen for subsequent analysis. No changes in either glycogen content (muscle and hepatic tissue) or glucose tolerance were observed. This study shows that creatine supplementation do not alter glucose homeostasis in rats submitted or not to physical activity for 4 and 8 weeks.

## 1 Introdução

O uso de suplementos nutricionais tem crescido em todo o mundo. Nos últimos 15 anos os negócios envolvidos nesse ramo cresceram de 3,3 bilhões de dólares para 14 bilhões no ano 2000 (ZEISEL, 1999). Um dos grandes líderes de mercado é a creatina. Desde 1992, após as olimpíadas de Barcelona, seu consumo tem aumentado significativamente. Em 1996, o público americano consumiu 1,2 milhões de quilos e gastou aproximadamente 50 milhões de dólares com esse suplemento. Já em 1998, o consumo quase que quadruplicou e as vendas excederam os 200 milhões de dólares (GRAHAM & HATTON, 1999).

Inicialmente a popularidade da creatina cresceu devido à divulgação, em revistas esportivas populares, dos seus possíveis efeitos em relação ao aumento de força, desempenho e massa muscular. Com o avanço dos estudos científicos, pôde-se constatar que a creatina era realmente capaz de beneficiar o desempenho em atividades esportivas que tinham como principal característica à alta intensidade e a curta duração (GRAHAM & HATTON, 1999).

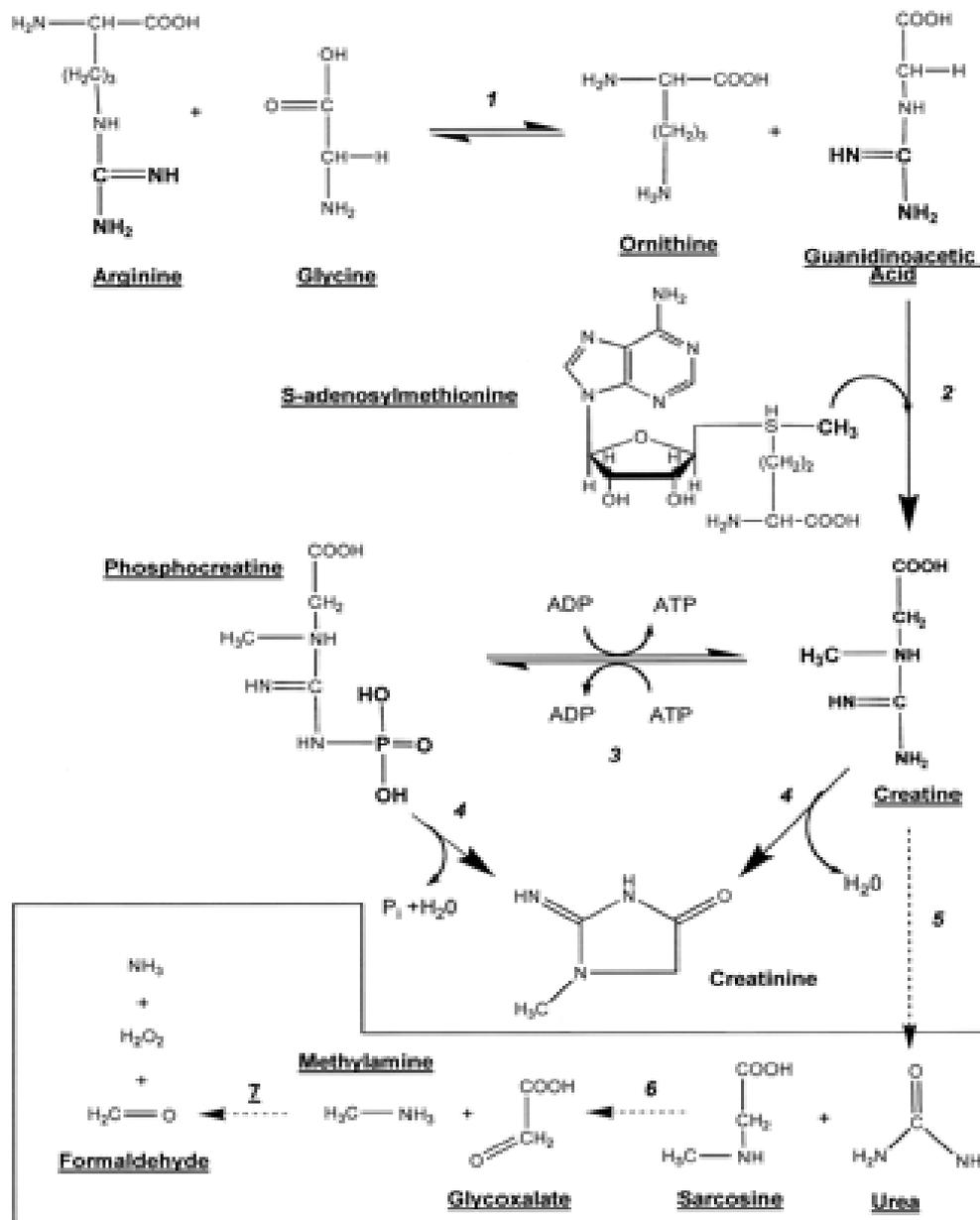
Devido ao fato da creatina aumentar a potência e massa muscular, seus benefícios têm sido testados em diversas situações patológicas como: Doença de Huntigton e a Distrofia Muscular Progressiva. Além disso, outros efeitos da suplementação de creatina têm sido investigados principalmente no que diz respeito à homeostasia da glicose. Estudos sugerem que a suplementação seja capaz de interferir na captação periférica de glicose. Se isso for constatado, a suplementação de creatina poderá trazer grandes benefícios, não só para atletas e praticantes de atividade física, mas principalmente, para pessoas que

tem problemas em relação ao controle glicêmico, como o que ocorre nos pacientes diabéticos não insulino-dependentes (VOLEK, 2004) que sentem bastante dificuldade em se manter compensados.

### **1.1 Metabolismo da creatina**

A creatina (ácido  $\alpha$ -metil guanidino acético) é um composto, produzido endogenamente ou obtido através da dieta, que exerce diversas funções metabólicas no corpo. Sua síntese endógena começa nos rins através da formação do ácido guanidino-acético, proveniente dos aminoácidos Arginina e Glicina, numa reação catalisada pela enzima Arginina-Glicina amidinotransferase (AGAT). O ácido guanidino-acético é transportado através da corrente sanguínea, para o fígado onde recebe um grupo metil, proveniente do aminoácido metionina, através da enzima S-adenosilmetionina-ganidinoacetato N-metiltransferase (GAMT), completando a síntese da Creatina (Cr) (Figura 1). O passo limitante dessa síntese é a enzima AGAT que é inibida quando há aumento na concentração de creatina (WALKER, 1979; WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000). Outros fatores que exercem influência na síntese de creatina são os hormônios tireoidianos, do crescimento e testosterona; além de fatores como a disponibilidade de ornitina e deficiências nutricionais (WALKER, 1979; WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).

A produção endógena (~ 1g / dia) somada à obtida na dieta (~ 1g / dia para uma dieta onívora) se iguala à taxa de degradação espontânea da creatina e fosfocreatina (PCr) em creatinina através de uma reação não enzimática.



**Figura 1** Adaptado de PERSKY & BRAZEAU (2001)

Legenda – 1: arginina:glicina amidino-transferase (AGAT); 2: S-adenosilmetionina-guanidinoacetato N-metiltransferase (GAMT); 3: creatina kinase (CK); 4: Conversão espontânea; 5: Creatina amidohidrolase; 6: glicina oxidase; 7: amino oxidase semicarbazida-sensível (SSAO). As linhas tracejadas indicam recentes hipóteses de formação tóxica do formaldeído.

Nos tecidos periféricos como músculo esquelético, coração, cérebro e testículos, a creatina é transportada para dentro das células através de um processo saturável pelo transportador, sódio-cloro dependente, chamado CREAT (creatine –transporter). Ao entrar na célula a creatina sofre a ação da

enzima creatina kinase (CK), responsável pela sua fosforilação reversível à fosfocreatina. Desta forma a fosfocreatina fica retida no interior da célula até que ocorram alterações no pH celular ou aumento da demanda energética, como observados na presença de hipóxia e atividade física. A  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) do transportador de creatina varia entre 20 e 60  $\mu\text{M}$  dependendo do local, isso explica as diferenças na concentração de creatina total (TCr / soma de creatina e fosfocreatina) nos diferentes tecidos (PERSKY & BRAZEAU, 2001).

No músculo esquelético, as fibras do tipo II (glicolítica) apresentam maior concentração de creatina total que nas fibras do tipo I (KUSHMERICK *et al.*, 1992; CASEY *et al.*, 1996). Em roedores, nas fibras do tipo II, o CREAT apresenta um  $K_m$  de 160 $\mu\text{M}$  enquanto que nas do tipo I esse valor cai para 73 $\mu\text{M}$ , conseqüentemente observa-se uma diferença de aproximadamente 50% a mais no conteúdo de fosfocreatina das células musculares do tipo II (KUSHMERICK *et al.*, 1992; WILLOTT *et al.*, 1999). Em humanos, a concentração muscular de creatina total varia entre 110 a 160 mmol/kg (HARRIS *et al.*, 1974). Assim como nos ratos, as fibras do tipo II apresentam uma concentração 45 a 55% maior de TCr que as do tipo I (GREENHAFF, 1996).

Diversos fatores influenciam na captação de creatina nas células. ODOOM *et al* (1996) verificaram que os hormônios triiodotironina (T3), fator de crescimento similar a insulina (IGF-1) e Insulina (3nM) foram responsáveis por aumentar em média 300%, 50% e 200% respectivamente, o conteúdo de creatina total em células musculares de ratos em comparação aos controles. O exercício físico também tem se mostrado efetivo em aumentar a captação de

creatina. HARRIS *et al* (1992) suplementaram indivíduos submetidos a treinamento em cicloergômetro, com somente uma das pernas, por 3 e 5 dias. Verificaram na perna treinada uma concentração significativamente maior de TCr que na perna controle. THORELL *et al* (1999) sugeriram que a atividade física aumentava a translocação do transportador de creatina assim como o fazia com o transportador de glicose, o GLUT-4.

O envolvimento da creatina no metabolismo energético se baseia no acúmulo de fosfato dentro da célula. Ao entrar na célula, ela retém uma molécula de fosfato e, em situações de hipóxia ou aumento da demanda energética, a creatina kinase hidrolisa a fosfocreatina liberando o fosfato que passa a ser utilizado para regenerar a molécula de ADP à ATP. A creatina livre, resultante dessa reação, se torna uma aceptora de prótons na membrana mitocondrial. Desta forma, a creatina auxilia na produção de energia no citossol e no controle do pH (BRODY, 1994).

A creatina ainda parece estar envolvida na regulação da glicólise. Quando sua concentração é baixa nos tecidos, humanos e animais se adaptam aumentando a atividade de enzimas oxidativas, por exemplo, citrato sintase e succinato desidrogenase, além de aumentar a translocação do transportador de glicose (GLUT4) (REN *et al.*, 1993; O`GORMAN *et al.*, 1996). Esse efeito parece contrabalançar a falta de energia proveniente da quebra da fosfocreatina do metabolismo anaeróbio. É importante salientar que esse efeito ainda pode ser dependente do tipo de fibra muscular e que pode não estar associado somente a concentração de creatina *per si*. BRANNON *et al* (1997) observaram aumento na atividade da citrato sintase no músculo sóleo

(oxidativo) de ratos suplementados com creatina, efeito que não ocorreu no músculo plantar (glicolítico).

Em humanos, estima-se que 60 a 70% do total de creatina intracelular seja encontrada na forma livre e que apenas 30 a 40% estejam sob a forma fosforilada. Há indícios que a razão PCr/TCr seja mais importante como determinante do status energético celular que a concentração de creatina per si. Outros autores sugerem que a concentração isolada de PCr e fosfato inorgânico (Pi) regulam a atividade das enzimas glicogênio fosforilase e fosfofrutoquinase I, responsáveis pela degradação de glicogênio e controle da via glicolítica, respectivamente (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).

Diante do exposto acima os reais efeitos da creatina no controle metabólico de outros nutrientes permanece obscuro.

## **1. 2 Efeitos da suplementação de creatina na homeostasia da glicose em ratos**

Conforme mencionado anteriormente, após se constatar os efeitos da suplementação de creatina no aumento de massa muscular e força no âmbito esportivo, diversos cientistas investigaram o efeito dessa suplementação em situações patológicas; em doenças, normalmente neuro-degenerativas, que em geral estavam associadas à perda de massa muscular ou força.

FERRANTE *et al* (2000) ao estudar o efeito da suplementação de creatina na doença de Huntington verificaram, através do teste de tolerância oral a glicose (OGTT) que o estabelecimento do Diabetes, característica da progressão da doença, era retardada nos animais suplementados com 2% da ração na forma de creatina. Dado que corroborou os de HURLBERT *et al*

(1999) que também verificaram esse mesmo efeito no mesmo modelo experimental: ratos com doença de Huntington suplementados com creatina.

A partir de então, diversos estudos em animais têm sido conduzidos no intuito de entender o efeito da suplementação de creatina na homeostasia da glicose.

ROONEY *et al.* (2002) dividiram 48 ratos em grupos que variavam de acordo com a suplementação e tempo de intervenção. Primeiramente os animais foram divididos em 02 grupos: suplementado com creatina (2% da ração na forma de creatina) ou ração comercial pura. Depois cada grupo foi subdividido em outros 3 subgrupos, que variavam de acordo com tempo de intervenção 2, 4 ou 8 semanas. No total formaram-se 6 grupos de 8 animais. Nesses três momentos, testes de tolerância oral a glicose (OGTT) concomitante a dosagens de insulinemia foram realizadas. Dois dias após o OGTT os animais eram sacrificados, tendo pâncreas e músculo (quadríceps) retirados para análise. O grupo suplementado com creatina apresentou picos de insulinemia, estimulados por glicose, significativamente maiores, que ao comparado grupo não suplementado, após quatro e oito semanas. Isso foi acompanhado pelo aumento significativo do conteúdo de creatina no pâncreas, já observado a partir da segunda semana. No músculo, nenhuma diferença significativa foi observada na concentração de creatina intramuscular, assim como, não foram verificadas alterações no conteúdo de glicogênio entre os grupos nos diferentes momentos de análise. Isso sugere que a suplementação de creatina possa realmente alterar o metabolismo da glicose, principalmente por aumentar a secreção de insulina.

Contraditoriamente, OP'T EINJDE *et al.* (2001a) administraram altas doses de creatina em ratos Wistar durante 5 dias. Os animais receberam ração contendo 5% de creatina monohidratada ou ração pura. Após os cinco dias, os valores plasmáticos de insulina eram medidos e os ratos anestesiados, sendo realizado uma nova dosagem de insulina. Os animais eram sacrificados e perfundidos com diferentes concentrações de insulina pura (0, 100, 20000 $\mu$ U / ml) ou ainda em combinação com creatina (2 ou 10 mmol / l). Os autores verificaram que a suplementação de creatina aumentou a concentração de TCr nos músculos sóleo (20%), porção vermelha do gastrocnêmio (15%) e porção branca do gastrocnêmio (10%). A atividade da enzima glicogênio sintase, captação de glicose e conteúdo de GLUT-4 não foram alterados de forma significativa pela suplementação de creatina em nenhum dos músculos. A suplementação também não foi efetiva em promover alterações nos níveis plasmáticos de insulina, apesar de ter aumentado a concentração plasmática de creatina em cinco vezes. No entanto, observou-se maior conteúdo de glicogênio no músculo sóleo (40%) e na porção vermelha do gastrocnêmio (15%), indicando que altas doses de creatina podem aumentar, de forma mais efetiva, a incorporação de creatina e glicogênio especialmente em músculos de característica oxidativa.

JEOUNG-SUN *et al.* (2005) dividiram 14 ratos Wistar em 2 grupos: suplementado com creatina (2% da ração na forma de creatina) ou alimentados com ração comercial sem creatina, por 3 semanas. Após esse período, observou-se o grau de expressão do GLUT-4 por Western Blot e constatou-se que o grupo suplementado com creatina apresentava o conteúdo de GLUT-4 significativamente maior nos músculos epitroclear, tríceps e extensor digitório

longo. Concomitantemente, os níveis de RNAm para GLUT-4 nos tríceps estavam 100% maiores no grupo suplementado; além do músculo epitroclear apresentar um conteúdo de glicogênio muscular significativamente maior (~40%) que o mesmo músculo no grupo controle. A suplementação de creatina foi capaz de aumentar significativamente (~50%) a fosforilação da proteína quinase ativada por 5`AMP (AMPK), os fatores de transcrição que regulam a expressão do GLUT-4: “myocyte enhancer factor 2” (MEF2) e suas isoformas MEF2A (90%), MEF2C(60%) e MEF2D(90%), no extrato nuclear do músculo extensor digitório longo. A análise de mobilidade eletroforética mostrou que a atividade de ligação ao DNA estava ~ 40% maior ( $p < 0,05$ ) no músculo do grupo suplementado com creatina em relação ao controle. Curiosamente, nesse mesmo músculo, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de ATP, creatina, fosfocreatina ou AMP entre os grupos. Inesperadamente o único metabólito que se encontrava diferente entre os grupos era a concentração intracelular de creatinina.

Em contrapartida, diversos autores verificaram alterações na concentração de creatina após a sua suplementação. MCMILLEN *et al.* (2001) suplementaram 20 ratos (SPRAGUE-DAWLEY) com creatina (2% da ração) ou ração comercial (sem creatina) por 02 semanas. Eles verificaram que a suplementação foi efetiva em aumentar as concentrações de creatina total, fosfocreatina e creatina livre principalmente no músculo de contração rápida (gastrocnêmio). Esses achados não puderam ser estendidos ao músculo de contração lenta (sóleo), indicando que a incorporação de creatina é maior em fibras do tipo II. Esses dados corroboram com os de BRANNON *et al.* (1997) que verificaram após 24 dias de suplementação que a concentração de

creatina era significativamente maior no músculo plantar (tipo II / glicolítico) que no músculo sóleo (oxidativo / tipo I).

Alguns autores sugerem que o decréscimo na razão  $[PCr]/[Cr]$ , proveniente da suplementação de creatina, seja o mecanismo responsável pelas alterações na homeostase da glicose. CEDDIA & SWEENEY (2004), verificaram o efeito da suplementação de creatina em células musculares de ratos. O objetivo era investigar o efeito na translocação do transportador de glicose (GLUT-4), estimulado ou não por insulina, captação e oxidação de glicose, conteúdo e síntese de glicogênio, produção de lactato e fosforilação da AMPK. Os autores observaram que após 48h de incubação com creatina, a concentração de creatina e fosfocreatina haviam aumentado ~ 9 e ~ 5 vezes respectivamente. No entanto, não foram verificadas alterações nas concentrações de ATP. Apesar da insulina alterar a captação de glicose, o conteúdo de glicogênio e a incorporação de glicose marcada no glicogênio, nenhum desses parâmetros foi alterado pela suplementação com creatina, mesmo havendo a queda na relação  $[PCr] / [Cr]$ . A creatina, no entanto, reduziu significativamente a produção de lactato (~42) e aumentou a produção de gás carbônico. Isso está de acordo com o aumento significativo na atividade da enzima citrato sintase (~35) e fosforilação da AMPK (~100), sugerindo ativação de vias oxidativas.

Também com o intuito de investigar a relação entre queda da razão  $[PCr] / [Cr]$  e captação da glicose, YOUNG & YOUNG (2002) suplementaram ratos Sprague-Dawley com creatina (300mg / kg / dia) por 5 semanas. Após esse período, os animais foram anestesiados e tiveram seus músculos plantar e epitoclear retirados para análise posterior. No músculo plantar foram feitas

análises do conteúdo de creatina, enquanto o epitoclear foi incubado com insulina para análise da captação de H-2-desoxiglicose. Em comparação ao grupo controle, o conteúdo de creatina livre aumentou 23% no grupo suplementado enquanto que a creatina total aumentou apenas 12%, logo, a relação  $[PCr] / [Cr]$  caiu nesse grupo. A captação de glicose no músculo epitoclear não foi maior no grupo suplementado com creatina, sugerindo que a razão  $[PCr] / [Cr]$  pouco tem haver com a captação de glicose. Os autores especularam que a concentração de fosfocreatina isolada, poderia ser um fator mais importante na captação da glicose que a razão  $[PCr] / [Cr]$ . Eles ainda sugeriram que a queda na  $[PCr]$  seja o verdadeiro indicativo da alteração do status energético celular.

### **1.3 Efeito da suplementação de creatina na homeostasia da glicose em humanos**

Conforme mencionado anteriormente, o uso da creatina foi difundido em praticantes de atividade física e atletas que desejavam melhorar seu desempenho através do aumento de força e massa muscular.

Reconhecidamente, a disponibilidade de glicogênio muscular era o principal determinante do desempenho esportivo, principalmente em atividades de intensidade moderada e duração prolongada (BERGSTROM *et al.*, 1967). Um dos métodos aceitos para aumentar a concentração intramuscular de glicogênio, envolvia a depleção prévia desse substrato pelo exercício seguida de uma dieta rica em carboidratos (dieta de supercompensação de carboidratos) por dias subseqüentes (BERGSTROM & HULTMAN, 1966; SHERMAN & COSTIL, 1984). Esse método promovia um aumento entre 150 a

200% na concentração de glicogênio muscular quando comparado ao estado de repouso. Em 1999, ROBINSON *et al.*, publicaram um artigo no qual a dieta de supercompensação de carboidratos era acompanhada da suplementação de creatina. Voluntários realizavam exercício em cicloergômetro com uma das pernas até a exaustão e biópsias musculares eram realizadas em ambas as pernas imediatamente após o exercício, após 6 horas e após 5 dias. Todos os indivíduos receberam uma dieta rica em carboidratos, sendo que a metade deles também consumiu creatina. Após 5 dias, ambos os grupos apresentavam concentrações significativamente maiores de glicogênio na perna exercitada em comparação a não exercitada. Em associação, o grupo suplementado com creatina apresentava um acúmulo de creatina total significativamente maior que o grupo não suplementado, acompanhado desse fato observaram que nesse grupo a concentração de glicogênio também era maior que o grupo que recebeu apenas carboidratos ( $p=0,06$ ). Os autores também verificaram que o aumento na concentração de creatina, apesar de significativo para ambas as pernas (exercitada e não exercitada), era mais expressivo na perna exercitada ( $p<0,001$ ).

Com base no estudo do ROBINSON *et al.* (1999), NELSON *et al.* (2001) tentaram verificar a reprodutibilidade em relação ao acúmulo de creatina e glicogênio no músculo. Doze indivíduos foram submetidos à atividade em cicloergômetro com apenas uma das pernas até a exaustão. Antes e após o exercício, biópsias musculares foram realizadas na perna direita (a mesma que foi submetida à atividade física). Após a sessão de exercício, os indivíduos eram submetidos a uma dieta de supercompensação de carboidratos por um período de 3 dias, quando uma nova biópsia era realizada nessa mesma perna.

Por 5 dias, os voluntários retornavam a sua dieta normal, só que desta vez acompanhado pela suplementação de creatina (20g/dia). No 11º dia de experimento, os voluntários eram submetidos a uma nova seção de exercício à exaustão acompanhada de biópsias musculares (desta vez com a perna esquerda) e 3 dias de dieta de supercompensação de carboidratos. O protocolo inicial de supercompensação de carboidratos resultou num aumento significativo de glicogênio na perna direita, apesar de nenhuma alteração na concentração de creatina ter sido constatada. A suplementação de creatina aumentou de forma significativa sua concentração intramuscular em ambas as pernas, apesar de não ter influenciado no conteúdo de glicogênio muscular. Após o último protocolo de supercompensação de carboidratos, que ocorreu subseqüentemente à suplementação de creatina, a concentração de glicogênio muscular da perna esquerda se apresentava significativamente (~53%) maior que o conteúdo de glicogênio apresentado na perna direita após o mesmo protocolo de supercompensação de carboidratos. Concomitantemente, a concentração de creatina intramuscular se apresentava significativamente maior após a suplementação. Mais uma vez, esse dado demonstrou a possível influência da suplementação de creatina nos estoques de glicogênio muscular.

OP'T EINDJ *et al.* (2001b) realizaram um estudo para verificar a influência da suplementação de creatina na expressão do transportador de glicose no músculo esquelético (GLUT-4). Vinte e dois indivíduos foram divididos em 2 grupos que variavam de acordo com o consumo ou não de creatina. Os voluntários tiveram uma das pernas imobilizadas por um período de 2 semanas e foram submetidos a um processo de reabilitação, envolvendo atividade física, por mais 10 semanas. Durante o período de imobilização foi

observado que o grupo não suplementado com creatina apresentou uma redução em 20% na expressão do GLUT-4, enquanto o suplementado teve um aumento de 10%. Após 10 semanas de reabilitação, o conteúdo de GLUT-4 do grupo suplementado estava significativamente maior (40%) em relação ao controle. A concentração de glicogênio, que permaneceu sem alteração significativa entre os grupos até o início da reabilitação, aumentou significativamente, no grupo suplementado, após as primeiras 3 semanas de reabilitação. Essa variação na concentração de glicogênio foi acompanhada por alterações nos estoques intramusculares de fosfocreatina, que se apresentavam 12% maior no grupo suplementado com creatina.

Em metodologia similar ao estudo do OP'T EINDJ (2001b), DERAIVE *et al.* (2003) também imobilizaram a perna direita dos indivíduos submetendo-os posteriormente à um período de reabilitação de 6 semanas. Nesse estudo além de existirem os grupos suplementados com placebo e creatina durante todo o protocolo, existia um terceiro grupo que era suplementado com creatina, durante o período de imobilização, e creatina mais proteína, durante a reabilitação. Contraditoriamente aos resultados apresentados por OP'T EINDJ (2001b), os autores observaram redução da expressão do GLUT-4 em todos os grupos durante a imobilização. Na reabilitação, os grupos suplementados com creatina aumentaram significativamente o conteúdo de GLUT-4 em relação ao placebo. A concentração de glicogênio muscular também foi significativamente maior nos grupos suplementados com creatina em relação ao placebo. Curiosamente, nenhuma alteração desse substrato e da expressão do GLUT-4 entre os grupos foi observada na perna esquerda não submetida ao protocolo experimental. Nenhuma alteração significativa foi percebida entre os grupos

placebo e creatina na área abaixo da curva no teste de tolerância oral a glicose. No entanto, no grupo suplementado com creatina e proteína, essa área foi reduzida significativamente comparando-se o início e o final do estudo. Foi concluído que a creatina estimula o aumento das concentrações de glicogênio e GLUT-4 somente quando acompanhado de atividade física e que a suplementação de creatina com proteína poderia interferir no teste de tolerância oral a glicose por mecanismos não relacionados ao aumento da expressão do GLUT-4.

Esses dados corroboram os de NEWMAN *et al.* (2003), que investigaram o efeito da suplementação de creatina, por 5 e 28 dias na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em homens não submetidos a atividade física. Os voluntários foram divididos em 2 grupos: suplementados com creatina ou glicose (20 g nos 5 primeiros dias e 3g nos últimos 23). Para análise da tolerância à glicose foram realizados testes de tolerância oral a glicose (OGTT). Biópsias musculares também foram realizadas nesse estudo com o intuito de verificar as concentrações de creatina e glicogênio. Em ambos períodos pôde-se observar aumentos significativos nas concentrações de creatina intramuscular, no entanto, nenhuma diferença foi observada em relação ao conteúdo de glicogênio e teste de tolerância oral a glicose.

Esse mesmo grupo desenvolveu um estudo posteriormente que tinha como objetivo verificar a influencia da suplementação de creatina na expressão do GLUT-4 e acúmulo de glicogênio. Vinte voluntários, divididos em 02 grupos (suplementado com creatina ou placebo) participaram durante 6 semanas do protocolo experimental. A suplementação de creatina consistiu em 20g / dia durante 5 dias associada a uma dose de manutenção de 2g / dia até o final do

estudo. O grupo placebo recebeu apenas maltodextrina. Os autores observaram que os 5 dias de suplementação com creatina aumentavam os estoques de glicogênio muscular significativamente (14%) em relação ao grupo placebo. No entanto, após 6 semanas essa diferença não era mantida. A concentração de fosfocreatina e creatina intramuscular acompanharam a curva da concentração de glicogênio, aumentando significativamente nos primeiros 5 dias e reduzindo após as 6 semanas. Sugerindo que o aumento na concentração de creatina seja um pré-requisito para aumentar a concentração de glicogênio. Apesar do aumento inicial de glicogênio, os autores não verificaram diferenças entre os grupos em relação à expressão do RNA-m para GLUT-4, glicogênio sintase, glicogenina e insulinemia em nenhum momento do estudo (VANLOON *et al.*, 2004).

No intuito de desvendar os mecanismos que dariam suporte aos resultados obtidos em 2001, OPT EIJNDJ *et al.* (2005) verificaram o efeito da suplementação de creatina na modulação da atividade da proteína quinase ativada por 5`AMP (AMPK). Novamente foi utilizado o protocolo de imobilização de uma das pernas com o subsequente período de reabilitação. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos, suplementado ou não com creatina, que consumiam 15g do suplemento nos primeiros 5 dias seguidos de uma dose de manutenção de 2,5g / dia até o final do estudo. A imobilização não foi capaz de afetar a fosforilação e expressão da AMPK em nenhuma de suas subunidades. No entanto, independentemente do tratamento recebido, após o treinamento houve aumento significativo (~25%) da fosforilação das subunidades  $\alpha$  e  $\alpha 1$ . Durante todo o estudo, a atividade da AMPK na perna contra-lateral permaneceu inalterada. Esses resultados sugeriram que o aumento da

expressão do GLUT-4 e conteúdo de glicogênio muscular observados anteriormente devido a suplementação de creatina, pouco tem haver com a influência da creatina na modulação da atividade da AMPK .

#### **1.4 Possíveis mecanismos que explicam os efeitos da suplementação de creatina na homeostasia da glicose**

Os mecanismos mais prováveis que se correlacionam com a influência da suplementação de creatina na homeostasia da glicose são: maior secreção de insulina, maior sensibilidade periférica perante esse hormônio e a maior captação periférica de glicose.

Alguns estudos propuseram que a suplementação de creatina fosse capaz de aumentar a secreção de insulina *in vitro* (ALSERVER *et al.*, 1970; MARCO *et al.*, 1976) e, mais recentemente, *in vivo* (ROONEY *et al.*, 2002).

Fisiologicamente o aumento da glicemia é acompanhado pela maior captação de glicose nas células  $\beta$  pancreáticas, através do transportador de glicose (GLUT-2). Ao entrar na célula a glicose é fosforilada estimulando a ativação da via glicolítica e do ciclo de Krebs, aumentando a concentração intracelular de ATP. Isso leva ao fechamento dos canais de potássio ( $K^+$ ), despolarização da membrana plasmática, e conseqüentemente abertura dos canais de cálcio ( $Ca^{++}$ ) (ODOM *et al.*, 2004). O aumento desse íon dentro da célula leva a fusão dos grânulos que contém insulina, promovendo sua secreção e conseqüentemente, aumento da concentração desse hormônio na corrente sanguínea.

A suposta influência da suplementação de creatina na maior secreção de insulina está baseada na idéia do fechamento dos canais de  $K^+$  e alteração

da polaridade da membrana. A creatina induziria esse processo por alterar o status energético celular, visto que sua suplementação normalmente provoca a queda na razão  $[PCr] / [Cr]$  refletindo num baixo status energético.

A insulina segue pela corrente sanguínea e ao atingir os tecidos alvos promove o aumento da captação de glicose por aumentar a translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática.

A musculatura esquelética tem um papel importantíssimo na manutenção da glicemia. Por representar aproximadamente 40 % do peso corporal, chega a ser responsável por 70 a 80% da captação periférica de glicose *in vivo* (DEFRONZO *et al.*, 1981). Então, se a creatina for capaz de aumentar a secreção de insulina, esse hormônio pode provocar um significativo aumento (~ 30 vezes) na captação periférica de glicose (JAMES, 1995). Sabe-se que o estímulo exercido pela insulina chega a aumentar em 40 vezes a concentração de GLUT-4 (transportador de glicose no músculo esquelético) na membrana plasmática celular (JAMES, 1995).

No entanto, a translocação de GLUT-4 não é mediada apenas por insulina. A contração muscular é um dos grandes estimuladores da translocação desse transportador. De fato, duas populações distintas de vesículas de GLUT-4 foram identificadas nas células (PLOUG *et al.*, 1998) e os efeitos da insulina e da contração muscular são aditivos, sugerindo que existem vias distintas para ativar a translocação desse transportador (CORTRIGHT & DOHM, 1997; HAYASHI *et al.*, 1998).

HAYASHI *et al.* (1997) sugeriram que a elevação na concentração de cálcio pela atividade contrátil pode iniciar ou facilitar a ativação de moléculas ou cascatas de proteínas sinalizadoras propiciando efeitos imediatos e

prolongados do exercício no transporte de glicose do tecido muscular. Dentre essas proteínas encontra-se muito bem estabelecido o envolvimento da AMPK (HAYASHI *et al.*, 1998). Essa proteína pode ser considerada um sensor metabólico primário de carga energética celular (HARDIE *et al.*, 1987; HARDIE & CARLING, 1997; HARDIE *et al.*, 1999), desativando e ativando vias de consumo de ATP a depender da demanda metabólica da célula. De fato, WRIGHT *et al.* (2004), verificaram que tanto o cálcio quanto o AMPK encontram-se simultaneamente envolvidos com a estimulação do transporte de glicose pela atividade contrátil. A ação da AMPK pode ocorrer agudamente via fosforilação de enzimas metabólicas ou cronicamente via efeitos na expressão gênica (HARDIE, 2000), enquanto sua regulação é dependente das relações AMP / ATP e fosfocreatina / creatina.

Há controvérsias, principalmente quando se trata de estudos realizados em espécies diferentes (humanos e ratos), em relação ao efeito da suplementação de creatina e aumento na atividade da AMPK (JEOUNG-SUN *et al.*, 2005; OPT EINDJ *et al.*, 2005).

Portanto, se a suplementação com creatina for capaz de interferir na concentração de cálcio intracelular ou na atividade da AMPK isso sugere mais um mecanismo de ação da suplementação de creatina na homeostasia da glicose.

Tendo em vista todos os aspectos discutidos nessa revisão e analisando as controvérsias apresentadas, o objetivo desse trabalho foi verificar a influência da suplementação de creatina nos estoques de glicogênio muscular, na sensibilidade à insulina e na captação de glicose em ratos submetidos ou não a atividade física por 4 e 8 semanas.

## **2 Objetivos**

O objetivo desse trabalho foi verificar a influência da suplementação de creatina nos estoques de glicogênio muscular, na sensibilidade à insulina e na captação de glicose em ratos submetidos ou não a atividade física por 4 e 8 semanas.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Animais**

A amostra total do experimento foi composta por 80 ratos machos, Wistar, adquiridos no Biotério Central do Instituto Butantã, com peso inicial médio de 300g. Os animais foram levados para o Biotério do Laboratório de Nutrição Aplicada a Atividade Motora da Escola da Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo – EEFUEUSP, onde eram mantidos em gaiolas coletivas, 2 a 3 animais por gaiola, e tinham livre acesso à água e ração comercial. Além disso, eram submetidos a ciclo claro / escuro invertido de 12/12hs com início às 7: 00 horas.

As análises descritas a seguir foram realizadas nesse laboratório.

Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da EEFUEUSP sob protocolo de número 110.

#### **3.2 Protocolo Experimental**

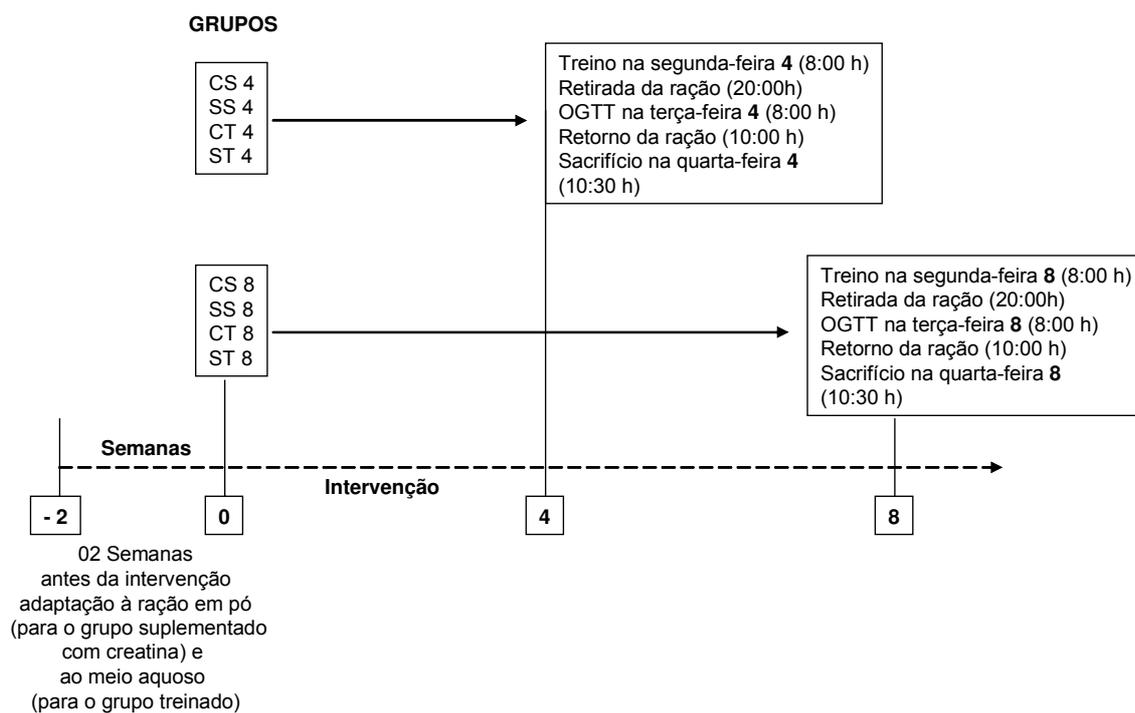
Os animais foram divididos em 02 grupos, distribuídos de acordo com o tempo do experimento, 4 ou 8 semanas. Cada grupo foi subdividido em 04 subgrupos: controle sedentário (CS); controle treinado (CT); suplementado sedentário (SS); e suplementado treinado (ST). O que resultou em 10 animais por subgrupo, conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1** Grupos experimentais

<b>Subgrupos</b>	<b>Semanas</b>	<b>Sigla</b>
Controle Sedentário	4	CS4
Controle Sedentário	8	CS8
Suplementado Sedentário	4	SS4
Suplementado Sedentário	8	SS8
Controle Treinado	4	CT4
Controle Treinado	8	CT8
Suplementado Treinado	4	ST4
Suplementado Treinado	8	ST8

Antes da intervenção os animais tiveram um período de 02 semanas de adaptação à ração em pó e ao meio aquoso. Na primeira semana, os animais que seriam treinados, eram introduzidos ao meio aquoso sem sobrecarga. Iniciava-se a semana com 20 minutos e terminava com 40 minutos. Na segunda semana, dava-se início a adaptação ao peso (1% do peso corpóreo) e a variação do tempo era mantida de acordo com a primeira semana.

Padronizamos segunda-feira como dia de início do experimento. Nesse dia, os ratos eram pesados individualmente em balança de precisão, antes que entrassem na água. Esse também, era o ultimo dia que os grupos exercitados eram submetidos ao treinamento. Após 4 e 8 semanas, na terça-feira, o teste oral de tolerância à glicose (OGTT) era realizado, após um jejum de 12 h e o sacrifício ocorria na quarta-feira as 10:30 h. Desta forma, os animais tinham acesso à ração por um período de 24 h antes do sacrifício. (Figura 2).

**DESENHO EXPERIMENTAL****Fig. 2 - Desenho Experimental****3.3 Treinamento dos animais**

O treinamento era realizado em sistema individual de natação para animais, com controle de temperatura da água, mantida por volta dos 31° C, em cubas medindo 25cm de diâmetro por 60cm de profundidade (Figura 4).

**Fig. 3 – Cubas de treinamento**

Conforme descrito anteriormente, as 02 semanas que antecediam o início da intervenção eram consideradas como período de adaptação ao meio

líquido e a sobrecarga com peso. A partir da primeira semana do experimento, para controle da intensidade do treinamento, era utilizada uma carga variável entre 2 e 5% do peso corpóreo do animal. O controle era realizado de forma subjetiva na tentativa de manter os animais com o mesmo nível de esforço, próximos do limiar anaeróbio. O peso era colocado ataxado ao tórax do animal e ajustado semanalmente sempre no início de cada semana (Figura 5).



**Fig. 4** – Peso e exercício do animal

MCCLUNG *et al* (2003) consideraram que animais submetidos a 30 minutos de exercício de natação com apenas 2% de peso corporal, 5 vezes na semana, seria suficiente pra promover alterações da expressão de proteínas no músculo cardíaco.

### **3.4 Pesagem dos animais**

A pesagem semanal era feita individualmente em balança analítica de precisão sempre nas segundas-feiras. Nesse momento os animais estavam secos e ainda não tinham sido submetidos à atividade física. O quadro com todos os pesos está em anexo.

### **3.5 Suplementação de creatina**

A suplementação de creatina consistiu na adição de creatina monohidratada (PROBIÓTICA), na ração comercial pulverizada (Labina /

Purina), na concentração de 2% (2g de creatina monohidratada para cada 100g de ração). O grupo controle consumia a ração sem adição do suplemento.

Tendo em vista que os dentes dos roedores poderiam crescer e prejudicar a alimentação era disponibilizado, nas gaiolas, pedaços de madeira para que esses pudessem desgastar seus dentes, visto que a ração era administrada na forma de pó.

A suplementação de 2% de creatina na ração tem sido utilizada por diversos autores em estudos com animais (FERRANTE *et al.*, 2000; MCMILLEN *et al.*, 2001; ROONEY *et al.*, 2002 ; JEONG-SUN JU *et al.*, 2005).

### **3.6 Teste de tolerância oral a glicose (OGTT)**

Para a estimativa da depuração sistêmica de glicose, eram realizados testes de OGTT. Para tal, conforme descrito anteriormente, os animais permaneciam 12 horas em jejum, após as quais recebiam, via gavagem, uma solução de glicose a 10%, num total de 2g/kg de peso. As coletas de sangue eram realizadas, pela veia caudal antes da administração da sobrecarga de glicose, ponto zero, e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem. O sangue coletado era analisado através do glicosímetro ACCU-CHEK Advantage II (ROCHE). Com os valores da glicemia, era traçada a curva glicêmica (ISHIDA *et al.*, 1996) e para interpretação desse parâmetro houve o cálculo da área abaixo da curva conforme demonstrado por MATTHEWS *et al.*, 1990.

### **3.7 Sacrifício**

O sacrifício, conforme descrito anteriormente, era feito às 10:30 h da manhã, na quarta-feira, das respectivas semanas 4 e 8. Ocorreu por

decapitação e imediatamente o músculo gastrocnêmio e o fígado foram retirados e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise. Para reduzir o estresse nos animais, cada animal foi levado individualmente para a sala de sacrifício e a guilhotina era lavada com sabão entre as execuções.

### **3.8 Análise do glicogênio muscular e hepático**

A análise do glicogênio era feita em 02 etapas: extração e quantificação.

#### **3.8.1 Extração** (SJORGREEN *et al.*, 1938)

As amostras de tecidos (músculo gastrocnêmio e fígado) foram pesadas ( $0,265 \pm 0,015$  mg) e digeridas em tubos de vidro contendo solução de 30% KOH (na razão de 0,250 g de tecido / 1 mL de solução), em banho fervente ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 60 minutos. Todos os tubos eram selados com bolas de vidro.

Após este período foi adicionado, em cada tubo de ensaio, solução saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (na razão de 0,250 g de tecido / 1 mL de solução), e 3,5 mL de etanol a 70%, sendo os tubos agitados no vórtex.

Novamente os tubos eram selados com as bolas de vidro e retornavam ao banho Maria numa temperatura de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após esse período, os tubos eram centrifugados, a temperatura ambiente, a 2000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante era descartado e ao precipitado era acrescentado mais 3,5 mL de etanol a 70%, sendo os tubos novamente agitados no vórtex.

Repetia-se o processo de centrifugação e descarte do sobrenadante, sendo adicionado 1 mL de água destilada quente para ressuspender o precipitado. A solução desta vez era guardada para posterior leitura.

### **3.8.2 Quantificação** (HASSID & ALBRAHAMS.,1957)

Soluções de glicose (1,11 mmol / L) foram feitas com diluições que determinavam os padrões para dosagem (Padrão A: 10 µg / mL; Padrão B: 20 µg / mL; Padrão C: 40 µg / mL; Padrão D: 60 µg / mL; Padrão E: 80 µg / mL).

Amostras de 50 µL e 10µL (gastrocnêmio e fígado, respectivamente) da solução proveniente da extração, eram adicionadas respectivamente a 950 µL e 990µl de água destilada e 2 mL de antrona (corante que se liga a glicose). Para formar a solução “Branco”, o mesmo era feito com 1000 µl de água destilada e 2 mL de antrona; enquanto que as soluções padrões também eram formadas a partir de 1000 µL de cada diluição padrão (A, B, C, D e E) adicionados à 2 mL de antrona. As amostras eram agitadas no vórtex e permaneciam por 15 minutos em banho fervente. Em seguida, eram retiradas do banho maria e levadas ao espectrofotômetro (*Dr. Lange CADAS 100*), que realizava a leitura com comprimento de onda de 650 nanômetros.

O espectro era zerado com o branco e as leituras das amostras eram feitas em duplicatas.

Para o cálculo do glicogênio era utilizado a média da leitura das duplicatas e a fórmula a seguir:

[mg de glicogênio / 100mg de tecido] =

$$\frac{1}{MT(mg)} \times \frac{\{A(mL)+H_2O(mL)\}}{A(mL)} \times \frac{\sum \{P(\mu g/mL)\}}{\sum(Abs P-branco)} \times (Abs-branco) \times \frac{100}{1000}$$

Onde: MT = massa do tecido utilizado (peso mg)

A = Amostra

P = Padrão

$$\sum P = 80 + 60 + 40 + 20 + 10 = 210\mu g/mL$$

## 2.9 Análise estatística

Para análise das diferenças entre os grupos em relação aos fatores glicogênio e peso, foram calculadas análises de variância através do General Linear Model.

Para as análises das médias de valores entre os pontos da curva do OGTT, variação de peso entre os grupos e área abaixo da curva, aplicou-se teste de normalidade de Shapiro-Wilk para todos os dados, análise de variância (ANOVA) One-Way e teste post-hoc de Tukey.

O nível de significância adotado foi  $p \leq 0,05$  e foram utilizados os programas de computador Minitab e SAS, nas versões 14 e 8,02 respectivamente.

### 3 Resultados

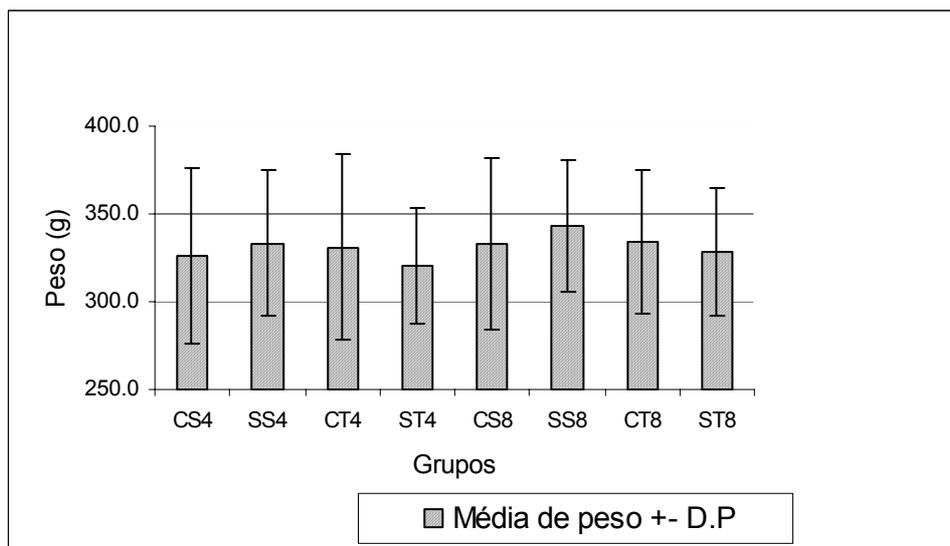
Para a análise dos resultados alguns animais foram excluídos do estudo devido as seguintes circunstâncias: no teste do OGTT a diferença nos valores de glicemia entre os tempos 0 e 30 eram  $\leq 5$ ; nas dosagens de glicogênio, apresentavam valores “outliners” (20% acima do desvio padrão do grupo) indicados pelo próprio programa estatístico; não resistiram ao treinamento e vieram a óbito. Desta forma, o novo número de animais em cada grupo está presente na tabela 2.

Grupos	CS4	SS4	CT4	ST4	CS8	SS8	CT8	ST8
n	9	10	6	8	10	8	7	7

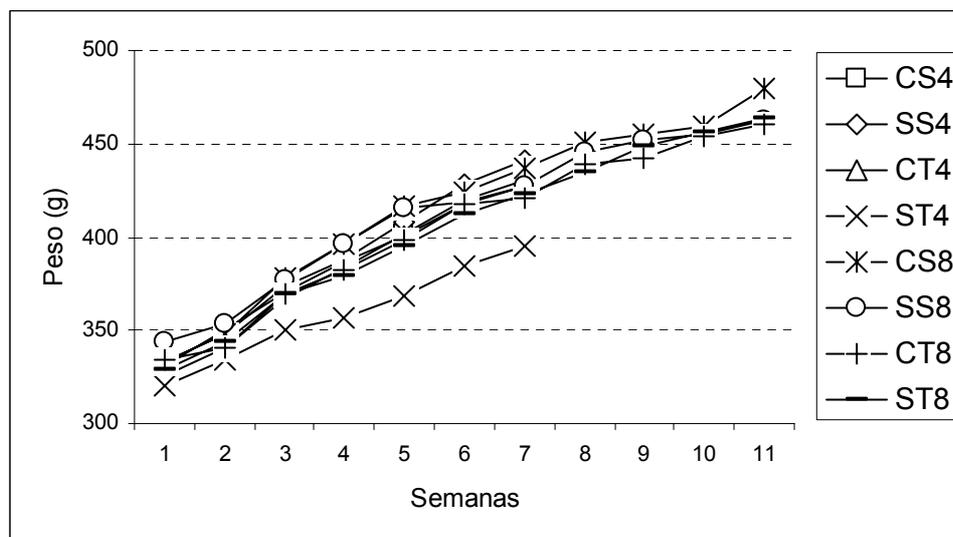
**Tabela 2** Novos números de animais por grupos. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).

#### 3.1 Peso dos animais

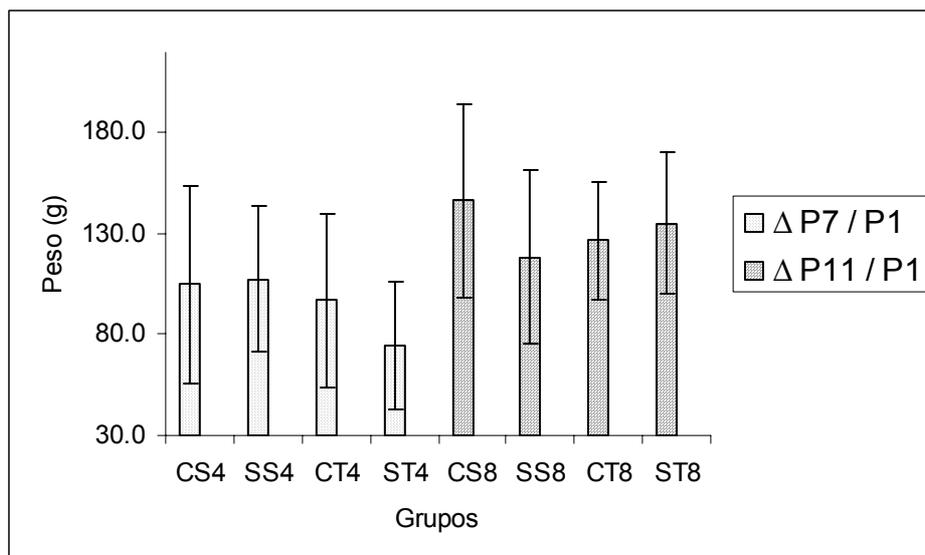
Existia uma uniformidade de peso entre os grupos no início do estudo (Figura 5), indicando homogeneidade. No decorrer do estudo, o ganho de peso médio entre os grupos também foi similar (Figura 6), exceto para o grupo ST4 em relação ao SS4 que teve um ganho de peso significativamente menor (Figura 7).



**Fig. 5** – Análise da média de peso e desvio padrão (g) entre os grupos no início do experimento. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).



**Fig. 6** - Curva de ganho de peso médio dos diferentes grupos. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).



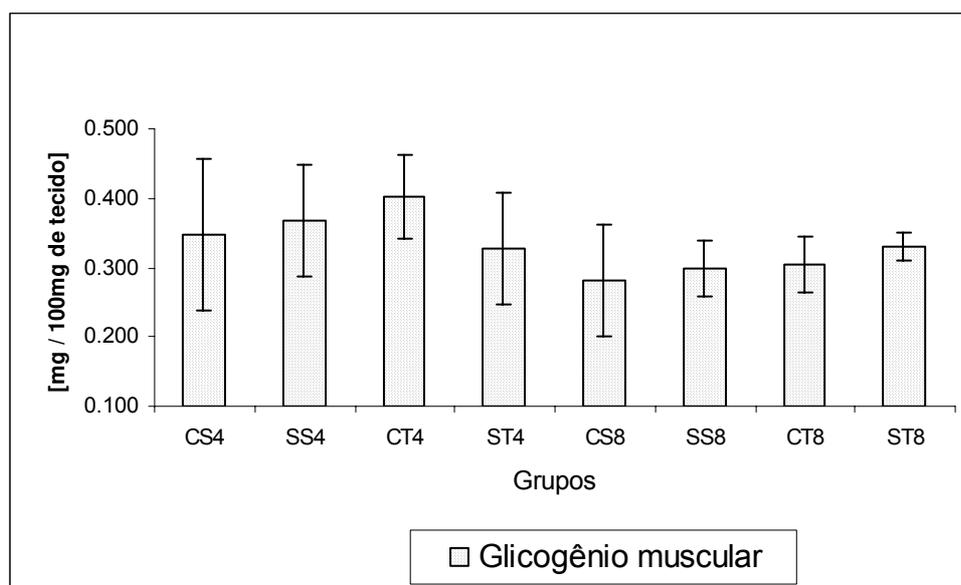
**Fig. 7** - Variação de ganho de peso (g) e desvio padrão entre os grupos. Os valores de peso dos grupos de semana 4 são referentes a diferença entre os pesos médios dos grupos entre as semanas 7 e 1. Enquanto que os da semana 8, são referentes a diferença entre os pesos médios da semana 11 e 1. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).\* Mostra a diferença estatística entre os grupos ST4 e SS4 ( $p=0,006$ ).

### 3.2 Glicogênio muscular e hepático

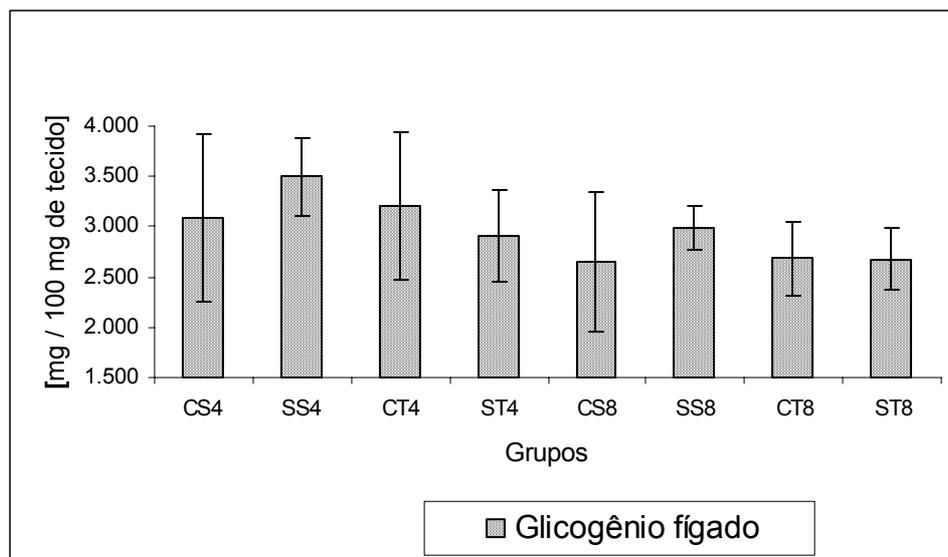
Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de glicogênio muscular e hepático nos diferentes grupos (Tabela 3; figuras 8 e 9). Como esse não era um resultado esperado, diversos modelos de análise foram montados reduzindo o número de fatores na análise e mesmo assim não foram verificadas diferenças significativas.

Grupo	Gastro.	DP±	Fígado	DP±	n	Erro G.	Erro F.
CS4	0,348	0,11	3,090	0,84	9	0,01	0,09
SS4	0,367	0,08	3,500	0,39	10	0,01	0,04
CT4	0,403	0,06	3,204	0,73	6	0,01	0,12
ST4	0,327	0,08	2,911	0,46	8	0,01	0,06
CS8	0,281	0,08	2,646	0,69	10	0,01	0,07
SS8	0,299	0,04	2,987	0,22	8	0,01	0,03
CT8	0,292	0,05	2,614	0,34	7	0,01	0,05
ST8	0,330	0,02	2,680	0,30	7	0,00	0,04

**Tabela 3** Valores de glicogênio expressos em mg de glicogênio / 100mg de tecido. Gastro. (músculo gastrocnêmio); Erro G. (erro médio padrão para músculo gastrocnêmio); Erro F. (erro médio padrão para Fígado); DP (desvio-padrão). Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).



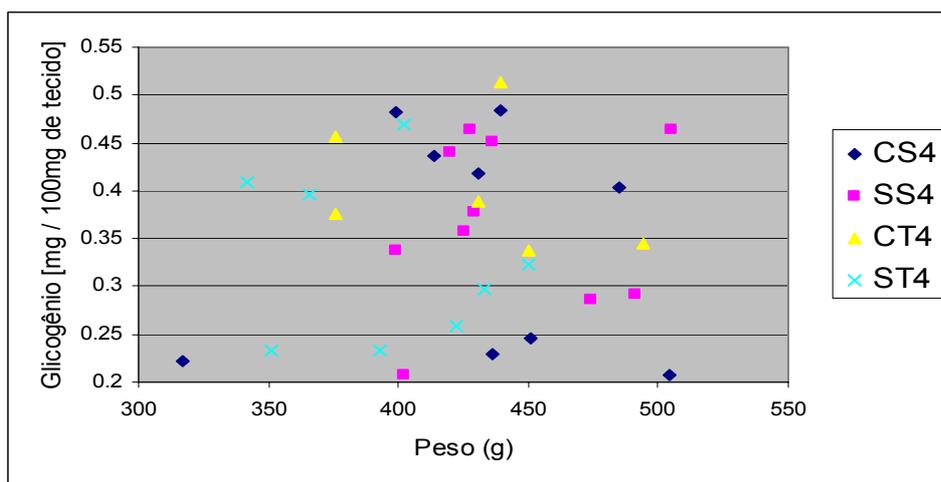
**Fig. 8** Concentrações de glicogênio muscular e respectivos desvios-padrões nos diferentes grupos. Valores expressos em mg de glicogênio por 100mg de tecido. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).



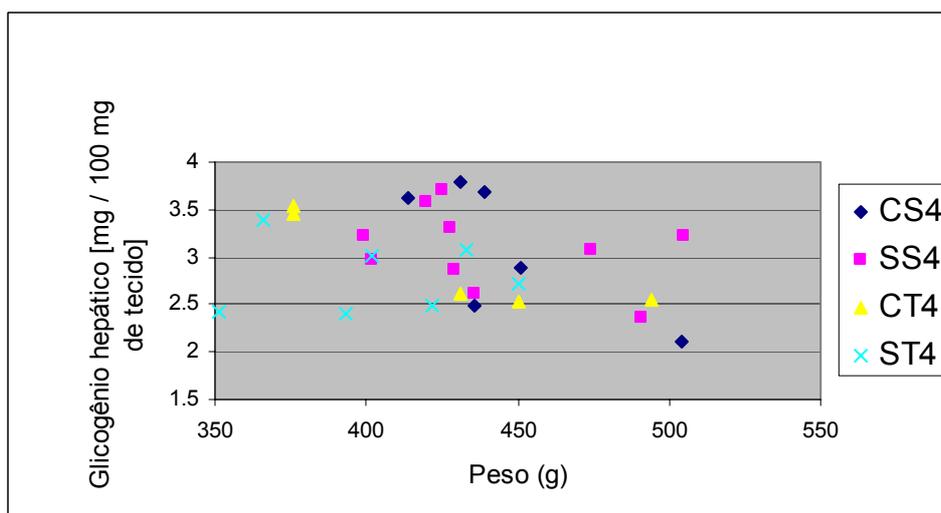
**Fig. 9** Concentrações de glicogênio hepático e respectivos desvios-padrões nos diferentes grupos. Valores expressos em mg de glicogênio por 100mg de tecido. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).

### 3.3 Correlações entre peso dos animais e as concentrações de glicogênio muscular e hepático

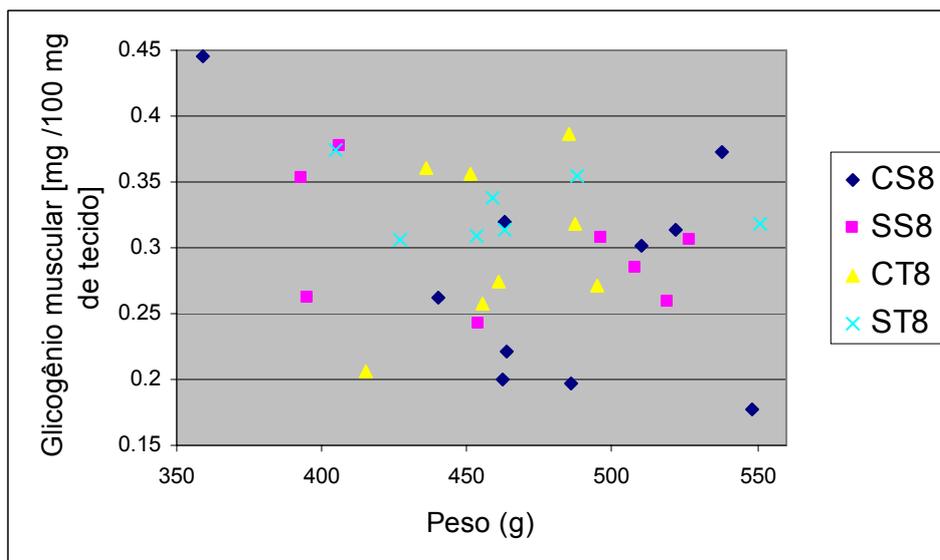
Os gráficos entre os pesos dos animais e as concentrações de glicogênio muscular e hepático mostraram que as correlações lineares são muito fracas entre esses dois fatores. Sugerindo que a relação peso e glicogênio são completamente independentes (Figuras 10, 11, 12 e 13).



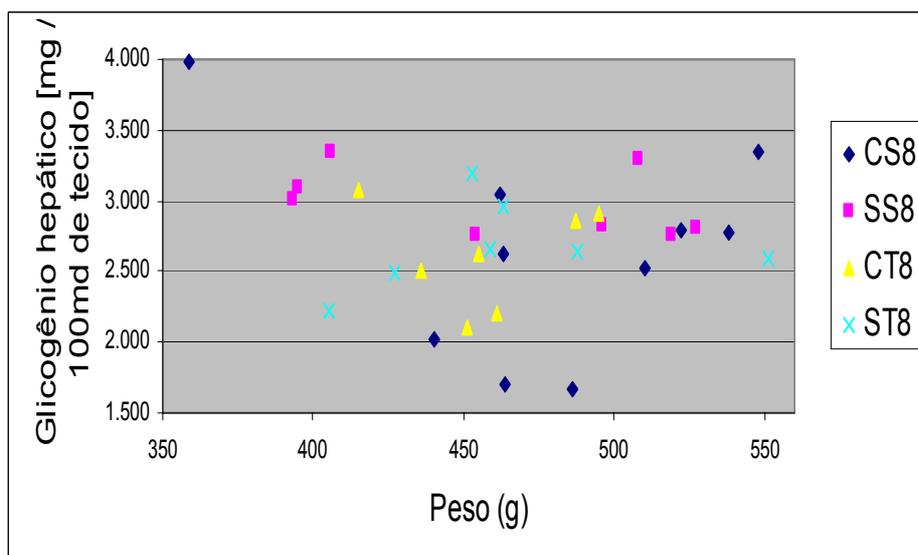
**Fig.10** – Gráfico de dispersão entre peso e glicogênio muscular nos grupos da semana 4. Análise referente ao peso da semana 7, quando os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos retirados para análise. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8).



**Fig.11** – Gráfico de dispersão entre peso e glicogênio hepático nos grupos da semana 4. Análise referente ao peso da semana 7, quando os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos retirados para análise. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8).



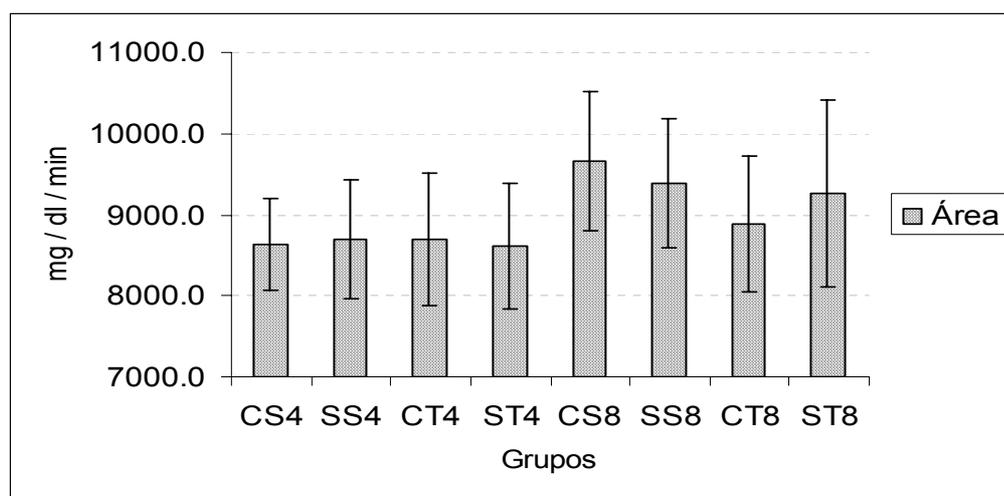
**Fig.12** – Gráfico de dispersão entre peso e glicogênio muscular nos grupos da semana 8. Análise referente ao peso da semana 11, quando os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos retirados para análise. Grupos: Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).



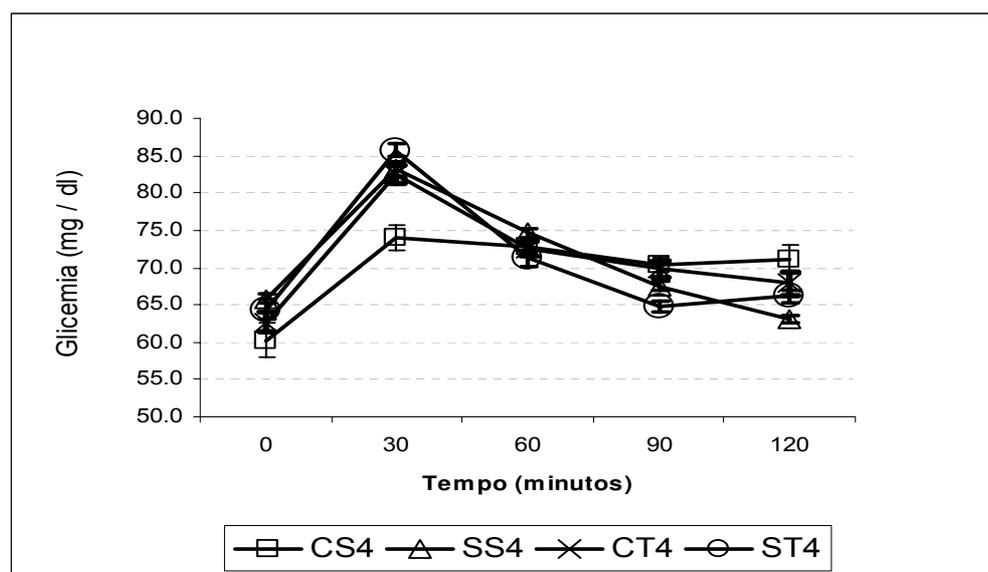
**Fig.13** – Gráfico de dispersão entre peso e glicogênio hepático nos grupos da semana 8. Análise referente ao peso da semana 11, quando os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos retirados para análise. Grupos: Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).

### 3.4 Análise do teste oral de tolerância à glicose

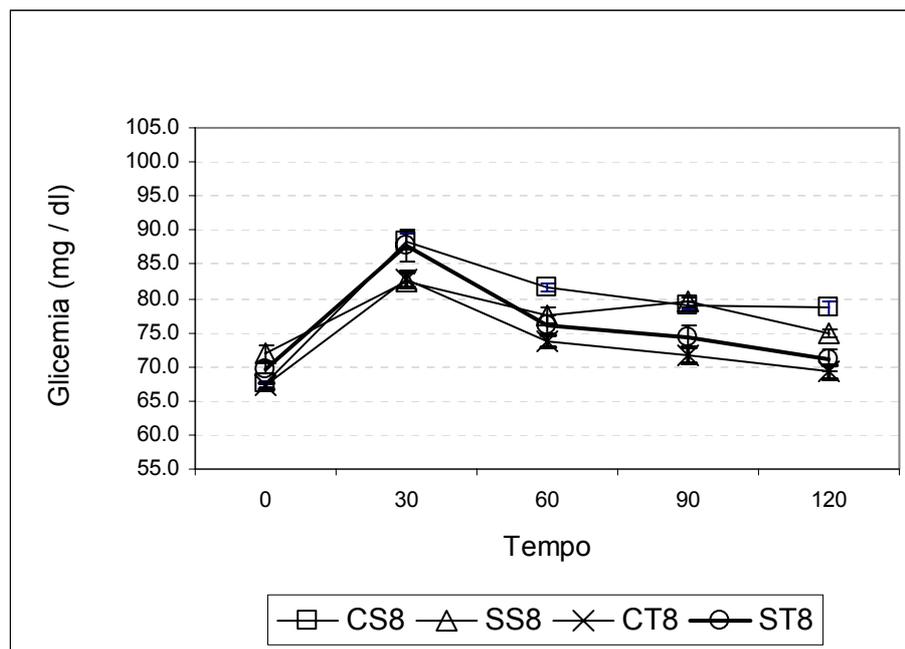
Duas análises distintas foram feitas com base nos valores do OGTT, área sob a curva e análise da glicemia entre grupos nos diferentes minutos do OGTT. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos em ambos os parâmetros.



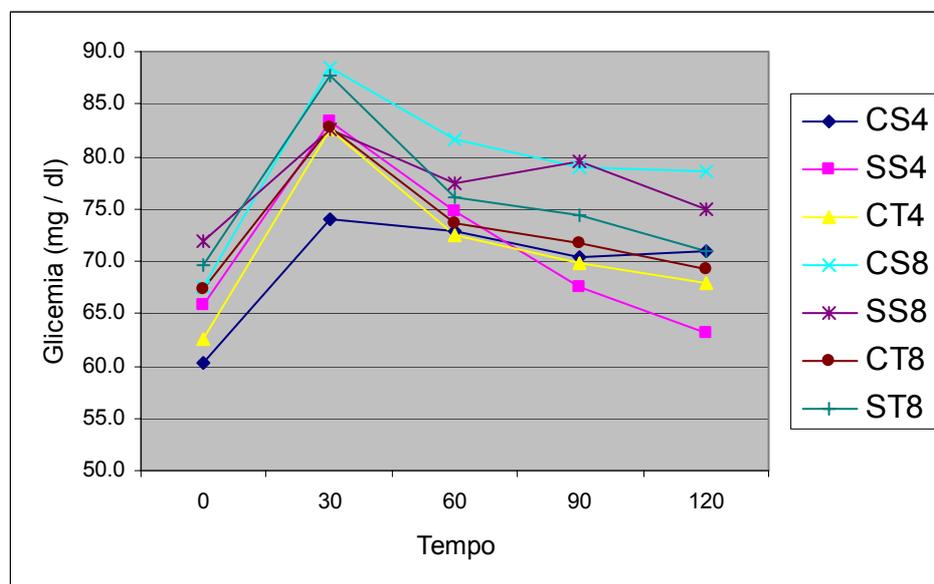
**Fig. 14** – Área sob a curva e os respectivos desvios-padrões dos diferentes grupos. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).



**Fig. 15** – Curva glicêmica dos diferentes grupos da semana 4. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8).



**Fig. 16** – Curva glicêmica dos diferentes grupos da semana 8. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).



**Fig. 17** – Média da glicemia nos diferentes pontos da curva para todos os grupos do experimento. Grupos: Controle sedentário semana 4 (CS4 / n-9); Suplementado sedentário semana 4 (SS4 / n-10); Controle treinado semana 4 (CT4 / n-6); Suplementado treinado semana 4 (ST4 / n-8); Controle sedentário semana 8 (CS8 / n-10); Suplementado sedentário semana 8 (SS8 / n-8); Controle treinado semana 8 (CT8 / n-7); Suplementado treinado semana 8 (ST8 / n-7).

## 4 Discussão

A nossa hipótese era que a suplementação de creatina fosse capaz de aumentar o conteúdo de glicogênio muscular e influenciar no teste de tolerância oral a glicose, principalmente nos animais submetidos à atividade física. No entanto, apesar de não confirmarmos a hipótese inicial, os nossos resultados estão de acordo com outros autores que não observaram alterações na concentração de glicogênio muscular (ROONEY *et al.*, 2002), captação de glicose (YOUNG & YOUNG, 2002) e alterações no teste oral de tolerância a glicose (NEWMAN *et al.*, 2003).

A suplementação de creatina na ração (2 gramas de creatina por 100 g de ração) parece ser satisfatória para promover aumento significativo na concentração de PCr e Cr nos tecidos de ratos (MCMILLEN *et al.*, 2001). BRANNON *et al.* (1997) avaliaram o efeito da suplementação de creatina ( $252 \pm 8$  mg / Kg de peso corporal) ao longo de 10 dias e verificaram aumento no conteúdo de creatina livre e na sua forma fosforilada nos músculos sóleo e plantar dos animais. MCBRIDE *et al.* (2002) observaram o efeito da suplementação de creatina (500mg / Kg de peso corporal / dia) ao longo de 4 semanas associada ou não ao treinamento e observaram aumento de creatina total nos músculos dos ratos suplementados.

Sendo o transporte da creatina um processo saturável, ou seja, que é inibido por altas concentrações de creatina dentro da célula e que adotamos um período de suplementação de 4 e 8 semanas (GUERRERO-ONTIVEROS, *et al.*, 1998), acreditamos que os estoques de creatina nos tecidos dos ratos suplementados estavam, pelo menos, próximos ao seu limite máximo. ROONEY *et al.* (2002) observaram aumento na concentração de creatina no

pâncreas de ratos em apenas 2 semanas de suplementação com 2% de creatina na ração.

É importante ressaltar que, se considerarmos que cada animal consome uma média de 20g de ração / dia e que a média de peso dos ratos durante o experimento foi de ~410g, cada rato consumiu em média 97,5 mg de creatina / kg do peso corporal. Se fizermos esse mesmo cálculo para o protocolo tradicional de suplementação em humanos que consiste em uma dose média de sobrecarga de 25g / kg / dia por 5 dias consecutivos, acompanhados de 5g / dia para dose de manutenção, chegaremos à conclusão que proporcionalmente ao peso, os animais consumiram 3 e 13 vezes mais creatina que os humanos, na fase de sobrecarga e manutenção, respectivamente. Essas doses são consideradas bem elevadas e dificilmente não promoveriam o aumento da disponibilidade de creatina para os animais.

Normalmente a incorporação da creatina nos tecidos é acompanhada do aumento de retenção hídrica devido ao efeito do aumento da osmolaridade intracelular. No entanto, não observamos ganho de peso significativo em relação aos grupos suplementados com os não suplementados. Isso sugeriria que não houve a incorporação de creatina nos tecidos, no entanto, outros autores também não verificaram alterações significativas em relação ao peso entre os grupos suplementado e não suplementados com creatina e isso foi independente da sua incorporação nos tecidos. (YOUNG & YOUNG., 2002; ROONEY *et al.*, 2002; JEONG-SUN *et al.*, 2005).

Portanto, consideramos improvável que a suplementação de creatina na ração tenha sido insuficiente para promover a incorporação desta nos tecidos dos animais.

No entanto, como não medimos esse dado, sabemos que existe a possibilidade de não ter ocorrido aumento nos estoques de creatina livre e fosfato nos ratos. JEONG – SUN *et al.* (2005) utilizando o mesmo protocolo de suplementação e ratos da mesma raça, não verificaram alterações significativas nas concentrações de creatina e creatina fosfato após 3 semanas de intervenção.

Considerando a diferença significativa de ganho de peso entre os grupos SS4 (suplementado sedentário 4) e ST4 (suplementado treinado 4), poderíamos sugerir que a suplementação de creatina exercesse efeito somente em animais submetidos à atividade física por um período de 4 semanas. No entanto, esse não pareceu ser um fator a ser levado em consideração, visto que nenhuma outra alteração pôde ser observada no conteúdo de glicogênio muscular e nos testes de tolerância oral a glicose.

O músculo escolhido para se analisar o glicogênio muscular foi o gastrocnêmio. Apesar de ser um músculo misto, sua característica nos ratos é a predominância de fibras musculares do tipo II (28% de IIa, 65% de IIb) e apenas 7% de fibras do tipo I (ARMSTRONG & PHELPS., 1984). Normalmente, músculos com essas características apresentam concentrações maiores de fosfocreatina e ATP que músculos com predominância oxidativa (Fibras do tipo I). MCMILLEN *et al.*, 2001, após a suplementação de creatina, mostraram um incremento significativo de 20% no conteúdo de creatina total no músculo gastrocnêmio e não observaram nenhuma alteração no sóleo.

BRANNON *et al.*, 1997 confirmaram esse achado, ao administrar creatina por 24 dias a ratos submetidos à atividade física. Eles observaram um incremento significativo na concentração de creatina total no músculo plantar, também predominante nas fibras musculares do tipo II, e não observaram nenhuma diferença significativa no sóleo. Dados, em relação ao músculo plantar, que também estão de acordo com os obtidos no estudo de YOUNG & YOUNG (2002). É importante salientar que as fibras musculares do tipo II são as que possuem maior quantidade de glicogênio no repouso.

Por essas características do músculo gastrocnêmio, acreditávamos que ele seria o ideal para analisar o glicogênio muscular. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos do estudo. A idéia de dividir o músculo gastrocnêmio em sua porção glicolítica e oxidativa, para aumentar a confiabilidade da análise, não nos pareceu necessária, visto que outros autores que realizaram esse protocolo não encontraram resultados significativamente diferentes entre as partes (OP'T EIJNDE *et al.*, 2001). Além do que, se observarmos o músculo como um todo, veremos que ele é constituído em 93% de fibras musculares do tipo II.

Um fator que merece atenção é que apesar das fibras musculares do tipo II apresentarem maiores concentrações de glicogênio que as fibras do tipo I no repouso, elas também são mais susceptíveis a glicólise quando há aumento da demanda energética. Ou seja, apesar do estoque de glicogênio ser maior, a degradação também ocorre de maneira mais rápida. A atividade da fosforilase (enzima responsável pela degradação do glicogênio) nas fibras do tipo IIb (8,8 U / g) e IIa (5,8 U / g) é aproximadamente o triplo e o dobro, respectivamente, da fosforilase das fibras do tipo I (2,8 U / g) (ESSEN *et al.*,

1976). Isso é importante se levarmos em consideração que no momento do sacrifício dos animais, quando os músculos eram retirados para posterior análise, nenhuma anestesia era aplicada, levando, algumas vezes, a contrações musculares por espasmos após o sacrifício. Supostamente, esses espasmos poderiam influenciar nos estoques de glicogênio muscular, pelo aumento da demanda energética, alterando a verdadeira concentração de glicogênio. Resta saber se a administração da anestesia, usada comumente em outros estudos, poderia evitar essas contrações e reduzir o estresse ao animal, fazendo com que a concentração do glicogênio se mantivesse mais estável.

Contraditoriamente a idéia de o gastrocnêmio ser o melhor músculo para avaliar os estoques de glicogênio, OP'T EIJNDE *et al.*, 2001 sugeriram que altíssimas doses de creatina (5 g / kg de peso) por 5 dias fosse mais eficiente em aumentar os estoques de creatina no músculo sóleo do que no gastrocnêmio, e que, inclusive nesse último, só se observou diferença na sua porção vermelha (oxidativa) quando comparada ao controle. A explicação para essa hipótese era que o  $K_m$  do transportador de creatina fosse menor no músculo sóleo (oxidativo) que quando comparado ao extensor digitário longo (glicolítico) (WILLOTT *et al.*, 1999) exigindo uma concentração menor de creatina circulante para promover maior incorporação nessas células.

Em relação à concentração de glicogênio no fígado, não encontramos nenhum trabalho que tivesse verificado sua concentração sob influência da suplementação de creatina. Ele poderia aumentar pelo mecanismo descrito anteriormente, referente ao aumento da captação de glicose, assim como poderia reduzir visto que o aumento na fosforilação da AMPK (proteína quinase

ativada por 5`AMP) tem sido associada à redução da atividade da enzima glicogênio sintase, apesar desse fato ter sido encontrado apenas em músculos de ratos (WOJTASZEWSKI. 2002). O efeito da fosforilação da AMPK nas concentrações de glicogênio parece ser dependente dos estoques prévios de glicogênio.

WOJTASZEWSKI *et al.* (2002) verificaram em ratos, com diferentes concentrações de glicogênio muscular, a ativação da AMPK mediada pela AICAR (5-Aminoidazole – 4 – Carboximide – 1 Beta –D – Ribofuranoside). A AICAR é um ativador da AMPK no repouso. Assim que entra na célula, é fosforilada a ZMP (5-Aminoidazole – 4 – Carboximide – 1 Beta –D – Ribofuranotide) um nucleotídeo que mimetiza o AMP (Adenosina 5`Monofosfato), conhecido por ativar a AMPK. De fato os autores observaram que a ativação da AMPK também era dependente do tipo de fibra muscular, se mostrando mais ativa na seguinte proporção: porção branca do músculo gastrocnêmio > porção vermelha do músculo gastrocnêmio > no sóleo. Além disso, verificou-se que atividade da AMPK era significativamente menor em fibras que apresentavam alta concentração de glicogênio muscular em relação as que apresentavam baixa e que o efeito da AICAR, na fosforilação da AMPK, enzima glicogênio sintase e na captação de glicose eram significativamente menores em músculos com alta concentração glicogênio.

A ativação da AMPK pela suplementação de creatina é controversa. Alguns estudos sugerem que a suplementação realmente ative a AMPK (JEONG-SUN *et al.*,2005) enquanto outros não observam nenhuma relação desse fenômeno (OP'T EIJNDE *et al.*, 2005).

Parece fazer sentido que a queda na relação fosfocreatina / creatina na célula, promovida pela suplementação de creatina, altere o status energético e ative a AMPK que conseqüentemente aumentaria a translocação do GLUT-4 e promoveria maior captação de glicose pela célula. No entanto, a ação da AMPK na captação de glicose parece estar sujeita a interferência de outros fatores como a concentração de glicogênio na célula.

Esses dados apontam a necessidade para que nos estudos que investigam o efeito da suplementação de creatina na captação de glicose, sejam feitas análises da concentração preliminar de glicogênio. Além de sugerir que sejam realizadas investigações do efeito da suplementação de creatina na AICAR e ZMP.

Isso nos levou a refletir se o treinamento foi suficiente para alterar as concentrações de glicogênio muscular nos animais. Muito provavelmente, no decorrer do experimento a atividade proposta tinha a intensidade que promoveria tal efeito, no entanto, questionamos se apenas a segunda-feira de treinamento, após o período de 5 dias em repouso (sábado, domingo, segunda, terça e quarta-feira antes do sacrifício), seria suficiente para manter as concentrações habituais dos estoques de glicogênio muscular entre o grupo treinado e sedentário. HOST *et al.* (1998) demonstraram que a elevação do GLUT-4 mediado pelo exercício físico crônico é revertido após dois dias de interrupção do treinamento. Além disso, acreditamos que se houvesse uma degradação significativa do glicogênio muscular na segunda-feira, talvez isso pudesse influenciar no teste oral de tolerância a glicose realizado na terça-feira. Os ratos treinados apresentariam uma maior captação de glicose e diferenças significativas seriam encontradas no OGTT, fato que não ocorreu.

Em relação ao OGTT, cabem outros questionamentos. Alguns autores têm utilizado um intervalo mais curto entre as coletas de sangue. Em alguns trabalhos, percebemos que as principais diferenças encontradas na glicemia ocorriam nos primeiros 20 minutos de teste. Ou seja, após a administração de glicose percebeu-se pico de glicemia entre 10 e 20 minutos (CARR *et al.*, 2003; ROONEY *et al.*, 2002). Isso nos sugere que o intervalo de 30 minutos talvez seja muito longo para a análise em animais. Contraditoriamente, KANDA *et al.*, conseguiram encontrar diferenças significativas em ratos mesmo após 300 minutos à administração de glicose.

Esse é o primeiro estudo em animais que estabelece uma relação entre a suplementação de creatina na captação periférica de glicose e estoques de glicogênio muscular em ratos submetidos ou não a treinamento aeróbio por diferentes períodos, 4 e 8 semanas. Mais estudos são indispensáveis para verificar o verdadeiro efeito da suplementação de creatina na captação da glicose e por quais mecanismos isso ocorre.

Tendo em vista os aspectos discutidos, concluímos que no protocolo adotado, a suplementação de creatina não foi capaz de alterar a homeostasia de glicose em ratos submetidos ou não a atividade física por 4 e 8 semanas.

## **5 Conclusões**

A suplementação de creatina (2% da ração) não foi capaz de aumentar o conteúdo de glicogênio muscular nem melhorar a captação periférica de glicose, em ratos submetidos ou não a atividade física por 4 e 8 semanas. Com base nos resultados conflitantes da literatura, sugerimos que mais estudos com esse objetivo sejam realizados. Enfatizamos ainda que sejam realizadas investigações do efeito da suplementação de creatina na AICAR e ZMP.

## 6 Referências Bibliográficas

- ALSERVER, R.N.; GEORG, R.H.; SUSSMAN, K.E. Stimulation of insulin secretion by guanidinoacetic acid and other guanidine derivatives. **Endocrinology** 86:332-336, 1970.
- ARMSTRONG, R.B. & PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of rat hindlimb, **Am J Anat** 171: 259 – 272, 1984.
- BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. **Acta Physiol Scand** 71: 140-150, 1967
- BERGSTROM, J.; HULTMAN, E. Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. **Nature** 1210: 218-228, 1996
- BRANNON, T.A.; ADAMS, G.R.; CONNIFF, C.L.; BALDWIN, K.M. Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. **Med Sci** 29: 489-495, 1997.
- BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. San Diego, CA: Academic Press Inc., 1994
- CARR, R.D.; BRAND, C.L.; BODVARSDOTTIR, T.B.; HANSEN, J.B.; STURIS, J. NN414, a SUR1/Kir6.2-Selective potassium channel opener, reduces blood glucose and improves glucose tolerance in the VDF Zucker rat. **Diabetes** 52: 2513-2518, 2003
- CASEY, A.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; HOWELL, S.; HULTMAN, E.; GREENHAFF, P.L. Creatine Ingestion Favorably Affects Performance and Muscle Metabolism During Maximal exercise in Humans. **Am. J. Physiol.** 271, E31-E37, 1996.
- CEDDIA, R. and SWEENEY, G. Creatine increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. **J. Physiol** 555:409-421, 2004.
- CORTRIGHT, R.N.; DOHM, G.L. Mechanisms by which insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. **Can J Appl Physiol.** 22(6): 519-530, 1997.
- DEFRONZO, R.A.; JACOT, E.; JEQUIER, E.; MAEDER, E.; WAHREN, J.; FELBER, J.P. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v.30, p. 1000-1007, 1981.

- DERAVE, W.; EIJNDE, B.O.; VERBESSEM,P.; RAMAEKERS, M.; VAN LEEMPUTTE, M.; RICHTER, E.A.; HESPEL,P. Combined creatine and protein supplementation in conjunction with resistance training promotes muscle GLUT4 content and glucose tolerance in humans. **J Appl Physiol.** 94, 1910-1916, 2003.
- ESSEN, B.; JANSSON, E.; HENRIKSSON, J.; TAYLOR, A.W.; SALTIN, B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. **Acta Physiol Scand** 95:153-65, 1976
- FERRANTE, R.J.; ANDREASSEN, O.A.; JENKINS, B.G.; et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci** 20:4389-4397, 2000.
- GRAHAM, A.S.; HATTON, R.C. Creatine: A review of efficacy and safety. **J Am Pharm Assoc** 39(6):803-810, 1999
- GREENHAFF, P.L.; Creatine Supplementation: Recent Developments. **Br. J. Sports Med.** 30, 276-277, 1996.
- GUERRO-ONTIVEROS, M.L.; WLLIMANN, T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. **Mol Cell Biochem** 184 : 427-437, 1998.
- HARDIE, D.G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? **Eur J Biochem.** 246:259-273, 1997. of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, 47: 1369-1373, 1998.
- HARDIE, D.G.; CARLING, D.; CARLSON, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annu Rev Biochem.** 67:821-855, 1987.
- HARDIE, D.G.; Metabolic control: A new solution to an old problem. **Current Biology.** 10:R757-R759, 2000.
- HARDIE, D.G.; SALT, I.P.; HAWLEY, S.A.; DAVIES, S.P. AMP-activated protein kinase: An ultrasensitive system for monitoring cellular energy change. **Biochem J.** 338, 717-722, 1999.
- HARRIS, R.C.; SODERLUND, K.; HULTMAN, E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. **Clin Sci** 83:367-374, 1992.
- HARRIS, RC.; HULTMAN, E.; NORDESJO, L.O. Glycogen, glycolytic intermediates and high-energy phosphates determined in biopsy samples of musculus quadriceps femoris of man at rest. **Methods and variance of values. Scand J Laboratory Invest** 33: 109-120, 1974

- HASSID, W. Z. & ALBRAHAMS, S. **Chemical Procedures for analyses of polisacchardies methods enzimol** 3: 34 – 51, 1957
- HAYASHI, T. et al. Evidence for 5`AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, 47: 1369-1373, 1998.
- HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J.F.P.; GOODYEAR, L.J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **Am J Physicol.** 273, E1039-E1051, 1997.
- HOST, H.H.; HANSEN, P.A.; NOLTE, L.A.; CHEN, M.M.; HOLLOSZY, J.O. Rapid reversal of adaptative increases in muscle GLUT4 and glucose transport capacity after training cessation. **J Appl Physiol.** 84(3): 798-802, 1998.
- HURLBERT, M.S, ZHOU, W.; WASMEIER, C.; KADDIS, F.G.; HUTTON, J.C.; FREED, C.R. Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington`s disease gene develop diabetes. **Diabetes** 48:649-651, 1999
- ISHIDA K, MIZUNO A, MURAKAMI T, SHIMA K. Obesity is necessary but not sufficient for the development of diabetes mellitus. **Metabolism** 45: 1288-95, 1996
- JAMES, D.E. The mammalian facilitative glucose transporter family. **American Physiology Society**, v.10, p.67-71, 1995.
- JEONG-SUN JU. Creatine feeding increases GLUT-4 expression in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 288: E347-E352, 2005
- KANDA, M.; SATOR, K.; ICHIARA, K. Effects of atirvastatin and pravastatin on glucose tolerance in diabetic rats mildly induced by streptozotocin. **Biol Pharm Bull** 26: 1681-1684, 2003
- KUSHMERICK, M.J.; MOERLAND, T.S.; WISEMAN, R.W. Mammslisk skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP and Pi. **Proc Natl Acad Sci** 89: 7521-7525, 1992.
- MARCO J, CALLE C, HEDO JA, et al: Glucagon-releasing activity of guanidine compounds in mouse pancreatic islets. **FEBS Lett** 64:52-54, 1976.
- MATTHEWS JNS, ALTMAN DG, CAMPBELL MJ. ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **B. Med. J** 300: 230-5, 1990.
- MCBRIDE, T.A. and M.A. GREGORY. Effect of creatine supplementation during high resistance training on mass, strength, and fatigue resistance in rat. **Skeletal Muscle.** J. Strength Cond. Res. V.16, n. 3, p.335-342, 2002.

- MCCLUNG, J.M.; HAND, G.A.; CARSON, J.A. Effect of creatine supplementation on cardiac muscle of exercise-stressed rats. **Eur J Appl Physiol** 89: 26-33, 2003.
- MCMILLEN, J.; DONOVAN, C.M.; MESSER, J.I.; WILLIS, W.T. Energetic driving forces are maintained in resting skeletal muscle after dietary creatine supplementation. **J Appl Physiol** 90: 62-66, 2001
- NELSON, A.G.; D.A.ARNALL, J.; KOKKONEN, R. D.; EVANS, J. Muscle Glycogen Supercompensation is enhanced by prior creatine supplementation. **Med Sci Sports Exerc** 33:1096-1100, 2001
- NEWMAN, J.E.; HARGREAVES,M.; GARNHAM,A.; SNOW,R.J. Effect of Creatine Ingestion on Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in Men. **Maed Sci in Sports and Exercise**. 32, 69-74, 2003.
- O`GORMAN, E.; BEUTNER, G.; WALLIMANN, T.; BRDICZKA, D. Differential effects of creatine depletion on regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, brain. **Biochin Biophys Acta** 1276: 161-170, 1996
- ODOM, D.T.; ZIZLSPERGER, N.; GORDON, D.B.; BELL, G.W.; RINALDI, N.J.; MURRAY, H.L.; et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. **Science** 303 (5662):1378-81, 2004
- ODOOM,J. E., G.J. KEMP, AND G. K. RADDA. The regulation of total creatine content in myoblast cell line. **Mol. Cell. Biochem.** 158: 179-188, 1996.
- OP`T EIJINDE B. URSO B. RICHTER EA, et al: Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT 4 protein content after immobilization. **Diabetes** 50: 18-23, 2001b.
- OP`T EIJINDE B., E. A. RICHTER, et alii: Effect of creatine supplementation on creatine and glycongen content in rat skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, 171, 169-176, 2001a.
- OP`T EIJNDE, B.O.; DERAIVE, W.; WOJTASZEWSKI, J.F.P.; RICHTER, E.A.; HESPEL, P. AMP kinase expression and activity in human skeletal muscle: effects of immobilization, retraining, and creatine supplementation. **J Appl Physiol**. 98: 1228-1233, 2005.
- PERSKY, ADAM M. & BRAZEAU, GAYLE A. Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate. **Pharmacol Rev** 53 (2): 161-176, 2001.
- PLOUG, T.; VAN DEURS, B.; AL, H.; CUSHMAN, S.W.; RALSTON, E. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: Identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. **J Cell Biol.** 135: 415-430, 1998.

- REN, J.M.; SEMENKOVICH, C.F.; HOLLOZY, J.O. Adaptation of muscle to creatine depletion: effects on GLUT-4 glucose transporter expression. **American Journal of Physiology** 264:146-150, 1993
- ROBINSON TM, SEWELL DA, HULTMAN E. et al: Role of submaximal exercise in promoting creatine and glycogen accumulation in human skeletal muscle. **J Appl Physiol** 87:598-604, 1999.
- ROONEY, K., J.BRYSON, J. PHUYAL, G. DENYER, I. CATERSON, AND C. THOMPSON. Creatine supplementation alters insulin secretion and glucose homeostasis in vivo. **Metabolism** 51:518-522, 2002.
- SHERMAN, W.M.; COSTIL, D.L. The marathon: dietary manipulation to optimize performance. **Am J Sports Med** 12: 44-51, 1984
- SJORGREEN, B., NORDENKSJOLD, T; HOLMGREN, H. & WOLLERSTRON. J.Beitrag Kentnis des lebenrhythmik. **Pflügers Arch Gesant Physiol Mensch Tice**, 240 – 247, 1938.
- THORELL, A. HIRSHMAN, MF.; NYGREN, J.; JORFELDT, L.; WOJASZEWSKI, J.F. et al. Exercise and insulin cause GLUT-4 translocation in human skeletal muscle. **Am J Physiol** 277: E733 – 741
- VANLOON, L.J.C.; MURPHY, R.; OOSTERLAAR, A.M.; CAMERON-SMITH, D.; HARGREAVES, M.; WAGENMAKERS, A.J.M.; SNOW, R. Creatine supplementation increases glycogen storage but not GLUT-4 expression in human skeletal muscle. **Clin Sci** 106, 99-106, 2004.
- VOLEK, J.S.; RAWSON, E.S. Scientific basis and practical aspects of creatine supplementation for athletes. **Nutrition** 20:609-614, 2004.
- WALKER, J.B. Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 50:177-242, 1979.
- WILLOTT, C.A.; YOUNG, M.E.; LEIGHTON, B. et al. Creatine uptake in isolated soleus muscle: kinetics and dependence on sodium, but not insulin. **Acta Physiol Scand**. 166, 99-104, 1999.
- WOJTASZEWSKI, J.F.P.; JORGENSEN, S. B.; HELLSTEN, Y.; HARDIE, D. G.; RICHTER, E.A. Gycogen-dependent effects of 5`Aminoidazole-4-Carborxamide (AICA)-Riboside on AMP-Activated Protein Kinase and Glycogen Synthase Activities in Rat Skeletal Muscle. **Diabetes** 51: 284-292, 2002
- WRIGHT, D.C.; HUCKER, K.A.; HOLLOSZY, J.O.; HAN, D.H. Ca(2+) and AMPK Both Mediate Stimulation of Glucose Transport by Muscle Contractions. **Diabetes**. 53(2): 330-5.2004.
- WYSS, M & KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev** 80: 1107-1213, 2000

YOUNG, J.C. & YOUNG, R.E. The effects of creatine supplementation on glucose uptake in rat skeletal muscle. **Life Sci** 71: 1731-1737, 2002

ZEISEL, SH. Regulation of "nutraceuticals" [see comments]. *Science* 285: 1853-1855, 1999

## 7 Anexos

Grupos	CS4	SS4	CT4	ST4	CS8	SS8	CT8	ST8
P. Inicial	325,8	333,3	330,8	320,8	332,9	343,8	326,0	328,4
D.P ±	49,8	41,5	52,7	32,7	48,9	37,5	41,4	36,4
n	9	10	6	8	10	8	7	7
E.P±	5,5	4,1	8,8	4,1	4,9	4,7	5,9	5,2

Tabela com o peso médio dos grupos o desvio padrão (D.P) e o erro padrão(E.P). Valores expressos em gramas.

CS4	326	340	367	384	401	420	431
SS4	333	348	374	388	408	428	441
CT4	331	351	371	387	401	418	428
ST4	321	334	350	357	369	384	395
CS8	333	348	378	396	416	424	436
SS8	344	353	378	396	415	419	428
CT8	326	336	364	377	393	409	417
ST8	328	344	369	379	395	413	423
Semanas	1	2	3	4	5	6	7

CS8	451	455	460	479
SS8	446	452	455	462
CT8	436	438	450	457
ST8	435	449	456	464
Semanas	8	9	10	11

Tabela com os pesos médios dos grupos no decorrer da semanas. Valores expressos em gramas.

Grupos	CS4	SS4	CT4	ST4	CS8	SS8	CT8	ST8
Δ Peso	104,9	107,6	96,8	74,1	146,3	118,5	130,7	135,3
D.P±	49,3	36,1	42,8	31,7	47,8	43,4	29,2	34,8
n	9	10	6	8	10	8	7	7
E.P±	5,48	3,61	7,14	3,97	4,78	5,42	4,17	4,97

Tabela da variação de peso entre os grupos. Para os grupos da semana 4, diferença entre a média do peso 7 e peso 1. Para os grupos da semana 8 diferença entre os pesos da semana 11 e semana 1. Valores expressos em gramas. N- número de animais por grupo; DP – Desvio Padrão; EP – Erro médio padrão.

Grupos	CS4	SS4	CT4	ST4	CS8	SS8	CT8	ST8
Área	8625,0	8698,5	8702,5	8610,0	9661,5	9391,9	8652,9	9259,3
D.P ±	563,6	731,7	818,0	782,4	850,3	790,8	587,8	1147,6
n	9	10	6	8	10	8	7	7
E.P±	62,6	73,2	136,3	97,8	85,0	98,8	84,0	163,9

Tabela com valor das áreas médias dos grupos no OGTT. Valores expressos em mg / dl / min.