

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Hamilton Augusto Roschel da Silva



Influência da Suplementação de Creatina na Concentração Sanguínea de Lactato em Ratos Submetidos à Atividade Intermitente Acima do Limiar Metabólico Anaeróbio

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Hamilton Augusto Roschel da Silva e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior

2003

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	80
Nº CHAMADA	UNICAMP
	Si 38i
V	EX
TOMBO BCI	54497
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/10/03
1º CPD	

CM00186753-7

IB ID 295257

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

Silva, Hamilton Augusto Roschel

Influência da suplementação de creatina na concentração sanguínea de lactato em ratos submetidos à atividade intermitente acima do limiar metabólico anaeróbico. / Hamilton Augusto Roschel da Silva. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Antonio Herbert Lancha Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1.Ratos. 2.Lactato. I. Lancha Júnior, Antonio Herbert. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

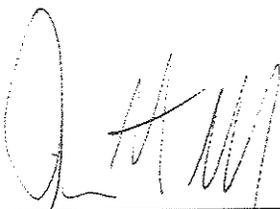
~~S387~~
Si 38i

Data da Defesa: 25 / 02 / 2003.

BANCA EXAMINADORA:

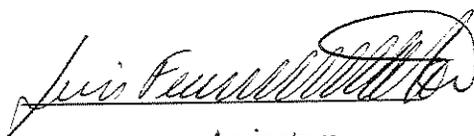
TITULARES:

Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior (Orientador)



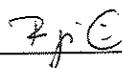
Assinatura

Prof. Dr. Luis Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa



Assinatura

Profª. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch



Assinatura

Profª. Dra. Denise Vaz de Macedo

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Antonio Herbert Lancha Junior pela confiança depositada em mim e compromisso assumido com nosso trabalho. Por motivar-nos pelo exemplo e incentivar nossos sonhos, sempre.

À Camila Sanchez de Freitas, mais do que assumidamente: o amor da minha vida, por ter estado ao meu lado em todos os momentos e dividido a vida comigo enquanto lhe foi possível. Obrigado por dar muito mais sentido à minha vida, hoje e sempre. Para você, com todo amor do mundo...

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por financiar este trabalho e acreditar em nosso potencial (processo nº 99/07678-3).

Aos meus pais, Amilton Roschel da Silva (seu Mirtão) e Nancir Augusto Roschel da Silva (Donanci), por absolutamente tudo que eu possa imaginar e lembrar de agradecer, mas principalmente por serem meus maiores incentivadores além dos maiores exemplos de vida que alguém poderia querer. Às minhas irmãs Juliana Aparecida Augusto Roschel da Silva e Nathalia Augusto Roschel da Silva que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação Marcelo Luis Marquezi, André dos Santos Costa, Letícia Aiko Sawada, Patrícia Lopes Campos, Rachel Pamfilio e Luciana Pereira Oquendo, e aos estagiários Alessandra Whyte Gailey, Renê Drezner, Fabiana Bennati e Desire Coelho além de Fernanda Scagliusi e Viviane Polacow (então estagiárias) pelo auxílio na execução deste trabalho. Sem vocês ele não poderia ter sido realizado.

Ao Professor Doutor Luis Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa (GG) pela amizade e por ter nos recebido em seu laboratório, tendo uma participação fundamental em diversos momentos da execução deste trabalho, tendo nos ajudado em absolutamente tudo que foi necessário. Ao Professor Doutor Eivor Martins Junior

e aos Professores. Ms. Ronaldo e Gabriela Chamusca pelo auxílio nas determinações enzimáticas e pela amizade.

Ao Junior, pela amizade e confiança, por ter me apoiado e compreendido nos momentos em que precisei ao longo deste período de mestrado.

Aos amigos Alexandre Barros Gaspar (Xinxá) Marcelo Luis Marquezi, André dos Santos Costa, Letícia Aiko Sawada, Rachel Pamfilio, Patrícia Lopes Campos, Mariana Klopfer, Luciana Oquendo Pereira, Luciano Lima, Miguel Oliveira, César Jeruseviscius e todos que conviveram comigo ao longo destes anos pela “brodagem” e por me apoiaram em todas, absolutamente todas as horas.

Às secretárias Andréia Vigilato e Marina Andresa da Cruz do Departamento de Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas por nos auxiliar ao longo de todo o período de pós graduação nesta instituição e pela eficiência, carinho e atenção na solução de todos os problemas. A nossa secretária do departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo por fazer o mesmo por nós aqui na USP, obrigado Shirley (Shirloca).

Ao Teahupoo (Tchopo), o cão lambão, pela alegria incondicional em estar comigo, mesmo nos momentos mais “heavy metal” .

Agradeço sobretudo a Deus pela sua proteção divina.

ÍNDICE

RESUMO	pg. ix
ABSTRACT	pg. x
1. INTRODUÇÃO	pg. 1
1.1 Histórico	pg. 2
1.2 Valores de referência da concentração de creatina e sua distribuição	pg. 3
1.2.1 Populações especiais	pg. 4
1.3 Alimentos fonte de creatina	pg. 4
1.4 Características metabólicas	pg. 5
1.4.1 Absorção intestinal e captação pelo tecido muscular	pg. 5
1.4.2 Síntese	pg. 6
1.4.3 Excreção	pg. 6
1.5 Metabolismo energético	pg. 7
1.5.1 Via ATP-CP	pg. 9
1.5.2 Via glicolítica	pg. 10
1.6 Suplementação de creatina	pg. 13
1.6.1 Protocolos de suplementação e aumentos de creatina, CP e TCr	pg. 13
1.6.2 Suplementação e atividade anaeróbia	pg. 14
1.6.3 Suplementação e atividade aeróbia	pg. 17
1.6.4 Suplementação e alteração de composição corporal	pg. 18
1.6.5 Efeitos adversos	pg. 19
1.6.6 Suplementação em ratos	pg. 20
2. OBJETIVOS	pg. 24
3. METODOLOGIA	pg. 25

3.1 Animais	pg. 25
3.2 Teste progressivo descontínuo	pg. 25
3.2.1 Adaptação ao meio líquido	pg. 26
3.2.2 Protocolo de teste	pg. 26
3.2.3 Coletas e dosagens sanguíneas	pg. 26
3.2.4 Determinação do limiar anaeróbio metabólico	pg. 26
3.3 Suplementação	pg. 27
3.4 Procedimento experimental	pg. 27
3.4.1 Protocolo	pg. 27
3.4.2 Eutanásia dos animais e coleta de sangue e tecidos	pg. 28
3.5 Procedimento de dosagens	pg. 28
3.5.1 Dosagens sanguíneas	pg. 28
3.5.1.1 Lactato (método eletroquímico)	pg. 28
3.5.2 Dosagens teciduais	pg. 28
3.5.2.1 Glicogênio muscular e hepático	pg. 28
3.5.2.2 Atividade máxima da enzima citrato sintase CS (E.C. 4.1.3.7)	pg. 29
3.5.2.3 Atividade máxima da enzima fosfofrutoquinase PFK (E.C. 2.7.1.11)	pg. 29
3.5.2.4 Concentração de proteínas nas amostras	pg. 30
3.6 Tratamento estatístico	pg. 30
4. RESULTADOS	pg. 32
4.1 Concentração de lactato ao longo das séries de natação	pg. 32
4.2. Conteúdo de glicogênio hepático	pg. 33
4.3 Conteúdo de glicogênio muscular – sóleo	pg. 34
4.4 Conteúdo de glicogênio muscular – gastrocnêmio	pg. 35
4.5. Atividade enzimática - citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) – sóleo	pg. 36
4.6 Atividade enzimática – citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) – gastrocnêmio	pg. 37

4.7 Atividade enzimática – fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11) – sóleo	pg. 38
4.8 Atividade enzimática – fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11) – gastrocnêmio	pg. 39
4.9 Peso dos animais após o período de suplementação	pg. 40
5. DISCUSSÃO	pg. 42
6. CONCLUSÃO	pg. 51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pg. 52

RESUMO

A suplementação de creatina tem sido amplamente utilizada entre atletas e praticantes de atividade física com o intuito de melhorar o rendimento em atividades físicas de alta intensidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da suplementação de creatina sobre a concentração sanguínea de lactato, o conteúdo de glicogênio muscular (sóleo e fígado) e hepático de glicogênio além das atividades máximas das enzimas citrato sintase e fosfofrutoquinase (sóleo e gastrocnêmio) em ratos submetidos a atividade intermitente acima do limiar metabólico anaeróbico. Os animais foram divididos em 2 grupos, controle (CTL) e suplemento (SPL), e após 5 dias de suplementação (0,3g/kg de peso), os mesmos foram submetidos à 6 repetições de 30 segundos de natação acima do limiar metabólico anaeróbico. As concentrações de lactato sanguíneo mostraram-se significativamente menores ($p < 0,05$) para o grupo SPL nas repetições 3,4,5 e 6. Não foram encontradas diferenças entre os grupos para o conteúdo de glicogênio e atividade máxima das enzimas em nenhum dos tecidos analisados. Sugerimos que a ressíntese aumentada de creatina fosfato em períodos de repouso bem como a maior disponibilidade do conteúdo total de creatina poderiam, em última análise, tamponar o acúmulo de ADP e H^+ , gerando menor dependência da glicólise anaeróbica e em consequência, a menor concentração de lactato observada.

ABSTRACT

Influence of Creatine Supplementation on Blood Lactate Concentration in Rats Submitted to Intermittent Swimming Exercise Above the Metabolic Anaerobic Threshold.

Creatine supplementation has been spread out among athletes and physical active people with the purpose of improving performance during high intensity exercises. The aim of this study was to evaluate the influence of creatine supplementation on blood lactate concentration and glycogen content (liver, soleus, and gastrocnemius) and maximal enzyme activity – phosphofructokinase and cytrate synthase (soleus, gastrocnemius) in rats submitted to intermittent swimming exercise above the metabolic anaerobic threshold. Animals were divided in two groups, control (CTL) and supplement (SPL), and after 5 days of creatine supplementation (0,3g/kg BW), all animals performed 6 bouts of 30s swimming exercise above the metabolic anaerobic threshold. Blood lactate concentrations were significantly lower ($p < 0,05$) for the SPL group on bouts 3,4,5, and 6. No differences were observed for any other parameter analyzed between groups. The possible mechanisms responsible for the lower blood lactate concentration are greater availability of total creatine content and increased creatine phosphate resynthesis during rest periods, thus buffering H^+ ions and ADP accumulation, which could reflect in lesser reliance on anaerobic glycolysis with lower lactate production.

1. INTRODUÇÃO

Vários são os motivos pelos quais os indivíduos são levados à prática de atividades físicas. Alguns o fazem visando melhora da saúde ou prevenção de doenças, outros pelo fator estético vinculado às adaptações oriundas desta prática e finalmente tem-se os atletas, os quais tem como principal objetivo o desempenho máximo em competições esportivas.

Com a crescente necessidade de se melhorar o desempenho de atletas, cada vez mais tenta-se criar estratégias para a mudança da composição corporal ou alteração do metabolismo destes indivíduos a fim de se obter melhor rendimento.

Uma grande variedade de produtos contendo os mais diferentes nutrientes são introduzidos no mercado freqüentemente. Entre eles, podemos destacar a creatina, a qual atualmente, é amplamente utilizada seja por atletas ou simplesmente por indivíduos engajados na prática regular de atividade física.

Mesmo com o avanço nas pesquisas, ainda existem questionamentos sobre os verdadeiros efeitos da suplementação de creatina na dieta de atletas ou indivíduos ativos, de forma que o uso indiscriminado desta substância gera preocupação na comunidade científica com relação aos seus reais efeitos.

Várias modalidades esportivas exigem períodos intermitentes de exercícios em alta intensidade, com intervalos de recuperação variados entre estímulos subseqüentes, onde a capacidade de recuperar-se é essencial para o sucesso nas próximas execuções do mesmo exercício.

A adenosina tri-fosfato (ATP) é a fonte imediata de energia disponível para a manutenção da homeostase da célula muscular e de sua função contrátil. Sua concentração absoluta no músculo esquelético é extremamente limitada (aproximadamente 24 mmol/Kg de músculo seco), sendo esta insuficiente para suprir a demanda energética durante o exercício (GREENHAFF et al., 1998).

A manutenção da oferta de energia, e portanto a continuidade do exercício, ocorre através da ressíntese de ATP, determinada pelo equilíbrio dinâmico entre as suas taxas de consumo e síntese, por meio de diferentes sistemas.

No exercício realizado com intensidade acima do limiar anaeróbio (ou de intensidade supra-limiar anaeróbio), a demanda energética é extremamente alta, superior a 11 mmol ATP/Kg músculo seco/seg (GREENHAFF et al., 1998). Nestas circunstâncias, a ressíntese de ATP ocorre preferencialmente através de mecanismos anaeróbios ou imediatos (degradação de creatina fosfato e a hidrólise de glicogênio a lactato), e seus produtos finais (lactato, íons H^+) determinam a fadiga.

Recentemente tem sido atribuído à suplementação de creatina, um efeito ergogênico para atividades intermitentes de alta intensidade. Supõe-se que isto se dê através da ressíntese aumentada de creatina fosfato (CP) em períodos de recuperação e pela maior disponibilidade de creatina fosfato ao iniciar a atividade além da menor acidose intracelular que é gerada pelo acúmulo de íons H^+ . Alguns trabalhos demonstram a melhora do desempenho em atividades desta natureza a partir da suplementação de creatina, porém poucos são os que buscam verificar a origem metabólica deste efeito.

1.1 Histórico

A creatina, ou ácido metil guanidino acético, uma amina nitrogenada, é um constituinte natural encontrado em alguns alimentos. Esta foi descoberta em 1832 pelo pesquisador francês Miguel Eugene Chevrul, o qual extraiu um novo constituinte a partir de amostras de carne e o chamou de creatina. Mais tarde em 1847, Justus von Liebig confirmou a ocorrência regular de creatina como constituinte de carne animal. Já em 1880, foi encontrada na urina uma substância chamada de creatinina, a ser mais tarde reconhecida como derivada da creatina, tratando-se da sua forma degradada a ser excretada (BALSOM et al., 1994).

Em 1912 e 1914, apesar da dificuldade na extração da creatina a partir de carne fresca, Folin e Denis já estudavam os efeitos da suplementação de creatina no conteúdo total de creatina (TCr) em gatos, verificando aumento de até 70% no mesmo.

A creatina fosfato, sua forma fosforilada, foi descoberta em 1927 por Fiske & Subbarow em gatos, os quais verificaram a diminuição do seu conteúdo ao final de

uma sessão de eletro-estimulação, vindo a reaparecer apenas durante o período de recuperação subsequente.

Creatina quinase (CK) (E.C. 2.7.3.2) enzima que catalisa a hidrólise da creatina fosfato foi descoberta em 1934, e em 1968 com o advento da técnica de biópsia muscular para extração de amostras de tecido muscular em humanos, pesquisadores suecos investigaram o papel da creatina fosfato na recuperação do exercício (WILLIAMS et al., 1999).

Atualmente, a ressonância magnética nuclear tem sido bastante utilizada para o estudo da dinâmica da creatina fosfato na musculatura esquelética por se tratar de um método não invasivo. Entretanto, desde 1940 já se teorizava que a suplementação de gelatina, a qual é composta em 25% por glicina, um dos três aminoácidos envolvidos na síntese de creatina, possuiria efeito ergogênico, possivelmente através do aumento do conteúdo muscular de creatina fosfato.

1.2 Valores de referência da concentração de creatina e sua distribuição

A creatina é encontrada em 95% do seu conteúdo na musculatura esquelética, e dos 5% restantes, a maior parte pode ser encontrada no coração, cérebro e testículos. Na musculatura esquelética, creatina fosfato constitui cerca de dois terços do TCr.

Mais recentemente, tem-se definido que o TCr no corpo humano é de aproximadamente 120g, e no músculo esquelético ela está presente numa concentração de aproximadamente 125 mmol/Kg de músculo seco, podendo variar entre 100 e 160mmol/Kg de músculo seco (GREEN et al., 1996). Ela é encontrada de forma abundante em fibras musculares de contração rápida, apresentando concentrações cerca de 45% e 55% maiores do que em fibras musculares de contração lenta e cardíacas respectivamente (GREENHAFF, 1996a).

Não existem evidências que sugiram a existência de diferenças no TCr entre homens e mulheres (REHUNEN et al., 1980). Já com relação ao envelhecimento, também não se verificou diferença no TCr, embora os idosos apresentassem menor

conteúdo de creatina fosfato e maior conteúdo de creatina na forma livre quando comparado com indivíduos mais jovens. Isto se deve possivelmente ao estado de inatividade física comumente observado na população idosa, pois em um grupo de idosos submetidos a treinamento, os valores de TCr, creatina fosfato e creatina livre se aproximavam bastante aos observados nos indivíduos mais jovens (MÖLLER et al., 1980).

1.2.1 Populações especiais

Uma população que apresenta alterações nas concentrações normais de creatina são os vegetarianos. DELANGHE et al. (1989) relatam menor TCr para esta população, uma vez que estes dependem quase exclusivamente da síntese endógena devido ao baixíssimo consumo de creatina na dieta como consequência da restrição da ingestão de carne.

Algumas doenças podem acarretar em anormalidades no TCr, BALSOM et al. (1994) citam que no começo do século observou-se menor retenção de creatina em pacientes portadores de doenças musculares quando comparados com indivíduos normais. Menores conteúdos de creatina fosfato e creatina livre do que os normais foram observados em pacientes com doenças musculares, artrites reumatóides, fibromialgias e portadores de doenças circulatórias crônicas ou agudas além de portadores de problemas respiratórios.

1.3 Alimentos fonte de creatina

Como visto anteriormente, a creatina é encontrada primordialmente na musculatura esquelética de vertebrados, portanto a principal fonte são os peixes e carnes vermelhas. BALSOM et al. (1994) citam a existência de traços de creatina em algumas plantas. Segundo WILLIAMS et al. (1999) encontra-se de 3 a 5g de creatina por Kg de peixe cru ou carne vermelha. Entretanto, o processo de cozimento pode acarretar na degradação de parte desta creatina. Portanto, o conteúdo de creatina disponível em alguns alimentos pode estar vinculado ao método de preparo do mesmo.

1.4 Características metabólicas

1.4.1 Absorção intestinal e captação pelo tecido muscular

Segundo CLARK (1996) a creatina consumida oralmente é absorvida intacta pelo epitélio intestinal, entrando na circulação sem sofrer qualquer ação da secreção ácida gastrointestinal durante o processo digestivo.

Depois de absorvida, a creatina plasmática é distribuída para vários tecidos, principalmente para a musculatura esquelética como citado anteriormente. Segundo CLARK (1998) a concentração celular de creatina é dependente da capacidade da célula em assimilar a creatina plasmática uma vez que não existe síntese da mesma no tecido muscular. Dois são os mecanismos propostos para explicar altas concentrações de creatina muscular. O primeiro estaria relacionado com o transporte da creatina para dentro do músculo por um processo ativo saturável sódio dependente específico e segundo pelo aprisionamento de creatina dentro do músculo (FITCH et al., 1966). Estes mesmos autores citam ainda que a creatina entra no músculo ativamente contra um gradiente de concentração, possivelmente envolvendo a interação da creatina com um sítio específico de membrana que reconheceria o grupamento amínico específico (GREENHAFF, 1997). GREENHAFF et al. (1996c) citam a identificação de um transportador específico de creatina no cérebro e em músculos esquelético e cardíaco de ratos.

Alguns autores sugerem que a captação da creatina pelo músculo possa ser mediada pela insulina. GREEN et al. (1996) observaram que a ingestão de carboidratos (95g) durante o período de suplementação de creatina (5g) provocou aumento na retenção desta, provavelmente devido à ação da insulina liberada pelo aumento na concentração de glicose, aumentando a captação de creatina. HARRIS et al. (1992) demonstraram que a captação de creatina é aumentada quando se executa um exercício submáximo antes da ingestão de creatina. Sugere-se que este aumento na captação esteja relacionado ao aumento na sensibilidade à insulina provocado pelo exercício, uma vez que na presença deste hormônio observa-se a captação aumentada de creatina em músculo esquelético de ratos, e quando

combina-se o exercício submáximo e a suplementação de creatina à ingestão de carboidratos, não observa-se nenhum efeito somativo, sugerindo que a ação do exercício estaria mascarada pela ingestão de carboidratos (GREEN et al., 1996).

1.4.2 Síntese

Além de estar presente na dieta, ela também é sintetizada endogenamente no fígado e pâncreas, e uma vez que cerca de 95% do seu conteúdo se encontra no músculo, existe uma separação entre sua biosíntese e utilização (BALSOM et al., 1994).

A síntese endógena de creatina envolve duas reações sucessivas as quais dependem de duas enzimas. A primeira reação é catalisada pela enzima glicina transaminase (*E.C. 2.6.1.4*), a qual promove a transferência reversível de um grupamento amínico oriundo da arginina para a glicina, formando o ácido guanidinoacético. A segunda reação envolve a transferência irreversível de um grupo metil proveniente da S-adenosilmetionina catalisada pela enzima guanidinoacetato metiltransferase (*E.C. 2.1.1.2*), resultando na metilação do guanidinoacetato e na formação da creatina (GREENHAFF et al., 1996b). A Figura 1 mostra as vias bioquímicas da síntese de creatina.

1.4.3 Excreção

BRODY (1994) cita que cerca de 1,6% do TCr é degradado diariamente de forma espontânea (não enzimática), gerando creatinina. Esta creatinina entra na circulação sanguínea e é excretada pelos rins na urina.

Estimando-se um indivíduo com peso corporal de 70Kg com TCr de aproximadamente 120g, a quantidade de creatina degradada a creatinina corresponderia a aproximadamente 2g por dia (BALSOM et al., 1994), entretanto este valor pode variar consideravelmente dependendo da massa muscular do indivíduo em questão.

LONG et al. (1990) citam que a concentração de creatinina excretada pode aumentar em resposta ao exercício intenso. Esta creatina é reposta no organismo através da síntese endógena ou de fontes exógenas como já vimos.

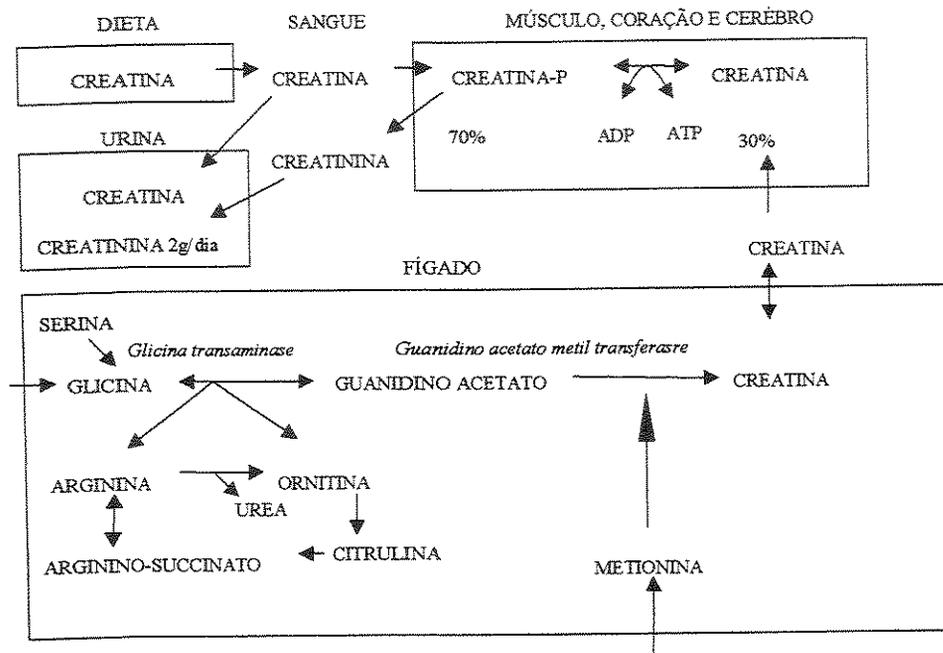


Figura 1. Ilustração das vias bioquímicas de síntese de creatina (Modificado de GREENHAFF et al., 1996b).

1.5 Metabolismo energético

Durante o exercício realizado com intensidade acima do limiar anaeróbio (intensidade supra-limiar) a manutenção da demanda energética é realizada por mecanismos não oxidativos - degradação de fosfagênios (CP), glicogenólise e glicólise - ocorrendo elevada ativação de fibras musculares do tipo II (SKINNER et al., 1980).

A produção de energia através do metabolismo anaeróbio, no qual as vias ATP-CP e glicolítica atuam conjuntamente, é essencial para a manutenção da atividade de alta intensidade, na qual a demanda de adenosina trifosfato (ATP) é maior do que a capacidade de produção pela via aeróbia.

A taxa em que as vias anaeróbias produzem ATP são determinantes para o desenvolvimento e manutenção de uma atividade de alta intensidade. Alguns estudos tentam estimar a capacidade de provisão de ATP pelas vias anaeróbias. Isto é feito através de dosagens de substratos e de alterações metabólicas em amostras colhidas por técnica de biópsia muscular após uma atividade intensa e de curta duração (GREENHAFF et al., 1996b). A Tabela 1 mostra a produção de ATP de cada via anaeróbia relativa à duração da estimulação.

Pode-se observar que a taxa de produção de ATP pelas vias anaeróbias declina com o prolongamento da atividade, e ambas as vias são ativadas simultaneamente com o início da atividade, atingindo contudo, seus picos em momentos diferentes.

O ponto de maior produção de ATP por ambas as vias (ATP-CP e glicólise) em atividades máximas ou próximas do máximo acontecem nos 10 segundos iniciais de exercício. Com 30 segundos de atividade, os estoques de creatina fosfato já se encontram bastante reduzidos e a via glicolítica tem sua atividade diminuída em aproximadamente 50% quando comparado aos 10 segundos iniciais.

Tabela 1. Taxa de produção de ATP a partir de creatina fosfato e glicólise durante ação muscular máxima em humanos.

Duração do estímulo (s)	Produção de ATP ($\text{mmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	
	ATP-CP	Glicólise
0 – 1.3	9.0	2.0
0 – 2.6	7.5	4.3
0 – 5.0	5.3	4.4
0 – 10	4.2	4.5
10 – 20	2.2	4.5
20 - 30	0.2	2.1

Modificado de GREENHAFF et al., (1996b).

1.5.1 Via ATP-CP

A via ATP-CP, ou seja, a mobilização de fosfagênios é o mecanismo mais simples para a geração de ATP. Ela ocorre através de uma reação que não requer a utilização de O₂ e pode ser escrita da seguinte forma:



A creatina é necessária para a formação de creatina fosfato na mitocôndria, a qual é utilizada na ressíntese de ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) no citosol. Observa-se portanto, uma troca constante de creatina entre o citosol e a mitocôndria; esse mecanismo de ressíntese de ATP citosólico e mitocondrial bem como a estabilização do conteúdo de creatina fosfato no citosol é assegurada pela lançadeira creatina fosfato, mantendo a disponibilidade de ATP intracelular e tamponando o acúmulo de íons de hidrogênio durante a atividade. A Figura 2 ilustra a lançadeira creatina fosfato.

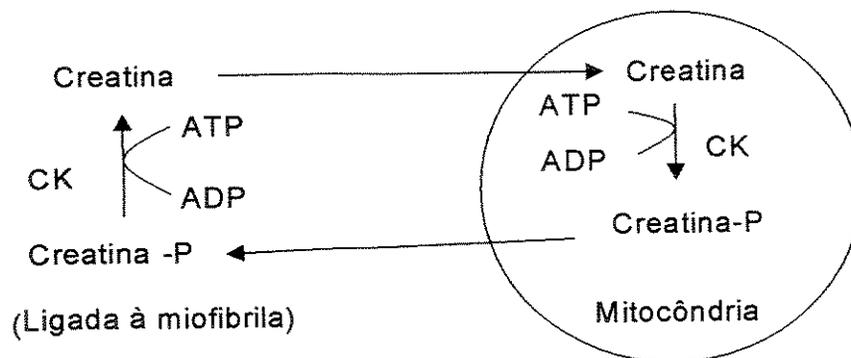


Figura 2. Ilustração da lançadeira creatina fosfato (BRODY, 1994).

Ambas as reações da via ATP-CP, como podemos ver na figura 2 são catalisadas pela enzima creatina quinase (*E.C. 2.7.3.2*): a conversão da creatina fosfato ligada a miofibrila para creatina com consequente ressíntese de ATP, e a ressíntese de creatina fosfato na mitocôndria a partir da formação de ADP. BESSMAN et al. (1990) citam que a creatina quinase (*E.C. 2.7.3.2*) é encontrada em vários sítios de utilização de ATP, tais como retículo sarcoplasmático e ribossomos,

existindo uma forte interação entre creatina quinase (*E.C. 2.7.3.2*) e os sítios de utilização e produção de ATP, onde o produto de um é usado como substrato pelo outro. Por exemplo, no sítio mitocondrial, o ATP nascente produzido pela fosforilação oxidativa mitocondrial tem acesso mais favorável a creatina quinase (*E.C. 2.7.3.2*) mitocondrial para a ressíntese de creatina fosfato do que o ATP extra-mitocondrial. Já nos sítios miofibrilares, o ATP produzido a partir da refosforilação do ADP pela ação da creatina quinase (*E.C. 2.7.3.2*) na creatina fosfato tem maior acesso a ATPase miofibrilar do que o ATP oriundo de outros sítios celulares (BESSMAN et al., 1990). Alguns autores atribuem a creatina, um papel de acceptor de ATP mitocondrial, exercendo algum tipo de regulação na sua produção (MEYER et al., 1984).

1.5.2 Via glicolítica

A glicólise envolve maior número de reações do que a degradação de creatina fosfato, porém, quando comparada com o tempo necessário para o início da fosforilação oxidativa (1segundo e 15 - 20 segundos respectivamente), a via glicolítica é ainda um meio bastante rápido para a manutenção da disponibilidade de ATP (GREENHAFF et al. 1998).

Esta via como vimos anteriormente, é rapidamente solicitada durante atividades intensas, produzindo rápida ressíntese de ATP, e conta com maior capacidade de produção de ATP do que a degradação de creatina fosfato. Isto é devido ao estoque de substrato necessário para a mesma, a qual é encontrada no organismo na forma de glicogênio. O glicogênio está presente no fígado e no tecido muscular, sendo o último a principal fonte de substrato para a via glicolítica e produção de ATP em atividades intensas, nas quais ele é degradado a lactato em um mecanismo de regeneração de NAD^+ (adenina nicotinamida dinucleotídeo), permitindo a manutenção do fluxo pela glicólise.

Como se pode observar, existe uma interação entre as vias anaeróbias de produção de ATP, pois com a rápida queda na capacidade de ressíntese de ATP a partir da creatina fosfato, fica evidente que para a manutenção da atividade, a via glicolítica deve estar ativada intensamente logo após o início da atividade. A ativação pelo Ca^{2+} necessária para a ação muscular, e o acúmulo de produtos da hidrólise de

ATP e CP, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), amônia (NH₃) e fosfato inorgânico (Pi) agem como estimuladores desta via, resultando na produção glicolítica de ATP (GREENHAFF et al., 1998).

Assim como a via ATP-CP, a glicólise tem uma capacidade de provisão de ATP limitada, embora esta, como já vimos, seja superior à degradação de fosfagênios.

Segundo LAMB (1983) a fadiga desenvolvida durante o exercício intenso e de curta duração está relacionada às elevadas concentrações de lactato resultantes da hidrólise do glicogênio, devido às características enzimáticas das fibras musculares ativadas (fibras do tipo II), as quais contam com elevadas concentrações de enzimas fosforilase (*E.C. 2.4.1.1*), fosfofrutoquinase (*E.C. 2.7.1.11*) e a isoenzima M da lactato desidrogenase (*E.C. 1.1.1.27*) – apresentando como consequência, grande capacidade de síntese de lactato (TESCH, 1980 e VITTASALO et al., 1980).

Alguns autores observaram que o desenvolvimento da fadiga é proporcional à concentração de H⁺ intramuscular gerado pela dissociação do ácido láctico em lactato e H⁺, causando alterações no pH (DAWSON et al, 1978).

(KARLSSON, 1971 e METZGER et al., 1987) citam quedas no pH para valores entre 6,3 e 6,6 após exercícios com intensidades superiores a 70% do VO₂ máximo.

A fadiga associada com o baixo pH intramuscular pode ser atribuída em grande parte pela inibição enzimática da glicogenólise e glicólise, com subsequente interrupção do suprimento de energia (KARLSSON, 1971; GOLLNICK et al., 1973; CHASIOSTIS, 1983; SPRIET, 1995 e HARGREAVES et al., 1998).

O aumento nas concentrações de IMP é um dos melhores indicadores do desbalanço entre as vias de utilização e ressíntese de ATP (HOCHACHKA et al., 1992).

GREENHAFF et al. (1998) citam ainda que a regulação da degradação de glicogênio está associada com as concentrações de AMP e IMP. A diminuição da concentração citoplasmática de AMP ocorre devido à diminuição na taxa de formação de ADP. O aumento na atividade da enzima AMP deaminase (*E.C. 3.5.4.6*), que catalisa a deaminação de AMP a IMP é estimulada por alterações no pH. Isto resulta na diminuição da ativação da fosforilase *a* (*E.C. 2.4.1.1*) e por conseguinte, da

glicólise e glicogenólise, devido à falta de substrato necessário para a ressíntese de ATP e não pela falta de estimuladores da via.

Alterações no pH podem causar ainda, alterações da afinidade nas interações entre os filamentos de actina e miosina, diminuindo o número de pontes cruzadas ativadas, diminuindo assim a força desenvolvida pela musculatura (EDMAN et al., 1990 e LANNERGREN et al., 1991). A elevada concentração de H^+ , assim como Mg^{2+}/ADP e P_i - produtos da hidrólise de ATP - reduzem a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, competindo pelos sítios de ativação da troponina (COOKE et al., 1988) prejudicando a ação muscular.

A Figura 3 mostra a via glicolítica e seus estimuladores e inibidores.

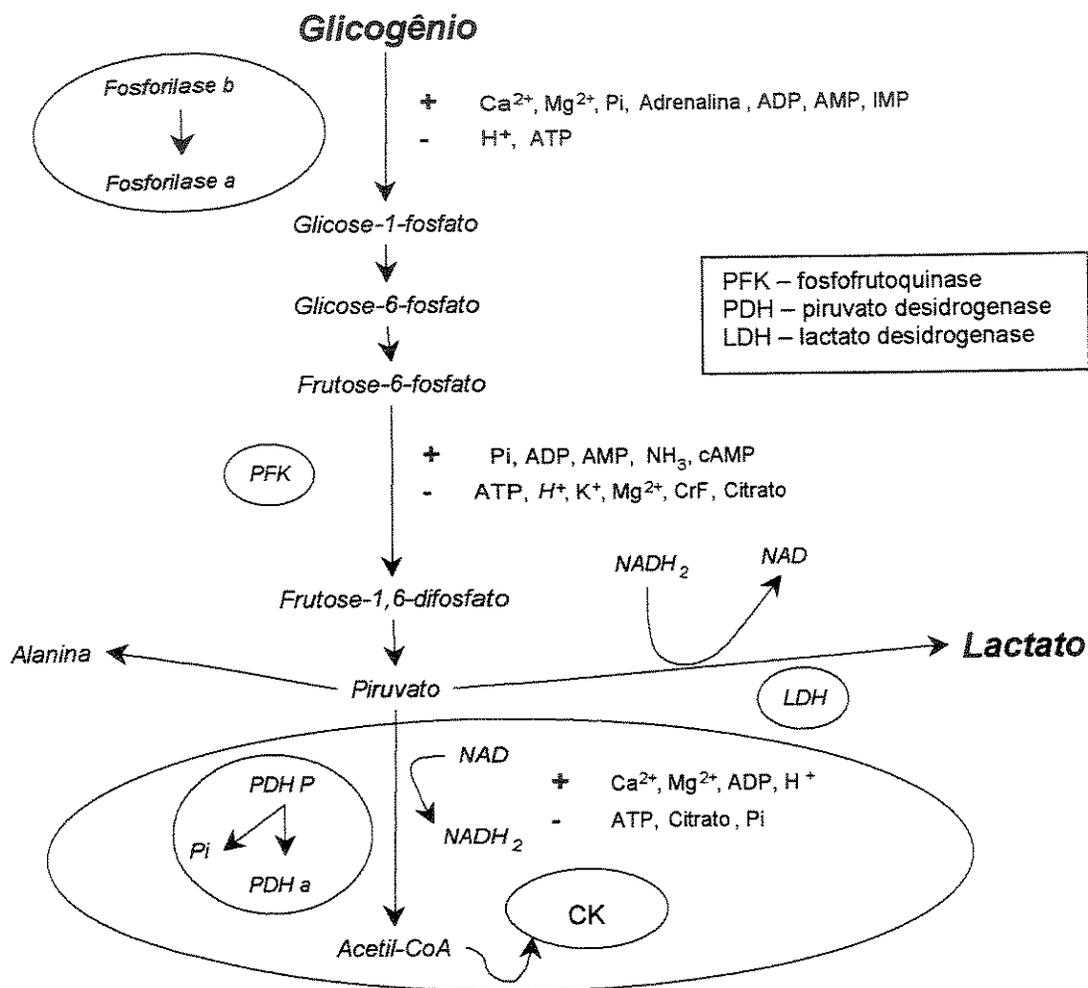


Figura 3. Ilustração da via glicolítica.

1.6 Suplementação de creatina

1.6.1 Protocolos de suplementação e aumento de creatina, CP e TCr

HARRIS et al. (1992) demonstraram que a suplementação oral de creatina poderia resultar em um aumento significativo no TCr e creatina fosfato em músculo esquelético de humanos.

Mais recentemente, vários autores verificaram este mesmo aumento a partir da suplementação de diferentes quantidades de creatina por diferentes períodos de tempo.

HARRIS et al. (1992) e GREENHAFF et al. (1994) relatam que a partir da ingestão de 20g diárias de creatina divididas em 4 doses de 5g ao longo do dia por aproximadamente 5 dias observa-se um aumento médio de 20% no TCr, sendo que aproximadamente 20% se dá na forma de creatina fosfato.

Estes dados estão de acordo com o estudo realizado por HULTMAN et al. (1996) no qual 20g de creatina por 6 dias resultaram em aumento de 20% no TCr. Estes mesmos autores submeteram sua amostra à ingestão de 3g de creatina por dia durante 28 dias, observando aumento semelhante de aproximadamente 20% no TCr ao final deste período.

Outros estudos falharam em verificar aumento no TCr a partir da suplementação de creatina. THOMPSON et al. (1996) citam que a ingestão de 2g diários por 6 semanas não foi suficiente para produzir tal aumento. ODLAND et al. (1997) também não observaram aumento após a ingestão de 20g de creatina por 3 dias. Esta baixa captação de creatina pode estar relacionada a sua baixa ingestão, a qual pode ter sido suficiente para equiparar-se à degradação diária, mas não para promover o aumento no TCr (MUJICA et al. 1997).

WILLIAMS et al. (1999) publicaram uma tabela sumária de vários trabalhos relevantes com relação aos protocolos de suplementação de creatina.

O protocolo de suplementação de creatina mais utilizado para promover aumento no TCr é a partir da ingestão diária de 20-30g de creatina em 4 doses iguais de 5-7g dissolvidas em 250ml de solução ao longo do dia, tipicamente pela manhã, meio-dia, a tarde e à noite por um período de 5 a 7 dias. Quando toma-se por base o

peso corporal, 0,3g/Kg de por um período de 5-7 dias parece ser o protocolo de suplementação mais eficiente.

Vale lembrar que, como mencionado acima, a suplementação de creatina associada à ingestão de carboidratos aumenta o transporte para dentro do músculo, mesmo nos indivíduos com alto conteúdo de creatina (GREEN et al., 1996), uma vez que GREENHAFF (1995) cita parecer existir uma concentração intracelular total ótima ou máxima de creatina por volta de 150-160mmol/Kg.

Entretanto, HARRIS et al. (1992) e GREENHAFF et al. (1996c) relatam que o aumento na concentração total de creatina após o período de suplementação está inversamente relacionado à concentração inicial de creatina. GREENHAFF (1996a) cita ainda o conceito de indivíduos responsivos e não responsivos à suplementação. Como mencionado anteriormente, o aumento médio no TCr é de aproximadamente 20%. GREENHAFF (1996a) define como não responsivos aqueles indivíduos que apresentam aumento no TCr menor do que 10mmol/Kg músculo seco (8%) após a suplementação de 20g/dia por 5 dias. O mesmo autor em outro estudo cita ainda que 20-30% dos indivíduos são não responsivos (GREENHAFF et al., 1996d).

HULTMAN et al. (1996) e MUJIKI et al. (1997) observaram também, que o conteúdo aumentado de creatina após a suplementação pode ser mantido a partir da ingestão de 2g por dia de creatina. HULTMAN et al. (1996) citam ainda que as concentrações musculares de creatina voltam ao normal após 30 dias da interrupção da suplementação.

1.6.2 Suplementação e atividade anaeróbia

WILLIAMS et al. (1999) citam que em atividades de alta intensidade e curta duração, a fadiga está relacionada à incapacidade de se manter a ressíntese de ATP na taxa necessária, principalmente em fibras do tipo II. Sugere-se que isto é devido à rápida depleção do conteúdo de creatina fosfato e a uma taxa de produção de ATP pela via glicolítica insuficiente para compensar a queda na produção de ATP, causando diminuição na capacidade de produção de força.

Uma vez que a creatina fosfato é o substrato necessário para esse sistema, parece razoável teorizar a melhora no desempenho neste tipo de atividade a partir da suplementação de creatina.

Vários autores verificaram a melhora no desempenho em atividades de alta intensidade (supra-limiar metabólico anaeróbico) e curta duração (até 30 segundos) com a suplementação de creatina.

AASERUD et al. (1998) citam que a suplementação de creatina resultou em atraso da instalação do processo de fadiga durante 8 *sprints* máximos de 40m, com intervalos de 25 segundos de recuperação em jogadores de handebol. Schneider et al. (1997), verificaram a melhora no desempenho em um protocolo máximo de 5 repetições de 15 segundos de cicloergometria após a suplementação de creatina.

KREIDER et al. (1998b) citam que após o período de suplementação, observou-se melhora do desempenho em 12 repetições de 6 segundos de *sprints* máximos. PEYREBRUNE et al. (1998) verificaram ainda a melhora no desempenho em 8 repetições de 50m de natação em atletas.

Outros trabalhos também relatam melhora do desempenho em protocolos que utilizam exercícios contra resistência. VOLEK et al. (1997) observaram melhora durante séries repetidas de supino e agachamento seguido de salto após a suplementação de creatina. VANDENBERGHE et al. (1997) também relatam melhora na capacidade de desempenhar exercícios máximos contra resistência de forma intermitente para os músculos flexores do cotovelo em mulheres.

KREIDER et al. (1998b) citam ainda aumento no volume total de treino em um protocolo de exercícios contra resistência (soma do volume final de 3 exercícios propostos) em jogadores universitários de futebol americano após o período de suplementação.

PREEN et al. (2001) observaram melhora no desempenho (trabalho total realizado e potência de pico), em 14 indivíduos ativos submetidos à suplementação de creatina e 10 séries de 5x6 segundos de *sprints* máximos no cicloergômetro com intervalos de recuperação variando entre 24 e 84 segundos.

VOLEK et al. (2001) realizaram 3 séries de 10 segundos de *sprints* máximos em cicloergômetro em alta temperatura (câmara hermética à 37° C e 80% de

umidade relativa do ar) antes e após suplementação de creatina e verificou aumento da performance no grupo suplementado.

ZIEGENFUSS et al. (2002) relatam aumento no trabalho total e potência de pico desempenhados por atletas universitários americanos submetidos a 3 dias de suplementação de creatina e 6 repetições de 10 segundos de *sprints* em cicloergômetro interespçados por 60 segundos de recuperação.

WILLIAMS et al. (1999) publicaram uma tabela com o resumo de alguns trabalhos realizados tentando verificar a influência da suplementação de creatina no desempenho em atividades anaeróbias. Os mesmos autores citam ainda que dos oitenta estudos, por eles analisados, realizados para verificar o efeito da suplementação no desempenho em atividades que dependam primordialmente da via ATP-CP, cinquenta demonstraram existir efeito ergogênico, sendo a maior incidência de resultados positivos em atividades de cicloergometria, produção de torque isocinético e produção de força isotônica.

Estes resultados foram quase que em sua totalidade obtidos em situações laboratoriais, entretanto parece existir efeito ergogênico neste tipo de atividade com a suplementação de creatina. No que concerne a situações em campo, mais estudos com melhor controle nas variáveis intervenientes são necessários.

Poucos são os estudos de campo como o realizado por COX et al. (2002). Neste os autores utilizaram jogadoras de elite de futebol de campo em uma simulação de jogo composta por diferentes tarefas desempenhadas de maneira intermitente. Após o período de suplementação de creatina de 6 dias, observou-se melhora no desempenho em *sprints* e testes de agilidade simulando uma partida de futebol. ROMER et al. (2001) utilizaram jogadores de *squash* em uma simulação de partida de *squash* (espelho, ou seja, sem adversário) que consistia em 10 séries de 2 repetições de posições de jogo interespçadas por 30 segundos de recuperação passiva. Após 5 dias de suplementação de creatina, observou-se diminuição no tempo total de conclusão do exercício, evidenciando seu efeito ergogênico.

Outros estudos buscaram verificar a influência da suplementação de creatina em atividades anaeróbias com duração acima de 30 segundos, dependentes primordialmente da glicólise anaeróbia. Pesquisadores teorizavam que com a

suplementação de creatina, poderia ocorrer menor produção de lactato, diminuição da acidose e menor dependência da glicólise anaeróbia.

JACOBS et al. (1997) citam efeito ergogênico em cicloergometria supra-limiar até a exaustão. NELSON et al. (1997) citam aumento no limiar anaeróbio em cicloergometria progressiva após a suplementação. BOSCO et al. (1997) relatam melhora de 13% no tempo de exaustão em corrida na esteira à velocidade constante. VIRU et al. (1994) citam melhora no tempo total em 4 séries de 300m após a suplementação de creatina.

Os relatos de efeito ergogênico para atividades intensas (anaeróbias) mais prolongadas (entre 30 e 150 segundos), são mais frequentes em situações laboratoriais, mas embora mais estudos sejam necessários, parece existir efeito ergogênico para atividades que dependam primordialmente da glicólise anaeróbia para produção de ATP com a suplementação de creatina.

Com relação ao desempenho em uma única repetição máxima, a suplementação de creatina parece não apresentar nenhum efeito ergogênico (FEBBRAIO et al., 1995; MUJICA et al., 1996; ODLAND et al., 1997; PEYREBRUNE et al., 1998 e SNOW et al., 1998). WILLIAMS et al. (1999) citam que isto se deve à alteração do custo energético da produção de força pelo músculo (custo de ATP para ação muscular) com o início da atividade pelo aumento na concentração de creatina fosfato.

1.6.3 Suplementação e atividade aeróbia

Poucos estudos tem sido realizados relacionando suplementação de creatina e desempenho em atividades prolongadas (acima de 150 segundos).

ENGELHARDT et al. (1998) citam melhora no desempenho em triatletas realizando atividade de alta intensidade (anaeróbia) entre períodos de atividade aeróbia. VIRU et al. (1994) relatam melhora no desempenho em corredores de meia distância realizando 4 séries de 1000m interespassados por 3 minutos de recuperação.

Embora WILLIAMS et al. (1999) relatem que dos 16 estudos, por eles analisados, envolvendo suplementação de creatina e atividades aeróbias sete deles

tenham encontrado efeito ergogênico, parece existir evidências científicas que dão suporte à hipótese da melhora no desempenho em atividades aeróbias que dependam em parte do metabolismo energético anaeróbio. Já em atividades aeróbias que dependam primordialmente do metabolismo oxidativo de carboidratos e gorduras parece existir pouco respaldo científico para tal abordagem nutricional.

1.6.4. Suplementação e alteração de composição corporal

Alguns autores relatam aumento de massa magra após o período de suplementação de creatina. A maioria dos estudos credits este aumento à retenção hídrica aumentada devido à alteração da osmolaridade celular e diminuição do volume de urina com a ingestão aumentada de creatina (HULTMAN et al., 1992; MUJICA et al., 1996 e BEMBEN et al., 2001a). Alguns estudos sugerem aumento da síntese de proteínas contráteis com a suplementação de creatina (VOLEK et al., 1996; VOLEK et al., 1997; BECQUE et al., 2000; TARNOPOLSKY et al., 2001; KILDUFF et al., 2002 e MCBRIDE et al., 2002).

BESSMAN et al. (1990) teorizam ainda que 70% da síntese protéica seria dependente da energia oriunda da lançadeira creatina fosfato, enfatizando que a importância da forma pela qual a energia é distribuída em uma célula depende das enzimas que estão localizadas mais próximas aos sítios de formação e utilização de ATP. Portanto, a creatina poderia ter uma atuação na síntese protéica na medida em que os processos intracelulares para tal são primordialmente dependentes da energia oriunda deste substrato. Além disso, o conteúdo de água intracelular aumentado devido à suplementação de creatina, poderia ser visto como um sinal anabólico proliferativo (HAUSSINGER et al., 1993; VOLEK et al., 1997 e BEMBEN et al., 2001). Outro ponto importante com relação ao aumento de massa muscular ao longo do período de suplementação é o aumento da capacidade de treino devido à diminuição do decréscimo da performance ao longo das séries de exercício contra resistência (BEMBEN et al., 2001).

O aumento de massa magra poderia ser visto como um fator ergogênico, aumentando a capacidade de geração de força e potência.

1.6.5 Efeitos adversos

Como visto anteriormente, parte da creatina é sintetizada endogenamente (aproximadamente 1g/dia). GREENHAFF (1995) cita que a síntese endógena de creatina é suprimida com a suplementação. O mesmo autor cita ainda que esta depressão na biosíntese é reversível com a interrupção da suplementação, a qual parece suprimir a atividade da glicina amidinotransferase (*E.C. 2.1.4.1*), uma vez que esta controla a síntese de creatina.

Aumentos de creatinina plasmática e urinária são usados clinicamente como marcadores de degradação tecidual ou de estresse renal. Alguns autores citam que tanto a creatinina plasmática quanto a muscular não sofrem aumento significativo após o período de suplementação, sugerindo que estes aumentos seriam então, reflexo de uma maior liberação pelo músculo como consequência de um *turnover* de proteína muscular aumentado ou devido ao maior volume de treino alcançado com a suplementação ao invés de estar relacionado a patologias (BALSOM et al., 1994 e KREIDER et al., 1998).

Entretanto, outros autores citam que a elevação nas concentrações de creatinina plasmática e urinária após a suplementação podem ser entendidas como indicativos de estresse renal (KUEHL et al., 1998). Por outro lado, POORTMANS et al. (1997) relatam não ter encontrado diferença na liberação de creatinina 24 horas após a suplementação de 20g/dia por 5 dias. O aumento na liberação de creatinina também é utilizado como marcador clínico de estresse renal.

Outro ponto importante concerne às alterações do volume sanguíneo e de eletrólitos plasmáticos, uma vez que como citado anteriormente, a captação de creatina é sódio dependente. Embora alguns relatos informais cite desidratação e câimbras como resultado da suplementação de creatina, HARRIS et al. (1992) não verificaram qualquer alteração nos perfis sanguíneos após o período de suplementação. KREIDER et al. (1998c) também não verificaram alterações nos conteúdos de fósforo, cálcio, potássio, cloreto de sódio, hemoglobina e hematócrito após a suplementação.

WILLIAMS et al. (1999) em sua revisão não relatam qualquer alteração da pressão arterial com a suplementação de creatina.

KREIDER et al. (1998) observaram que 28 dias de suplementação de creatina durante o período de treinamento promoveu aumento nas concentrações de HDL (13%) e diminuição das concentrações de VLDL (-13%). Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar estes resultados preliminares.

SCHILING et al. (2001) não observaram nenhum efeito na incidência de lesão muscular, câimbras ou outros efeitos colaterais em estudo realizado com 26 atletas suplementados com creatina por períodos que variavam de oito meses até quatro anos.

1.6.6 Suplementação em ratos

Poucos são os estudos que verificam o efeito da suplementação de creatina em ratos.

Em um dos estudos mais interessantes realizados com modelo animal, BRANNON et al. (1997) avaliaram o efeito da suplementação de creatina associado ao treinamento no desempenho em corrida e em algumas propriedades bioquímicas em músculo esquelético de ratos.

Os autores subdividiram a amostra em 4 grupos experimentais combinando ratos sedentários e exercitados com dieta normal ou suplementada com creatina. Os animais submetidos à suplementação ingeriram em média 252 ± 8 mg/Kg de peso corporal/dia de creatina ao longo de 10 dias.

O protocolo de suplementação resultou em aumento no conteúdo de creatina livre e na sua forma fosforilada nos músculos sóleo e plantar dos animais.

Não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais ao longo do estudo e ao final do mesmo. No entanto, os autores verificaram pequena hipertrofia no músculo plantar dos animais suplementados e submetidos ao treinamento em comparação ao grupo treinado sem suplementação, indicando possível hipertrofia neste tecido.

Os autores relatam também melhora no desempenho em dois testes de corrida distintos. Foram observados então, aumento no tempo total de corrida (teste contínuo à velocidade e inclinação constantes) e no número de tiros de 30 segundos de corrida em alta intensidade interpassados por intervalos de recuperação completados

pelos animais submetidos à dieta suplementada com creatina. O treinamento associado à suplementação promoveu aumentos ainda maiores no desempenho nos dois testes de corrida em relação ao grupo submetido apenas ao treinamento.

O treinamento foi capaz de aumentar a atividade da enzima citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) nos ratos. No entanto, os animais submetidos ao treinamento e suplementação combinados, apresentaram aumentos ainda maiores na atividade da mesma enzima no músculo plantar. Já no músculo sóleo, a suplementação sozinha causou aumento significativo na atividade da enzima em relação ao controle. Não foram verificadas diferenças significativas em nenhum tratamento para a atividade da enzima creatina quinase (E.C. 2.7.3.2).

OOPIK et al. (1996) verificaram que a suplementação de creatina (400mg/Kg de peso corporal/dia) ao longo de 7 dias, resultou em aumento na concentração de uréia plasmática em ratos tanto sedentários quanto treinados. Os autores sugerem que a fonte de uréia aumentada seria a maior disponibilidade de arginina, a qual é usada na síntese endógena de creatina em situações normais, uma vez que em humanos a biosíntese de creatina é suprimida com a suplementação da mesma (WALKER, 1960 e WALKER, 1979).

MCBRIDE et al. (2002) estudaram o efeito da suplementação de creatina (500mg/Kg de peso corporal/dia) ao longo de 4 semanas associada ou não ao treinamento na massa corpórea, força e resistência à fadiga em ratos.

Os autores observaram aumento no TCr dos ratos suplementados e no peso muscular úmido dos animais submetidos a treinamento e suplementação de creatina em relação aos animais submetidos apenas ao treinamento. No entanto, não foram observadas diferenças no peso muscular seco dos animais na mesma base de comparação.

Não foram verificadas alterações na resistência à fadiga durante um teste de fadiga de intensidade e duração constantes. Entretanto, os autores puderam observar redução no tempo de recuperação nos músculos de ratos suplementados em relação ao grupo não suplementado.

Alguns trabalhos estudaram a influência da suplementação de creatina sobre a captação de glicose e conteúdo de glicogênio em ratos.

YOUNG et al. (2002) suplementaram ratos com creatina sob a forma de gelatina (300mg/Kg de peso corporal/dia) durante 5 semanas. O músculo epitroclear foi incubado na ausência de insulina ou em concentração de estimulação máxima de insulina (20,000 μ U/ml). Não foram observadas diferenças na captação de 2-deoxiglicose entre os grupos. Os autores sugerem que a captação de glicose na musculatura esquelética estaria mais intimamente ligada ao conteúdo de CP e não a razão CP/TCr.

OP'T EIJNDE et al. (2001) verificaram os efeitos da suplementação de altas doses de creatina (5g/Kg de peso corporal/dia) durante 5 dias no conteúdo de creatina, transporte de glicose e acúmulo de glicogênio em músculos sóleo e nas porções brancas e vermelhas de gastrocnêmio de ratos.

A suplementação aumentou o TCr no sóleo (20%), porção vermelha do gastrocnêmio (15%) e porção branca do gastrocnêmio (10%), embora apenas o sóleo tenha apresentado diferença estatisticamente significativa. A taxa de transporte de glicose, conteúdo de GLUT-4, atividade da enzima glicogênio sintase, taxa de síntese de glicogênio e concentração circulante de insulina não apresentaram diferenças entre os dois grupos. Contudo, os autores relatam maior conteúdo de glicogênio no sóleo (40%) e na porção vermelha do gastrocnêmio (15%), indicando que altas doses de creatina aumenta incorporação de creatina e conteúdo de glicogênio na musculatura esquelética de ratos, entretanto este efeito parece ser mais marcante em músculos de característica oxidativa.

GAGNON et al. (2002) suplementaram creatina (250-270mg/Kg de peso corporal/dia) ou 0,8% da dieta (7 dias) de β -guanidinopropionato (inibidor competitivo que provoca diminuição dos estoques de TCr) por 7 dias e verificaram a influência desta suplementação sobre a contração de músculos esqueléticos de ratos submetidos a eletroestimulação. Foram utilizados os músculos extensor longo dos dedos e esternóide.

Os autores não observaram nenhuma influência da creatina nas tensões tetânicas e de contração, na cinética de contração, na relação contração/tensão, na relação entre tensão e frequência ou fadiga em ambos músculos. β -guanidinopropionato também não demonstrou efeito sobre os mesmos parâmetros

com exceção da fadiga, mostrando a influência da depleção de creatina sobre este parâmetro.

MCMILLEN et al. (2001) verificaram a influência da suplementação de creatina (2% da dieta) durante 2 semanas no estado de fosfatos de energia de músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos em repouso. Não foram verificadas alterações nas variáveis de fosfato de energia (ATP e CP/TCr) entre os grupos em nenhum dos dois tecidos. Os autores observaram no entanto, aumento no TCr em músculos de contração rápida (gastrocnêmio).

Tendo em vista os aspectos discutidos ao longo desta revisão bibliográfica, tivemos como proposta de nosso estudo verificar os efeitos da suplementação de creatina sobre as concentrações plasmáticas de lactato em ratos submetidos à atividade intermitente de natação desempenhada acima do limiar metabólico anaeróbico em moldes similares aos executados em experimentos com humanos.

O conteúdo de glicogênio também foi avaliado uma vez que a suplementação de creatina parece estar relacionada a aumentos no mesmo.

A hipótese de ressíntese aumentada de creatina fosfato a partir da maior disponibilidade de creatina total com conseqüente aumento na provisão de ATP pela via ATP-CP resultando em menor dependência da glicólise anaeróbia foi considerada, e as atividades máximas das enzimas fosfofrutoquinase (PFK) (E.C. 2.7.1.11) e citrato sintase (CS) (E.C. 4.1.3.7) foram determinadas.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Verificar a influência da suplementação de creatina na concentração sanguínea de lactato, e nos conteúdos hepático e muscular (sóleo e gastrocnêmio) de glicogênio em ratos após atividade intermitente desempenhada acima do limiar anaeróbio metabólico;

- Verificar a influência da suplementação de creatina nas atividades máximas das enzimas citrato sintase (CS) (*E.C. 4.1.3.7*) e fosfofrutoquinase (PFK) (*E.C. 2.7.1.11*) nos músculos sóleo e gastrocnêmio em ratos após atividade intermitente desempenhada acima do limiar anaeróbio metabólico.

3. METODOLOGIA

Embora a grande maioria dos trabalhos da literatura reporte e discuta dados experimentais obtidos com humanos, optamos pelo modelo animal devido à dificuldade de execução do procedimento de biópsia muscular em humanos, o que nos permitiria uma avaliação mais detalhada frente aos nossos objetivos.

3.1 Animais

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos, oriundos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP), e acomodados em gaiolas de 4 animais, alimentados com ração comercial (Labina, Ralston Purina do Brasil, São Paulo/SP) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição Experimental e Metabolismo da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo onde as análises descritas a seguir foram realizadas. Os animais foram mantidos com ciclo claro/escuro invertido de 12hs com início às 7:00 horas.

3.2 Teste progressivo descontínuo

Todos os protocolos de exercício em natação foram realizados em um sistema de natação para animais com controle de temperatura da água e de cubas de natação individuais, medindo 25cm de diâmetro por 60cm de profundidade. A temperatura foi mantida por volta de 33° C para todos os procedimentos.

O protocolo de teste progressivo descontínuo em natação para determinação do limiar metabólico anaeróbio em ratos foi desenvolvido em nosso laboratório e será publicado em breve (MARQUEZI et al., no prelo).

3.2.1 Adaptação ao meio líquido

Na semana anterior ao teste, os animais foram adaptados ao exercício de natação durante cinco dias, 20 minutos por dia, sem sobrecarga.

3.2.2 Protocolo de teste

O protocolo de teste consistiu em exercício agudo de natação com sobrecarga progressiva, sob a forma de pesos atados ao tronco do animal, correspondendo a 4, 5, 6, 7 e 8% do seu peso corporal, durante períodos de 3 minutos, intercalados por intervalos de 1 minuto de repouso. Anteriormente ao teste foi realizado um período de adaptação, com duração de 20 minutos sem sobrecarga, como forma de minimizar os efeitos do estresse causado pelo manejo do animal e mudança de meio.

3.2.3 Coletas e dosagens sanguíneas

Aos 10 e 20 minutos do período de adaptação e nos períodos subsequentes de repouso foram realizadas coletas de sangue venoso a partir da veia caudal. Foram coletados 25 µl de sangue em capilares heparinizados para dosagem de lactato por técnica eletroquímica utilizando lactímetro modelo Yellow Springs YSI 2300, após estabilização da amostra com fluoreto de sódio a 2%, ao final de cada carga.

3.2.4 Determinação do limiar anaeróbio metabólico

O limiar anaeróbio metabólico foi determinado a partir da inflexão da curva da concentração de lactato sanguíneo pela sobrecarga utilizada. A sobrecarga correspondente ao ponto de inflexão da curva foi considerada como a carga do limiar anaeróbio metabólico.

Após a determinação do limiar metabólico, os animais foram submetidos à suplementação.

3.3 Suplementação

O grupo suplemento recebeu via gavagem 300mg de creatina monohidrato (Pro Performance Laboratories – Pure Creatine Monohydrate) por Kg de peso, divididos em 2 doses por dia, durante cinco dias.

O grupo controle recebeu a mesma quantidade em água destilada nos mesmos moldes do grupo suplemento (via gavagem, dividido em 2 doses diárias durante 5 dias).

Após o período de suplementação, os animais de ambos os grupos foram submetidos ao procedimento experimental.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Protocolo

Antes do procedimento experimental, os animais foram submetidos a 12 horas de jejum. O protocolo experimental consistiu em exercício intermitentes de natação supra- limar, no qual os ratos realizaram 6 tiros de 30 segundos de natação a uma intensidade relativa à 3 cargas acima do ponto determinado como limiar metabólico anaeróbico, seguindo-se o mesmo modelo, ou seja, sob a forma de pesos atados ao tronco do animal.

Anteriormente ao teste foi também realizado um período de aquecimento, com duração de 10 minutos sem sobrecarga, como forma de minimizar os efeitos do estresse causado pelo manejo do animal e mudança de meio.

Os períodos de estímulo foram intercalados por períodos de 2 minutos de recuperação, sendo que nos últimos 30 segundos do mesmo, procederam-se coletas de sangue venoso a partir da veia caudal do animal. Foram coletados 25 µl de sangue em capilares heparinizados para posterior dosagem de lactato sanguíneo por técnica eletroquímica utilizando lactímetro modelo Yellow Springs YSI 2300, após

estabilização da amostra com fluoreto de sódio a 2%, ao final de cada período de estímulo.

3.4.2 Eutanásia dos animais e coleta de sangue e tecidos

Imediatamente após o procedimento experimental os animais foram mortos por decapitação para coleta de sangue e extração de tecidos. Foram extraídos os músculos sóleo e gastrocnêmio das patas traseiras esquerda e direita, além de uma porção do fígado. As amostras de tecidos foram embaladas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após a sua extração.

3.5 Procedimentos de dosagens

3.5.1 Dosagens sanguíneas

3.5.1.1 Lactato (método eletroquímico)

O tampão consistia em - EDTA (1,4 mM); ácido benzóico (6,7 mM); NaH_2PO_4 (13,3 mM); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (18,0 mM); NaCl (52,6 mM); KCl (4,4 mM). Solução de calibração - Lactato (5 mM).

Foi utilizado Lactímetro Yellow Springs Instruments, modelo 2300. Para a determinação de lactato sanguíneo foram utilizados 25 μl de sangue venoso, coletados em capilares heparinizados. As amostras foram estabilizadas com fluoreto de sódio (4,7 mM).

3.5.2 Dosagens teciduais

3.5.2.1 Glicogênio muscular e hepático

O glicogênio foi determinado segundo o método descrito por PASSONNEAU et al. (1993), e o tampão utilizado consiste em KOH (53 mM); antrona (10 mM); solução saturada de Na_2SO_4 ; solução padrão de glicose (1,11 mM); etanol.

A partir da solução padrão de glicose (1,11 mmol/l) foram feitas as diluições para a determinação dos 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).

As amostras de tecidos (músculo gastrocnêmio, sóleo e fígado) foram digeridas em tubos de vidro contendo 1ml de KOH (0,053 mol/l), em banho fervente por 60 minutos. Após este período foram acrescentados 100 µl de Na₂SO₄ saturado e 3,5 ml de etanol (1 mol/l), mantendo em banho fervente até início da ebulição.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido, sendo adicionado 1 ml de água quente para ressuspender o precipitado. As amostras foram agitadas no vórtex e acrescentado 3,5 ml de etanol (1 mol/l). Este processo foi repetido duas vezes.

Foram utilizados tubos de vidro de 5 ml contendo 50 µl de amostra mais 950 µl de água e 2 ml de antrona (determinação de glicogênio), 1000 µl de água e 2 ml de antrona (branco) e 1000 µl do padrão respectivo (A, B, C, D e E) mais 2 ml de antrona. As amostras permaneceram 15 minutos em banho fervente.

As leituras das absorbâncias das amostras, branco e padrões foram realizadas em espectrofotômetro Stasar III - Gilford Instrument, com comprimento de onda de 650 nm.

3.5.2.2 Atividade máxima da enzima citrato sintase - CS (E.C. 4.1.3.7)

A determinação da atividade máxima da enzima citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) foi feita segundo método descrito por ALP et al. (1976), nos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio. O tampão utilizado consiste em Tris-aminometano 50mM, EDTA 1mM, DTNB 0,2mM, acetil-CoA 0,1mM, oxaloacetato 0,5mM e Triton x-100 0,05%, ao qual foi adicionado o homogeneizado, num volume total de 1ml e pH 8,1. A reação foi iniciada pela adição do oxaloacetato ao meio e a leitura realizada a 25° C, num intervalo de 300 segundos a 412nm, em espectrofotômetro HITACHI U-2001.

3.5.2.3 Atividade máxima da enzima fosfofrutoquinase - PFK (E.C. 2.7.1.11)

A determinação da atividade máxima da enzima fosfofrutoquinase (*E.C. 2.7.1.11*) foi feita segundo o método descrito por ZAMMIT et al. (1976), nos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio. O tampão utilizado consiste em Tris HCl 50mM, MgCl₂ 6mM, KCl 250mM, ATP 1mM, AMP 2mM, NADH 0,17mM, KCN 1mM, Frutose 6 Fosfato 3mM, Glicerol 3 Fosfato Desidrogenase (GDH) 4μg (0,16 unidades) e Aldolase 100μg (0,9 unidades).

O pH foi corrigido para 8,2 e adicionado o homogeneizado para completar um volume final de 1ml. A reação foi iniciada pela adição de Frutose 6 Fosfato e a leitura foi realizada a 25° C, num intervalo de 600 segundos a 450 nm, em espectrofotômetro HITACHI U-2001.

3.5.2.4 Concentração de proteínas nas amostras

Os resultados de atividade enzimática são expressos por mg de proteína, e o conteúdo de proteína foi determinado pelo método descrito por LOWRY et al. (1951), usando curva padrão de albumina. O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas celulares, com posterior reação de hidroxilas fenólicas com o reagente de Folin-Ciocateau, em solução contendo Na₂CO₃ 200mM, NaOH 100mM, tartarato de sódio e potássio 1mM e sulfato de cobre 20mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Hitachi U-2001 a 750nm.

3.6 Tratamento estatístico

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e teste post-hoc (LSD planned comparison) entre os dois grupos para cada repetição de tiro de natação em relação ao lactato sanguíneo. Os conteúdos de glicogênio e as atividades enzimáticas foram comparados utilizando teste t de Student. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram efetuadas com o software *STATISTICA for Windows* versão 5.0 Estatística StatSoft, Inc. (1995). - StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA.

A Figura 4 ilustra a linha temporal de procedimentos.

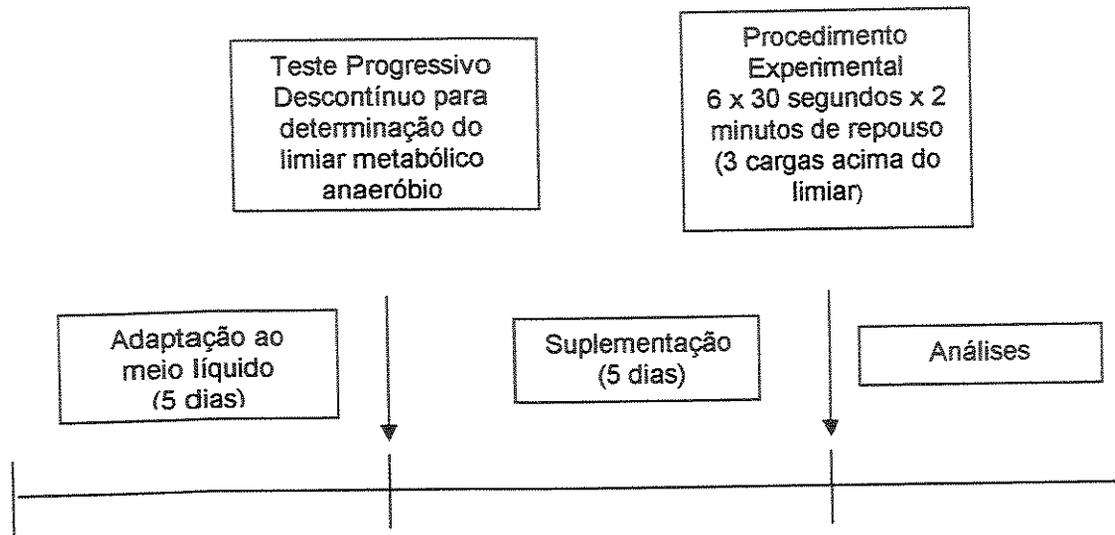


Figura 4. Ilustração da linha temporal de procedimentos

4. RESULTADOS

4.1 Concentração de lactato ao longo das séries de natação

A Figura 5 mostra o gráfico das concentrações de lactato sanguíneo obtidas ao longo dos seis tiros de natação. Os valores correspondentes estão na Tabela 2.

O grupo controle apresentou concentrações crescentes de lactato ao longo dos seis tiros de natação desempenhados acima do limiar metabólico anaeróbico. O grupo suplemento apresentou comportamento similar embora com concentrações sanguíneas de lactato significativamente menores nos tiros 3, 4, 5 e 6 em relação ao grupo controle.

Tabela 2. Concentração de lactato (mmol/l) ao longo dos 6 tiros de natação executados acima do limiar metabólico anaeróbico (n=14 animais por grupo).

Tratamento		Repouso	10' SC	Tiro 1	Tiro 2	Tiro 3	Tiro 4	Tiro 5	Tiro 6
Controle	Média	1,56	4,33	5,47	7,11	7,86	8,55	10,31	10,00
	Erro padrão	0,11	0,67	0,51	0,63	0,62	0,53	1,30	0,81
Suplemento	Média	1,63	4,14	5,02	6,08	6,41 *	6,98 *	7,40 *	7,97 *
	Erro padrão	0,13	0,40	0,37	0,40	0,43	0,42	0,62	0,54

10' SC = 10 minutos sem carga (aquecimento); * $p < 0,05$ (entre grupos para o mesmo momento). Média \pm desvio padrão.

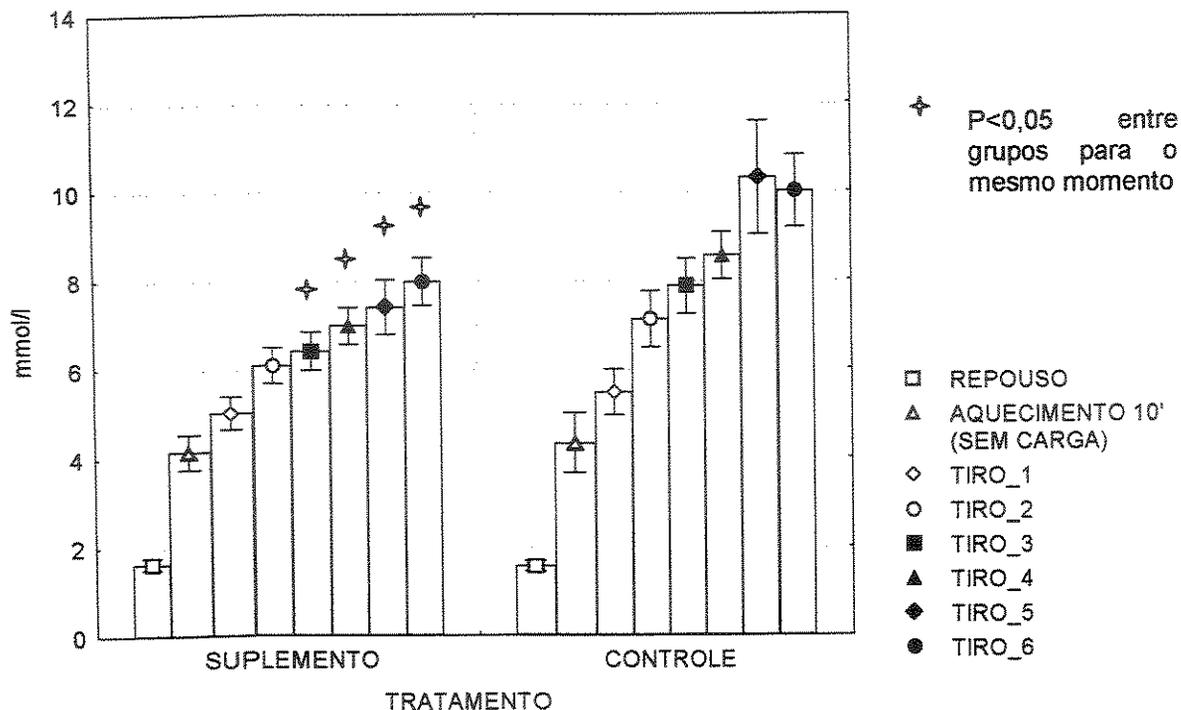


Figura 5. Concentração de lactato sanguíneo (mmol/l) após cada tiro de natação com carga supra-limiar metabólico anaeróbio em ratos controle e suplementados com creatina. (n=14 animais por grupo).

4.2 Conteúdo de glicogênio hepático

A concentração hepática de glicogênio hepático é mostrada na Figura 6. Ao analisarmos as amostras ao final dos seis tiros de natação não pudemos observar diferenças significativas entre os grupos controle e suplemento ($0,711 \pm 0,23$ e $0,578 \pm 0,11$ mg/100mg de tecido). Também não foram observadas diferenças em relação ao padrão (animais de mesma origem e peso submetidos ao mesmo tempo de jejum porém sem participação em nenhum procedimento experimental) $0,870 \pm 0,12$ mg/100mg de tecido.

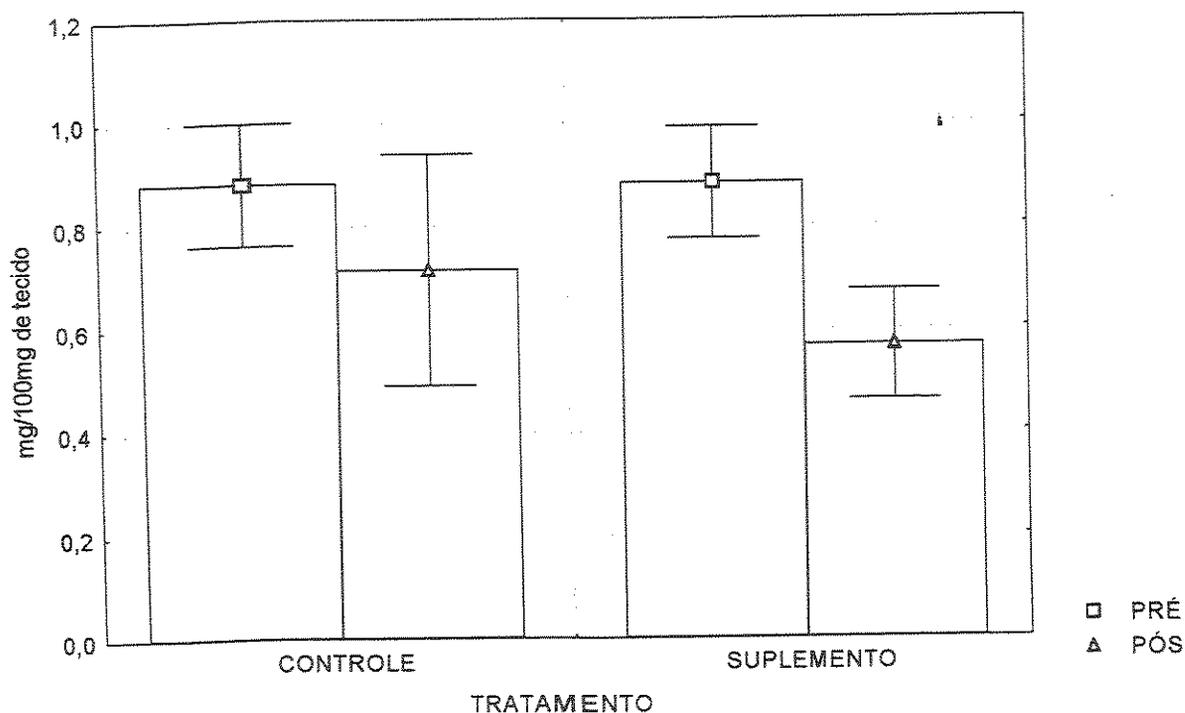


Figura 6. Concentração de glicogênio hepático ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbico pré (repouso) e pós procedimento experimental (teste para determinação do limiar metabólico anaeróbico, suplementação e procedimento experimental) para os grupos controle e suplemento (n=14 animais por grupo).

4.3 Conteúdo de glicogênio muscular – sóleo

A Figura 7 mostra as concentrações de glicogênio muscular (sóleo) para os grupos controle e suplemento ao final dos seis tiros de natação acima do limiar metabólico anaeróbico. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($0,122 \pm 0,01$ e $0,130 \pm 0,012$ mg/100mg de tecido) para os grupos controle e suplemento respectivamente, ou em comparação ao padrão (animais de mesma origem e peso submetidos ao mesmo tempo de jejum porém sem participação em nenhum procedimento experimental) $0,126 \pm 0,015$ mg/100mg de tecido).

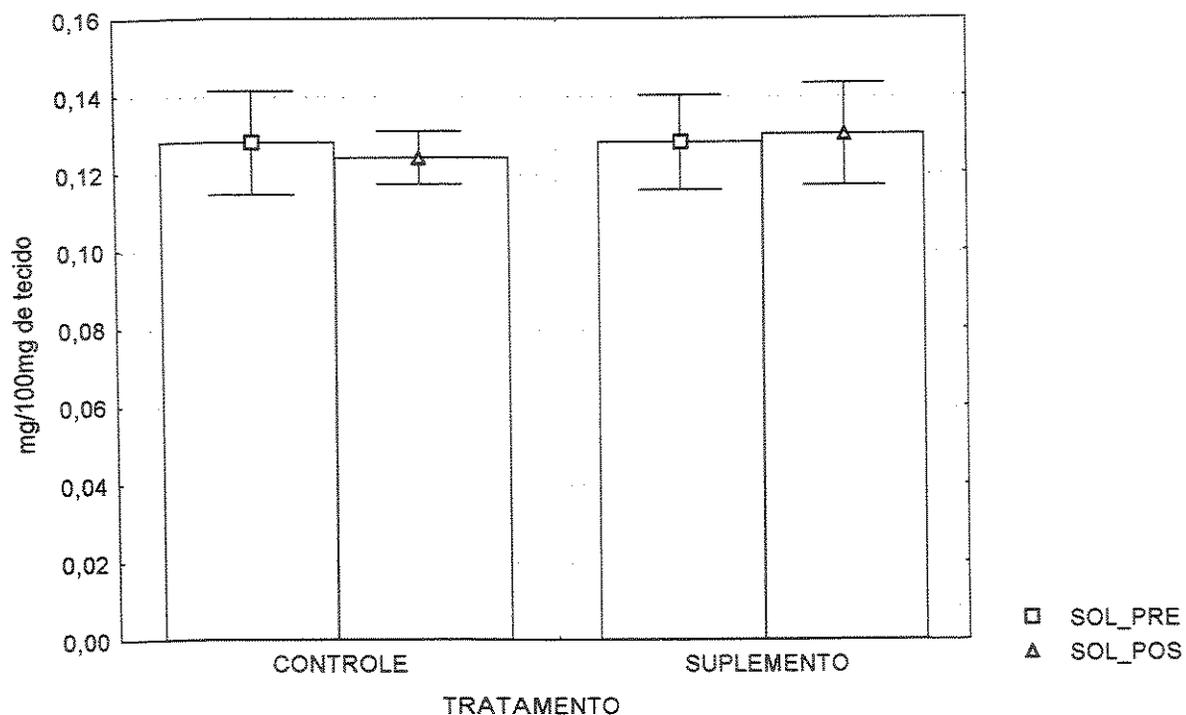
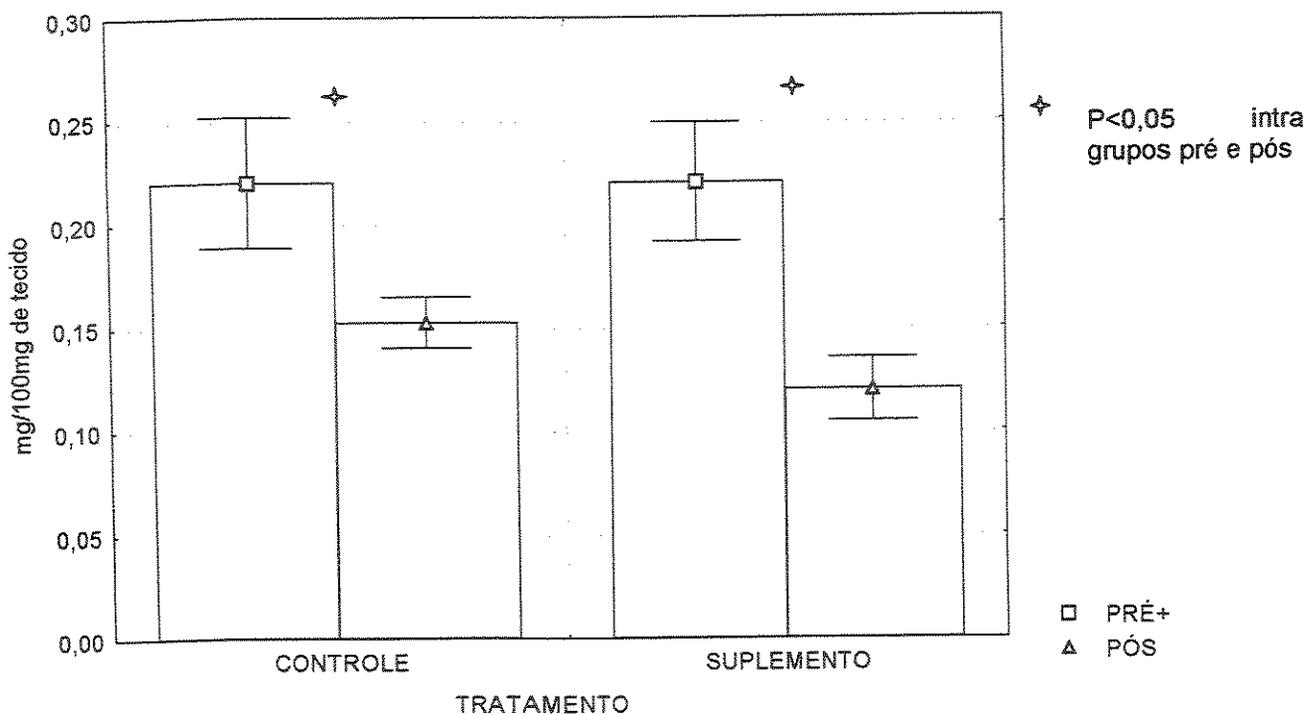


Figura 7. Concentração de glicogênio muscular (sóleo) ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbio pré (repouso) e pós procedimento experimental (teste para determinação do limiar metabólico anaeróbio, suplementação e procedimento experimental) para os grupos controle e suplemento (n=14 animais por grupo).

4.4 Conteúdo de glicogênio muscular – gastrocnêmio

Os valores obtidos nas determinações das concentrações de glicogênio muscular (gastrocnêmio) para ambos os grupos ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbio são mostradas na Figura 8. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e suplemento ($0,154 \pm 0,01$ e $0,129 \pm 0,02$ mg/100mg de tecido) respectivamente. Já em comparação ao padrão (animais de mesma origem e peso submetidos ao mesmo tempo de jejum porém sem participação em nenhum procedimento experimental) $0,222 \pm 0,03$ mg/100mg de tecido, foram observadas diferenças significativas nos dois grupos.



Erro!

Figura 8. Concentração de glicogênio muscular (gastrocnêmio) ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbico pré (repouso) e pós procedimento experimental (teste para determinação do limiar metabólico anaeróbico, suplementação e procedimento experimental) para os grupos controle e suplemento (n=14 animais por grupo).

4.5 Atividade enzimática – citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) – sóleo

Ao analisarmos as amostras para determinação da atividade enzimática máxima da citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) no músculo sóleo, não observamos diferenças significativas ao final do procedimento experimental entre os grupos controle e suplemento respectivamente ($104,51 \pm 13,99$ e $103,95 \pm 12,39$ mmol/min/mg). A Figura 9 mostra os valores de atividade para a enzima citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) no músculo sóleo em ambos os grupos ao final do exercício intermitente de natação.

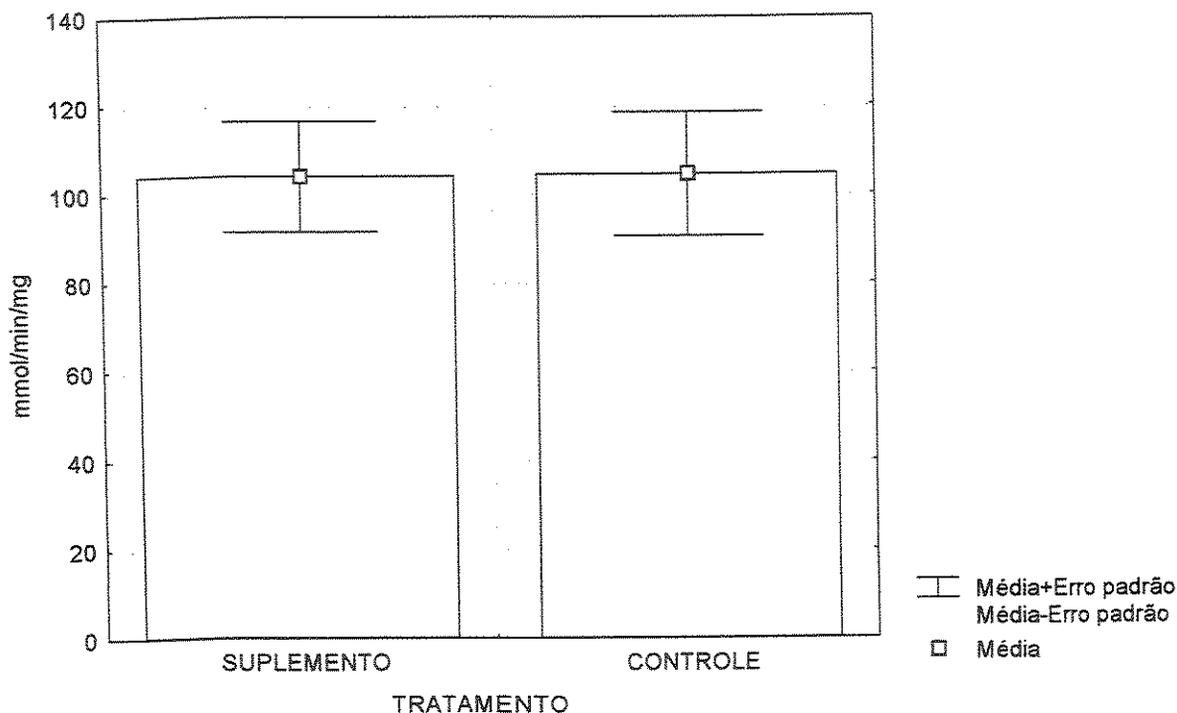


Figura 9. Atividade máxima da enzima citrato sintase em músculo sóleo dos animais dos grupos controle e suplemento (mmol/min/mg) ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbico (n=14 animais por grupo).

4.6 Atividade enzimática – citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) – gastrocnêmio

Assim como no músculo sóleo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na atividade enzimática da citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) no músculo gastrocnêmio ao final do procedimento experimental, $61,69 \pm 7,05$ e $63,80 \pm 4,61$ mmol/min/mg para os grupos controle e suplemento respectivamente. A Figura 10 mostra os valores de atividade para a enzima citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) no músculo gastrocnêmio em ambos os grupos ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbico.

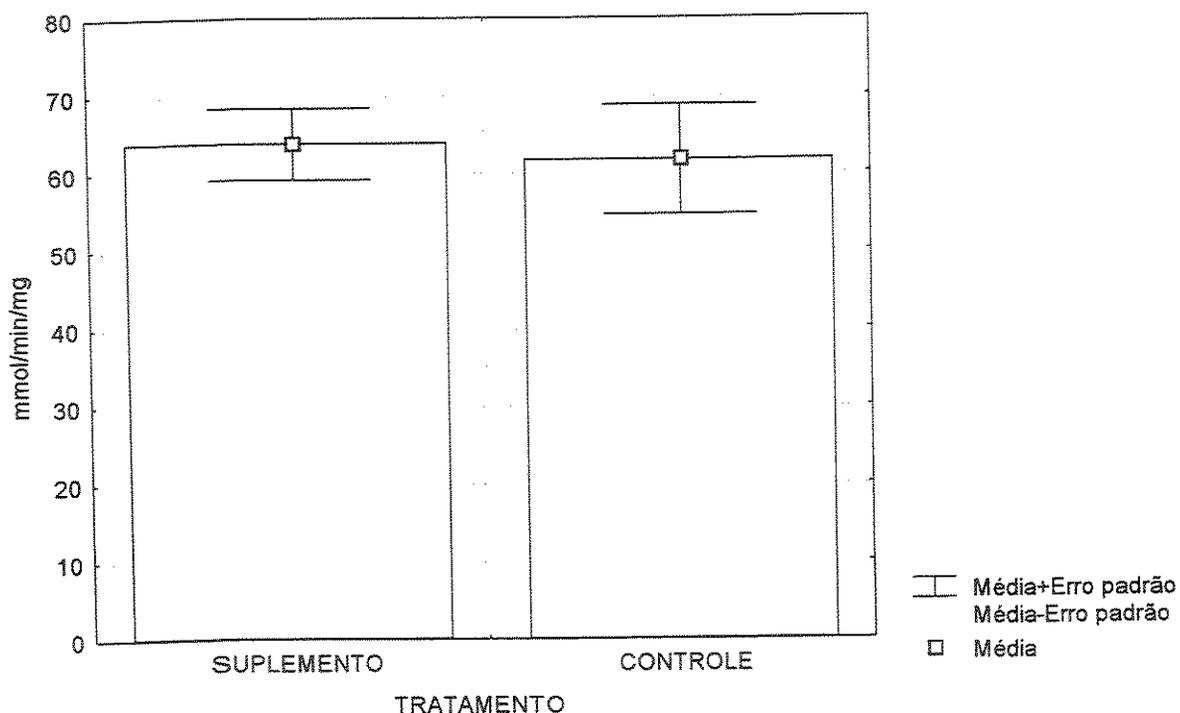


Figura 10. Atividade máxima da enzima citrato sintase em músculo gastrocnêmio para os grupos controle e suplemento (mmol/min/mg) ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbio (n=14 animais por grupo).

4.7 Atividade enzimática – fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11) – sóleo

Os grupos controle e suplemento não mostraram diferenças significativas na atividade enzimática da fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11) ao final do procedimento experimental, ($5,84 \pm 0,22$ e $5,55 \pm 0,19$ mmol/min/mg) respectivamente. A Figura 11 mostra os valores da atividade da fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11) para o músculo sóleo em ambos os grupos ao final do procedimento experimental.

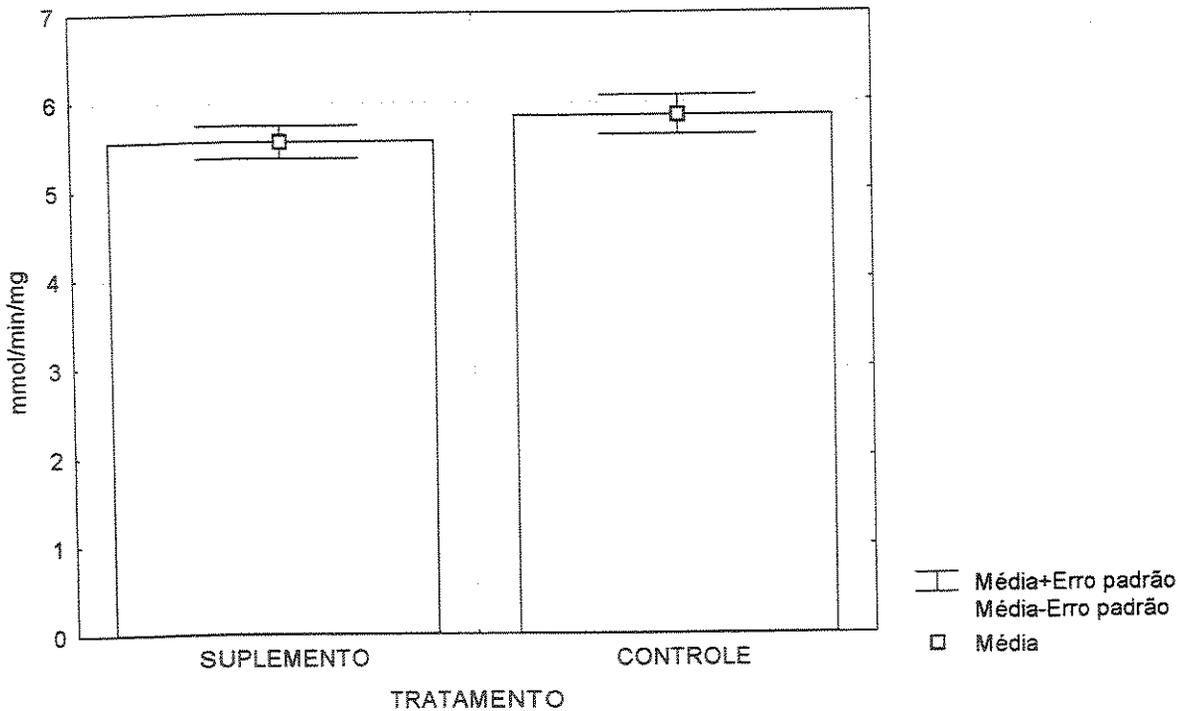


Figura 11. Atividade máxima da enzima fosfofrutoquinase em músculo sóleo para os grupos controle e suplemento (mmol/min/mg) ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbio (n=14 animais por grupo).

4.8 Atividade enzimática – fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11) - gastrocnêmio

A Figura 12 mostra a atividade enzimática da fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11) no músculo gastrocnêmio de ambos os grupos ao final do procedimento experimental. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e suplemento ($7,43 \pm 0,18$ e $7,92 \pm 0,13$ mmol/min/mg respectivamente).

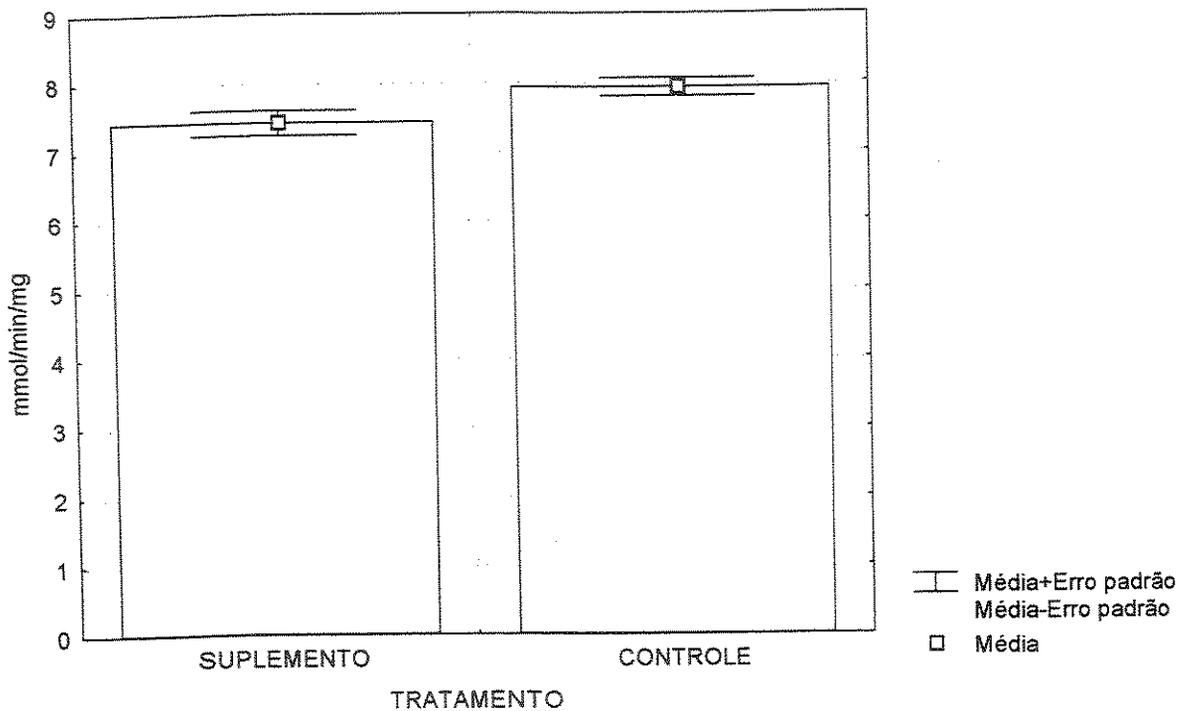


Figura 12. Atividade máxima da enzima fosfofrutoquinase em músculo gastrocnêmio para os grupos controle e suplemento (mmol/min/mg) ao final dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbico (n=14 animais por grupo).

4.9 Peso dos animais após o período de suplementação

Foram avaliados os pesos dos animais antes e após o período de 5 dias de suplementação de creatina. O grupo controle apresentou menor incremento de peso após os 5 dias de suplementação ($221,40 \pm 3,75\text{g}$ (pré suplementação) x $228,20 \pm 3,20\text{g}$ (pós suplementação)) em relação ao grupo suplemento ($213,64 \pm 3,53\text{g}$ (pré suplementação) x $226,55 \pm 3,40\text{g}$ (pós suplementação) $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças intra ou entre os grupos antes ou após a suplementação. A Figura 13 mostra os valores de peso em gramas para os dois grupo, antes e após o período de suplementação de creatina.

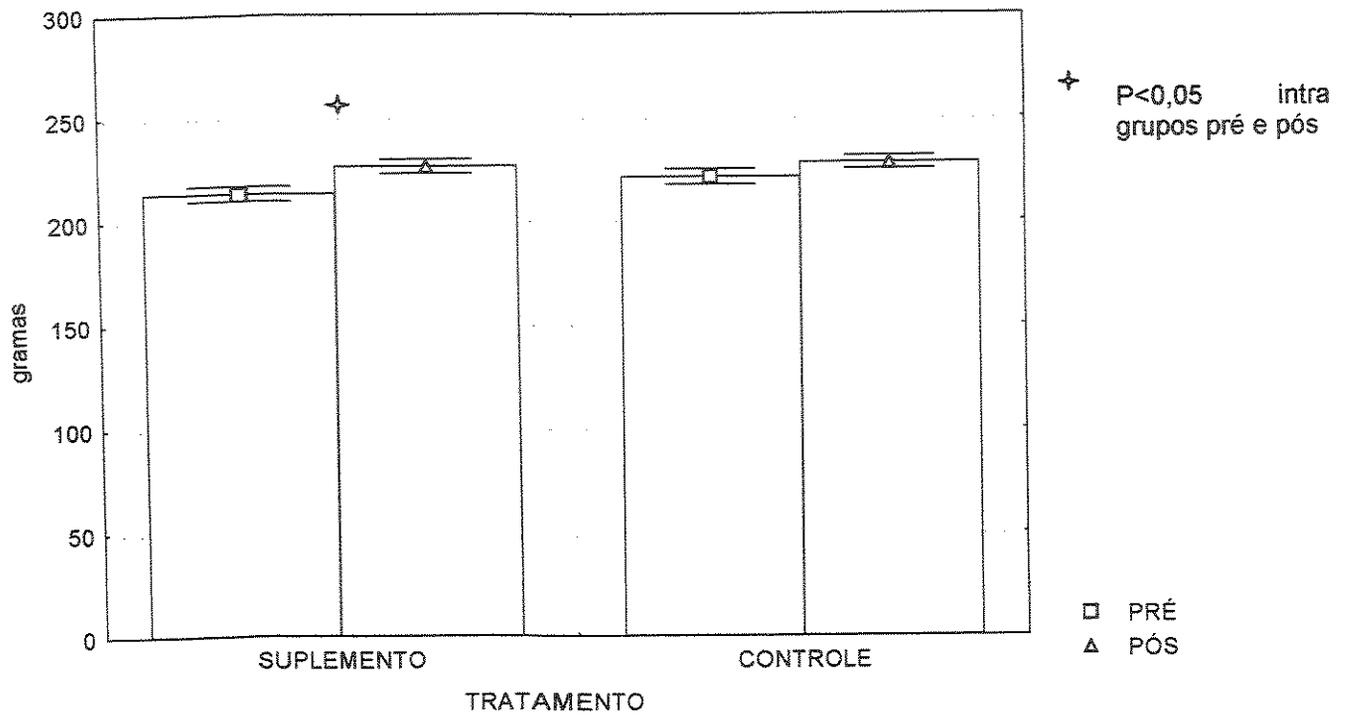


Figura 13. Peso em gramas dos animais de ambos os grupos, controle e suplemento, antes (PRÉ) e após (PÓS) o período de 5 dias de suplementação de creatina (n=14 animais por grupo).

5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a proposta de estudarmos as alterações metabólicas decorrentes da suplementação de creatina levou-nos a estabelecer um protocolo de procedimento experimental em ratos semelhante aos protocolos de atividade intermitente que demonstraram a eficiência da suplementação de creatina em humanos.

O protocolo de atividade intermitente com carga acima do limiar metabólico anaeróbio para ratos se mostrou eficiente, o que pode ser comprovado pelo aumento crescente nas concentrações sanguíneas de lactato, o que cria um modelo experimental que pode ser mais amplamente explorado para análises futuras.

A suplementação de creatina promoveu, em nosso estudo, menor aumento da concentração sanguínea de lactato em ratos submetidos à atividade intermitente de natação desempenhada acima do limiar anaeróbio metabólico comparados ao controle.

Em atividades realizadas nesta intensidade, a demanda energética é suprida predominantemente pela via glicolítica (SKINNER et al., 1980 e HOLLOSZY et al., 1998), sendo o acúmulo de lactato, o indicativo do aumento da sua atividade (BONEN et al., 1989 e KATZ et al., 1990). A manutenção da atividade da via glicolítica é dependente da contínua reoxidação de NADH_2 em NAD , que pode ocorrer através da oxidação mitocondrial ou da síntese de lactato, sendo esta última, a predominante em atividades de alta intensidade (KATZ et al., 1990).

As menores concentrações de lactato sanguíneo observadas em nosso estudo permitiriam em tese, inferir maior tempo de manutenção em atividades físicas desempenhadas acima do limiar metabólico anaeróbio.

As causas de fadiga em atividades com intensidade acima do limiar metabólico anaeróbio estão envolvidas com a depleção de fosfagênios (ATP e creatina fosfato) e principalmente com o acúmulo de metabólitos como: lactato, amônia e íons H^+ (MACLAREN et al., 1989; ROBERTS et al., 1989; ENOKA et al., 1992 e GREEN, 1997). Muitos dos efeitos do lactato sobre a fadiga são mediados via aumento da concentração de H^+ , ou diminuição do pH, gerado pela dissociação do ácido láctico em

lactato e H^+ (MACLAREN et al., 1989; ROBERTS et al., 1989; ENOKA et al., 1992 e GREEN, 1997).

Aproximadamente 85% do H^+ livre gerado durante o exercício induzindo acidose é contribuição do ácido láctico (SAHLIN, 1986). Em intensidades de exercício superiores a 70% do VO_2 máximo, ou acima do limiar anaeróbio, a atividade da via glicolítica e a subsequente produção de H^+ são muito altas, fazendo com que o pH muscular caia de um valor de repouso de aproximadamente 7,0 para 6,3-6,6 (KARLSSON, 1971 e METZGER et al., 1987). A diminuição da potência produzida associada com o baixo pH intramuscular pode ser atribuída em grande parte à inibição da via glicolítica, através da diminuição da atividade da enzima fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11), e subsequente interrupção do suprimento de energia (KARLSSON, 1971 e GOLLNICK et al., 1973), além da influência negativa exercida nos mecanismos de ativação das pontes cruzadas, diminuindo a força desenvolvida pela musculatura (EDMAN et al., 1990 e LANNERGREN et al., 1991).

A atividade glicogenolítica também pode ser deprimida pela elevada concentração de H^+ , conforme demonstrado por CHASIOSTIS (1983) através de três mecanismos. Inicialmente a ativação da fosforilase (E.C. 2.4.1.1) - conversão da fosforilase b inativa a fosforilase a ativa - pela fosforilase quinase (E.C. 2.7.1.38), é inibida pelo H^+ . O segundo mecanismo de inibição ocorre durante a formação de AMP cíclico, onde o H^+ é um potente inibidor da adenilciclase (E.C. 4.6.1.1). O terceiro e mais forte mecanismo de inibição está associado com a diminuição da disponibilidade de substrato.

Considerando então, o acúmulo de lactato como indicativo de fadiga em atividades intensas, e relacionando a magnitude do seu acúmulo com a atividade da via glicolítica e glicogenolítica, ou seja, quanto maior a concentração de lactato maior a atividade destas vias, a diminuição das concentrações sanguíneas de lactato nos ratos suplementados com creatina submetidos ao procedimento experimental pode estar relacionada a uma menor dependência da glicólise como via produtora de energia.

A menor velocidade de incremento da concentração de lactato ao longo dos tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbico é um dado importante, pois poderia conforme discutido anteriormente refletir em maior

autonomia de exercício em intensidades elevadas. Após a obtenção de resultados similares em relação ao lactato em diferentes experimentos tentamos então estabelecer um protocolo de avaliação de desempenho em exercício de natação de alta intensidade para ratos.

A partir da determinação dos limiares metabólicos anaeróbios, os animais foram submetidos a exercício contínuo de natação com carga acima do limiar. Caso nossa hipótese se comprovasse, os animais suplementados seriam capazes de se manter em atividade por mais tempo devido ao menor acúmulo de lactato.

No entanto, a metodologia não se mostrou eficiente pois, com o prolongamento da atividade por um tempo maior que os 30 segundos que compõem o protocolo de avaliação em atividade intermitente de alta intensidade, os animais passavam a adotar uma manobra que invalidava o modelo. Após algum período de natação os ratos passavam a submergir e ao tocar o fundo da cuba de natação eles impulsionavam-se à superfície novamente, anulando assim o exercício continuado supra limiar.

Embora não tenha sido a proposta do estudo, não pudemos então, obter dados que confirmassem a melhora no desempenho em atividades intensas em ratos submetidos à suplementação de creatina e com menor aumento da concentração sanguínea de lactato em atividades intermitentes de alta intensidade. Uma alternativa que certamente será adotada em experimentos futuros será a manutenção da execução de tiros de natação intermitentes com carga acima do limiar até a exaustão.

GREENHAFF (1997b) cita que a disponibilidade de creatina é tida como fator limitante na capacidade de exercício durante atividades curtas de alta intensidade. GREENHAFF (1995) e NEWSHOLME et al. (1996) destacam ainda, a importância da via ATP-CP na ressíntese de ATP e provisão de energia em atividades intensas, sendo os estoques intramusculares de ATP e creatina fosfato, embora limitados, responsáveis pela manutenção da demanda energética por aproximadamente 10 segundos em atividades de alta intensidade (BALSOM et al., 1994).

Segundo MUJIKÁ et al. (1997) o ATP é utilizado a partir da mioquinase (E.C. 2.7.4.3), resultando na formação de AMP, o qual é desaminado pela enzima adenilato deaminase (E.C. 3.5.4.6) na primeira reação do ciclo das purinas nucleotídeos, levando à depleção do conteúdo de adenina nucleotídeo e produção de amônia e

hipoxantina em situações onde a taxa de hidrólise do ATP no músculo excede a taxa de refosforilação de ADP. SAHLIN (1998) dá suporte a estas afirmações e também sugere que a interação entre a deficiência na produção de energia e fadiga possa estar relacionada a aumentos nas concentrações dos produtos da hidrólise de ATP, como ADP, AMP e Pi, ao invés da própria redução das concentrações de ATP. Uma pequena diminuição na concentração de ATP causaria grande aumento dos produtos de sua hidrólise, e a fadiga muscular estaria associada ao aumento no catabolismo de adenina nucleotídeos em situações de desbalanço entre produção e utilização de ATP. GREENHAFF (1997b) dá suporte a estas citações em estudo onde foi observado menor acúmulo de amônia plasmática e hipoxantina durante exercício máximo após a suplementação de creatina.

Conforme discutido anteriormente, a suplementação de creatina é responsável pelo aumento do TCr em aproximadamente 20%, sendo 20% deste total, acumulado sob a forma fosforilada – creatina fosfato (HARRIS et al., 1992; GREENHAFF et al., 1994 e HULTMAN et al., 1996).

O aumento no TCr, bem como do conteúdo de creatina fosfato, facilitam a geração de creatina fosfato intramuscular e ressíntese de ATP, principalmente em fibras de contração rápida, prolongando assim, a duração de atividades desenvolvidas em altas intensidades (BALSOM et al., 1994 e CASEY et al., 1996).

GREENHAFF et al. (1994b) e CASEY et al. (1996) citam ainda que a suplementação oral de creatina atenua a degradação de ATP durante atividades intensas, provavelmente devido à melhor manutenção da taxa de ressíntese de ATP a partir de ADP.

Com a suplementação de creatina, a capacidade da lançadeira creatina fosfato é aumentada, resultando em melhor desempenho em atividades intermitentes de alta intensidade, uma vez que a mesma manteria baixas concentrações de ADP, prevenindo efeitos inibitórios nas miosinas ATP-ases e perda de adenina nucleotídeos (WILLIAMS et al., 1999).

A suplementação de creatina, e o conseqüente aumento dos conteúdos de creatina livre e fosforilada agindo no aumento da capacidade de ressíntese de creatina fosfato e formação de ATP, funcionariam então como um tampão do acúmulo de ADP, diminuindo a formação de estimuladores da via glicolítica, resultando numa

menor dependência da glicólise anaeróbia, tendo como forte indicativo, em última análise, a menor concentração de lactato sanguíneo observada em nosso estudo.

Um ponto de discussão bastante importante neste momento trata da dosagem de suplementação e incorporação de creatina em ratos. Conforme discutido anteriormente, poucos são os trabalhos que estudam a suplementação desta substância em animais e sua relação com o exercício. Em relação aos seres humanos, parece haver um consenso em relação ao período e dosagem de suplementação, com vários trabalhos publicados mostrando o aumento no TCr a partir da suplementação de 20g/dia de creatina ao longo de 5 dias.

Já em relação a ratos, as doses reportadas na literatura variam dentro de um espectro muito amplo (de 250mg a 5g/Kg de peso corporal/dia). O mesmo pode se dizer dos períodos de suplementação (5 dias a 5 semanas). Não parece haver então, um consenso com relação ao protocolo de suplementação de creatina em ratos, embora nos estudos mais recentes a dose suplementada parece ser maior do que a usada em nosso experimento, ou quando os valores de dosagem se aproximam ao nosso, o período de suplementação parece ser maior.

Na elaboração de nosso protocolo, tomamos por base o estudo realizado por BRANNON et al. (1997). Neste, os autores utilizaram 250mg/Kg de peso corporal/dia de creatina ao longo de 10 dias. Esta dosagem se mostrou eficiente para o aumento de TCr em ratos.

Um dado que dá suporte ao nosso protocolo de suplementação é o maior aumento de peso significativo observado nos ratos suplementados com creatina após o período de suplementação. Conforme já discutido, a creatina é uma substância osmoticamente ativa, e sua incorporação na célula resultaria em aumento na incorporação de água na mesma. (HULTMAN et al., 1992; MUJIKI et al., 1996 e BEMBEN et al., 2001a). Os mesmos autores verificaram aumento significativo de peso em humanos após a suplementação de creatina e creditaram o aumento de peso observados em seus estudos à retenção hídrica promovida pela suplementação.

OP'T EIJNDE et al. (2001) e OP'T EIJNDE et al. (2001b) citam o aumento do conteúdo de glicogênio em músculos oxidativos (sóleo e porção vermelha do gastrocnêmio) em ratos após a suplementação de creatina. NELSON et al. (2001)

citam que a capacidade de armazenamento de glicogênio pode ser aumentada pela suplementação de creatina, devido à influência desta no aumento do volume celular.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças entre os grupos para o conteúdo de glicogênio em nenhum dos tecidos analisados após o exercício de natação em alta intensidade comparado com a situação controle, ou seja, a um animal de mesmo peso e origem que não tenha sido submetido a nenhum dos tratamentos propostos em nosso estudo.

A menor concentração de lactato no grupo suplementado, acompanhada da hipótese de menor dependência da glicólise anaeróbia não foram suficientes para mostrar diferenças no conteúdo de glicogênio. Talvez a demanda energética e conseqüentemente o conteúdo de glicogênio degradado não tenha sido de magnitude suficiente para revelar diferenças significativas entre os grupos, uma vez que o protocolo experimental era composto de 6 estímulos de apenas 30 segundos. Entretanto, a obtenção de dados referentes ao conteúdo de glicogênio após somente o período de suplementação e compará-los com os dados obtidos após todo o procedimento experimental, poderiam revelar alguma diferença em relação ao aumento do conteúdo de glicogênio e conseqüente eficiência da suplementação de creatina.

Alguns autores citam o papel da creatina como regulador da respiração celular. BRANNON et al. (1997) observaram aumento da atividade da enzima citrato sintase (E.C. 4.1.3.7), um marcador da capacidade oxidativa, em músculos sóleo e gastrocnêmio em ratos submetidos a treinamento e suplementação de creatina. MEYER et al. (1984) atribuem a creatina um papel de acceptor de ATP mitocondrial, podendo exercer alguma regulação sobre o metabolismo oxidativo, uma vez que a ressíntese de creatina fosfato é dependente do ATP produzido pela fosforilação oxidativa (BESSMAN et al., 1990). O TCr aumentado, e o conseqüente aumento na ressíntese de creatina fosfato após a suplementação poderiam então estar ligados a aumentos na capacidade oxidativa do indivíduo.

WALSH et al. (2001) estudaram o papel da creatina fosfato e da creatina na regulação da respiração mitocondrial em amostras de músculo de humanos. Os autores observaram que a creatina fosfato diminui a sensibilidade da respiração mitocondrial enquanto a creatina tem o efeito oposto. Numa situação onde a razão

creatina fosfato/creatina diminuir, fase de transição entre o repouso e atividade intensa por exemplo, a sensibilidade da respiração mitocondrial aumenta.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças na atividade máxima da enzima citrato sintase (*E.C. 4.1.3.7*), embora podemos inferir que houve ressíntese de creatina fosfato aumentada nos períodos de recuperação em função da menor concentração de lactato observada.

O mesmo pode ser dito a respeito da fosfofrutoquinase (*E.C. 2.7.1.11*). Não foram observadas diferenças significativas na atividade máxima desta enzima em nosso estudo. No entanto, podemos inferir menor fluxo pela via em decorrência da menor concentração de lactato observada com o aumento da ressíntese de creatina fosfato e provisão de ATP e conseqüente menor dependência da via glicolítica.

WALKER (1979) indica que a glicólise pode ser modulada pela creatina fosfato. A fosfofrutoquinase (*E.C. 2.7.1.11*), enzima chave na regulação da atividade glicolítica pode ser parcialmente inibida pela creatina fosfato. Conforme discutido anteriormente, a maior produção de ATP pela via ATP-CP “tamponaria” o acúmulo de ADP, diminuindo assim a formação de estimuladores das vias glicolítica e glicogenolítica e conseqüentemente suas atividades, resultando em menor acúmulo de lactato conforme observado em nosso estudo.

O fato de não termos verificado diferenças nas atividades máximas das enzimas citrato sintase (*E.C. 4.1.3.7*) e fosfofrutoquinase (*E.C. 2.7.1.11*) pode ser atribuído tanto à dose administrada aos nossos animais quanto à extensão do período de suplementação, o qual pode não ter sido suficiente para promover alterações expressivas nas atividades máximas destas enzimas.

Uma alternativa interessante nos próximos trabalhos seria a determinação do fluxo por estas vias, principalmente da via glicolítica, a qual poderia ser obtida através da infusão de glicose marcada e determinação subsequente de lactato marcado, o que nos permitiria entender a interação entre as vias ATP-CP e glicólise anaeróbia de produção de energia a partir da suplementação de creatina, além de comprovar a hipótese de menor dependência da glicólise anaeróbia como via de produção de energia em ratos suplementados, explicando as menores concentrações de lactato sanguíneo obtidas com a suplementação.

Alguns autores relatam ainda, a diminuição das concentrações plasmáticas de lactato com a suplementação de creatina (BALSOM et al., 1995; BURKE et al., 1996; NELSON et al., 1997; PREVOST et al., 1997 e YQUEL et al., 2002).

HARRIS et al. (1992) citam ainda que a ressíntese aumentada de creatina fosfato poderia gerar um efeito de “tamponamento” de íons H^+ , comprometendo a síntese de lactato.

Com a suplementação de creatina, a obtenção de menores concentrações de lactato e a realização de igual ou maior quantidade de trabalho alcançadas em relação ao grupo controle, ou concentrações similares ao grupo controle quando mais trabalho é realizado sugerem uma indicação de menor dependência da glicólise anaeróbia. Este mecanismo dar-se-ia pela diminuição da produção de substâncias estimuladoras da via glicolítica (menor acúmulo de ADP, AMP, Pi e menor queda do pH), ou pela geração de substâncias inibitórias da via glicolítica; BRANNON et al. (1997) demonstraram aumento da atividade da enzima citrato sintase (*E.C. 4.1.3.7*) com a suplementação de creatina em fibras do tipo I e, com a suplementação associada ao treinamento em fibras do tipo IIB, aumentando a atividade oxidativa e conseqüentemente aumentando a concentração de citrato, podendo gerar inibição da enzima fosfofrutoquinase (*E.C. 2.7.1.11*) e ainda favorecer a ressíntese de creatina fosfato em períodos de recuperação aeróbia.

Outros autores observaram aumento da concentração de lactato ou não verificaram diferenças significativas após a suplementação de creatina (FEBBRAIO et al., 1995; MUJICA et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1997; VANAKOSKI et al., 1998; TARNOPOLSKY et al., 2000; PREEN et al., 2001 e SKARE et al., 2001). Um fato importante, é que nestes estudos, a quantidade de trabalho realizada pelos grupos suplementados foi maior que nos grupos controles, indicando assim melhora no desempenho, evidenciando o efeito ergogênico da suplementação de creatina.

Em nosso estudo, conforme mencionado anteriormente, os animais suplementados apresentaram maior peso após os 5 dias de suplementação de creatina. Discutimos também, que de acordo com a literatura, este aumento é creditado à retenção hídrica promovida pela incorporação de creatina na célula.

Tendo em vista que a retenção hídrica promove aumento do volume da célula muscular sem promover aumento efetivo das proteínas contráteis do músculo (actina

e miosina), em um processo denominado hipertrofia sarcoplasmática, os animais suplementados teriam então maior carga de trabalho em relação aos animais controle, pois a determinação da carga utilizada no procedimento experimental é referente ao peso corporal do animal.

Mesmo com uma maior carga de trabalho em relação ao controle, os animais suplementados apresentaram menor concentração de lactato ao longo dos seis tiros de natação com carga acima do limiar metabólico anaeróbio, o que nos leva a crer, embora não pudemos observar outras alterações metabólicas, no efeito da suplementação de creatina na ressíntese aumentada de creatina fosfato e na menor dependência da glicólise anaeróbia.

6. CONCLUSÃO

A suplementação de 0,3g de creatina por Kg de peso corporal em ratos durante 5 dias foi suficiente para reduzir a concentração de lactato nas quatro últimas repetições de esforço supra limiar desenvolvidos em natação sem alteração tanto do conteúdo de glicogênio como da atividade máxima das enzimas citrato sintase (E.C. 4.1.3.7) e fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11).

Sugerimos aumento da ressíntese de creatina fosfato e maior provisão de ATP pela via ATP-CP com a suplementação de creatina, o que em última análise pode gerar menor dependência da glicólise anaeróbia e “tamponamento” de íons H⁺, reduzindo assim a concentração de lactato sanguíneo observado em nosso estudo. No entanto, novos estudos são necessários para podermos afirmar tal hipótese.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALP, P.R., E. A. NEWSHOLME and V.A. ZAMMIT. Activities of Citrate Synthase and NAD⁺- Linked and NADP⁺-Linked Isocitrate Dehydrogenase in Muscle from Vertebrates and Invertebrates. *Biochem. J.* n.154, p.689-700, 1976.
- AASERUD, R., P.GRAMVIK, S.R. OLSEN and J. JENSEN. Creatine Supplementation Delays Onset of Fatigue During Repeated Bouts of Sprint Running. *Scan. J. Med. Sci. Sports.* v.8, p.247-251, 1998.
- BALSOM, P.D., K. SODERLUND and B. EKBLÖM. Creatine in Humans with Special Reference to Creatine Supplementation. *Sports Med.* v.18, n.4, p.268-280, 1994.
- BALSOM, P.D., K. SODERLUND, B. SJODIN and B. EKBLÖM. Skeletal Muscle Metabolism During Short Duration High Intensity Exercise: Influence of Creatine Supplementation. *Acta Physiol. Scand.* v.154, n.3, p.303-310, 1995.
- BECQUE, M.D., J.D. LOCHMANN and D.R. MELROSE. Effects of Oral Creatine Supplementation on Muscular Strength and Body Composition. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.32, n.3, p.654-658, 2000.
- BEMBEN, M.G., D.A., BEMBEN, D.D. LOFTISS and A.W. KNEHANS. Creatine Supplementation During Resistance Training in College Football Athletes. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.33, n.10, p.1667-1673, 2001.
- BEMBEN, M.G., T.D. TUTTLE, D.A. BEMBEN and A.W. KNEHANS. Effects of Creatine Supplementation on Isometric Force-Time Curve Characteristics. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.33, n.11, p.1876-1881, 2001a

- BESSMAN, S. P., and R. SAVABI. The Role of the Phosphocreatine Energy Shuttle in Exercise and Muscle Hypertrophy. In *Biochemistry of Exercise VII*, A.W.TAYLOR, P.D. GOLLNICREATINA QUINASE, H.J. GREEN, C.D. IANUZZO, E.G. NOBLE, G. MÉTVIER and J. SUTTON. (Ed.). Champaign, IL: Human Kinetics Publishers Inc. p.167-178, 1990.
- BONEN, A., J.C. McDERMOTT and C.A. HUTBER. Carbohydrate Metabolism in Skeletal Muscle: An Update of Current Concepts. *Int. J. Sports. Med.* v.10, p.385-401, 1989.
- BOSCO, C., J. TIHANYI, J. PUCSPK, I. KOVACS, A. GABOSSY, R. COLLI, G. PUIVIRENTI, C. TRANQUILLI, C. FOTI, M. VIRU and A. VIRU. Effect of Oral Creatine Supplementation on Jumping and Running Performance. *Int. J. Sports Med.* v.18, p.369-372, 1997.
- BRANNON, T.A., G.R. ADAMS, C.L. CONIFF and K.M. BALDWIN. Effects of Creatine Loading and Training on Running Performance and Biochemical Properties of Rat Skeletal Muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.29, n.4, p.489-495, 1997.
- BRODY, T. *Nutritional Biochemistry*. San Diego, CA: Academic Press Inc., 1994
- BURKE, L.M., D.B. PYNE and R.D. TELFORD. Effect of Oral Creatine Supplementation on Single-Effort Sprint Performance in Elite Swimmers. *Int. J. Sport Nutr.* v.6, p.222-233, 1996.
- CASEY, A., D. CONSTANTIN-TEODOSIU, S. HOWELL, E. HULTMAN and P.L. GREENHAFF. Creatine Ingestion Favorably Affects Performance and Muscle Metabolism During Maximal Exercise in Humans. *Am. J. Physiol.* n.271, p.E31-E37, 1996.

- CHASIOTIS, D. The Regulation of Glycogen Phosphorilase and Glycogen Breakdown in Human Skeletal Muscle. *Acta Physiological Scandinavia*, v.526, p.5-68, 1983.
- CLARK, J.F. Uses of Creatine Phosphate and Creatine Supplementation for the Athlete. In *Creatine and Creatine Phosphate: Scientific and Clinical Perspectives*, M.A. CONWAY, and J.F. CLARK. (Ed.). San Diego, CA: Academic Press Inc., 1996.
- CLARK, J.F. Creatine: A Review of its Nutritional Applications in Sport. *Nutrition*. v.14, p.322-324, 1998.
- COOKE, R., K. FRANKS, G.B. LUCIANI and E. PATE. The Inhibition of Rabbit Skeletal Muscle Contraction by Hydrogen Ions and Phosphate. *Journal of Physiology*, v.395, p.77-97, 1988.
- COX, G., I. MUJIKA, D. TUMILTY and L. BURKE. Acute Creatine Supplementation and Performance During a Field Test Simulating Match Play in Elite Female Soccer Players. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* V.12, n.1, p.33-46, 2002.
- DAWSON, M., D. GADIAN and D. WILKIE. Muscular Fatigue Investigated by Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance. *Nature*, v.274, p.861-66, 1978.
- DELANGHE, J., J.P. De SLYPERE and M. De BUYZERE. Normal Reference Values for Creatine, Creatinine, and Carnitine are Lower in Vegetarians. *Clin. Chem.* v.35, p.1802-1803, 1989.
- EDMAN, K.A.P. and F. LOU. Changes in Force and Stiffness Induced by Fatigue and Intracellular Acidification in Frog Muscle Fibers. *Journal of Physiology*, v.424, p.133-49, 1990.

- ENGELHARDT, M., G. NEUMANN, A. BERBALK and I. REUTER. Creatine Supplementation in Endurance Sports. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.30, p.1123-1129, 1998.
- ENOKA, R.M. and D.G. STUART. Neurobiology of Muscle Fatigue. *J. Appl. Physiol.* v.72, n.5, p.1631-48, 1992.
- FEBBRAIO, M.A., T.R. FLANAGAN, R.J. SNOW, S. ZHAO and M.F. CAREY. Effect of Creatine Supplementation on Intramuscular TCr, Metabolism and Performance During Intermittent, Supramaximal Exercise in Humans. *Acta Physiol. Scand.* v.155, p.387-395, 1995.
- FITCH, C.D. and R.P. SHIELDS. Creatine Metabolism in Skeletal Muscle. I. Creatine Movement Across Muscle Membranes. *J. Biol. Chem.* v.241, p.3611-3614, 1966.
- GAGNON, M., M. MAGUIRE, M. MACDERMOTT and A. BRADFORD. Effects of Creatine Loading and Depletion on Rat Skeletal Muscle Contraction. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* v.29, p.885-890, 2002.
- GOLLNICREATINA QUINASE and P.L. HERMANSEN. Biochemical Adaptations to Exercise: Anaerobic Metabolism. *Exerc. Sports Sci. Rev.* v.1, p.1-43, 1973.
- GREEN, A.L., E.J. SIMPSON, J.J. LITTLEWOOD, I.A. MACDONALD and P.L. GREENHAFF. Carbohydrate Ingestion Augments Creatine Retention During Creatine Feeding in Humans. *Acta Physiol. Scand.* v.158, p.195-202, 1996.
- GREEN, H.J. Mechanisms of Muscle Fatigue in Intense Exercise. *J. Sports. Sci.* v.15, n.3, p.247-56, 1997.
- GREENHAFF, P.L. Creatine and Its Application as an Ergogenic Aid. *Int. J. Sport Nutr.* v.5, p.S100-S110, 1995.

- GREENHAFF, P.L. Creatine Supplementation: Recent Developments. *Br. J. Sports Med.* v.30, p.276-277, 1996a.
- GREENHAFF, P.L. The Nutritional Biochemistry of Creatine. *J. Nutr. Biochem.* v.11, p.610-618, 1997.
- GREENHAFF, P.L., K. BODIN, K. SODERLUND and E. HULTMAN. The Effect of Oral Creatine Supplementation on Skeletal Muscle Phosphocreatine Resynthesis. *Am J. Physiol.* v.266, p.E725-E730, 1994.
- GREENHAFF, P.L., K. BODIN, A. CASEY, D.C. TEODOSIU, A. GREEN, K. SODERLUND, J. TIMMONS and E. HULTMAN. Dietary Creatine Supplementation and Fatigue During High-Intensity Exercise in Humans. In *Biochemistry of Exercise IX*, R.J. MAUGHAN, and S.M. SHIRREFFS. (Ed.), Champaign, IL: Human Kinetics Publishers Inc., 1996b.
- GREENHAFF, P.L., K. BODIN, K. SODERLUND and E. HULTMAN. The Effect of Oral Creatine Supplementation on Skeletal Muscle Phosphocreatine Resynthesis. *Acta Physiol. Scand.* v.158, p.195-202, 1996c.
- GREENHAFF, P.L., A. CASEY and A. GREEN. Creatine Supplementation Revisited: An update. *Insider.* v.4, n.3, p.1-2, 1996d.
- GREENHAFF, P.L. and J.A. TIMMONS. Interaction Between Aerobic and Anaerobic Metabolism During Intense Muscle Contraction. In: *Exerc. and Sport Sci. Rev.*, J. HOLLOSZY (Ed.). Philadelphia, : Williams and Wilkins, v.26, p.1-30, 1998.
- HARGREAVES, M., M.J. MCKENNA, D.G. JENKINS, S.A. WARMINGTON, J.L. LI, R.J. SNOW and M.A. FEBBRAIO. Muscle Metabolites and Performance During High-Intensity, Intermittent Exercise. *J. Appl. Physiol.* v.84, n.5, p.1687-1691, 1998.

- HARRIS, R.C., K. SODERLUND and E. HULTMAN, E. Elevation of Creatine in Resting and Exercised Muscle of Normal Subjects by Creatine Supplementation. *Clin. Sci.* v.83, p.367-374, 1992.
- HAUSSINGER, D., E. ROTH, F. LANG and W. GEROK. Cellular Hydration State: An Important Determination of Protein Catabolism in Health and Disease. *Lancet.* n.341, p.1330 -1332, 1993.
- HOCHACHKA, P.W. and G.O. MATHESON. Regulating ATP Turnover Rates Over Broad Dynamic Work Ranges in Skeletal Muscles. *J. Appl. Physiol.* v,73, p.1697-1703, 1992.
- HOLLOSZY, J.O., M. KOHRT and P.A. HANSEN. The Regulation of Carbohydrate and Fat Metabolism During and After Exercise. *Front. Biosci.* 3, p.1011-1027, 1998.
- HULTMAN, E., K. SODERLUND, J.A. TIMMONS, G. CEDERBLAD and P.L. GREENHAFF. Muscle Creatine Loading in Men. *J. Appl. Physiol.* v.81, n.1, p.232-237, 1996.
- JACOBS, I., S. BLEUE and J. GOODMAN. Creatine Ingestion Increases Anaerobic Capacity and Maximal Accumulated Oxygen Deficit. *Can. J. Appl. Physiol.* v.22, p.231-243, 1997.
- KILDUFF, L.P., P. VIDA KOVIC, G. COONEY, R.W. LEWIS, P. AMUNA, M. PARKER, L. PAUL and Y.P. PITSILADIS. Effects of Creatine on Isometric Bench Press Performance in Resistance Trained Humans. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.34, n.7, p.1176-1183, 2002.
- KARLSSON, J. Lactate and Phosphagen Concentrations in Working Muscles of Man. *Acta Physiological Scandinavia*, v.358, p.1-72, 1971.

- KATZ, A. and K. SAHLIN. Role of Oxygen in Regulation of Glycolysis and Lactate Production in Human Skeletal Muscle. *Exerc. Sports. Sci. Rev.* v.18, p.1-28, 1990.
- KREIDER, R.B. Creatine, the Next Ergogenic Supplement? In *Sport Science Training and Technology*, Internet Society for Sport Science. <http://www.sportsci.org/traintech/creatine/rbk.html>. 1998b.
- KREIDER, R.B., M. FERREIRA, M. WILSON, P. GRINDSTAFF, S. PLISK, J. REINARDY, E. CANTLER and A.L. ALMADA. Effects of Creatine Supplementation on Body Composition, Strength and Sprint Performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.30, n.1, p.73-82, 1998.
- KREIDER, R., C. RASMUSSEN, J. RANSOM and A.L. ALMADA. Effects of Creatine Supplementation During Training on the Incidence of Muscle Cramping, Injuries and GI Distress. *Journal of Strength and Conditioning Research.* v.12, p.275 (Abstract), 1998c.
- KUEHL, K., L. GOLDBERG and D. ELLIOT. Renal Insufficiency After Creatine Supplementation in a College Football Athlete. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.30, S235 (Abstract), 1998.
- LAMB, D. *Physiology of Exercise: Responses and Adaptations*. 2. ed. New York, MacMillian, 1983.
- LANNERGREN, J. and H. WESTERBLAD. Force Decline Due to Fatigue and Intracellular Acidification in Isolated Fibers from Mouse Skeletal Muscle. *Journal of Physiology*, v.434, p.307-22, 1991.
- LONG, D., M. BLAKE, L. McNAUGHTON, and B. ANGLE. Hematological and Biochemical Changes During a Short Triathlon Competition in Novice Triathletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.61, p.93-99, 1990.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* n.193, p.265-275, 1951.

MacLAREN, D.P., H. GIBSON, M. PARRY-BILLINGS and R.H. EDWARDS. A Review of Metabolic and Physiological Factors in Fatigue. *Exerc.Sports. Sci. Rev.* v.17, p.29-6, 1989.

MARQUEZI, M.L., H.A. ROSCHEL, A.S. COSTA, L.A. SAWADA and A.H. LANCHETA JR. Effect of Aspartate and Asparagine Supplementation on Fatigue Determinants in Intense Exercise. *Int. J. Sports. Nutr.* (no prelo).

METZGER, J. and R. FITTS. Role of Intracellular pH in Muscle Fatigue. *J. Appl.Physiol.* v.62, p.1392-97, 1987.

MEYER, R.A., H.L. SWEENEY and M.J. KUSHMERICREATINA QUINASE. A Simple Analysis of the "Phosphocreatine Shuttle". *Am J. Physiol.* v.246, p. C365-C377, 1984.

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.

MCMILLEN, J., C.M. DONOVAN, J.I. MESSER and W.T. WILLIS. Energetic Driving Forces are Maintained in Resting Rat Skeletal Muscle After Dietary Creatina Supplementation. *J. Appl. Physiol.* v.90, p.62-66, 2001.

MÖLLER, P., J. BERGSTRÖM and P. FURST. Effect of Aging on Energy Rich Phosphagens in Human Skeletal Muscle. *Clin. Sci.* v.58, p.553-555, 1980.

- MUJIK, I., J.C. CHATARAD, L. LACOSTE, F. BARALE, and A. GEYSSANT. Creatine Supplementation Does Not Improve Sprint Performance in Competitive Swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.28, n.11, p.1435-1441, 1996.
- MUJIK, I. and S. PADILLA. Creatine Supplementation as an Ergogenic Aid for Sports Performance in Highly Trained Athletes: A Critical Review. *Int. J. Sports Med.* v.18, p.491-496, 1997.
- NELSON, A., R. DAY, E. GLICREATINA QUINASEMAN-WEISS, M. HEGSTAD, and B. SAMPSON. Creatine Supplementation Raises Anaerobic Threshold. *FASEB.* v.11, p. A589 (Abstract), 1997.
- NELSON, A.G., D.A. ARNALL, J. KOKKONEN, R. DAY and J. EVANS. Muscle Glycogen Supercompensation is Enhanced by Prior Creatine Supplementation. *Med. Sci Sports. Exerc.* v.33, n.7, p.1096-1100, 2001.
- NEWSHOLME, E.A. and I. BEIS. Old and New Ideas on the Roles of Phosphagens and their Kinases. In *Creatine and Creatine Phosphate: Scientific and Clinical Perspectives*. M.A. CONWAY, J.F. CLARK (Ed.), San Diego, Academic Press, p.3-15, 1996.
- ODLAND, L.M., J.D. MacDOUGALL, M.A. TARNOPOLSKY, A. ELORRIAGA, and A. BORGSMANN. Effect of Oral Creatine Supplementation on Muscle [PCr] and Short-Term Maximum Power Output. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.29, n.2, p.216-219, 1997.
- OOPK, V., S. TIMPMANN, L. MEDIJAINEN, and T. ALEKSEJEVA. Effect of Creatine Administration on Blood Urea Level and Postexercise Glycogen Repletion in Liver and Skeletal Muscle in Rats. *Ann. Nutr. Metab.* v.40, p.359-363, 1996.

- OP'T EIJNDE, B., E.A. RICHTER, J.C. HENQUIN, B. KIENS and P. HESPEL.
Effect of Creatine Supplementation on Creatine and Glycogen Content in Rat
Skeletal Muscle. *Acta Physiol. Scand.* v.171, p.169-176, 2001.
- OP'T EIJNDE, B., B. URSO, E.A. RICHTER, P.L. GREENHAFF and P. HESPEL.
Effect of Oral Creatine Supplementation on Human Muscle GLUT 4 Protein
Content After Immobilization. *Diabetes.* v.50, n.1, p.18-23, 2001b.
- PASSONNEAU, J.V. and O.H., LOWRY. *Enzymatic Analysis: A Practical Guide.*
New Jersey, Human Press, 1993
- PEYREBRUNE, M.C., M.E. NEVILL, F.J. DONALDSON, and D.J. COSFORD. The
Effects of Oral Creatine Supplementation on Performance in Single and
Repeated Sprint Swimming. *J. Sports Sci.* v.16, p.271-279, 1998.
- POORTMANS, J.R., H. AUQUIER, V. RENAUT, A. DURUSSEL, M. SAUGY, and
G.R. BRISSON. Effect of Short-Term Creatine Supplementation on Renal
Responses in Men. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.76, p.566-567, 1997.
- PREEN, D., B. DAWSON, C. GOODMAN, S. LAWRENCE, J. BEILBY and S.
CHING. Effect of Creatine Loading on Long-Term Sprint Exercise Performance
and Metabolism. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.33, n.5, p.814-821, 2001.
- PREVOST, M.C., A.G. NELSON, and G.S. MORRIS. Creatine Supplementation
Enhances Intermittent Work Performance. *Res. Q. Exerc. Sport.* v.68, p.233-
240, 1997.
- REHUNEN, S. and M. HARKONEN. High-Energy Phosphate Compounds in
Human Slow-Twitch and Fast-Twitch Muscle Fibers. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*
v.40, p.45-54, 1980.

ROBERTS, D. and D.J. SMITH. Biochemical Aspects of Peripheral Muscle Fatigue: A Review. *Sports. Med.* v.7, p.125-38, 1989.

ROMER, L.M., J.P. BARRINGTON and A.E. JEUKENDRUP. Effects of Oral Creatine Supplementation on High Intensity, Intermittent Exercise Performance in Competitive Squash Players. *Int. J. Sports. Med.* v.22, n.8, p.546-552, 2001.

SAHLIN, K. Muscle Fatigue and Lactic Acid Accumulation. *Acta Physiol. Scand.* v.128, p.82-91, 1986.

SAHLIN, K. Anaerobic Metabolism, Acid-Base Balance, and Muscle Fatigue During High Intensity Exercise. In *Oxford Textbook of Sports Medicine*. M. HARRIES, C. WILLIAMAS, W.D. STANISH, L.J. MICHELI (Ed.). Oxford University Press, Oxford, p.69-76, 1998.

SCHILLING, B.K., M.H. STONE, A. UTTER, J.T. KEARNEY, M. JOHNSON, R. COGLIANESE, L. SMITH, H.S. O'BRYANT, A.C. FRY, M. STARKS, R. KEITH and M.E. STONE. Creatine Supplementation and Health Variables: A Retrospective Study. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.33, n.2, p.183-188, 2001

SCHNEIDER, D.A., P.J. McDONOUGH, P.J. FADEL, and J.P. BERWICREATINA QUINASE. Creatine Supplementation and the Total Work Performed During 15s and 1min Bouts of Maximal Cycling. *Aust. J. Sci. Med. Sport.* v.3, p.65-68, 1997.

SKARE, O.C., SKADBERG and A.R. WISNES. Creatine Supplementation Improves Sprint Performance in Male Sprinters. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* v.11, n.2, p.96-102, 2001.

SKINNER, J.S and T.H. MCLELLAN. The Transition from Aerobic to Anaerobic Metabolism. *Res. Q. Exerc. Sport.* v.51, n.1, p.234-48, 1980.

- SMITH, S.A., S.J. MONTAIN, R.P. MATOTT, G.P. ZIENTARA, F.A. JOLESZ, and R.A. FIELDING. Effects of Creatine Supplementation on the Energy Cost of Muscle Contraction: a ^{31}P -MRS study. *J. Appl. Physiol.* v.87, n.1, p.116-123, 1999.
- SNOW, R.J., M.J. McCREATINA, S.E. SELIG, J. KEMP, C.G. STATHIS, and S. ZHAO. Effect of Creatine Supplementation on Sprint Exercise Performance and Muscle Metabolism. *J. Appl. Physiol.* v.84, n.5, p.1667-1673, 1998.
- SPRIET, L.L. Anaerobic Metabolism During High-Intensity Exercise. In *Exercise Metabolism*, M. HARGREAVES. (Ed). Champaign, IL: Human Kinetics Publishers Inc., 1995.
- TARNOPOLSKY, M.A. and D.P. MacLENNAN. Creatine Monohydrate Supplementation Enhances High Intensity Exercise Performance in Males and Females. *Int. J. Nutr. Exerc. Metab.* v.10, n.4, p.452-463, 2000.
- TARNOPOLSKY, M.A., G. PARISE, N.J. YARDLEY, C.S. BALLANTYNE, S. OLATUNJI and S.M. PHILLIPS. Creatine Dextrose and Protein Dextrose Induce Similar Strength Gains During Training. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.33, n.12, p.2044-2052, 2001.
- TESCH, P. Muscle Fatigue in Man with Special Reference to Lactate Accumulation During Short Term Intense Exercise. *Acta Physiological Scandinavia*, v.480, p.5-40, 1980.
- THOMPSON, C.H., G.J. KEMP, A.L. SANDERSON, R.M. DIXON, P. STYLES, D.J. TAYLOR, and G.K. RADDA. Effect of Creatine on Aerobic and Anaerobic Metabolism in Skeletal Muscle in Swimmers. *Br. J. Sports Med.* v.30, p.222-225, 1996.

- VANAKOSKI, J., V. KOSUNEN, E. MERININNE, and T. SEPALLA. Creatine and Caffeine in Anaerobic and Aerobic Exercise: Effects on Physical Performance and Pharmacokinetic considerations. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* v.36, p.258-262, 1998.
- VANDENBERGHE, K., M. GORIS, P. VAN HECREATINA QUINASEE, M. VAN LEEMPUTTE, L. VANGERVEN, and P. HESPEL. Long Term Creatine Intake is Beneficial to Muscle Performance During Resistance Training. *J. Appl. Physiol.* v.83, n.6, p.2055-2063, 1997.
- VITTASALO, J. and, P. KOMI. EMG, Reflex and Reaction Time Components Muscle Structure and Fatigue During Intermittent Isometric Contractions in Man. *International Journal of Sports Medicine*, v.1, p.185-90, 1980.
- VIRU, M., V. OOIPIK, A. NURMEKIVI, L. MEDIJAINEN, S. TIMPMANN, and A. VIRU. Effect of Creatine Intake on the Performance Capacity in Middle-Distance Runners. *Coaching and Sport Science Journal.* v.1, p.31-36, 1994.
- VOLEK, J.S., R.D. WILLIAM, W.J. KRAEMER, J.A. BUSH, M. BOETES, T. INCLEDON, K.L. CLARK, and J.M. LYNCH. Creatine Supplementation Enhances Muscular Performance During High-Intensity Resistance Exercise. *J. Am. Diet. Assoc.* v.97, p.765-770, 1997.
- VOLEK, J.S and W.J. KRAEMER. Creatine Supplementation: Its Effect on Human Muscular Performance and Body Composition. *Journal of Strength and Conditioning Research.* v.10, p.200-210, 1996.
- VOLEK, J.S., N.D. DUNCAN, S.A. MAZZETTI, R.S. STARON, M. PUTUKIAN, A.L. GÓMEZ, D.R. PEARSON, W.J. FINK, and W.J. KRAMER. Performance and Muscle Fiber Adaptations to Creatine Supplementation and Heavy Resistance Training. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.31, n.8, p.1147-1156, 1999.

- VOLEK, J.S., S.A. MAZZETTI, W.B. FARQUHAR, B.R. GOMES, A.L. GOMEZ and W.J. KRAEMER. Physiological Responses to Short-Term Exercise in Heat After Creatine Loading. *Med. Sci. Sports. Exerc.* v.33, n.7, p.1101-1108, 2001.
- WALKER, J.B. Metabolic Control of Creatine Biosynthesis, 1: Effect of Dietary Creatine. *J. Biol. Chem.* n.235, p.2357-2361, 1960.
- WALKER, J.B. Creatine: Biosynthesis, Regulation and Function. *Advan. Enzymol.* n.50, p.177-242, 1979.
- WALSH, B., M. TONKONOJI, K. SODERLUND, E. HULTMAN, V. SAKS and K. SAHLIN. The Role of Phosphorylcreatine and Creatine in the Regulation of Mitochondrial Respiration in Human Skeletal Muscle. *J. Physiol.* v.15, n.537, p.971-978, 2001.
- WILLIAMS, M.H., R.B. KREIDER and J.D. BRANCH. *Creatine the Power Supplement*. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers Inc., 1999
- YOUNG, J.C. and R.E. YOUNG. The Effect of Creatine Supplementation on Glucose Uptake in Rat Skeletal Muscle. *Life Sci.* n.71, p.1731-1737, 2002.
- YQUEL, R.J., L.M. ARSAC, E. THIAUDIERE, P. CANIONI G. MANIER. Effect of Creatine Supplementation on Poshocreatine Resynthesis, Inorganic Phosphate Accumulation and pH During Intermittent Maximal Exercise. *J. Sports. Sci.* v.20, n.5, p.427-437, 2002.
- ZAMMIT, V.A. and E.A. NEWSHOLME. The Maximum Activities of Hexokinase, Phosphorylase, Phosphofructokinase, Glycerol Phosphate Dehydrogenase, Lactate Dehydrogenase, Octopine Dehydrogenase, Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase, Nucleoside Diphosphate Kinase, Glutamate Oxaloacetate Transaminase and Arginine Kinase in Relation to Carbohydrate Utilization in Muscles from Marine Invertebrates. *Biochem. J.* n.160, p.447-462, 1976.

ZIEGENFUSS, T.N., M. ROGERS, L. LOWERY, N. MULLINS, R. MENDEL, J. ANTONIO, P. LEMON. Effect of Creatine Loading on Anaerobic Performance and Skeletal Muscle Volume in NCAA Division I Athletes. *Nutrition*. V.18, n.5, p.397-402, 2002.