

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

RENATO APARECIDO DE SOUZA

ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE CREATINA
EM RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS - AVALIAÇÃO
BIOQUÍMICA E HISTOMORFOLÓGICA DA FUNÇÃO RENAL E
HEPÁTICA

São José dos Campos, SP

2006

RENATO APARECIDO DE SOUZA

ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE CREATINA EM RATOS
SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E
HISTOMORFOLÓGICA DA FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ribeiro

São José dos Campos, SP

2006

S718e

Souza, Renato Aparecido de

Estudo da suplementação aguda e crônica de creatina em ratos sedentários e exercitados - Avaliação bioquímica e histomorfológica da função renal e hepática / Renato Aparecido de Souza. São José dos Campos: UNIVAP, 2006.

123f.: :il.; 30 cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Creatina 2. Função renal 3. Função hepática I. Ribeiro, Wellington, Orientador. II. Título

CDU:547.495.9

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:



Data:

24/02/06

**“ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE CREATINA EM RATOS
SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS - AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA DA FUNÇÃO
RENAL E HEPÁTICA”**

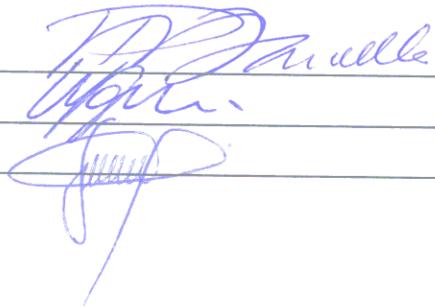
Renato Aparecido de Souza

Banca Examinadora:

Profª Drª **PATRICIA MARA DANELLA** (UNIVAP)

Profª Dr. **WELLINGTON RIBEIRO** (UNIVAP)

Profª. Dr **JOSÉ WELBER M. COSTA CRUZ.** (USP)

Three handwritten signatures in blue ink are positioned over horizontal lines. The top signature is for Patricia Mara Danella, the middle for Wellington Ribeiro, and the bottom for José Welber M. Costa Cruz.

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, que sempre mostrou a relevância do estudo e nunca mediu esforços para permitir meu crescimento intelectual.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom inexorável da vida;

A meus pais, pela presença constante e total apoio;

A Gabriela Loiola Camargo, pelo amor, palavras de incentivo, compreensão, carinho e paciência;

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do IP&D (UNIVAP);

Ao Prof. Rodolfo de Paula Vieira (USP), pelas fundamentais cooperações e parcerias;

A D. Ivone (IP&D), por resolver todos os problemas a ela recorridos;

A Bibliotecária Rosangela Regis Cavalcanti, pela paciência e prontidão nas correções metodológicas do trabalho.

E, meus especiais e sinceros agradecimentos a meu orientador Prof. Dr. Wellington Ribeiro, que sem dúvida alguma, permitiu-me crescer pessoal e academicamente durante estes 2 anos de convivência.

“ Não sei o que pareço aos olhos do mundo, mas para mim, sou apenas um garoto brincando na praia, entretido em descobrir de vez em quando um pedregulho mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade estende à minha frente, totalmente desconhecido”

Isaac Newton 1643-1727

Resumo

A creatina (ácido acético α -metilguanidina) é um composto de ocorrência natural que desempenha diversas funções sobre a bioenergética tecidual. Diversos estudos têm demonstrado possíveis efeitos ergogênicos associados à suplementação oral deste composto. Entretanto, existem alguns relatos de efeitos colaterais desta suplementação em tecidos metabolicamente relacionados. Desta forma, o presente objetivou avaliar bioquimicamente e histomorfologicamente as funções renais e hepáticas de ratos Wistar sedentários ou submetidos à natação (80% de carga máxima tolerada, cinco vezes por semana, durante 30 minutos diários) e suplementados com creatina a curto ($5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ durante uma semana) e a longo prazo ($1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ durante quatro e oito semanas). Para tanto, as concentrações plasmáticas de alanina aminotransferase (ALT (U/L)), aspartato aminotransferase (AST (U/L)), gama glutamiltransferase (GGT (U/L)), fosfatase alcalina (U/L), lactato desidrogenase (LDH (U/L)), bilirrubinas totais (mg/dl), albumina (g/dl), uréia (mg/dl), creatinina (mg/dl) e creatina quinase (CQ (U/L)), foram mensuradas e correlacionadas com os achados histomorfológicos do rim e fígado. Também foi avaliada a carga máxima suportada (g) durante o teste de carga máxima, bem como as concentrações sanguíneas de glicose (mg/dl) e lactato (mg/dl) pré e pós-teste. Setenta e dois animais ($240 \pm 10\text{g}$) foram divididos em quatro grupos ($n=18$): dieta normal sedentário (**CON**), dieta com Creatina sedentário (**CRE**), dieta normal exercitado (**NAT**), dieta com creatina exercitado (**CRE+NAT**). Ao final da primeira, quarta e oitava semanas foram sacrificados seis animais de cada grupo e obtidos os seguintes resultados significativos (média \pm e.p.m.; $p < 0,05$ - ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer): (1) Elevação sérica de marcadores da função renal após quatro semanas de suplementação em animais do grupo **CRE-4** (creatinina: $1,1 \pm 0,2$ e uréia: 37 ± 3), quando comparamos o grupo **CRE-4** com os grupos **CON-4** (creatinina: $0,4 \pm 0,2$ e uréia: 20 ± 2), **NAT-4** (creatinina: $0,5 \pm 0,2$ e uréia: 18 ± 2) e **CRE+NAT-4** (creatinina: $0,6 \pm 0,1$ e uréia: 22 ± 3); Elevação sérica de marcadores da função renal após oito semanas de suplementação em animais do grupo **CRE-8** (creatinina: $1,2 \pm 0,2$ e uréia: 36 ± 8), quando comparamos o grupo **CRE-8** com os grupos **CON-8** (creatinina: $0,4 \pm 0,1$ e uréia: 19 ± 1), **NAT-8** (creatinina: $0,6 \pm 0,1$ e uréia: 20 ± 2) e **CRE+NAT-8** (creatinina: $0,6 \pm 0,2$ e uréia: 23 ± 2); Os resultados da função bioquímica renal puderam ser associados com alterações histomorfológicas do parênquima renal condizentes com injúria tecidual após quatro e oito semanas, nos grupos **CRE-4** e **CRE-8**, respectivamente. (2) Elevação sérica de marcadores da função hepática após oito semanas de suplementação em animais do grupo **CRE-8** (ALT: 41 ± 7 , AST: 89 ± 6 , GGT: $8,0 \pm 0,9$ e fosfatase alcalina: 125 ± 10) quando comparamos o grupo **CRE-8** com os grupos **CON-8** (ALT: 23 ± 7 , AST: 62 ± 5 , GGT: $3,9 \pm 1,0$ e fosfatase alcalina: 67 ± 09), **NAT-8** (ALT: 21 ± 8 , AST: 71 ± 5 , GGT: $4,1 \pm 1,0$ e fosfatase alcalina: 69 ± 12) e **CRE+NAT-8** (ALT: 27 ± 6 , AST: 67 ± 7 GGT: $3,9 \pm 0,7$ e fosfatase alcalina: 75 ± 12). Os resultados da função bioquímica hepática puderam ser associados com alterações histomorfológicas do parênquima hepático condizentes com injúria tecidual no grupo **CRE-8**; (3) redução dos níveis glicêmicos (pós-teste), do acúmulo de lactato sanguíneo (pós-teste) e incremento da carga máxima tolerada (pós-teste) durante todo o experimento em animais dos grupos **CRE+NAT**. Os resultados deste estudo apontam: (1) possível nefro e hepatotoxicidade tempo-dependente após a suplementação de creatina em animais sedentários; (2) possível efeito ergogênico da creatina se associada à atividade física. Estes achados nos permite concluir que a suplementação de creatina se associada a atividade física, não prejudica as funções renais e hepáticas e incrementa a tolerância ao esforço físico.

Palavras-chave: suplementação de creatina, função renal, função hepática, recursos ergogênicos, ratos Wistar.

Abstract

The creatine (α -methylguanidine acetic acid) is a natural occurrence compound that carries several functions on the tissue bioenergetic. Several studies have been demonstrated possible ergogenic effects associated to the creatine oral supplementation. However, there are some reports that showed side effects of creatine supplementation in metabolic related tissue. The present study aimed to evaluate biochemistry and histomorphological the renal and hepatic functions of Wistar rats sedentary or submitted to the swimming (80% of tolerated maximum load, five times a week, for 30 diaries minutes) and creatine supplemented with the short-term ($5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ during one week) and long-term ($1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for four and eight weeks). The plasmatic concentrations of alanine aminotransferase (ALT (U/L)), aspartate aminotransferase (AST (U/L)), gamma glutamyltransferase (GGT (U/L)), alkaline phosphatase (U/L), lactate deshydrogenase (LDH (U/L)), total bilirubin (mg/dl), albumin (g/dl), ureia (mg/dl), creatinine (mg/dl) and creatine kinase (CQ (U/L)) were measured and correlated with the kidney and liver histomorphological aspects. Also it was evaluated the supported maximum load (g) during the Test of Maximum Load, as well as the sanguine concentrations of glucose (mg/dl) and lactate (mg/dl) before and after the test. Seventy two animals ($240 \pm 10\text{g}$) were divided in four groups ($n=18$): sedentary normal diet (**CON**), sedentary creatine diet (**CRE**), exercised normal diet (**NAT**), exercised creatine diet (**CRE+NAT**). At the end of the first, fourth and eighth weeks six animals of each group were sacrificed and obtained the following significant results (mean \pm e.p.m; $p < 0,05$ - ANOVA following for the test Tukey-Kramer): (1) plasmatic elevation of biochemical markers of the renal function after four weeks of creatine supplementation in animals of the group **CRE-4** (creatinine: $1,1 \pm 0,2$ and ureia: 37 ± 3), when compared the group **CRE-4** to the groups **CON-4** (creatinine: $0,4 \pm 0,2$ and ureia: 20 ± 2), **NAT-4** (creatinine: $0,5 \pm 0,2$ and ureia: 18 ± 2) and **CRE+NAT-4** (creatinine: $0,6 \pm 0,1$ and ureia: 22 ± 3); plasmatic elevation of biochemical markers of the renal function after eight weeks of creatine supplementation in animals of the group **CRE-8** (creatinine: $1,2 \pm 0,2$ and ureia: 36 ± 8), when compared the group **CRE-8** to the groups **CON-8** (creatinine: $0,4 \pm 0,1$ and ureia: 19 ± 1), **NAT-8** (creatinine: $0,6 \pm 0,1$ and ureia: 20 ± 2) and **CRE+NAT-8** (creatinine: $0,6 \pm 0,2$ and ureia: 23 ± 2); The results of the renal biochemical function could be associated with histomorphological alterations related with tissue damage in the renal parenquime, after four and eight weeks, in the groups **CRE-4** and **CRE-8**, respectively. (2) plasmatic elevation of biochemical markers of the hepatic function after eight weeks of creatine supplementation in the group **CRE-8** (ALT: 41 ± 7 , AST: 89 ± 6 , GGT: $8,0 \pm 0,9$ and alkaline phosphatase: 125 ± 10) when compared the group **CRE-8** to the groups **CON-8** (ALT: 23 ± 7 , AST: 62 ± 5 , GGT: $3,9 \pm 1,0$ and alkaline phosphatase: 67 ± 09), **NAT-8** (ALT: 21 ± 8 , AST: 71 ± 5 , GGT: $4,1 \pm 1,0$ and alkaline phosphatase: 69 ± 12) and **CRE+NAT-8** (ALT: 27 ± 6 , AST: 67 ± 7 GGT: $3,9 \pm 0,7$ and alkaline phosphatase: 75 ± 12). The results of the biochemical hepatic function could be associated with histomorphological alterations related with tissue damage in the hepatic parenquime after eight weeks of creatine supplementation in group **CRE-8**; (3) reduction of the sanguine glucose (after-test), reduction of the sanguine lactate (after-test) and increment of the tolerated maximum load (after-test) during the whole experiment in animals of the groups **CRE+NAT**. The results of this study suggest: (1) possible nephro and hepatotoxicity time-dependent after long-term creatine supplementation in sedentary animals; and (2) possible ergogenic effect of the creatine supplementation if associated to the physical activity. In conclusion, the creatine supplementation if associated to the physical activity does not harm the renal and hepatic functions and it increases the physical tolerance.

Keywords: creatine supplementation, renal function, hepatic function, ergogenic aids, rats.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Estrutura química da Creatina.	03
Figura 2. Formas ionizadas das moléculas de Creatina (Cr) e Creatina Fosfato (CP)	05
Figura 3. Biosíntese da Creatina	07
Figura 4. Catabolismo e Excreção da Creatina	08
Figura 5. Efeitos da Creatina sobre o metabolismo da glicose e do lactato	10
Figura 6. Fosforilação e Desfosforilação da Creatina	11
Figura 7. Modelo de Lançadeira de Creatina e Creatina Fosfato	12
Figura 8. Hipótese de toxicidade da Creatina	15
Figura 9. Topografia Geral do Rim	16
Figura 10. Vista panorâmica da cortical do rim	18
Figura 11. Lóbulo hepático	20
Figura 12. Aspecto tridimensional do fígado normal	21
Figura 13. Fotomicrografia do fígado normal	22
Figura 14. Ingestão diária de ração	34
Figura 15. Ingestão diária de água	35
Figura 16. Eficiência Alimentar	36
Figura 17. Massa Corporal Total	37
Figura 18. Teste de Carga Máxima	38
Figura 19. ALT	41
Figura 20. AST	42
Figura 21. GGT	43
Figura 22. Fosfatase Alcalina	44
Figura 23. LDH	45
Figura 24. Bilirrubinas Totais	46
Figura 25. Albumina	47
Figura 26. Uréia	48
Figura 27. Creatinina	49
Figura 28. CQ	50
Figura 29. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CON	51
Figura 30. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CON	52
Figura 31. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo NAT	53

Figura 32. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo NAT	54
Figura 33. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-1	55
Figura 34. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-1	56
Figura 35. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-1	57
Figura 36. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-1	58
Figura 37. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-4	59
Figura 38. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-4	60
Figura 39. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-4	61
Figura 40. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-4	62
Figura 41. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-8	63
Figura 42. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-8	64
Figura 43. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-8	65
Figura 44. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-8	66
Figura 45. Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo CRE-8	67
Figura 46. Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo CON	68
Figura 47. Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo NAT	69
Figura 48. Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo CRE-4	70
Figura 49. Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo CRE+NAT	71

Lista de Tabelas

Tabela 1. Glicose Pré e Pós Teste de Carga Máxima	39
Tabela 2. Lactato Pré e Pós Teste de Carga Máxima	40

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ADP – Adenosina Dinucleotídeo Fosfato
- AGAT – Arginina-glicina amidinotransferase
- AH – Alça de Henle
- ALT - Alanina aminotransferase
- ANOVA – Análise da Variância
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AST - Aspartato aminotransferase
- ATP - Adenosina Trifosfato
- ATP-CP - Sistema Fosfagênio de obtenção de energia
- BB-CQ – Creatina Quinase Cerebral
- CB – Cápsula de Bowman
- CEP – Comitê de Ética e Pesquisa
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COI - Comitê Olímpico Internacional
- CON – Grupos Experimentais Controle
- CP - Creatina Fosfato
- CQ - Creatina Quinase
- Cr - Creatina
- CRE - Grupos Experimentais Sedentários e Suplementados
- CRE + NAT - Grupos Experimentais Exercitados e Suplementados
- CS - Citrato Sintase
- CT1 - Receptor celular para Creatina do tipo 1
- EA - Eficiência Alimentar
- E.P.M – Erro Padrão da Média
- g - gramas
- g/dl – gramas por decilitro
- GAMT – Guanidinoacetato metiltransferase
- GGT - Gama glutamiltransferase
- GLs – capilares glomerulares
- GLDH – Glutamato Desidrogenase (GLDH)
- GLUT-4 - Receptor celular de Glicose do tipo 4

HPCE – Eletroforese de Alta Resolução por Capilar

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Pressão

IGF-1 – Fator de Crescimento Insulínico do tipo 1

KCl – Cloreto de Potássio

kg – Quilograma

LDH - Lactato Desidrogenase

MB-CQ - Creatina Quinase Muscular e Cerebral

mg/dl – miligramas por decilitro

Mi-CQ – Creatina Quinase mitocondrial

ml - mililitro

mm – milímetro

mmol/l – milimolar por litro

MM-CQ - Creatina Quinase Muscular

NAT – Grupos Experimentais Exercitados e Não Suplementados

RE - Recursos Ergogênicos

r.p.m. – rotações por minuto

SNC – Sistema Nervoso Central

TCD – Túbulo Contorcido Distal

TCM - Teste de Carga Máxima

TCP – Túbulo Contorcido Proximal

*T*_{máx}- Tempo necessário para que uma substância atinja sua máxima concentração plasmática

U/L – Unidades por litro

VCL – Veia centrolobular

Sumário

1. Introdução	01
1.1 A Creatina	03
1.1.1 Absorção, distribuição e captação tecidual da Creatina	04
1.1.2 Síntese endógena	06
1.1.3 Catabolismo e Excreção	08
1.2 Vias metabólicas de obtenção de energia	09
1.2.1 Papel da Creatina no metabolismo energético	11
1.3 Aplicações terapêuticas e possíveis efeitos adversos da suplementação de Cr	14
1.4 Os Rins	16
1.5 O Fígado	19
2. Objetivos	23
2.1 Objetivos Gerais	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. Material e Métodos	25
3.1 Modelo Experimental	25
3.2 Dieta dos animais	26
3.2.1 Ração utilizada	27
3.3 Protocolo de Atividade Física	28
3.4 Suplementação da Creatina	29
3.5 Glicose e Lactato	30
3.6 Sacrifício dos Animais	30
3.7 Coleta Sanguínea e Tecidual	31
3.8 Avaliação Histomorfológica Renal e Hepática	32
3.9 Avaliações Bioquímicas	32
3.10 Análise Estatística	33
4. Resultados	34
4.1 Ingestão Alimentar (Ração e Água)	34
4.2 Eficiência Alimentar	36
4.3 Massa Corporal Total	37
4.4 Teste de Carga Máxima	38
4.5 Glicose	39

4.6 Lactato	40
4.7 Testes Bioquímicos	41
4.7.1 ALT	41
4.7.2 AST	42
4.7.3 GGT	43
4.7.4 Fosfatase Alcalina	44
4.7.5 LDH	45
4.7.6 Bilirrubinas Totais	46
4.7.7 Albumina	47
4.7.8 Uréia	48
4.7.9 Creatinina	49
4.7.10 CQ	50
4.8 Histomorfologia Renal	51
4.9 Histomorfologia Hepática	67
5. Discussão	72
6. Conclusões	81
Referencias	82

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os exercícios físicos representam uma importante preocupação da população mundial (LAMONTE *et al.*, 2005). Alguns indivíduos exercitam por questões de saúde, seja para prevenir doenças crônicas, ou para promover determinada reabilitação (BENDERMACHER *et al.*, 2005). Outros se exercitam para manter ou melhorar sua aparência física (SILVA *et al.* 2004). Também há aqueles que fazem exercícios esporádicos objetivando o prazer dos esportes recreacionais ou através de treinamentos rigorosos buscam alcançar a superioridade atlética em esportes de alto nível (CLARKE *et al.*, 2005).

Entretanto, em todos os níveis da prática de atividade física, alguns indivíduos para obter melhoras adicionais, recorrem ao uso de Recursos Ergogênicos (RE) (ELLENDER ; LINDER, 2005). Segundo Silver (2001), os RE são substâncias capazes de incrementar e aprimorar o desempenho físico. Neste sentido, inúmeros suplementos dietéticos têm sido comercializados, especialmente para atletas, como forma de novas estratégias nutricionais que visam potencializar o rendimento físico (TOKISH *et al.*, 2004; MILMAN ; ROSS, 2003; AHREND, 2001). Diante dos potenciais riscos encontrados em substâncias ergogênicas proibidas pelo COI (Comitê Olímpico Internacional) e as penalidades associadas ao teste *antidoping* positivo, o interesse é cada vez maior por substâncias ergogênicas legalizadas (LOMBARDO, 2004; FOUILLOT, 2004). O mais popular suplemento dietético legalizado à venda como possível RE é a creatina (Cr), um nutriente encontrado naturalmente nos alimentos de origem animal (BEMBEN ; LAMONT, 2005; KREIDER, 2003).

O interesse pela suplementação de Cr atingiu enorme popularidade entre os atletas dos jogos olímpicos de Atlanta (1996). Foi estimado que nestes jogos, cerca de 80% dos atletas utilizaram Cr e um número importante destes atletas conseguiram medalhas de ouro (EKBLUM, 1996). Desde 1995, nos Estados Unidos, as vendas da Cr crescem anualmente

mais de 730% totalizando lucros de aproximadamente 100.000 dólares (ROBINSON *et al.*, 2000). Estes dados estão associados ao fato de que nenhum constituinte natural alimentar como a Cr é classificado como droga pelo COI, ou seja, a Cr é legalizada para o uso aliado à competição esportiva. No entanto, devido ao possível uso indiscriminado cada vez maior pela população mundial e a preocupação com possíveis efeitos colaterais associados a Cr, instituições governamentais de regulamentação procuram formas de controlar a comercialização deste suplemento.

No Brasil não existem dados que quantifique o número de consumidores ou o perfil dos usuários deste suplemento alimentar. Sua venda é liberada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde que haja cumprimento das normas estabelecidas na proposta de regulamento para venda de nutrientes isolados com funções bioativas, e alegações de propriedade funcional e ou de saúde (publicada no Diário Oficial do dia 17 de agosto de 2001). A finalidade é regulamentar a venda e o registro de nutrientes que, além da função de nutrir, provocam efeitos benéficos no metabolismo humano, sendo obrigatório à presença de orientações específicas nos rótulos das embalagens comerciais, como por exemplo: "Não utilize mais do que 2g diários de Creatina"; "Não produz efeito em exercícios de longa duração"; "Não deve ser consumido por pessoas com problemas hepáticos ou renais" e "O consumo acima da quantidade recomendada pode provocar sintomas como náusea, diarreia e vômito" (ANVISA, 2001). Outro aspecto importante é o controle de qualidade que garante o grau de pureza do produto e impede qualquer tipo de contaminação durante o processo de industrialização do suplemento. A Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) e a Eletroforese de Alta Resolução por Capilar (HPCE) são os métodos de análise química necessários para a qualificação do produto (ANVISA, 2001). Neste sentido, algumas pesquisas sobre a suplementação de Cr têm sido conduzidas para fornecer informações sobre

a segurança do uso deste nutriente (PLINE ; SMITH, 2005; POORTMANS *et al.*, 2005; TARNOPOLSKY *et al.* 2003; WALDRON *et al.*, 2002).

A despeito da ampla utilização da Cr pela população mundial, e a persistência de muitas dúvidas e controvérsias quanto à suplementação deste nutriente, o presente estudo foi realizado na tentativa de melhor esclarecer os efeitos a curto e a longo prazo da suplementação de Cr sobre tecidos metabolicamente relacionados ao processo de armazenamento, síntese e excreção desta substância. Além disto, como a Cr é pouco estudada em relação ao metabolismo aeróbico, e parece modificar a utilização de substratos energéticos, como a glicose e o lactato (CEDDIA ; SWEENEY, 2004; HAVENETIDIS ; BOURDAS, 2004), este estudo observou a relação da Cr sobre a utilização e produção de substratos energéticos e o desempenho físico durante atividade aeróbica de alta intensidade. Desta forma, objetivamos adquirir informações complementares que possam contribuir para um emprego mais seguro e eficiente da Cr.

1.1 A Creatina

A Cr (ácido acético α -metilguanidina), uma amina nitrogenada (Figura 1), é um constituinte nutricional encontrado naturalmente em alimentos de origem animal e sintetizado pelo próprio organismo humano a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina (WALKER, 1979).

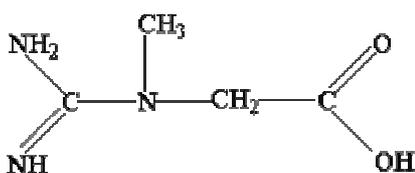


Figura 1. Estrutura química da Creatina (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000).

A compreensão dos processos de absorção, distribuição e captação tecidual da Cr após sua suplementação, bem como sua síntese endógena, catabolismo e excreção, é fundamental para o entendimento dos efeitos orgânicos promovidos por esta substância.

1.1.1 Absorção, distribuição e captação tecidual da Creatina

Os suplementos de Cr são comercializados sob diversas formas, como pó, tabletes, gel, líquido, goma de mascar e barras. No entanto, a absorção da Cr suplementada oralmente é determinada pelas propriedades físico-químicas da molécula. Como a Cr é estruturalmente semelhante aos aminoácidos glicina, arginina e metionina, a passagem da Cr para a circulação sanguínea é dependente de transportadores especializados para estes aminoácidos (KARLSSON *et al.*, 1999).

Estudos indicam que a Cr consumida por via oral é absorvida intacta e completamente pelo lúmen intestinal, apesar da presença de secreções gastro-intestinais altamente ácidas durante o processo digestivo (SYLLUM-RAPOPORT *et al.*, 1980). Greenhaff (1997) indicou que a Cr, quando ingerida em pó miscível em água, apresenta uma maior biodisponibilidade plasmática que ao ser ingerida sobre outra forma farmacêutica. Adicionalmente, foi sugerido que a Cr micronizada melhora ainda mais a absorção deste composto.

Após a ingestão de 1-10g de Cr, o tempo necessário para que seus níveis plasmáticos alcancem a máxima concentração ($t_{máx}$) é menor que 1 hora (SCHEDEL *et al.*, 1999; GREEN *et al.*, 1996). Este fato é importante para sistematizar o protocolo de suplementação, uma vez que a captação tecidual de Cr é significativamente maior quando é atingida a concentração plasmática máxima (HARRIS *et al.*, 1992).

Após à absorção, a creatina plasmática é distribuída através de diferentes tecidos corpóreos, incluindo o coração, o cérebro, os pulmões, os testículos, o fígado, os rins, e

principalmente os músculos esqueléticos (IPSIROGLU *et al.*, 2001). Cerca de 95% de toda Cr orgânica está armazenada na musculatura esquelética. Dessa quantidade, cerca de 60-70% liga-se ao fosfato, formando a Creatina Fosfato (CP), enquanto os 30-40% restantes permanecem como Cr livre. Entretanto, há diferenças na concentração de Cr dentro dos vários tipos de fibra muscular: fibras musculares do tipo II (predominantemente anaeróbicas) apresentam maiores concentrações de Cr que as fibras musculares do tipo I (predominantemente aeróbicas) (MEYER *et al.*, 1985; KUSHMERICK *et al.*, 1992; CASEY *et al.*, 1996). Os 5% restantes do total de Cr são encontrados nos outros tecidos supracitados.

Segundo Wiss e Kaddurah-Daouk (2000) a concentração celular de Cr é determinada pela habilidade da célula em assimilar este nutriente. Foram propostos dois mecanismos para explicar o processo de armazenamento da Cr tecidual: (1) a presença de receptores específicos para Cr (CT1), cuja função depende de um processo ativo e dependente de entrada saturável de sódio; e (2) a necessidade de um elemento intracelular que capture a Cr (especialmente o grupo fosfato), impedindo-a de retornar a corrente sanguínea. A CP apresenta polaridade diferente da molécula de Cr o que impede que a CP atravesse as membranas plasmáticas (Figura 2).

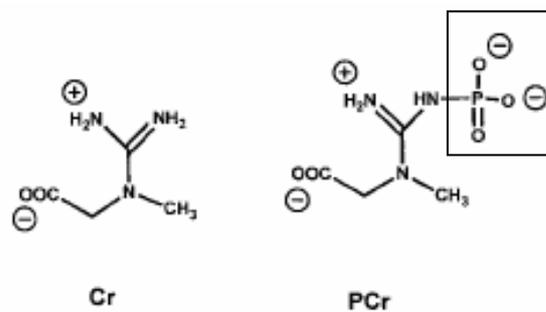


Figura 2. Formas ionizadas das moléculas de Creatina (Cr) e Creatina Fosfato (CP). Em destaque: cargas negativas do grupo fosfato adicionado a Cr (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000).

Há evidências de que a captação tecidual de Cr também possa ser influenciada pela insulina, por catecolaminas, pelo fator de crescimento insulínico (IGF-1) e pela própria atividade física (GREEN *et al.*, 1996; ODOOM *et al.*, 1996). Além disto, todos os tecidos apresentam uma capacidade máxima de armazenamento (IPSIROGLU *et al.*, 2001). Este fato pode ser devido a suplementação de Cr a longo prazo estimular o mecanismo de regulação lenta (*down regulation*) dos receptores de Cr impedindo a captação adicional deste nutriente. Desta forma, a suplementação a longo prazo incrementa enormemente as concentrações deste composto em tecidos que apresentam valores basais muito baixos de Cr celular, como os rins e o fígado (IPSIROGLU *et al.*, 2001).

Teoricamente, para a suplementação oral de Cr ser um ergogênico eficaz, a Cr deve ser absorvida eficientemente a partir do lúmen intestinal, aumentando seus níveis plasmáticos e desta forma facilitando o transporte e a captação pelas células musculares. Várias maneiras de suplementação de Cr têm sido utilizadas com este intuito. No entanto, a literatura reporta que para humanos, a maneira mais efetiva envolve duas fases de suplementação: (1) uma fase de carregamento (*Loading Phase*) que dura de 5 a 7 dias com ingestão diária de 20 a 30g de Cr, seguida pela (2) fase de manutenção que é caracterizada por doses de 2 a 5g diárias de Cr, em períodos de 4 a 10 semanas (HARRIS *et al.*, 1992).

1.1.2 Síntese endógena

A ingestão de Cr pela dieta, especialmente pelo consumo de carnes, responde por cerca de metade da necessidade corporal diária. O restante é obtido por meio da síntese endógena, que ocorre especialmente quando a disponibilidade de Cr na dieta é insuficiente para atender as necessidades diárias. A Cr é sintetizada endogenamente a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina, especialmente no fígado e nos rins (Figura 3).

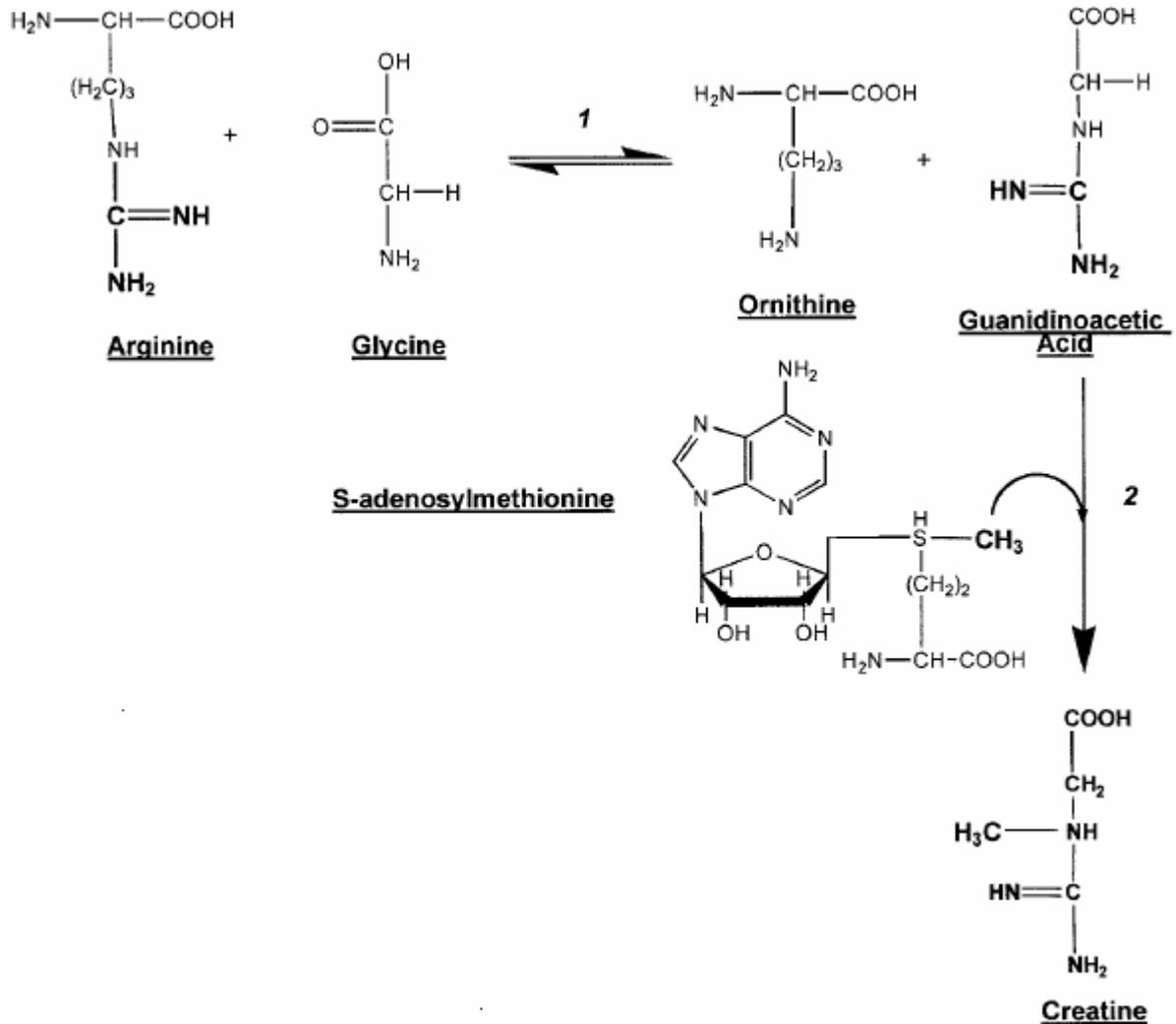


Figura 3. Biosíntese da creatina. 1: reação catalisada pela arginina-glicina amidinotransferase (AGAT); 2: reação catalisada pela guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) (PERSKY ; BRAZEU, 2001).

O primeiro passo na biosíntese da Cr acontece nos rins e utiliza a reação promovida pela enzima arginina-glicina amidinotransferase (AGAT) que transfere reversivelmente o grupo amidino da arginina para a glicina, formando o ácido guanidinoacético. Em seguida, através da guanidinoacetato metiltransferase (GAMT), localizado no fígado, acontece a transferência irreversível de um grupo metil da S-adenosilmetionina para o ácido guanidinoacético, formando a Cr (WALKER, 1979).

A biosíntese de Cr normalmente é controlada mais pela ação da AGAT do que pela GAMT. Além disso, existe um controle na utilização dos aminoácidos necessários na obtenção endógena de Cr, de modo que as outras necessidades metabólicas dos aminoácidos

necessários para sua síntese (arginina, glicina e metionina) não sejam prejudicadas. Este controle pode ser modificado por diversos fatores. Quando a disponibilidade de Cr na dieta está baixa, sua síntese endógena encontra-se aumentada para manter os níveis normais do nutriente. Por outro lado, se os níveis de Cr estiverem elevados, particularmente quando há suplementação com Cr, a biosíntese endógena pode ser suprimida (WALKER, 1979).

1.1.3 Catabolismo e Excreção

Walker (1979) indicou que, a única transformação conhecida da Cr e sua forma fosforilada (PCr) em vertebrados é sua conversão não-enzimática irreversível à creatinina. (Figura 4). A maior parte da creatinina é gerada no músculo esquelético, o maior sítio de armazenamento da Cr, e esta conversão parece ser espontânea (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000). Uma vez produzida, a creatinina entra na circulação por meio de difusão simples e é filtrada pelos glomérulos renais num processo independente de energia, sendo excretada na urina (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000).

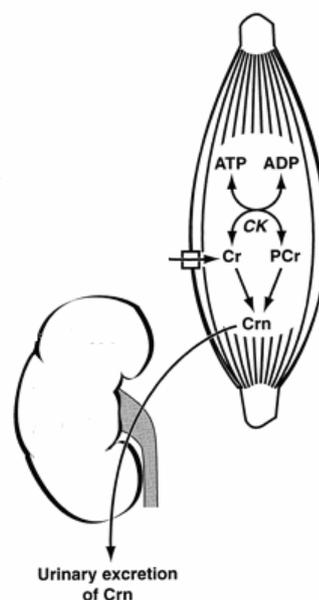


Figura 4. Catabolismo e Excreção da Creatina (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000).

Mensurações *in vivo* no músculo esquelético de ratos indicam que a conversão de Cr e CP acontecem em taxas diárias de 2,6% e 1,1%, respectivamente (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000). A excreção diária aproxima-se de 2 gramas, mas esta quantidade pode variar consideravelmente entre os indivíduos, dependendo da massa muscular total. Tem sido relatado que os níveis de creatinina aumentam levemente em resposta ao exercício intenso de curta duração (IRVING *et al.*, 1990) e aumentos de até 10 vezes podem ocorrer em certas condições patológicas, como a doença renal (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000). Além disto, em alguns estudos a suplementação de Cr também incrementou os níveis plasmáticos deste metabólico (KAMBER *et al.*, 1999; SCHEDEL *et al.*, 1999; VOLEK *et al.*, 2000).

1.2 Vias metabólicas de obtenção de energia

No corpo humano, a energia alimentar é utilizada para produzir ATP, um composto químico que, quando desintegrado (hidrolisado), fornece energia para os processos biológicos.

A produção de ATP acontece bioquimicamente através de *reações acopladas* a partir de três sistemas dinâmicos e interdependentes: (1) o sistema ATP-CP (ou sistema fosfagênio), no qual a energia para a obtenção de ATP provém da CP; (2) glicólise anaeróbica, sistema que gera ácido láctico, mas que proporciona ATP a partir da degradação parcial da glicose ou glicogênio sem a presença de oxigênio; e (3) glicólise aeróbica (fosforilação oxidativa), sistema que envolve o término da oxidação dos carboidratos na presença de oxigênio (O₂) e efetivamente é o sistema mais rentável de obtenção de ATP.

Teoricamente, o sistema energético ATP-CP é capaz de fornecer ATP por apenas algumas poucas contrações musculares antes de ser esgotado. Uma vez que a CP é o substrato para esse sistema, é evidente supor que a suplementação de Cr é uma possível estratégia ergogênica para situações de necessidade energética de curta duração (atividades

anaeróbicas). No entanto, neste estudo foi adotado um modelo de atividade física predominantemente aeróbica. Neste sentido, alguns autores observaram que a suplementação de Cr pode modificar a utilização e formação de substratos energéticos, como a glicose e o lactato, e possivelmente melhorar o desempenho físico durante exercícios prolongados que utilizem preferencialmente o metabolismo aeróbico (ENGELHARDT *et al.*, 1998; STROUD *et al.*, 1994).

Ceddia e Sweeney (2004) propuseram um modelo esquemático demonstrando a influência da suplementação de Cr sobre o metabolismo da glicose e a formação de lactato (Figura 5). Estes autores observaram que a suplementação de Cr incrementou a expressão do receptor CT1 e dos receptores da glicose (GLUT-4). Com isto, o conteúdo de glicogênio e de Cr foi aumentado. Por um mecanismo ainda desconhecido as altas concentrações celulares de Cr e CP atenuaram a atividade da Lactato Desidrogenase (LDH), diminuindo a formação de lactato. Além disto, a glicose armazenada sob a forma de glicogênio foi utilizada preferencialmente via glicólise aeróbica (oxidação mitocondrial), haja visto que a atividade da Citrato Sintase (CS), um marcador da capacidade aeróbica estava aumentada.

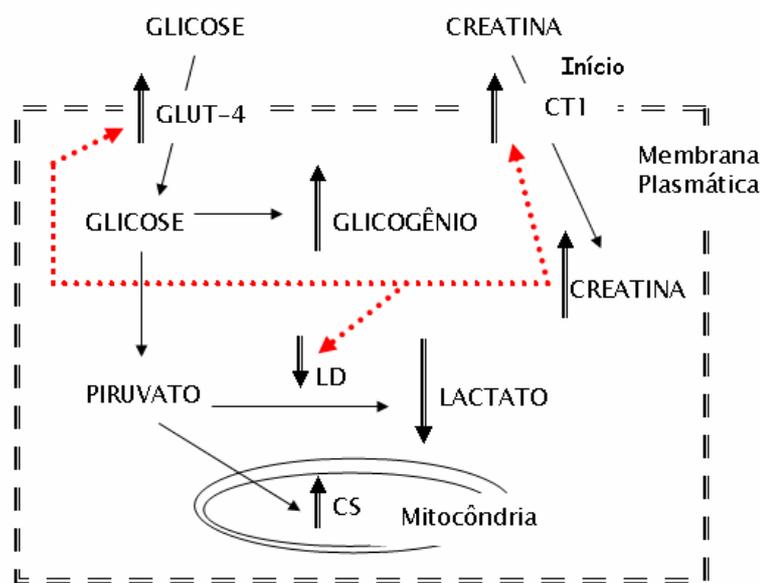


Figura 5. Efeitos da Creatina sobre o metabolismo da glicose e do lactato. GLUT-4: receptor de glicose; CT1: receptor de Creatina; LD: Lactato Desidrogenase; CS: Citrato Sintase. (CEDDIA ; SWEENEY, 2004).

1.2.1 Papel da Creatina no metabolismo energético

Para Ceddia e Sweeney (2004) e Op't Eijnde *et al.* (2001), os possíveis benefícios ergogênicos da suplementação de Cr estão relacionados ao seu papel bioquímico e fisiológico na bioenergética do tecido muscular esquelético. Diversos mecanismos foram propostos para demonstrar o envolvimento da suplementação de Cr com o desempenho físico melhorado, dentre eles: (1) o aumento dos níveis de CP disponível em repouso, servindo como tampão imediato do uso de Adenosina Trifosfato (ATP) durante o exercício (SAHLIN, 1998; CASEY *et al.*, 1996; BALSOM *et al.*, 1994); (2) o aumento dos níveis de Cr em repouso para aumentar a taxa de ressíntese da própria CP durante e após o exercício (GREENHAFF, 1997; BOGDANIS *et al.*, 1995); A CP serve como um tampão temporário de energia durante os períodos de intensa atividade celular, quando o consumo de ATP excede sua síntese (Figura 6).

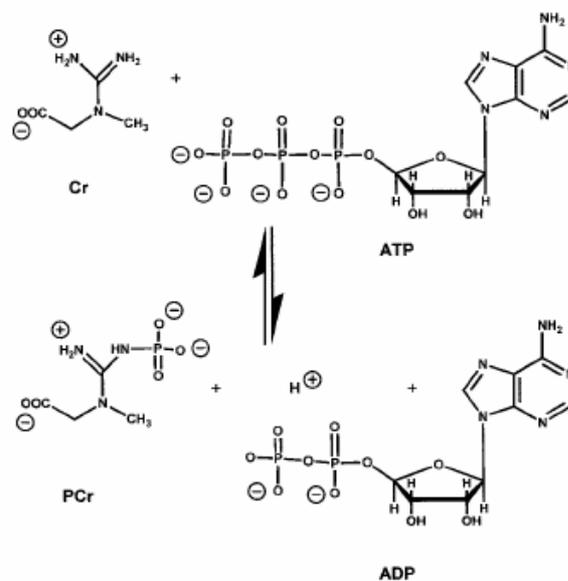


Figura 6. Fosforilação e Desfosforilação da Creatina (PERSKY ; BRAZEU, 2001).

A reação supracitada é reversível e catalisada pela Creatina Quinase (CQ), uma enzima que merece destaque. Atualmente reconhecem-se pelo menos quatro isoenzimas da

CQ. A combinação das subunidades M e B, assim chamadas por terem sido caracterizadas pela primeira vez respectivamente no músculo (*Muscle*) e no cérebro (*Brain*) resulta em três isoenzimas, MM-CQ, MB-CQ e BB-CQ. A quarta isoenzima está localizada no lado externo da membrana mitocondrial (Mi-CQ). Todas as isoformas da CQ funcionam simultaneamente para formar uma rápida interconversão da Cr, CP e da ATP, mantendo um equilíbrio energético tecidual (QIN *et al.*, 1998). Do ponto de vista ergogênico, a suplementação de Cr poderia aumentar o *pool* de CP e assim determinar um tampão temporário de energia mais duradouro, incrementando o rendimento anaeróbico e retardando o metabolismo glicolítico.

Em adição a esse papel de tampão energético, tem sido proposto que a CP e a Cr atuam como moléculas "lançadas" e mensageiras entre as mitocôndrias e os sítios subcelulares de produção e hidrólise de ATP, e desta forma auxiliem atividades aeróbicas. A Figura 7 ilustra o modelo de lançadeira proposto por Walker (1979).

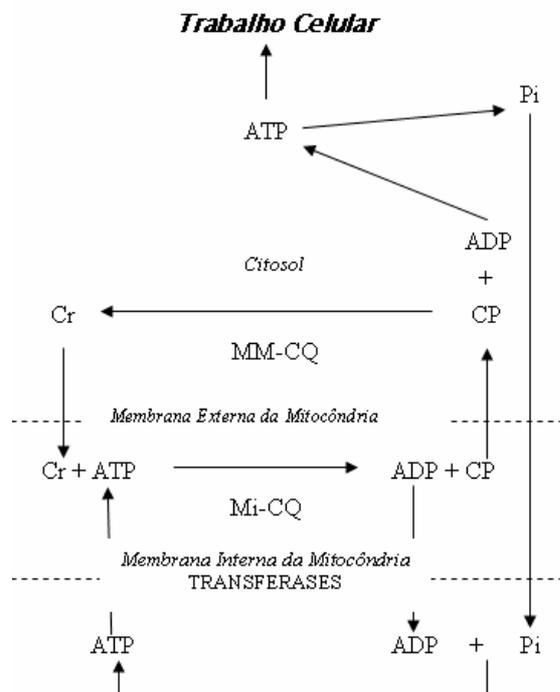


Figura 7. Modelo de Lançadeira de Creatina e Creatina Fosfato (WALKER, 1979).

No sítio mitocondrial, a ATP sintetizada entra no espaço intermembranoso mitocondrial, onde uma parte é utilizada pela Mi-CQ para a formação de ADP e CP. A ADP resultante está, então, favoravelmente situada para o transporte por uma translocase ao interior da matriz mitocondrial na troca pela ATP da matriz. A CP formada, ao contrário da ADP, difunde-se até a banda M miofibrilar, onde serve localmente para repor ATP, tendo a MM-CQ como agente catalisador. A Cr resultante retorna ao espaço intermembranoso mitocondrial para continuar o ciclo. Se a capacidade desta lançadeira puder ser aumentada, como proposto pela suplementação com Cr, o desempenho do exercício de longa duração poderá ser melhorado.

Walsh *et al.* (2001) propuseram uma função primordial para a fundamentação da suplementação com Cr. Para estes autores a Cr auxilia no tamponamento das elevações de ADP. Relata-se que elevações consideráveis da ADP exercem um efeito inibitório sobre as ATPases celulares, resultando em redução no ciclo de acoplamento das pontes cruzadas dos filamentos musculares (BALABAN, 1990). Nos sarcômeros em que grandes quantidades de ATP são hidrolisadas, a refosforilação imediata do ADP pela MM-CQ mantém uma baixa concentração de ADP. Isso evita a inativação de miosinas ATPases e não bloqueia a geração de ATP rapidamente (BLEI *et al.*, 1993; RADDA, 1996). Além disto, com a ocorrência da hidrólise de ATP durante a contração muscular, são liberados prótons (H^+). Tem-se sugerido que o aumento dos íons hidrogênio (e diminuição concomitante do pH) durante o exercício intenso contribui para a fadiga. Como demonstrada na figura 6 a ressíntese de ATP pela CP, acontece consumindo um H^+ . Consequentemente, aumentar a capacidade celular de refosforilar imediatamente o ADP e tamponar o H^+ pode servir para incrementar o rendimento físico de longa duração (ROSSITER *et al.*, 1996; PEYREBRUNE *et al.*, 1998). Segundo Casey e Greenhaff (2000), a suplementação de Cr poderia contribuir com todos estes processos, e desta forma potencializar ou incrementar exercícios de longa duração.

A Cr também pode ser um sinalizador para a síntese protéica, possivelmente por promover a retenção intracelular de fluido e aumentar a pressão osmótica celular (POTTEIGER *et al.*, 2002; WILDER *et al.*, 2001; KREIDER, 1998). Dangott *et al.* (2000) relataram que a adição de Cr às células musculares esqueléticas incubadas aumenta a síntese de miosina *in vitro*. Este autor especulou que o aumento na hidratação celular induzida pela suplementação de Cr induzia a síntese protéica e diminuía a proteólise, o que aumentaria a massa magra.

1.3 Aplicações terapêuticas e possíveis efeitos adversos da suplementação de Cr

De fato, durante décadas, as pesquisas buscavam exclusivamente compreender a interação da Cr com o desempenho físico humano (WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000). Estes estudos foram basicamente norteados pela análise da reação enzimática promovida pela CQ a partir do metabolismo muscular anaeróbico (SAKS *et al.*, 1996).

Contudo, com a recente identificação, purificação e clonagem de diversas enzimas e receptores envolvidos no metabolismo da Cr, uma ampla variedade de investigações terapêuticas deste nutriente está sendo realizada (GUERRERO-ONTIVEROS; WALLIMANN, 1998; SORA *et al.*, 1994; GUIMBAL; KILIMANN, 1993). Prejuízos motores e mentais gerados pela ineficiência ou incapacidade de sintetizar endogenamente a Cr poderiam ser amenizados por sua suplementação (SCHULZE, 2003). A administração endovenosa de CP melhorou o metabolismo do miocárdio e diminuiu a incidência de fibrilação ventricular em pacientes com isquemia cardíaca (ANDREWS *et al.*, 1998). Andres *et al.* (2005), observou uma possível proteção de danos teciduais isquêmicos relacionados com órgãos transplantados através da CP. Em diversas doenças neuromusculares, como doença de Huntington, esclerose múltipla e distrofias musculares, o uso terapêutico da Cr tem

ocorrido de forma benéfica (BENDER *et al.*, 2005; TARNOPOLSKY *et al.*, 2004). Substâncias análogas à Cr, como a ciclocreatina, estão sendo investigadas quanto sua capacidade de diminuir a taxa de crescimento de células tumorais (JEONG *et al.*, 2000; SCHIMMEL *et al.*, 1996).

Por outro lado, pesquisas demonstram interesse em investigar os efeitos da suplementação da Cr sobre diversos marcadores clínicos, avaliando os possíveis riscos e danos teciduais desta substância (BIZZARINI ; DE ANGELIS, 2004; TAES *et al.*, 2003; ROBINSON *et al.*, 2000; VANDENBERGHE *et al.*, 1999). Alguns estudos têm associado à suplementação de Cr à condições patológicas, como câibras musculares (ZIEGENFUSS *et al.*, 1997), desidratações (ZIEGENFUSS *et al.*, 1998; ZIEGENFUSS *et al.*, 1997), disfunções renais (PRITCHARD;KAIRA, 1998; POORTMANS *et al.*, 1997) e hepáticas (TARNOPOLSKY *et al.*, 2003). Yu e Deng (2000) propuseram um modelo de explicação de como a Cr poderia ser tecidualmente tóxica (Figura 8). Estes autores observaram uma possibilidade de conversão química da Cr em formaldeído, um agente extremamente agressor. A partir desta constatação, ficam evidentes estudos que justifiquem a preocupação com o uso indiscriminado e não orientado da suplementação de Cr, especialmente sobre os possíveis efeitos colaterais em tecidos metabolicamente relacionados à Cr, como o tecido renal e hepático.

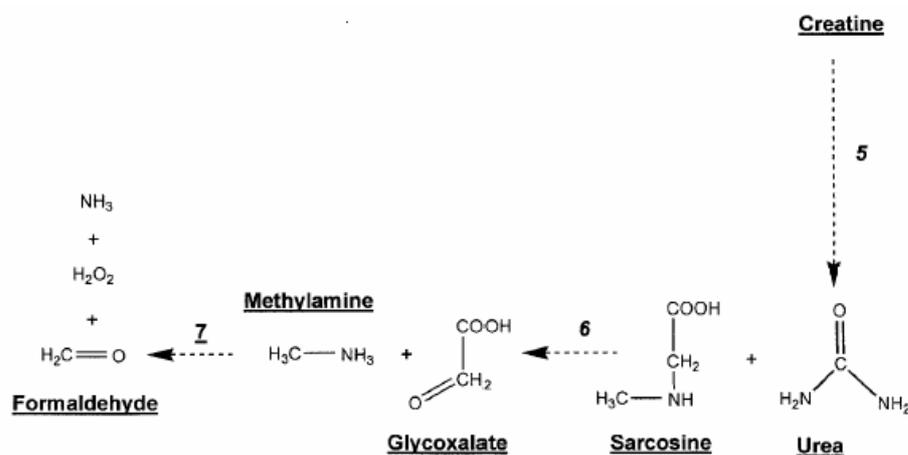


Figura 8. Hipótese de toxicidade da Creatina. 5: reação catalisada pela Creatina Amidohidrolase; 6: reação catalisada pela Glicina Oxidase; e 7: reação catalisada pela Semicarbazida-Sensitiva Amina Oxidase (SSAO) (YU; DENG, 2000).

1.4 Os rins

Estes órgãos contribuem para a homeostase orgânica, participando da regulação do balanço hidro-eletrolítico, do equilíbrio ácido-básico, da produção de eritrócitos, da produção da 1,25 diidroxivitamina D₃, da pressão arterial, e excretarem escórias metabólicas, como a uréia (proveniente do metabolismo dos aminoácidos), bilirrubinas (produto final da degradação da hemoglobina) e creatinina (proveniente do metabolismo da Cr) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004a).

Cada rim é constituído por 1 a 4 milhões de néfrons, a unidade morfofuncional renal. O néfron é formado pelo Corpúsculo Renal (Glomérulo e Cápsula de Bowman), Túbulo Contorcido Proximal (TCP), partes delgada e espessa da Alça de Henle (AH), pelo Túbulo Contorcido Distal (TCD) e pelos túbulos e ductos coletores. Morfologicamente, pode ser dividido em uma zona cortical e zona medular (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004a) (figura 9).

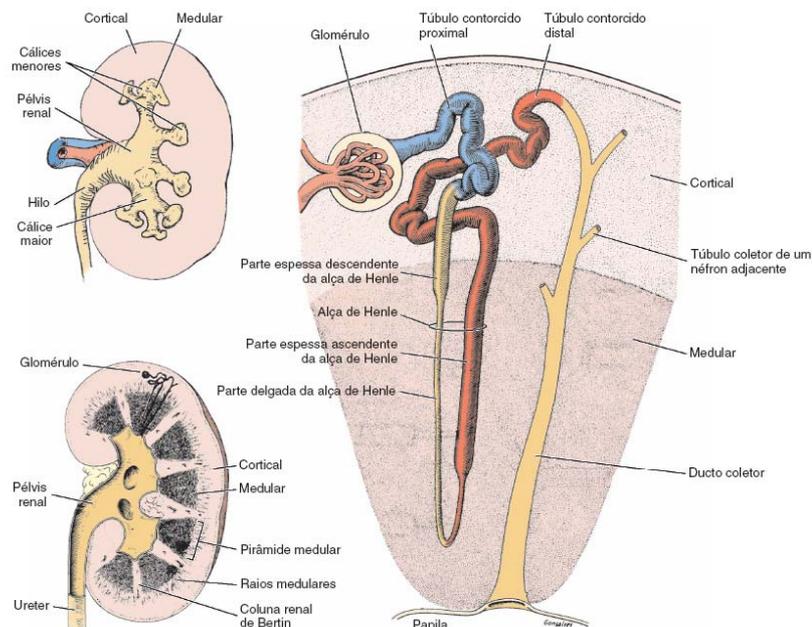


Figura 9. Topografia Geral do Rim. A figura a direita mostra a localização cortical e medular dos componentes de um néfron (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004a).

A magnitude da excreção de diferentes substâncias na urina representa o resultado de três processos nefróticos: (1) filtração glomerular, (2) reabsorção tubular, e (3) secreção tubular. O rim não consegue regenerar seus néfrons. Por isso, lesões e doenças renais, acarretam uma diminuição gradual do número de néfrons. No entanto, a perda nefrótica, pode ser acompanhada por alterações adaptativas nos néfrons remanescentes permitindo-lhes ainda desempenhar suas funções. Evidentemente, alterações nefro-morfológicas podem acarretar distúrbios nos processos básicos de formação de urina (GUYTON ; HALL, 1997a).

Os produtos finais do metabolismo são em geral, considerados como nitrogênicos não protéicos, e têm que ser removidos do corpo para garantir a continuação do metabolismo protéico normal. A concentração destes compostos, especialmente de uréia e creatinina, pode estar elevada e fornece um meio importante de avaliar a função renal. Como toda substância plasmática não protéica, a uréia e a creatinina são filtradas completamente dos Capilares Glomerulares (GLs) para a Cápsula de Bowman (CB). No entanto, metade da uréia filtrada pelos GLs é passivamente reabsorvida dos túbulos, contribuindo para a capacidade renal de concentração da urina. A creatinina, uma molécula maior que a uréia, é impermeável à membrana tubular e quase nenhuma creatinina é reabsorvida, de modo que toda creatinina filtrada pelos GLs é excretada na urina (BRZÓSKA *et al.*, 2003)

A atividade celular das diversas regiões do néfron pode estar prejudicada por (1) condições que lesam os GLs; (2) condições que lesam o epitélio tubular renal; e (3) condições que lesam o interstício renal. Desta forma, um exame histológico, especialmente da zona cortical é necessário para elucidar a condição histomorfológica da função renal (BRZÓSKA *et al.*, 2003).

Ao microscópio óptico, o tufo de capilares glomerulares deve ser observado quanto sua celularidade global, simetria dos GLs, densidade das paredes capilares, e preservação do espaço intersticial entre o GLs e a CB, sem a presença de secreções. Normalmente, todos os

Gls apresentam as mesmas espessuras que são muito delgadas e com normo-celularidade, e os núcleos celulares não estão agrupados ou sobrepostos (figura 10). A distinção entre os TCP e TCD, ambos encontrados na zona cortical e formados por epitélio cúbico, baseia-se nos seguintes dados: as células do TCP são menores (maior número de núcleos em cada corte transversal), não possuem orla estriada e são menos acidófilas (possuem menor número de mitocôndrias) (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004a).

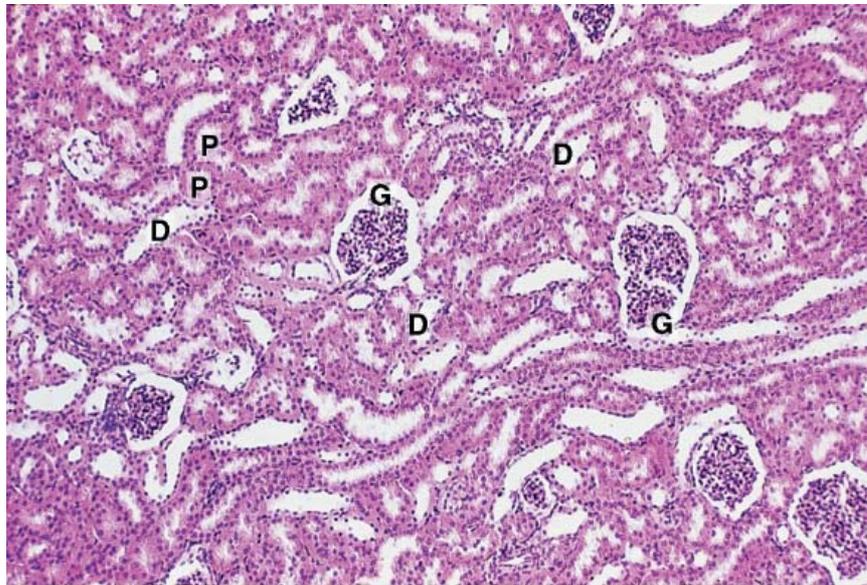


Figura 10. Vista panorâmica da cortical do rim. (P) Túbulos Contorcidos Proximais; (D) Túbulos Contorcidos Distais; (G) Glomérulos. Coloração pela pararrosanilina-azul-de-toluidina. Pequeno Aumento - 40X (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004a).

A literatura indica que a suplementação de Cr aguda ou crônica parece não aumentar o estresse renal em indivíduos saudáveis e ativos fisicamente, conforme por vários marcadores séricos e urinários (PLINE; SMITH, 2005; MAYHEW *et al.*, 2002). Entretanto, poucos estudos avaliaram de forma abrangente os efeitos da Cr em populações sedentárias, havendo a necessidade de pesquisas adicionais antes de conclusões definitivas, especialmente pelo fato de existir a possibilidade terapêutica desta substância em pessoas com nível de atividade física insignificante (BIZZARINI ; DE ANGELIS, 2004).

1.5 O Fígado

O fígado apresenta funções essenciais em todas as fases do metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e hormônios; síntese, armazenamento e liberação de vitaminas, glicogênio, aminoácidos não essenciais e proteínas plasmáticas e carreadoras, como a albumina; fagocitose de eritrócitos, remoção de substâncias tóxicas; e produção de bile. Grande parte do sangue que vai para o fígado chega pela veia porta (70-80%), que transporta sangue pouco oxigenado e rico em nutrientes provenientes das vísceras abdominais, enquanto os 20% restantes derivam da artéria hepática, que fornece sangue rico em oxigênio (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004b).

Com relação às funções hepáticas no metabolismo protéico, deve-se ressaltar a desaminação e interconversões de aminoácidos, e formação de uréia para a remoção de amônia dos líquidos corporais. A desaminação de aminoácidos é necessária para que eles possam ser utilizados na produção de energia ou para serem convertidos em carboidratos ou gordura. Grandes quantidades de amônia são formadas pelo processo de desaminação, e na ausência da função hepática de formação de uréia, a concentração plasmática de amônia aumenta rapidamente, resultando em coma hepático e morte (GUYTON ; HALL, 1997b).

A capacidade das vias metabólicas hepáticas está em função direta com sua integridade estrutural e sua função celular. Quando se produz a lesão celular, o desequilíbrio resultante inicia um processo de alterações da permeabilidade no tecido hepático o qual se manifesta pela passagem de moléculas do espaço intra para o extracelular, especialmente das enzimas celulares que participam dos processos de desaminação, como a Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), e Gama glutamiltransferase (GGT) (GAYOTTO ; ALVES, 2001b).

Quando a lesão é extensa, é possível identificar quase todas as enzimas tissulares. Entretanto é necessário estabelecer um diagnóstico diferencial de acordo com os padrões enzimáticos em virtude de suas diferentes localizações, solubilidade e comportamento frente às diferentes lesões. Gayotto e Alves (2001b), propuseram a seguinte diferenciação:

1- Indicadores de Integridade Celular: Aminotransferases, Desidrogenase Láctica (LDH) e Glutamato Desidrogenase (GLDH);

2- Indicadores de reação Celular ou Sobrecarga: Fosfatase Alcalina e Gama glutamiltransferase (GGT);

Além das provas de função hepática, deve-se ter em conta, o aspecto histológico do fígado. A unidade morfofuncional do fígado são os lóbulos hepáticos, uma massa poligonal construída em torno da veia centrolobular (VCL) e constituída por numerosas placas hepatocelulares, essencialmente formada por hepatócitos (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004b) (figura 11).

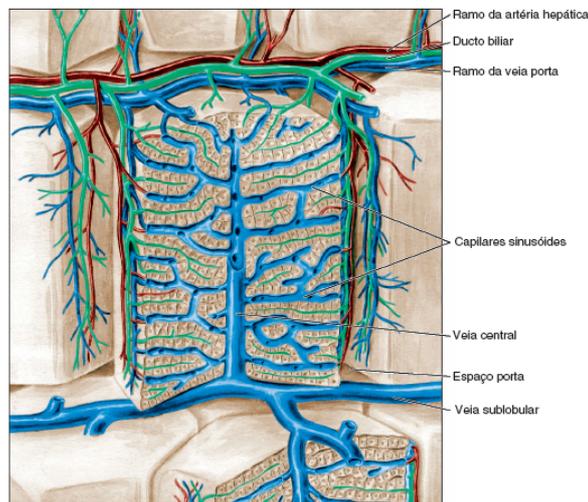


Figura 11. Lóbulo Hepático (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004b)

Os espaços entre as placas hepatocelulares contêm os sinusóides hepáticos, cujas células endoteliais estão separadas dos hepatócitos por uma região conhecida como espaço de Disse, que contém microvilos dos hepatócitos. Além das células endoteliais, os sinusóides

contêm as células de Kupffer (macrófagos hepáticos). Em algumas regiões da periferia dos lóbulos existe uma região de tecido conjuntivo contendo um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, ducto biliares e vasos linfáticos, denominada espaço porta. Cada lóbulo hepático contém de 3 a 6 espaços porta, situados sempre nas regiões angulares do polígono lobular (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004b) (figura 12).

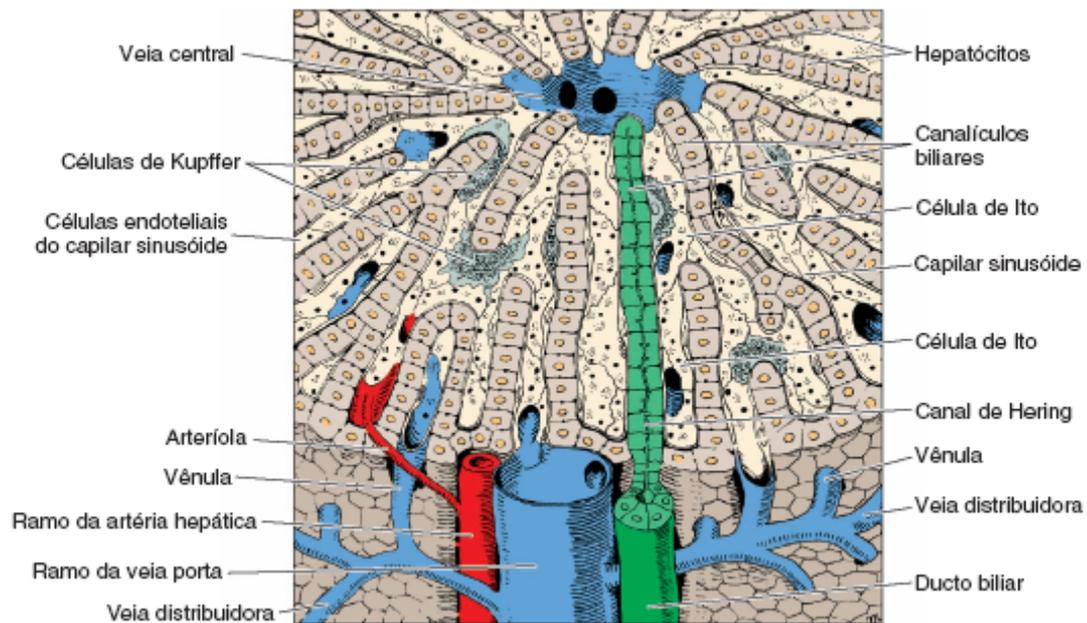


Figura 12. Aspecto tridimensional do fígado normal (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004b).

O estudo de lamina histológicas hepáticas exige a observação dos critérios de normalidade citados anteriormente (figura 13) e quanto: (1) aos processos degenerativos dos hepatócitos que pode revelar tumefação celular, proliferação do retículo endoplasmático liso, alterações eosinofílicas amorfas com aspecto flocular e distribuição irregular citoplasmática; (2) morte hepatocelular, seja apoptose ou necrose que manifestam respectivamente por distribuição celular anormal (células isoladas ou agrupadas e sobrepostas), reação tecidual (fagocitose e exsudato leucocitário) e morfologia alterada (retração celular, tumefação, citoplasma fragmentado e extensões citoplasmáticas); e (3) neoformação conjuntiva

observada por proliferação de tecido fibroso especialmente nos espaços porta (GAYOTTO ; ALVES, 2001a).

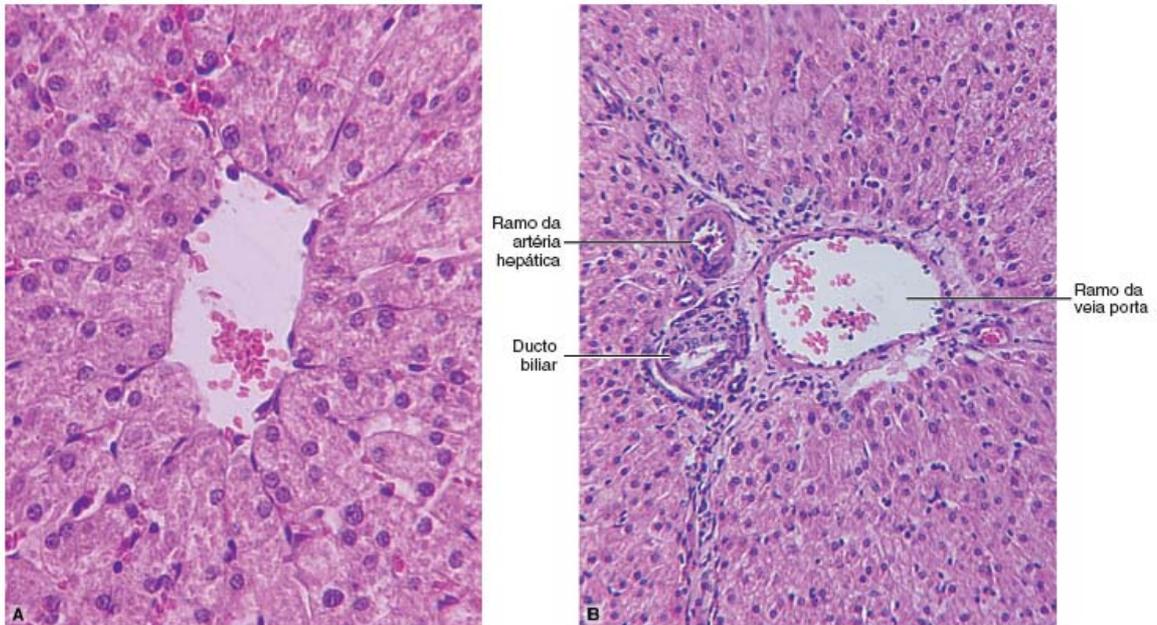


Figura 13. Fotomicrografia do fígado normal. **A:** Veia Centrolobular (VCL). Observar as placas de hepatócitos limitando os espaços ocupados pelos capilares sinusóides. **B:** Um espaço porta. Coloração Hematoxilina e Eosina (H&E). Aumento médio - 100X (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004b).

Achados de pesquisas sugerem que a suplementação de Cr não afeta o efluxo de enzimas hepáticas, cujas elevações podem ser indicadoras de estresse hepático (BIZZARINI ; DE ANGELIS, 2004; MAYHEW *et al.*, 2002). No entanto, como ocorre com a função renal, a função hepática necessita ser observada de forma mais detalhada e integrada (bioquímica e histomorfologicamente) em populações distintas quanto ao nível de atividade física e tempo de suplementação (TARNOPOLSKY *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

A maioria dos experimentos que propuseram analisar a suplementação de Cr como recurso ergogênico, buscaram compreender como a interação deste composto com a atividade anaeróbica muscular pode beneficiar o desempenho físico. Além disto, a eficácia desta suplementação tem sido atribuída a capacidade de armazenamento da Cr no tecido muscular esquelético. No entanto, por estar presente em diversos tecidos, a suplementação de Cr também poderia gerar adaptações teciduais e eventuais alterações funcionais em outros órgãos metabolicamente ativos, como os rins e o fígado. Não obstante, pouco é sabido dos efeitos da suplementação de Cr sobre o desempenho físico aeróbico. Tendo em vista estas possibilidades, este estudo foi delineado para analisar as respostas homeostáticas do tecido renal e hepático frente os possíveis efeitos da suplementação da Cr durante atividade física predominantemente aeróbica.

2.2. Objetivos Específicos

O presente estudo analisou os efeitos da suplementação aguda (Fase de Carregamento: 1 semana) e crônica (Fase de Manutenção: 4 e 8 semanas) de Cr em ratos machos Wistar sedentários e submetidos ao exercício de natação a 80% da carga máxima, onde foram avaliados os seguintes parâmetros:

- (1) Eficiência Alimentar (EA) dos animais;
- (2) Aspecto ponderal dos animais (massa corporal);
- (3) Carga máxima suportada pelos animais durante o Teste de Carga Máxima (TCM);

- (4) Concentrações sanguíneas de Glicose e Lactato antes e após o TCM;
- (5) Aspecto histomorfológico dos tecidos renal e hepático, através de técnicas histológicas específicas;
- (6) Aspecto funcional renal e hepático, através de ensaios bioquímicos: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Gama glutamiltransferase (GGT), Fosfatase Alcalina, Lactato Desidrogenase (LDH), Bilirrubinas Totais, Albumina, Uréia e Creatinina e Creatina Quinase (CQ);
- (7) Possíveis correlações existentes entre os achados histomorfológicos e bioquímicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em obediência as normas para experimentação animal (TOUITOU *et al.*, 2004) e de acordo com os princípios éticos de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), descritos por Cardoso (2004). Além disto, adotou as normas para a prática didático-científica de vivisseção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979), obtendo aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (Protocolo nº L022-2005-CEP) (Anexo A).

3.1 Modelo Experimental

Foram utilizados 72 ratos (240 ± 10 gramas) machos Wistar (*Rattus Norvegicus*), adultos jovens (10 a 12 semanas de idade), obtidos da fazenda Bem-te-vi (Paulínia-SP). Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno no biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP & D II) da Universidade do Vale do Paraíba com temperatura (22 a 25°C), umidade relativa (40 a 60%) e fotoperíodo (ciclo de 12 horas claro-escuro) controlados.

O estudo teve duração de 8 semanas e os animais foram divididos igualmente em 4 grupos experimentais constituídos de 3 subgrupos cada um:

1- Grupos Controle (CON) (n=18): sedentários e não suplementados:

CON-1 (n=6): durante 1 semana;

CON-4 (n=6): durante 4 semanas;

CON-8 (n=6): durante 8 semanas;

2- Grupos Natação (NAT) (n=18): exercitados e não suplementados:

NAT-1 (n=6): durante 1 semana;

NAT-4 (n=6): durante 4 semanas;

NAT-8 (n=6): durante 8 semanas.

3- Grupos Creatina (CRE) (n=18): sedentários e suplementados:

CRE-1 (n=6): durante 1 semana;

CRE-4 (n=6): durante 4 semanas;

CRE-8 (n=6): durante 8 semanas.

4- Grupo Creatina Natação (CRE+NAT) (n=18): exercitados e suplementados:

CRE+NAT-1 (n=6): durante 1 semana;

CRE+NAT-4 (n=6): durante 4 semanas;

CRE+NAT-8 (n=6): durante 8 semanas.

3.2 Dieta dos animais

Os animais receberam ração e água *ad libitum*. A verificação da quantidade de ração e água consumida foi realizada em todos os animais diariamente durante todo o período experimental, através do seguinte protocolo (ROGATTO *et al.*, 2004):

- Período Inicial: fornecimento de uma concentração superestimada de ingestão diária (50g de ração e 500ml de água);

- Período de Aferição: aferição da quantidade não consumida de ração e água após 24 horas. O resultado encontrado foi subtraído dos valores superestimados para determinar o consumo diário de ração e água de cada animal.

Para se avaliar a Eficiência Alimentar dos animais foi utilizada a seguinte equação (ROGATTO *et al.*, 2004):

$$EA = \frac{(MF - MI)}{TA}$$

Onde:

EA: eficiência alimentar;

MF: massa corporal do animal ao final do experimento (g);

MI: massa corporal do animal no início do experimento (g);

TA: quantidade total de alimento ingerido durante o experimento (g).

3.2.1 Ração utilizada

- Marca comercial da ração: Socil Guyomarc'H - Indústria e Comércio Ltda (Labcil[®]).
- Indicação: animais de laboratório.
- Composição nutricional (por kg do produto): proteína bruta (22%), matéria mineral (10%), matéria fibrosa (8%), extrato etéreo (4%) cálcio (1,40%), fósforo (0,80%), antioxidante (100,00 mg), colina (600,00 mg), cobre (10,00 mg), cobalto (1,50 mg), ferro (50,00 mg), iodo (2,00 mg), manganês (60,00 mg), selênio (0,05 mg), zinco (60,00 mg), vit. A (1.200 UI), vit. B12 (20,00 mg), vit. D3 (1.800 UI), vit. E (30,00 mg), vit. B1 (5,00 mg), vit. B6 (7,00 mg), vit. K3 (3,00 mg), niacina (60,00 mg), vit. B2 (6,00 mg), biotina (0,05 mg), ácido pantotênico (20,00 mg), ácido fólico (1,00 mg), metionina (300,00 mg) e lisina (100 mg).

3.3 Protocolo de Atividade Física

A natação foi utilizada como forma de submeter os animais à atividade física. Todo protocolo de natação instituído foi realizado em um tanque de amianto com capacidade para 250 litros de água, mantidos a temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ controlada por um termostato (BAKER ; HORVATH, 1964) e obedeceu aos seguintes períodos:

- Período de Adaptação (VOLTARELLI *et al.*, 2002; NAKAO *et al.*, 2000; UENO *et al.*, 1997): período para reduzir o estresse do nado sem promover adaptações do treinamento. Durante este período, todos os animais realizaram natação sem carga durante 30 minutos diários por cinco dias consecutivos. Além disto, não aconteceu a suplementação com Cr.

- Período do Teste de Carga Máxima (OSORIO *et al.*, 2003a; OSORIO *et al.*, 2003b): Após o período de adaptação, todos os animais foram submetidos individualmente ao teste de carga máxima (TCM). O TCM é caracterizado pela introdução de células de carga (placas de cobre) correspondendo a 0%, 1%, 2%, 3%, etc., da massa corporal total do rato, colocadas a cada 3 minutos, em uma tira elástica posicionada junto ao tórax do animal até sua exaustão. Neste estudo, a massa corporal do animal foi usada para permitir o cálculo individual dos percentuais da carga de trabalho durante o TCM. A exaustão foi determinada pela incapacidade do animal manter-se sob a superfície da água por aproximadamente 8 a 10 segundos. Posteriormente, todas as placas de cobre encontradas na tira elástica do animal foram pesadas em uma balança digital de alta precisão (Bel[®]) para obter o valor da carga máxima tolerada. Além do primeiro TCM, realizado após a adaptação e, portanto sem nenhuma intervenção experimental, novos Testes de Carga Máxima foram realizados ao final da primeira semana, no início e ao final da quarta e oitava semanas.

- Período de Treinamento Físico (FRANCO, 2004; SAMPAIO-BARROS *et al.*, 2003; VIRU, 1994): neste período foi utilizada a natação em grupo (6 animais) por promover um exercício mais vigoroso do que o nado individual. A carga de trabalho para o treinamento físico foi ajustada individualmente a 80% da carga máxima tolerada durante o TCM. Esta carga foi obtida por um dispositivo constituído por esferas de chumbo contidas em uma fita adesiva, colocado a uma tira elástica posicionada junto ao tórax do animal de modo confortável. O treinamento físico ocorreu nos grupos experimentais NAT e CRE+NAT durante cinco dias consecutivos por semana, com sessões diárias de 30 minutos.

3.4 Suplementação da Creatina

- Marca comercial da Cr: Integral Médica[®].
- Forma de apresentação: Cr micronizada (100%), padrão HPLC (cromatografia líquida de alta pressão).
- Administração: A suplementação de Cr foi realizada por gavagem através de uma sonda oro-esofágica (1mm de diâmetro; 3cm de comprimento) adaptada a uma seringa de 3 ml. Água potável foi utilizada como veículo de infusão. A administração do suplemento sempre ocorreu uma hora antes da realização do protocolo de atividade física.
- Dose (AOKI *et al.* 2004, TARNOPOLSKY *et al.*, 2003, IPSIROGLU *et al.* 2001, OP'T EIJNDE *et al.*, 2001; e BRANNON *et al.* 1997): durante a primeira semana do experimento, após o período de adaptação ao nado, foi utilizada a dose de 5g de Cr/kg de massa corporal do animal para todos os animais suplementados (CRE-1, CRE-4, CRE-8, CRE+NAT-1, CRE+NAT-4 e CRE+NAT-8) (Fase de Carregamento). Após a primeira semana de suplementação foi utilizada a dose de 1g de Cr/kg de massa corporal do animal, para os animais dos grupos CRE-4, CRE-8, CRE+NAT-4 e CRE+NAT-8 (fase de

manutenção). Como o regime de dosagem para a suplementação de Cr utilizou a massa dos animais como parâmetro, a dose exata do composto foi determinada no início da primeira, quarta e oitava semanas do experimento através de uma balança digital de alta precisão (Bel[®]).

3.5 Glicose e Lactato

- Coleta: As amostras sanguíneas (~25µl) foram coletadas através da extremidade caudal de cada animal e em seguida colocadas em tiras-teste de glicose (Blood Glucose Sensor Electrode - Medisense[®]) e lactato (BM-Lactate[®]).

- Análise: Imediatamente após a coleta as tiras-teste foram analisadas em analisadores portáteis MediSense - Q.I.D. Precision[®] e Accusport Lactate[®] para determinação das concentrações de glicose e lactato, respectivamente. Este procedimento foi realizado antes e imediatamente após todos os TCM.

3.6 Sacrifício dos Animais

Após o período de tratamento instituído para cada grupo experimental, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. O sacrifício foi realizado após dois dias da última sessão de treinamento, para atenuar os efeitos agudos do exercício (NAKAO *et al.*, 2000).

- Anestésico (ZARAGOZA *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2003; CARDOSO, 2004; THEOCHARIS *et al.*, 2001): o etoxietano (dietil éter) promove anestesia por ação depressora no Sistema Nervoso Central (SNC) e não provoca disfunção e toxicidade tecidual (hepática e renal). Foi utilizado um sistema de câmara fechada para a indução anestésica por inalação.

Todas as precauções recomendadas para o manuseio de produto inflamável foram seguidas durante este procedimento. O nível de anestesia foi monitorado através de indicadores fisiológicos como perda do reflexo corneano (2 a 5 minutos), frequência respiratória, respostas reflexas, relaxamento da mandíbula e musculatura abdominal.

- Sacrifício (MORALES-GONZALES *et al.*, 1999; THEOCHARIS *et al.*, 2001): os animais foram sacrificados logo após a coleta sanguínea e tecidual através da administração de Cloreto de Potássio (KCl) 20% intracardíaco, ainda sob o efeito anestésico.

3.7 Coleta Sanguínea e Tecidual

Após a indução anestésica os animais foram imediatamente colocados em posição supina sobre uma prancha para realização do procedimento de coleta sanguínea e tecidual. Com uma tesoura de ponta romba foi realizada uma incisão curta na linha longitudinal mediana do abdome para a borda inferior do esterno. Em seguida, a parede ventral abdominal foi seccionada e fixada na prancha para exposição da cavidade abdominal e realização do procedimento de coleta de sangue, do fígado e do rim direito. Como mencionado anteriormente, durante todo este procedimento o animal ainda estava sob efeito anestésico.

- Coleta sanguínea (TEIXEIRA, 2003): As amostras sanguíneas (5ml) foram coletadas da veia cava inferior dos animais com seringas de 5ml, utilizando agulhas de calibre 25x7mm, após afastamento prévio das vísceras anteriores. O sangue coletado foi colocado em tubos de ensaio sem a presença de anticoagulantes e centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C em centrífuga (Excelsa® II – Mod. 206BL). Em seguida, separadas as amostras de soro do sangue de cada animal, estas foram conduzidas para as determinações bioquímicas específicas.

- Coleta Tecidual (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004): todos os órgãos removidos (fígado e rim direito) foram imediatamente limpos em salina 0,9% para melhor aferição de suas massas e depositados em solução de formol a 10% para evitar a autólise tecidual. Para facilitar o processo de fixação ao formol, os órgãos foram seccionados em fragmentos de 3 a 5 milímetros.

3.8 Avaliação Histomorfológica Renal e Hepática

Após as etapas de retirada dos fragmentos teciduais e fixação em formol 10%, como descrito anteriormente, os fragmentos foram desidratados e clarificados gradativamente em banhos de álcool (Synth[®]). Logo em seguida, as amostras foram tratadas com xilol (Synth[®]) para que se tornassem translúcidas e passíveis de serem vistas em microscópio óptico, e posteriormente emblocadas em parafina (Paraplast[®]) para os cortes microscópicos. Os blocos de parafina contendo os tecidos foram cortados utilizando micrótomo (LUPE 820 Spencer Microtome[®]), em secções transversais de 5 micrômetros. A coloração utilizada para as análises em microscopia óptica foi através dos corantes hidrossolúveis Hematoxilina-Eosina (Doles[®]). As imagens analisadas foram fotografadas através de um sistema de microfotografia (Nikon Eclipse[®] - E200).

3.9 Avaliações Bioquímicas

As avaliações bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas OuroClin (Ouro Fino/MG) e determinadas através de kits comerciais (Laborlab[®]), por meio de um Espectrofotômetro (Hitachi[®] - Modelo U-2001). Todos os procedimentos adotados

para análise bioquímica das diferentes enzimas obedeceram às recomendações preconizadas pelos seus respectivos catálogos (Laborlab[®]) (Anexo B).

- Testes bioquímicos: foram realizados os testes para determinar as concentrações plasmáticas da Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Gama Glutamiltransferase (GGT), Fosfatase Alcalina, Lactato Desidrogenase (LDH), Bilirrubinas Totais, Albumina, Uréia, Creatinina e Creatina Quinase (CQ).

3.10 Análise Estatística

Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparação múltipla (Tukey-Kramer), quando necessário. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (Média \pm E.P.M.), sendo os valores de $p \leq 0,05$ (5%) considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Ingestão alimentar (Ração e Água)

A figura 14 representa a média da ingestão diária de ração (g) durante os períodos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas durante a ingestão diária de ração para os diferentes grupos experimentais ao final da primeira, quarta e oitava semanas ($p > 0,05$).

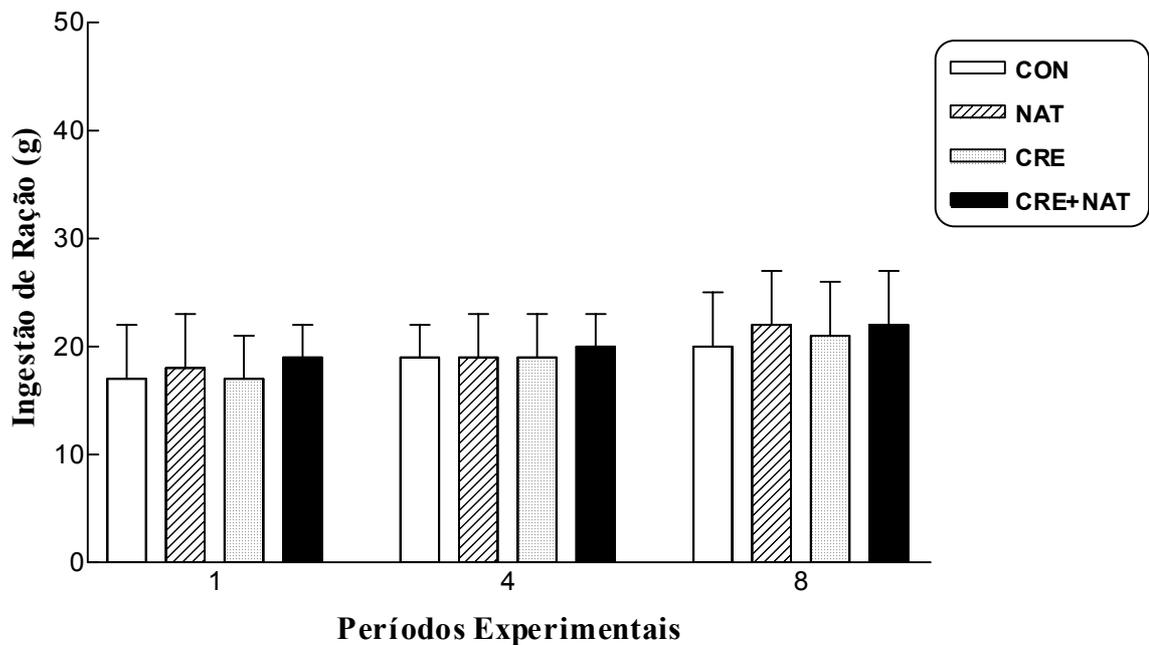


Figura 14. Ingestão diária de ração. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas) ($p > 0,05$).

A figura 15 representa a média da ingestão diária de água (ml) durante os períodos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas durante a ingestão diária de água para os diferentes grupos experimentais ao final da primeira, quarta e oitava semanas ($p > 0,05$).

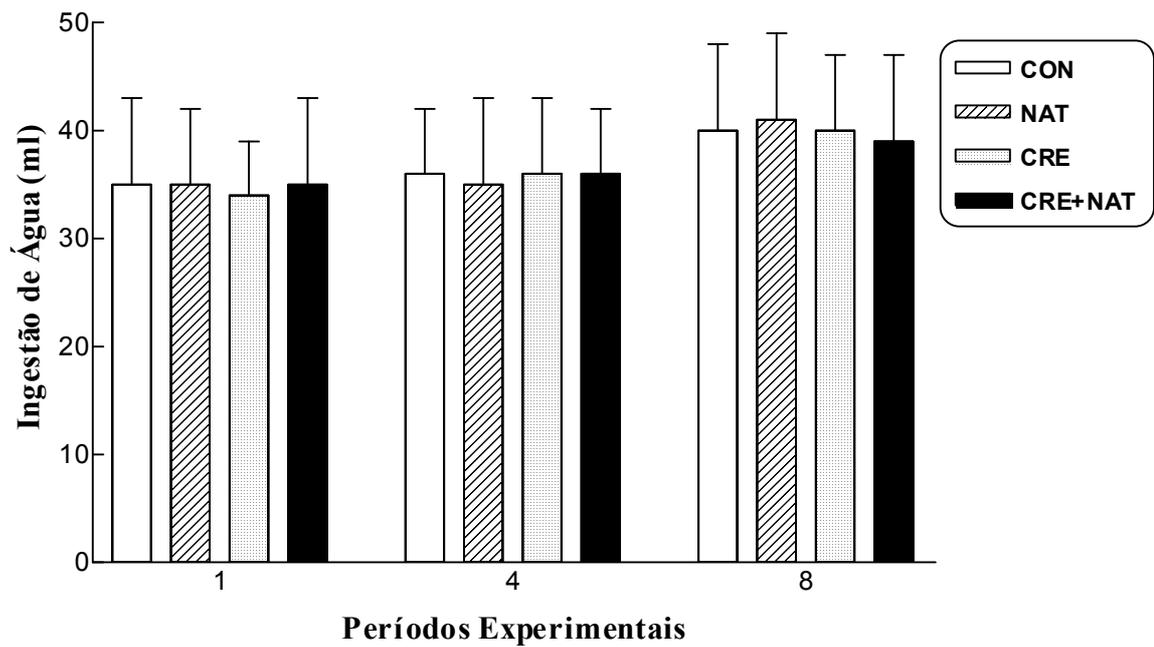


Figura 15. Ingestão diária de água. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. (n = 6) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas) ($p > 0,05$).

4.2 Eficiência Alimentar

A figura 16 representa a média da Eficiência Alimentar (%) ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da Eficiência Alimentar quando comparamos os grupos **CRE-1** ($0,35 \pm 0,03$) e **CRE + NAT-1** ($0,31 \pm 0,03$) *versus* o grupo **CON-1** ($0,18 \pm 0,02$) e **NAT-1** ($0,15 \pm 0,03$). Não foram encontradas diferenças significativas de Eficiência Alimentar entre os grupos experimentais ao final da quarta e oitava semanas ($p > 0,05$).

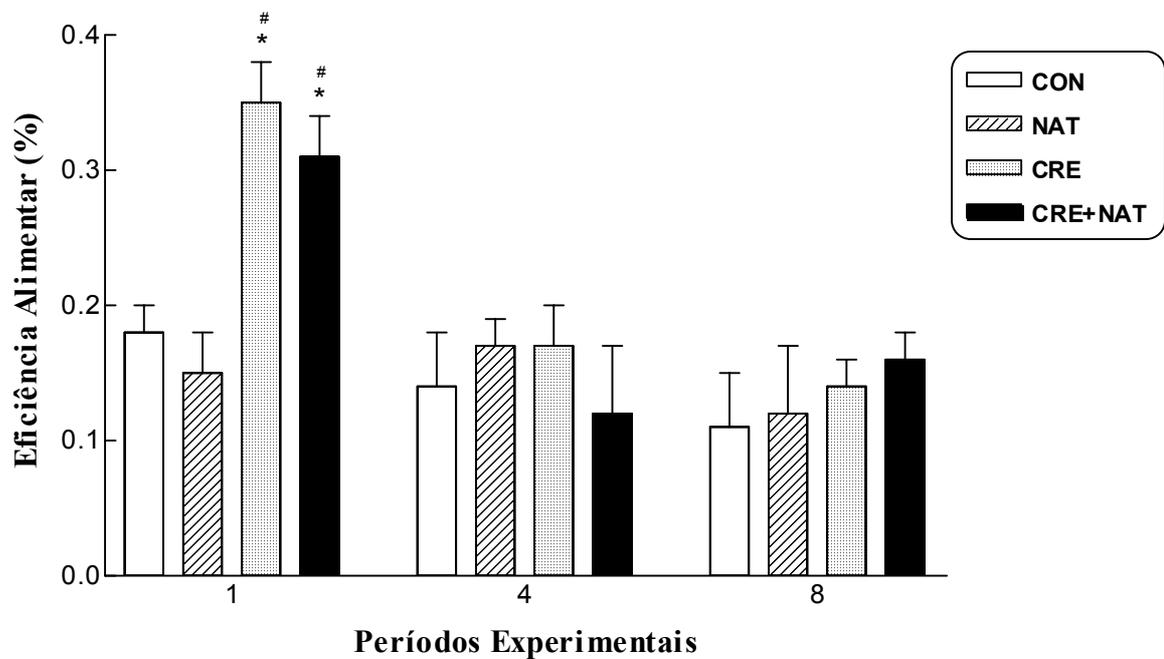


Figura 16. Eficiência Alimentar. Resultados obtidos pela divisão do ganho de peso do animal pela quantidade de alimento ingerido no mesmo período, e expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON-1; # $p < 0,05$ *versus* NAT-1 (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.3 Massa Corporal Total

Na figura 17 está representada a média da massa corporal total (g) dos animais ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de massa corporal quando comparamos os grupos **CRE-1** (294 ± 10) e **CRE + NAT-1** (292 ± 13) *versus* os grupos **CON-1** (273 ± 11) e **NAT-1** (270 ± 12). Semelhante aumento foi obtido após a quarta semana ao compararmos os grupos **CRE-4** (361 ± 13) e **CRE + NAT-4** (352 ± 10) *versus* os grupos **CON-4** (327 ± 12) e **NAT-4** (330 ± 13). Novamente, ao final da oitava semana, observamos que a média da massa corporal dos animais nos grupos suplementados (**CRE-8**: 455 ± 13 e **CRE + NAT-8**: 440 ± 12) foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) em relação os grupos não suplementados (**CON-8**: 410 ± 12 e **NAT-8**: 402 ± 11).

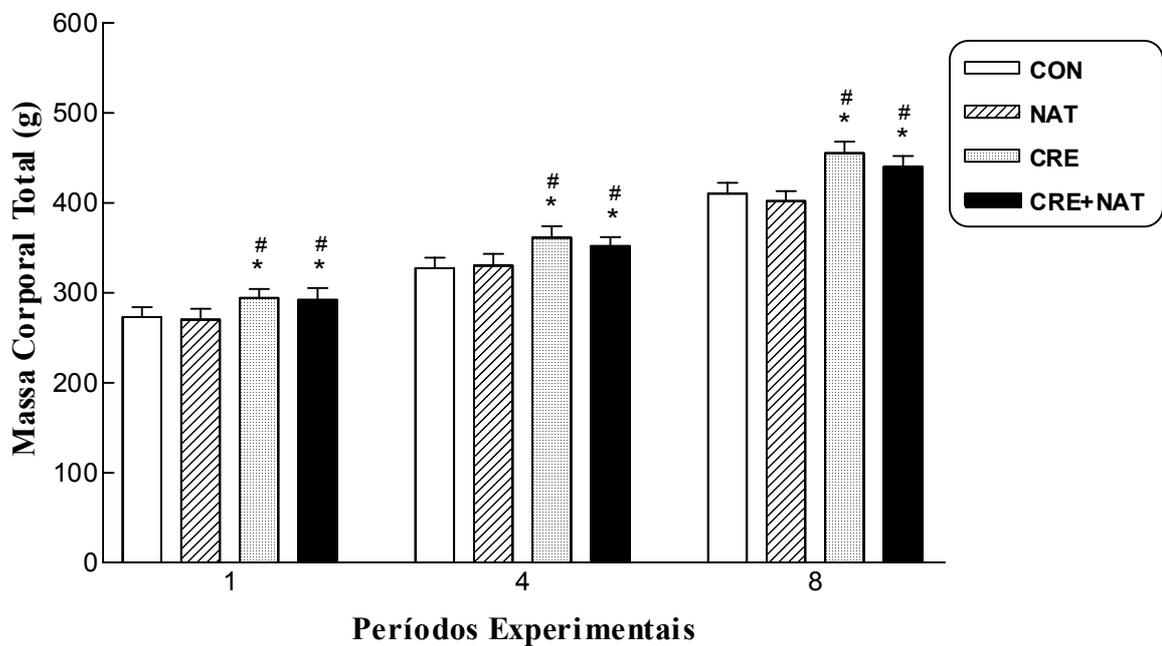


Figura 17. Massa Corporal Total. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupo Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.4 Teste de Carga Máxima

A figura 18 representa a média de carga tolerada (g) durante o Teste de Carga Máxima ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de tolerância quando comparamos os grupos **CRE + NAT-1** ($16,8 \pm 2,0$), *versus* os grupos **CON-1** ($10,9 \pm 2,3$), **NAT-1** ($10,8 \pm 12$) e **CRE-1** ($11,7 \pm 2,1$). Semelhante aumento foi obtido após a quarta semana ao compararmos os grupos **CRE + NAT-4** ($22,3 \pm 2,3$), *versus* os grupos **CON-4** ($13,4 \pm 2,4$), **NAT-4** ($13,2 \pm 2,5$) e **CRE-4** ($14,4 \pm 1,9$). Novamente, ao final da oitava semana, observamos que a tolerância dos animais do grupo suplementado e exercitado (**CRE + NAT-8**: $35,2 \pm 2,4$) foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (**CON-8**: $16,8 \pm 1,9$; **NAT-8**: $24,1 \pm 2,1$ e **CRE-8**: $18,2 \pm 1,9$). Também foi observado após a oitava semana que os animais do grupo **NAT-8** ($24,1 \pm 2,1$) apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) de tolerância em relação os grupos **CON-8** ($16,8 \pm 1,9$) e **CRE-8** ($18,2 \pm 1,9$).

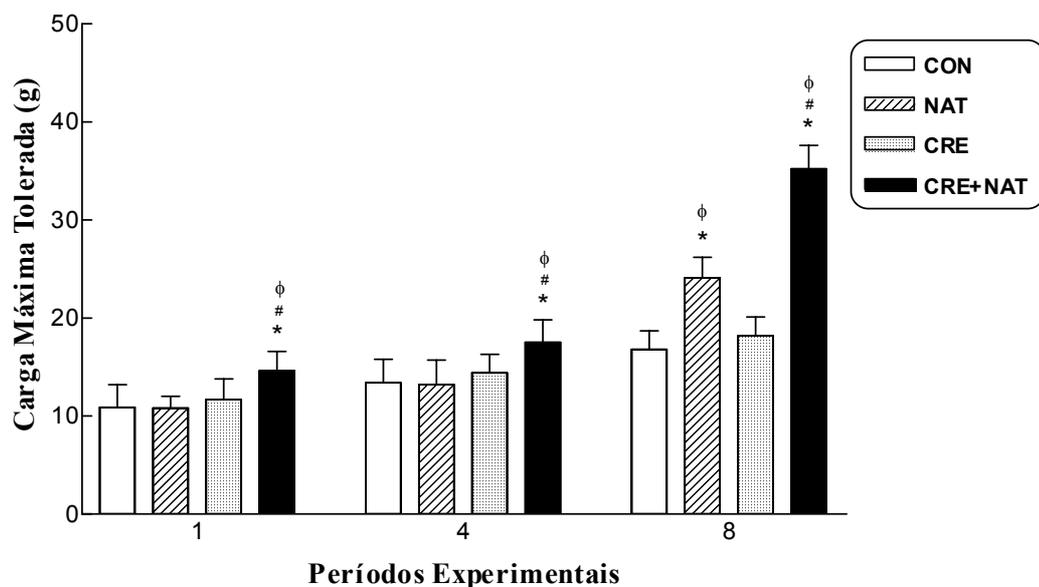


Figura 18. Teste de Carga Máxima. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.5 Glicose

A tabela 1 apresenta os valores médios das concentrações sanguíneas de glicose (mg/dl), pré e pós o teste de carga máxima, ao final dos períodos experimentais. No período pré-teste não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos ao final da primeira, quarta e oitava semanas. No período pós-teste, ao final de todos os períodos experimentais observamos uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de glicose quando comparamos os grupos **CRE + NAT** *versus* os grupos **CON** e **NAT**.

Tabela 1: Valores médios das concentrações sanguíneas de Glicose Pré e Pós Teste de Carga Máxima. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação.

Períodos Experimentais	Grupos Experimentais			
	CON	NAT	CRE	CRE+NAT
Primeira semana				
Pré-Teste (mg/dl)	112 \pm 13	109 \pm 10	110 \pm 15	115 \pm 12
Pós-Teste (mg/dl)	95 \pm 4	91 \pm 2	83 \pm 4	67 \pm 15* [#]
Quarta semana				
Pré-Teste (mg/dl)	95 \pm 16	111 \pm 14	99 \pm 10	105 \pm 13
Pós-Teste (mg/dl)	92 \pm 13	97 \pm 09	82 \pm 15	70 \pm 18* [#]
Oitava semana				
Pré-Teste (mg/dl)	117 \pm 14	98 \pm 13	95 \pm 15	99 \pm 17
Pós-Teste (mg/dl)	93 \pm 16	91 \pm 11	88 \pm 12	69 \pm 15* [#]

(n = 6), durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; [#] $p < 0,05$ *versus* NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.6 Lactato

A tabela 2 apresenta os valores médios das concentrações sanguíneas de lactato (mmol/l), pré e pós o teste de carga máxima, após os períodos experimentais. No período pré-teste não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos ao final da primeira, quarta e oitava semanas. No período pós-teste, ao final de todos os períodos experimentais observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de lactato quando comparamos os grupos **CRE + NAT**, *versus* os grupos **CON**, **NAT** e **CRE**. Semelhante aumento foi observado quando comparado o grupo **NAT-8** *versus* os grupos **CON-8** e **CRE-8**.

Tabela 2: Valores médios das concentrações sanguíneas de Lactato Pré e Pós Teste de Carga Máxima. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação.

Períodos Experimentais	Grupos Experimentais			
	CON	NAT	CRE	CRE + NAT
Primeira Semana				
Pré-Teste (mmol/l)	4,8 \pm 0,9	3,6 \pm 0,7	3,4 \pm 0,9	3,6 \pm 1,0
Pós-Teste (mmol/l)	9,0 \pm 0,8	10,2 \pm 0,6	9,8 \pm 0,8	5,4 \pm 0,7 ^{*#Φ}
Quarta Semana				
Pré-Teste (mmol/l)	3,5 \pm 0,7	4,0 \pm 1,0	2,6 \pm 0,8	4,4 \pm 0,9
Pós-Teste (mmol/l)	11,5 \pm 0,8	8,9 \pm 0,9	9,1 \pm 0,5	6,4 \pm 0,7 ^{*#Φ}
Oitava Semana				
Pré-Teste (mmol/l)	4,1 \pm 0,8	4,5 \pm 0,7	3,8 \pm 0,9	4,6 \pm 0,6
Pós-Teste (mmol/l)	12,1 \pm 0,9	8,0 \pm 0,6 ^{*Φ}	10,5 \pm 0,7	5,7 \pm 1,0 ^{*#Φ}

(n = 6) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT; Φ $p < 0,05$ *versus* CRE (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7 Testes Bioquímicos

4.7.1 ALT

A figura 19 representa a média da ALT plasmática (U/L) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira e quarta semanas não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Ao final da oitava semana observamos um aumento significativo de ALT ($p < 0,05$) quando comparamos o grupo **CRE-8** (41 ± 7) *versus* os grupos **CON-8** (23 ± 7), **NAT-8** (21 ± 8) e **CRE + NAT-8** (27 ± 6).

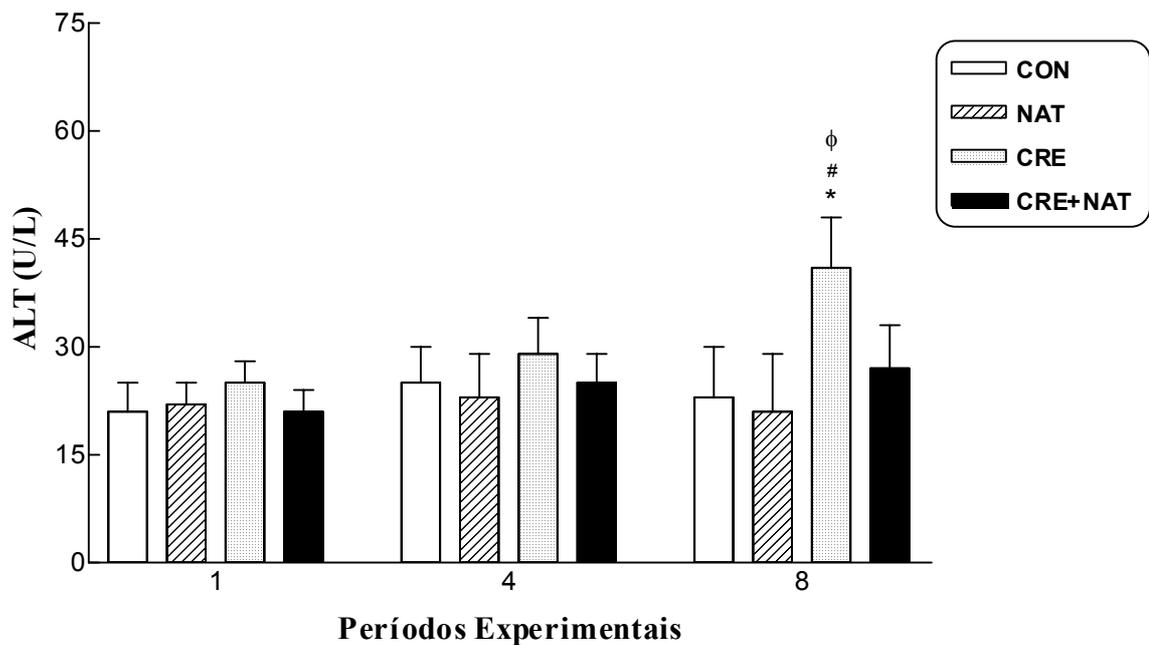


Figura 19. ALT. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE+NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7.2 AST

A figura 20 representa a média de AST plasmática (U/L) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da AST quando comparamos os grupos **NAT-1** (75 ± 1) e **CRE + NAT-1** (77 ± 2) *versus* os grupos **CON-1** (61 ± 5) e **CRE-1** (62 ± 3). Ao final da oitava semana observamos que os animais do grupo **CRE-8** (89 ± 6) apresentaram valor médio de AST superior ($p < 0,05$) em relação os demais grupos (**CON-8**: 62 ± 5 ; **NAT-8**: 71 ± 5 ; e **CRE + NAT-8**: 67 ± 7). Não foram encontradas diferenças significativas de AST entre os grupos experimentais ao final da quarta semana ($p > 0,05$).

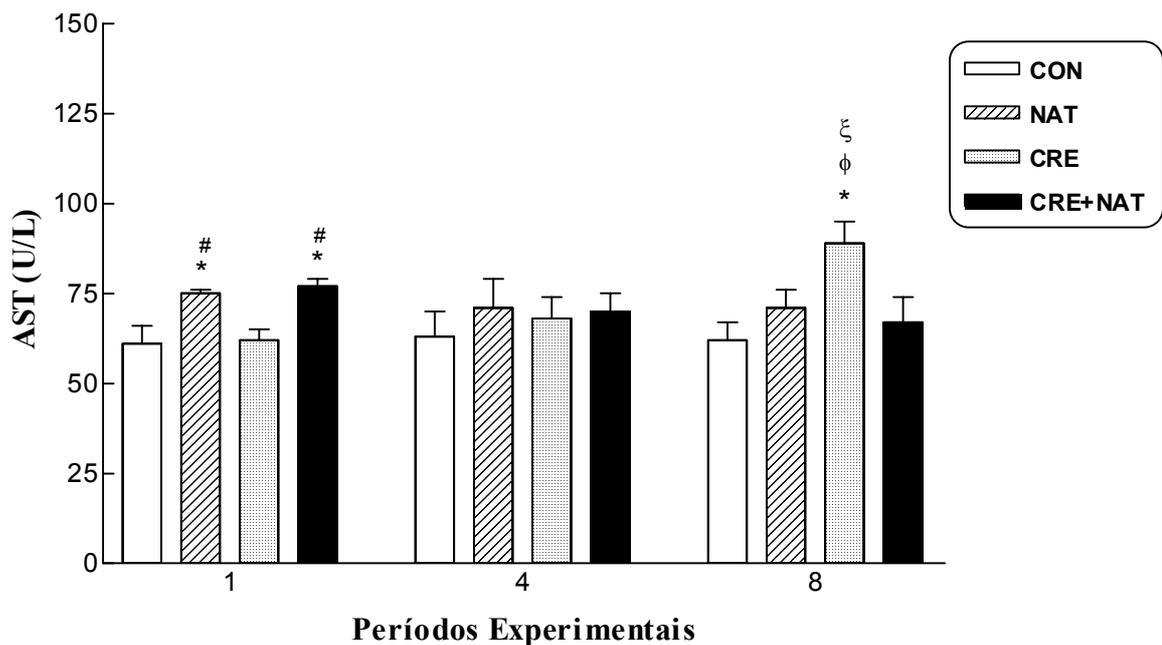


Figura 20. AST. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* CRE, ϕ $p < 0,05$ *versus* NAT; ξ $p < 0,05$ *versus* CRE + NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7.3 GGT

A figura 21 representa a média da GGT plasmática (U/L) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira e quarta semanas não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Ao final da oitava semana observamos um aumento significativo da GGT ($p < 0,05$) quando comparamos o grupo **CRE-8** ($8,0 \pm 0,9$) *versus* os grupos **CON-8** ($3,9 \pm 1,0$), **NAT-8** ($4,1 \pm 1,0$) e **CRE + NAT-8** ($3,9 \pm 0,7$).

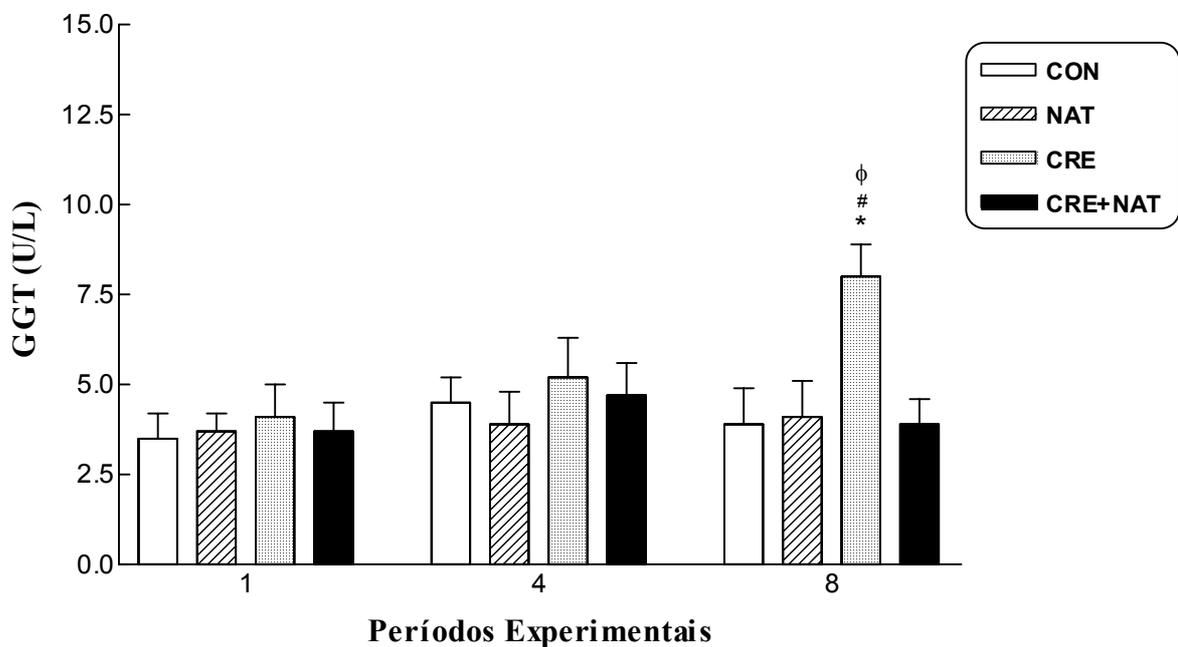


Figura 21. GGT. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE+NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7.4 Fosfatase Alcalina

A figura 22 representa a média da Fosfatase Alcalina plasmática (U/L) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira e quarta semanas não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Ao final da oitava semana observamos um aumento significativo de Fosfatase Alcalina ($p < 0,05$) quando comparamos o grupo **CRE-8** (125 ± 10) *versus* os grupos **CON-8** (67 ± 9), **NAT-8** (69 ± 12) e **CRE + NAT-8** (72 ± 15).

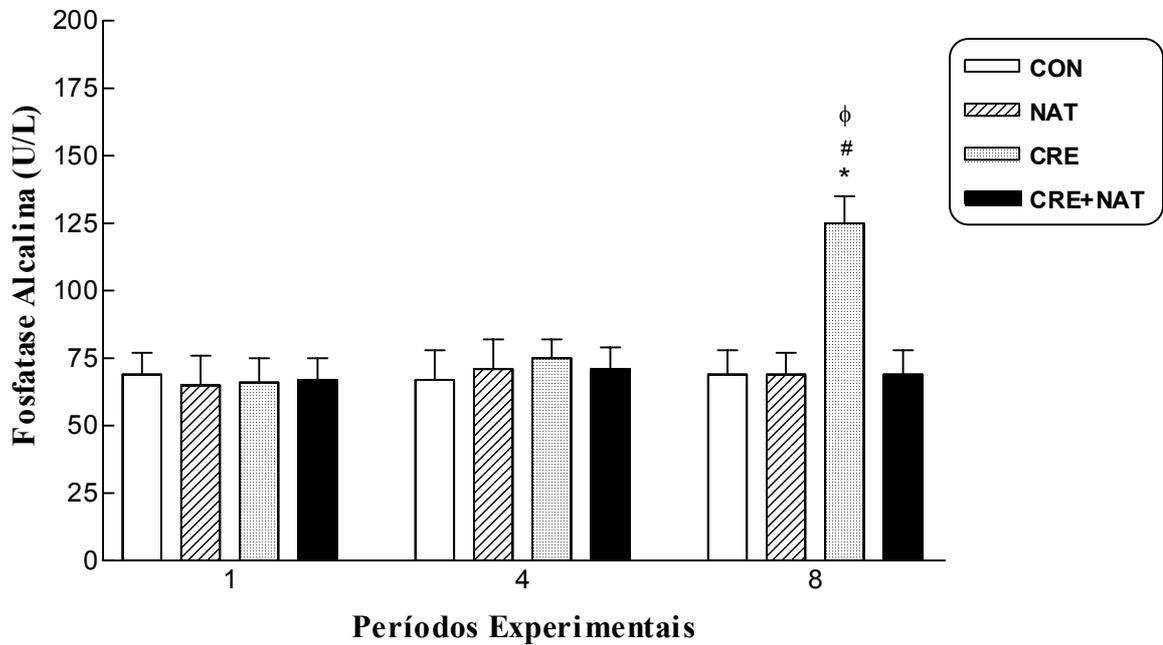


Figura 22. Fosfatase Alcalina. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE+NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7.5 LDH

A figura 23 representa a média da LDH plasmática (U/L) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da LDH quando comparamos os grupos **NAT-1** (161 ± 15) e **CRE + NAT-1** (153 ± 17) *versus* os grupos **CON-1** (92 ± 13) e **CRE-1** (108 ± 12). Ao final da quarta semana observamos que os animais do grupo **NAT-4** (155 ± 19) apresentaram valor médio de LDH superior ($p < 0,05$) em relação os demais grupos (**CON-4**: 103 ± 20 ; **CRE-4**: 105 ± 18 ; e **CRE + NAT-4**: 120 ± 15). Não foram encontradas diferenças significativas de LDH entre os grupos experimentais ao final da oitava semana ($p > 0,05$).

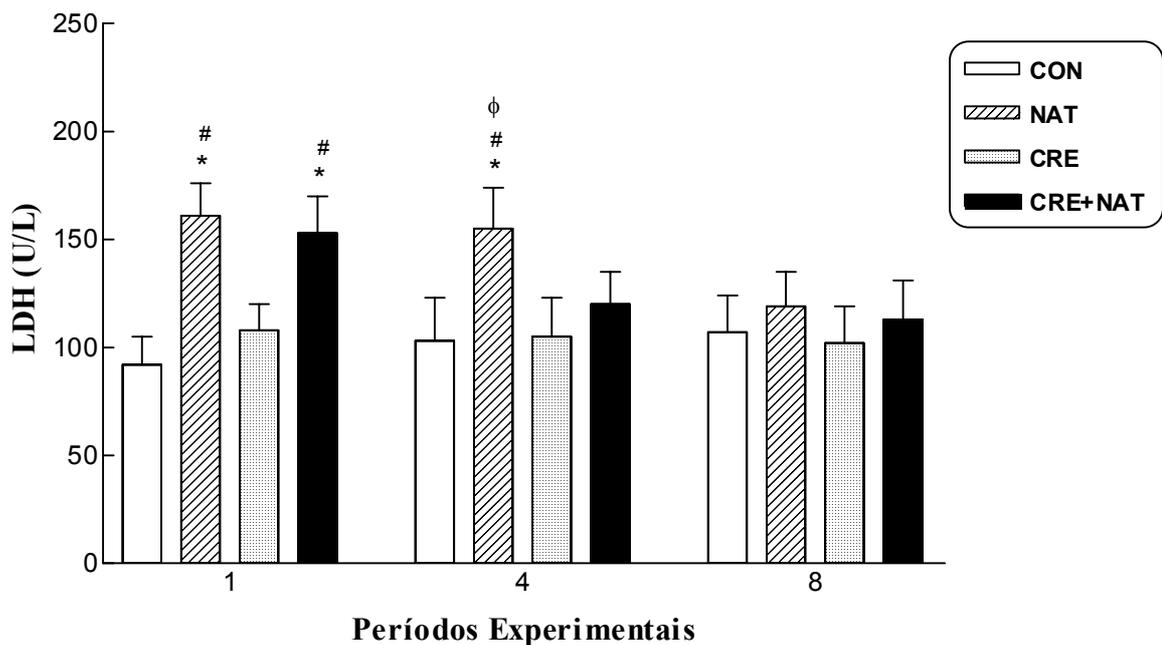


Figura 23. LDH. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* CRE, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE + NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7.6 Bilirrubinas Totais

A figura 24 representa a média de Bilirrubinas Totais plasmáticas (mg/dl) encontrada ao final dos períodos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas de ingestão de ração entre os grupos experimentais ao final da primeira, quarta e oitava semanas ($p > 0,05$).

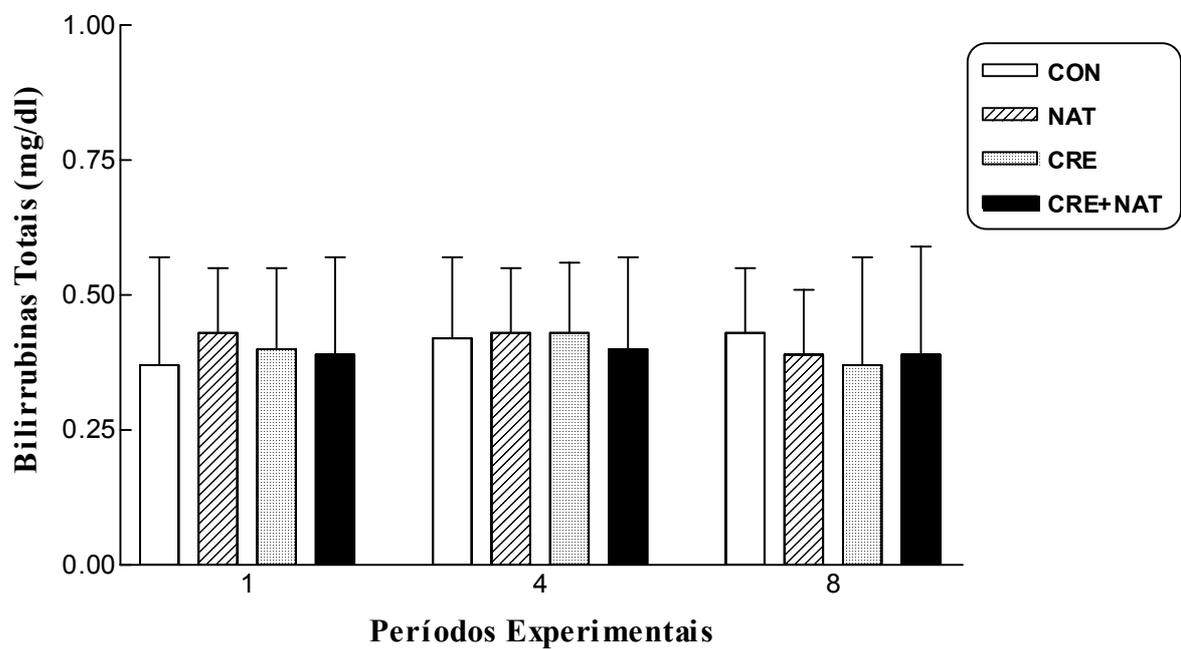


Figura 24. Bilirrubinas Totais. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental em cada período experimental (1, 4 e 8 semanas).

4.7.7 Albumina

A figura 25 representa a média de Albumina plasmáticas (g/dl) encontrada ao final dos períodos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas de ingestão de ração entre os grupos experimentais ao final da primeira, quarta e oitava semanas ($p > 0,05$).

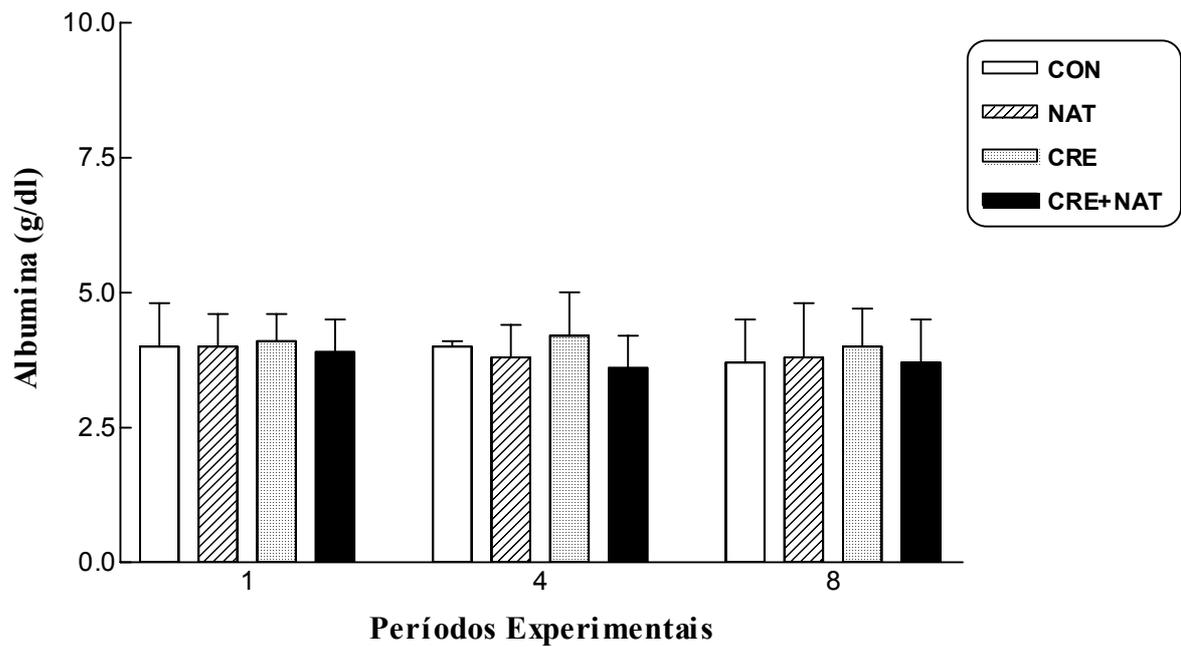


Figura 25. Albumina. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental em cada período experimental (1, 4 e 8 semanas).

4.7.8 Uréia

A figura 26 representa a média de Uréia plasmática (mg/dl) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Ao final da quarta semana observamos um aumento significativo de Uréia ($p < 0,05$) quando comparamos o grupo **CRE-4** (37 ± 3) *versus* os grupos **CON-4** (20 ± 2), **NAT-4** (18 ± 2) e **CRE + NAT-4** (22 ± 3). Semelhante aumento foi obtido ao final da oitava semana quando comparamos o grupo **CRE-8** (36 ± 3) *versus* os grupos **CON-8** (19 ± 1), **NAT-8** (20 ± 2) e **CRE + NAT-8** (23 ± 2).

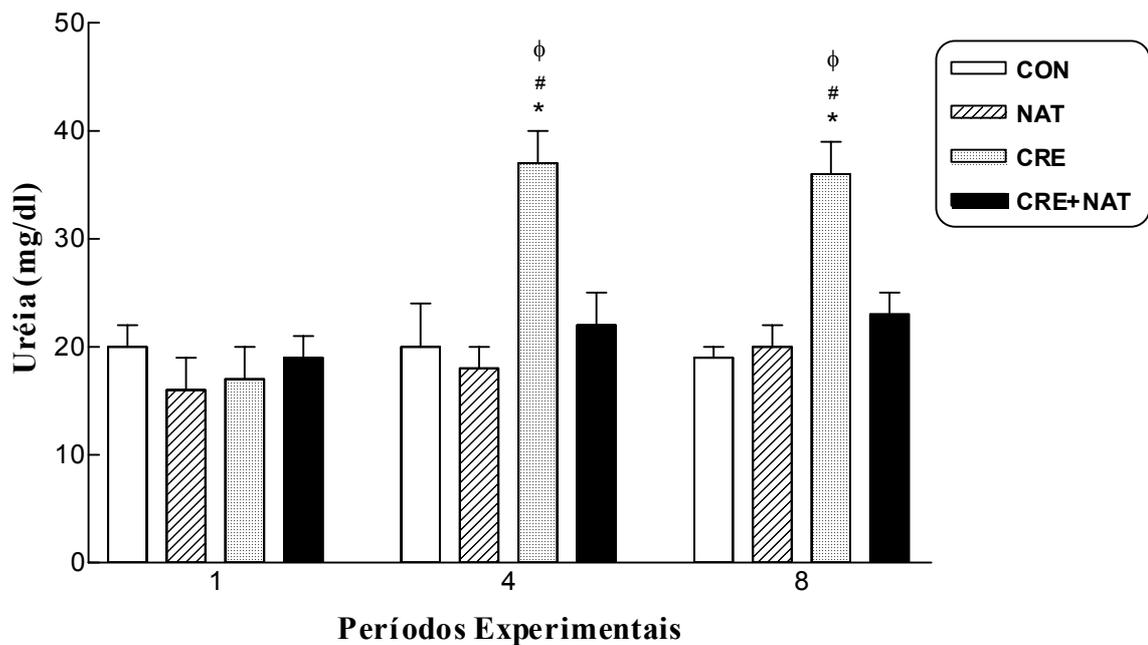


Figura 26. Uréia. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE+NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7.9 Creatinina

A figura 27 representa a média de Creatinina plasmática (mg/dl) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Ao final da quarta semana observamos um aumento significativo de Creatinina ($p < 0,05$) quando comparamos o grupo **CRE-4** ($1,1 \pm 0,2$) *versus* os grupos **CON-4** ($0,4 \pm 0,2$), **NAT-4** ($0,5 \pm 0,2$) e **CRE + NAT-4** ($0,6 \pm 0,1$). Semelhante aumento foi obtido ao final da oitava semana quando comparamos o grupo **CRE-8** ($1,2 \pm 0,2$) *versus* os grupos **CON-8** ($0,4 \pm 0,1$), **NAT-8** ($0,6 \pm 0,1$) e **CRE + NAT-8** ($0,6 \pm 0,2$).

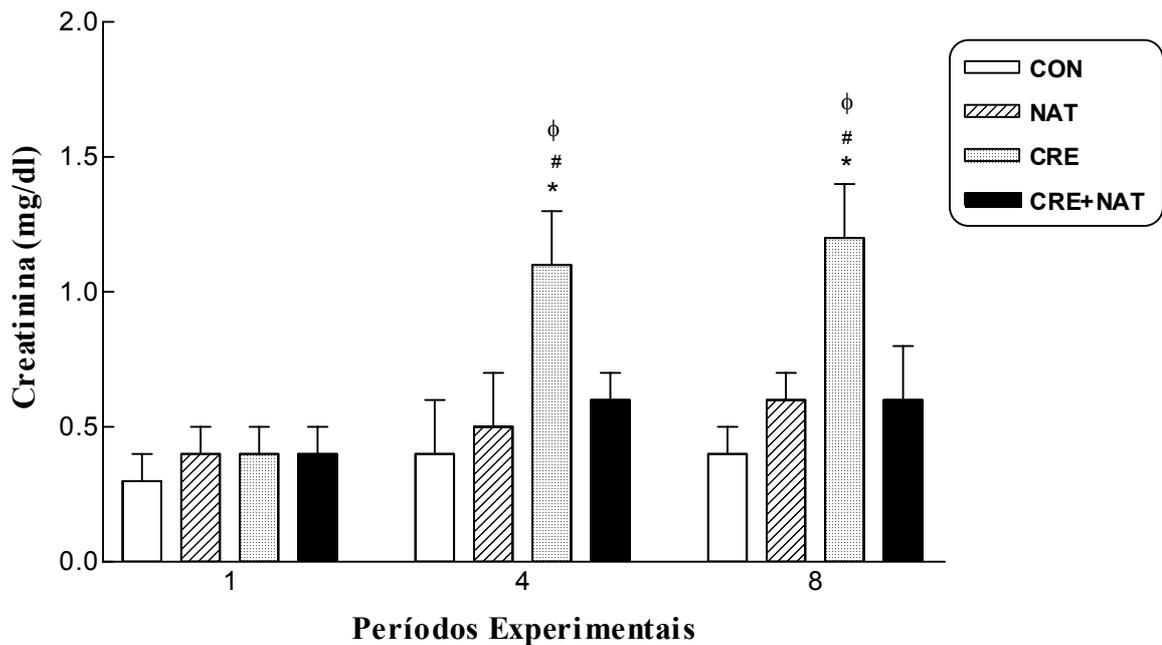


Figura 27. Creatinina. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* NAT, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE+NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.7.10 CQ

A figura 28 representa a média de CQ plasmática (U/L) encontrada ao final dos períodos experimentais. Após a primeira semana observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de CQ quando comparamos os grupos **NAT-1** (130 ± 13) e **CRE + NAT-1** (122 ± 15) *versus* os grupos **CON-1** (79 ± 12) e **CRE-1** (68 ± 08). Ao final da quarta semana observamos que os animais do grupo **NAT-4** (120 ± 12) apresentaram valor médio de CQ superior ($p < 0,05$) em relação os demais grupos (**CON-4**: 81 ± 10 ; **CRE-4**: 75 ± 14 ; e **CRE + NAT-4**: 91 ± 10). Não foram encontradas diferenças significativas de CQ entre os grupos experimentais ao final da oitava semana ($p > 0,05$).

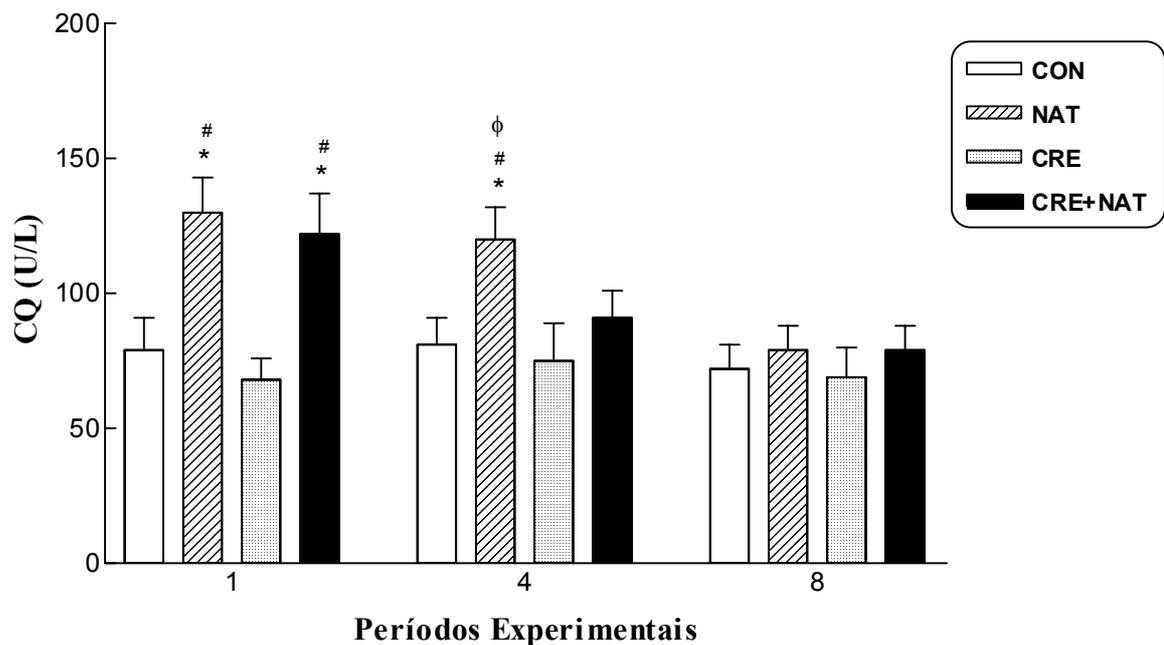


Figura 28. CQ. Resultados expressos como média \pm E.P.M. CON: Grupos Controle; NAT: Grupos Natação; CRE: Grupos Creatina; CRE + NAT: Grupos Creatina Natação. ($n = 6$) por grupo experimental durante os diferentes períodos (1, 4 e 8 semanas). * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* CRE, ϕ $p < 0,05$ *versus* CRE + NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

4.8 Histomorfologia Renal

Como os grupos CON e NAT não foram submetidos a protocolos experimentais que pudessem influenciar a morfologia do tecido renal, os animais destes grupos não apresentaram alterações histomorfológicas compatíveis com perda de integridade tecidual (figuras 29, 30, 31 e 32).

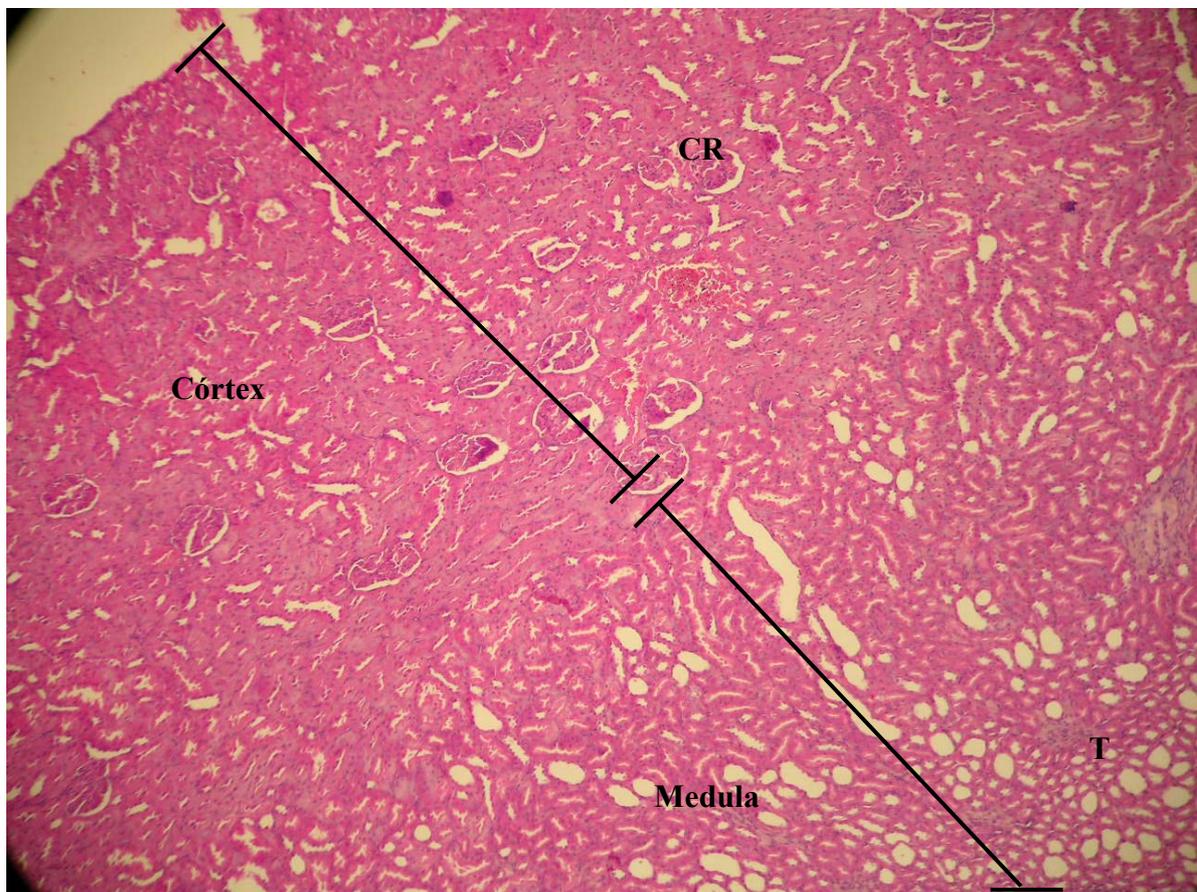


Figura 29. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CON. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração condizentes com o padrão de normalidade (H & E – 100x).

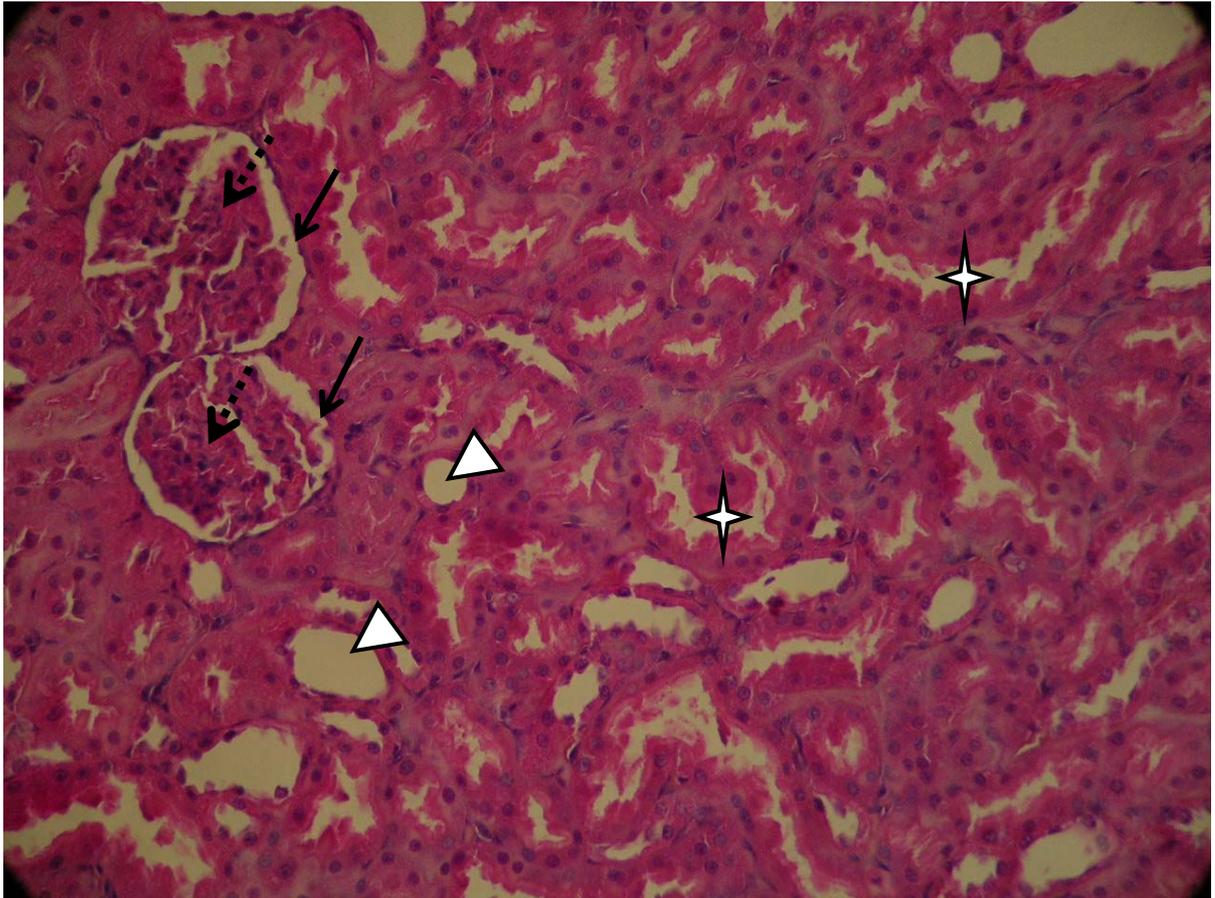


Figura 30. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CON. Corpúsculos Renais com contorno delgado e definido da Cápsula de Bowman (setas contínuas). Capilares glomerulares (setas tracejadas) não congestionados e com espaço intra-capsular preservado. Túbulos renais exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide) e lúmen distinto. Observar Túbulo Contorcido Proximal (estrelas) com suas células grandes e apresentando orla em escova, formada por numerosos microvilos paralelos. Comparar com o Túbulo Contorcido Distal (cabeças de setas) (H & E – 400x).

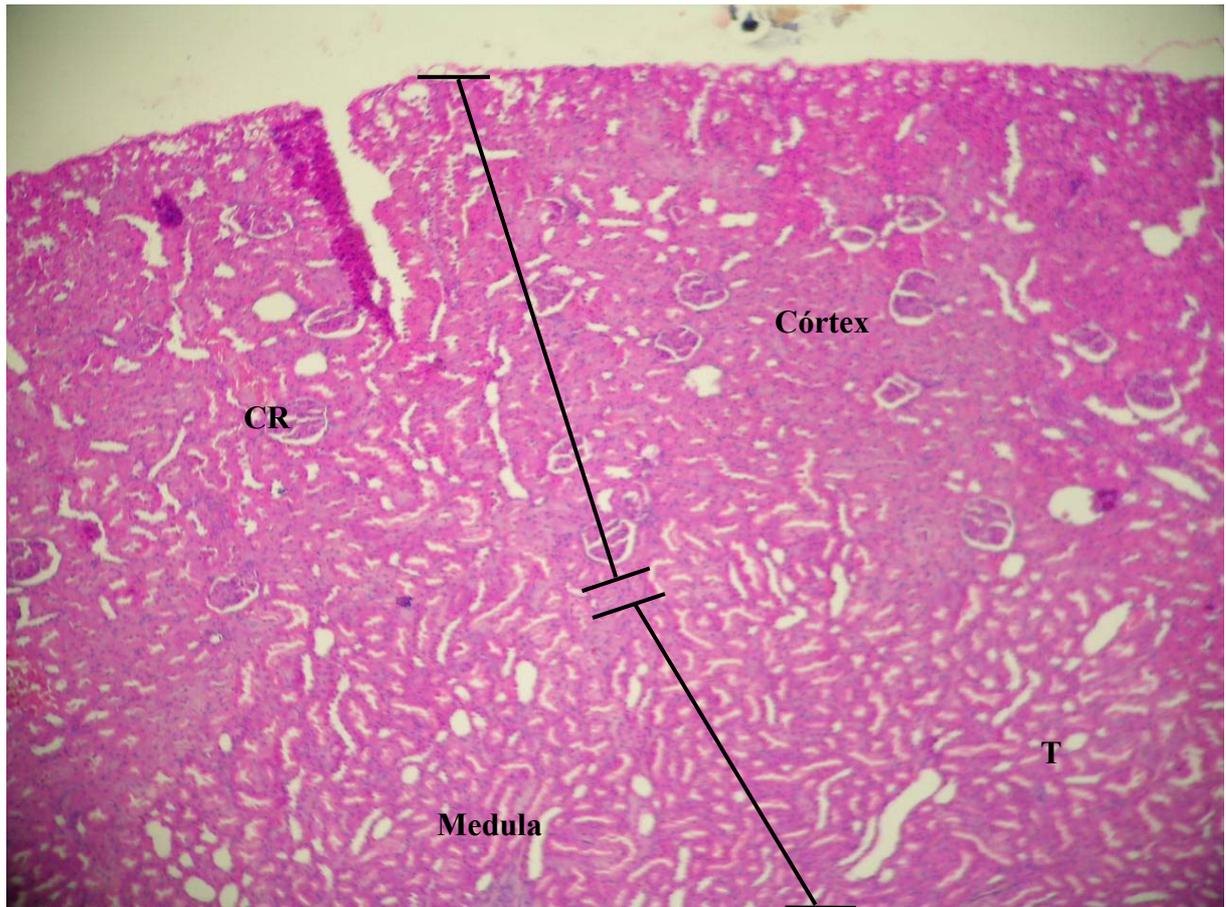


Figura 31. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo NAT. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração condizentes com o padrão de normalidade (H & E – 100x).

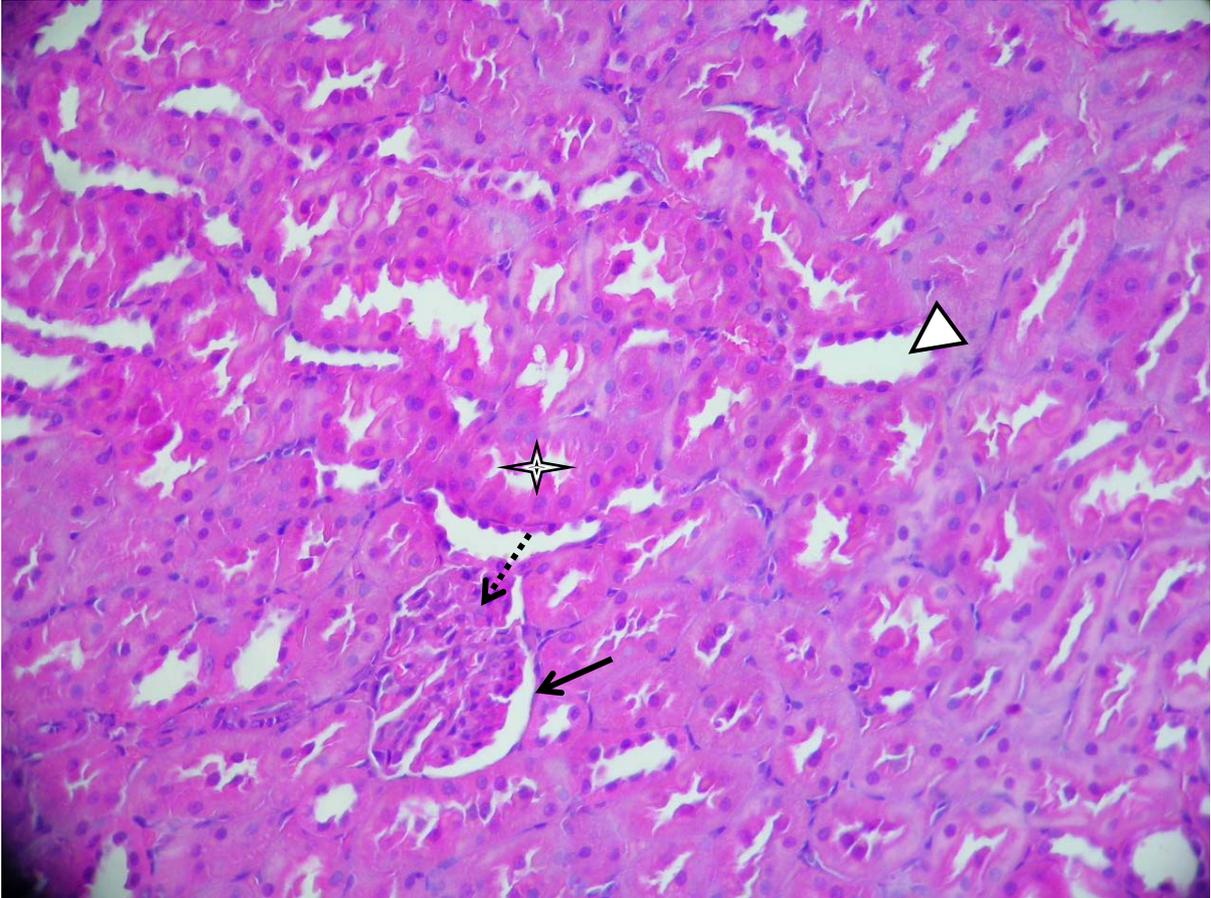


Figura 32 – Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo NAT. Corpúsculos Renais com contorno delgado e definido da Cápsula de Bowman (setas contínuas). Capilares glomerulares (seta tracejada) não congestionados e com espaço intra-capsular preservado. Túbulos renais exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide) e lúmen distinto. Observar Túbulo Contorcido Proximal (estrela) com suas células grandes e apresentando orla em escova, formada por numerosos microvilos paralelos. Comparar com o Túbulo Contorcido Distal (cabeça de seta) (H & E – 400x).

Nas figuras 33 e 34 observamos as fotomicrografias do tecido renal do grupo CRE-1. A suplementação de Cr não alterou a integridade do tecido renal nos animais destes grupos.



Figura 33. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-1. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração condizentes com o padrão de normalidade (H & E - 100x).

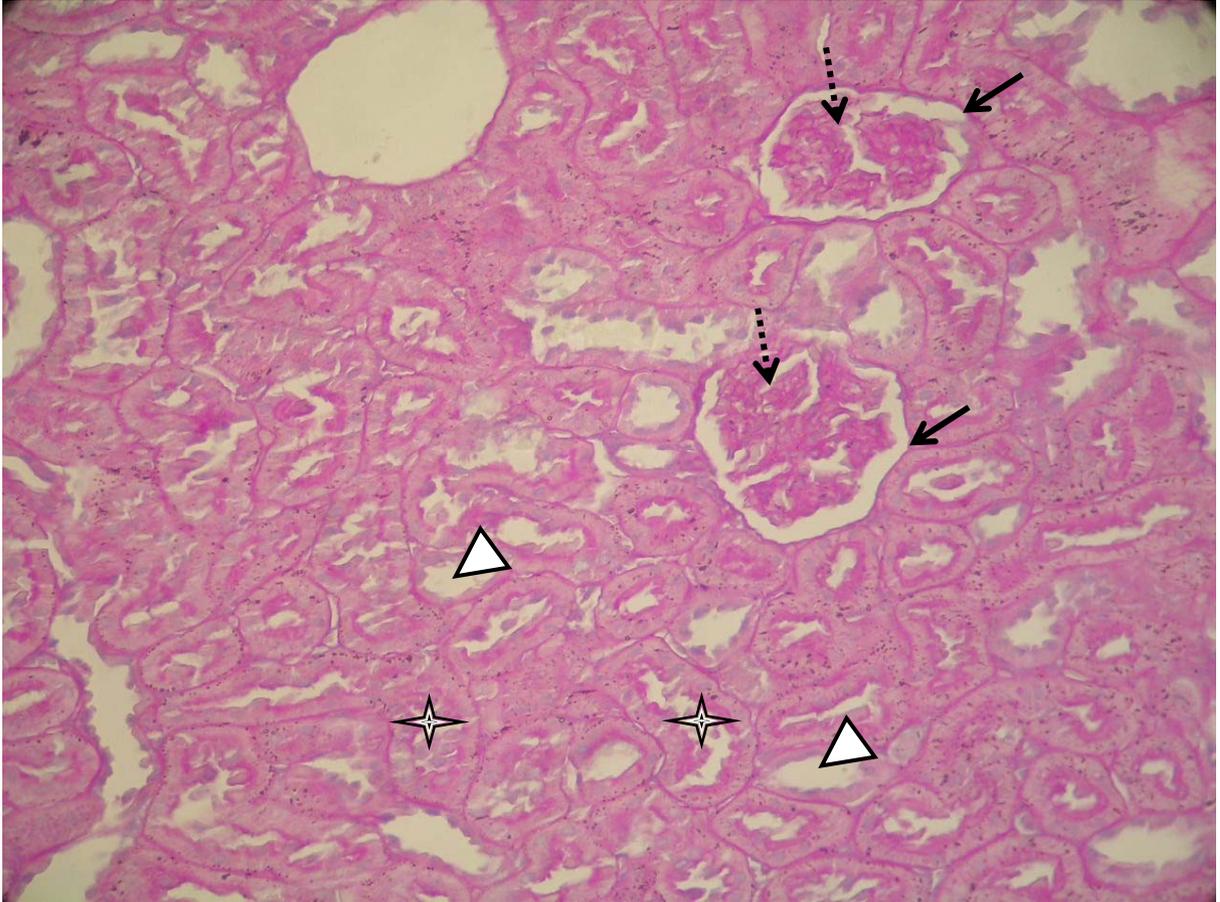


Figura 34. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-1. Corpúsculos Renais com contorno delgado e definido da Cápsula de Bowman (setas contínuas). Capilares glomerulares (setas tracejadas) não congestionados e com espaço intra-capsular preservado. Túbulos renais exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide) e lúmen distinto. Observar Túbulo Contorcido Proximal (estrelas) com suas células grandes e apresentando orla em escova, formada por numerosos microvilos paralelos. Comparar com o Túbulo Contorcido Distal (cabeças de setas) (H & E – 400x).

Nas figuras 35 e 36 observamos as fotomicrografias do tecido renal do grupo CRE+NAT-1. A suplementação de Cr não alterou a integridade do tecido renal nos animais destes grupos.

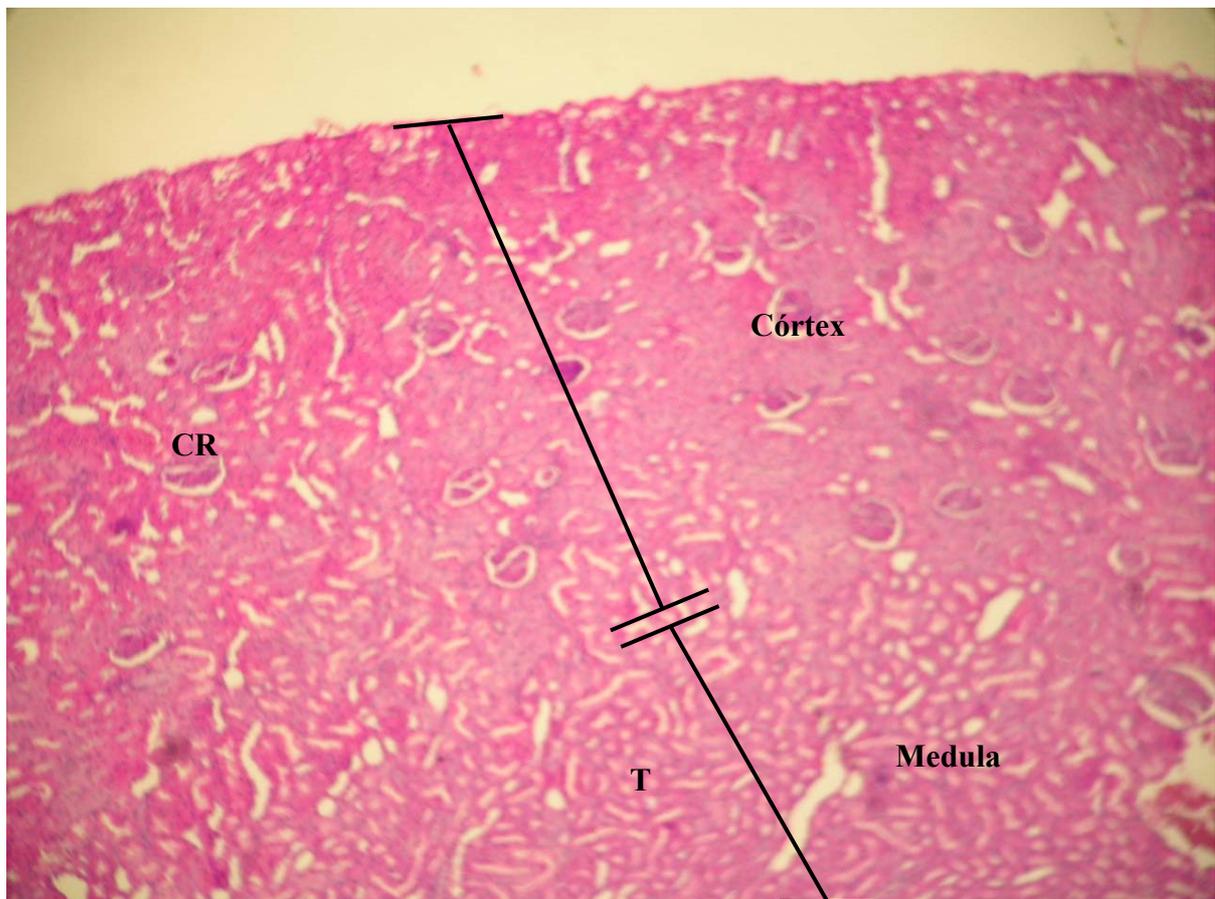


Figura 35. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-1. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração condizentes com o padrão de normalidade (H & E - 100x).

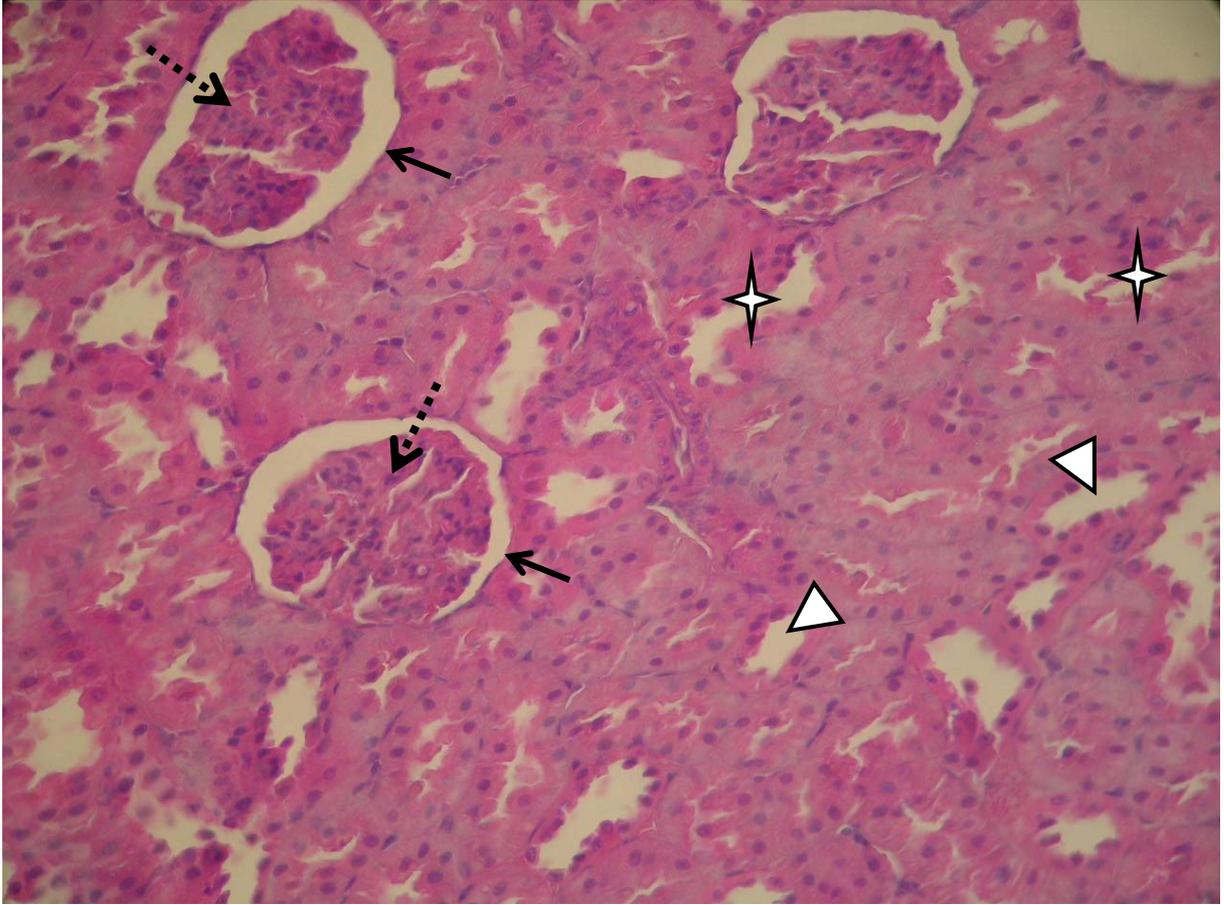


Figura 36. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-1. Corpúsculos Renais com contorno delgado e definido da Cápsula de Bowman (setas contínuas). Capilares glomerulares (seta tracejadas) não congestionados e com espaço intra-capsular preservado. Túbulos renais exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide) e lúmen distinto. Observar Túbulo Contorcido Proximal (estrelas) com suas células grandes e apresentando orla em escova, formada por numerosos microvilos paralelos. Comparar com o Túbulo Contorcido Distal (cabeças de setas) (H & E – 400x).

Nas figuras 37 e 38 observamos as fotomicrografias do tecido renal do grupo CRE-4. Após quatro semanas de estudo, os animais sedentários que recebiam suplementação de Cr apresentaram alterações histomorfológicas renais compatíveis com perda da integridade morfológica deste tecido.

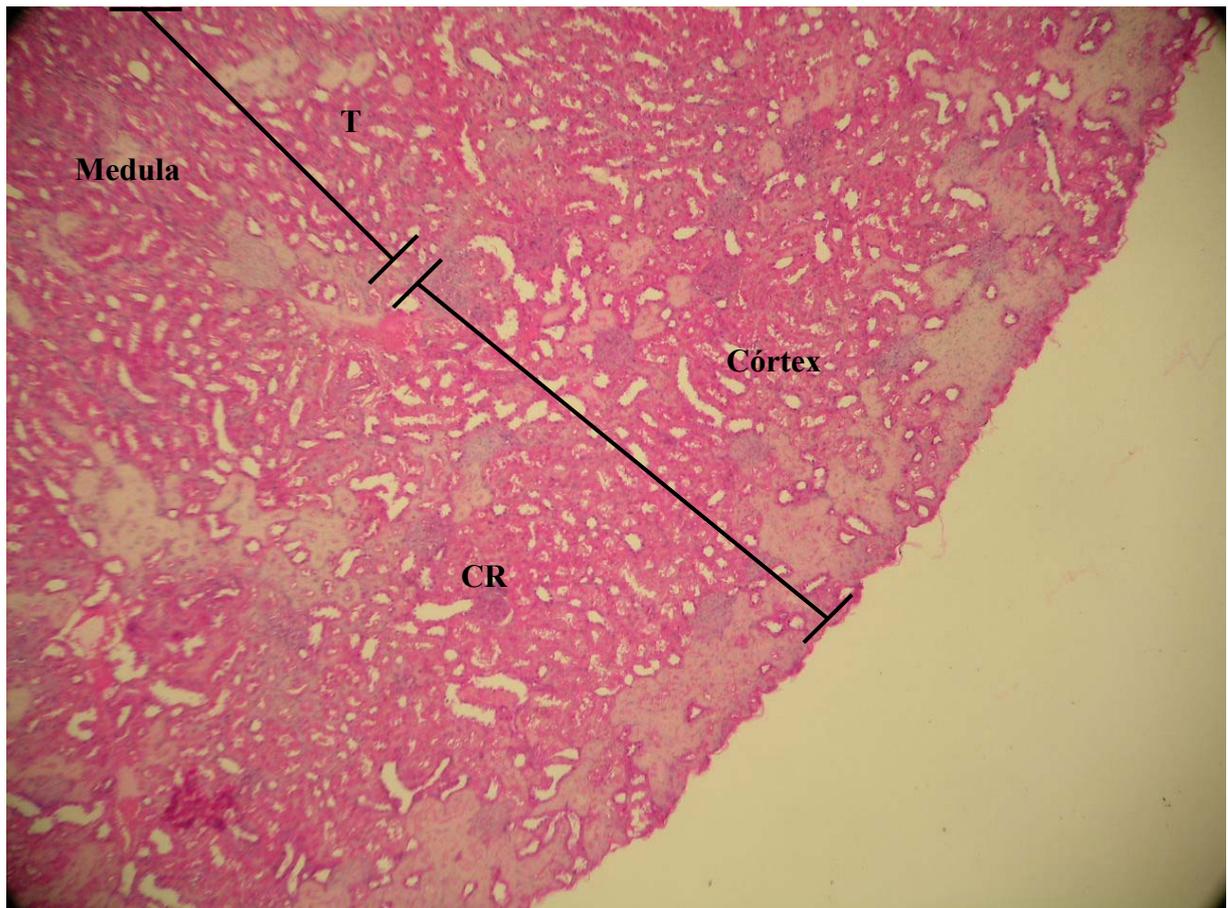


Figura 37. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-4. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) indefinidos em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração não condizentes com o padrão de normalidade (H & E – 100x).

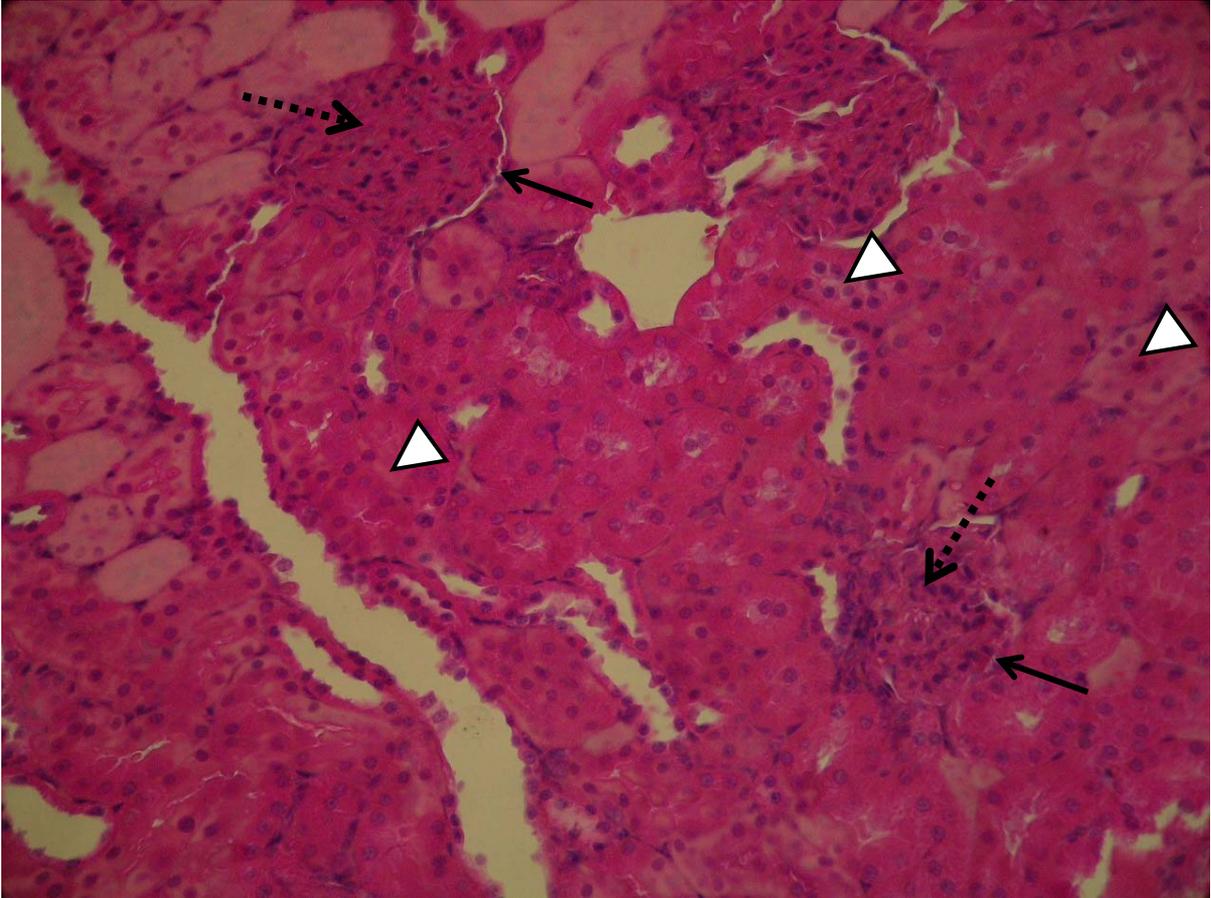


Figura 38. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-4. Corpúsculos Renais com contorno de difícil delimitação e irregular da Cápsula de Bowman (setas contínuas). Capilares glomerulares (setas tracejadas) congestionados e espaço intra-capsular não preservado. Túbulos Renais (cabeças de setas) exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide), mas espaço tubular indefinido (H & E – 400x).

Nas figuras 39 e 40 observamos as fotomicrografias do tecido renal do grupo CRE+NAT-4. Os animais do grupo CRE-NAT-4, embora suplementados com Cr não apresentaram qualquer evidência de histomorfologia renal alterada.



Figura 39. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-4. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração condizentes com o padrão de normalidade (H & E – 100x).

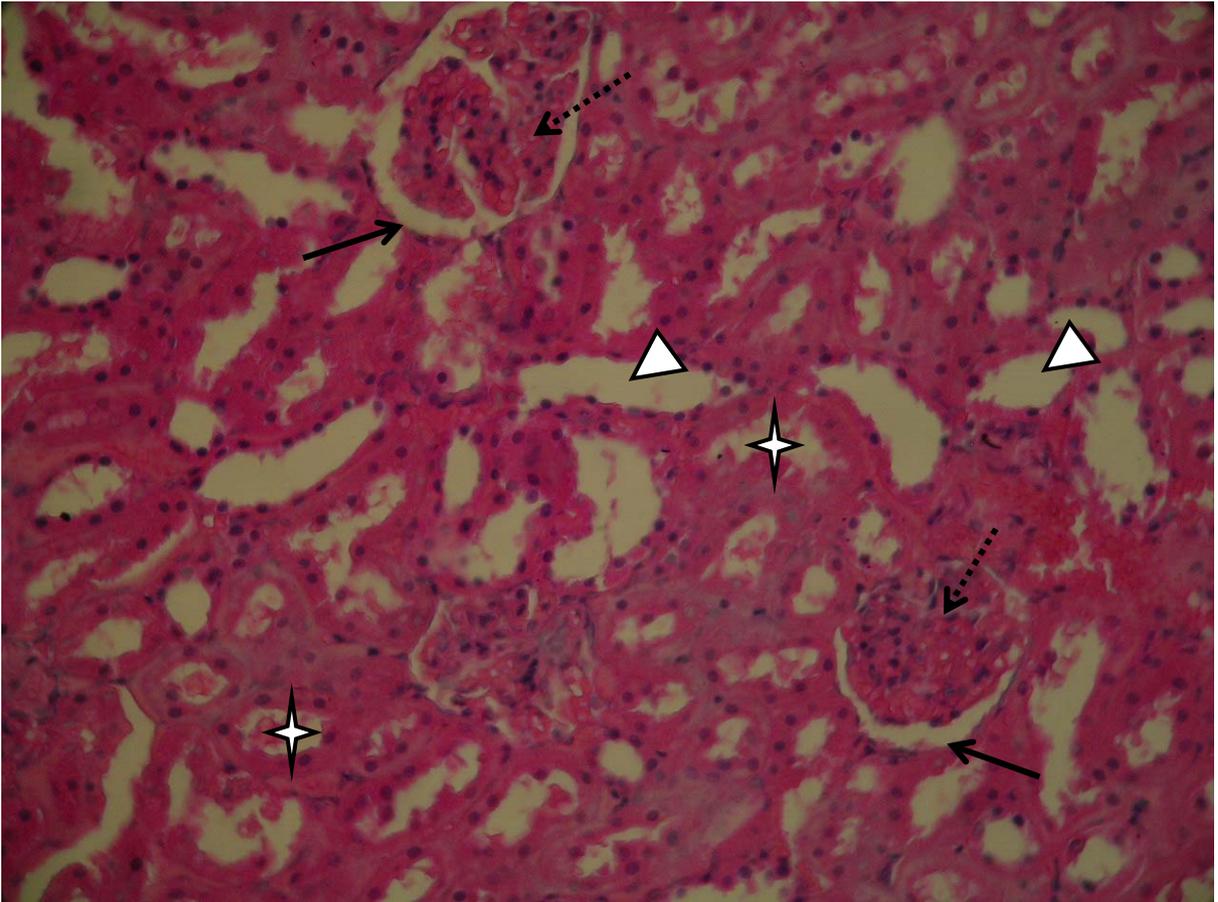


Figura 40. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-4. Corpúsculos Renais com contorno delgado e definido da Cápsula de Bowman (setas contínuas). Capilares glomerulares (setas tracejadas) não congestionados e com espaço intra-capsular preservado. Túbulos renais exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide) e lúmen distinto. Observar Túbulo Contorcido Proximal (estrelas) com suas células grandes e apresentando orla em escova, formada por numerosos microvilos paralelos. Comparar com o Túbulo Contorcido Distal (cabeças de setas) (H & E – 400x).

Nas figuras 41 e 42 temos as fotomicrografias do tecido renal dos grupos CRE-8. Após oito semanas de estudo, os animais sedentários que recebiam suplementação de Cr apresentaram alterações histomorfológicas renais compatíveis com perda da integridade morfológica deste tecido.

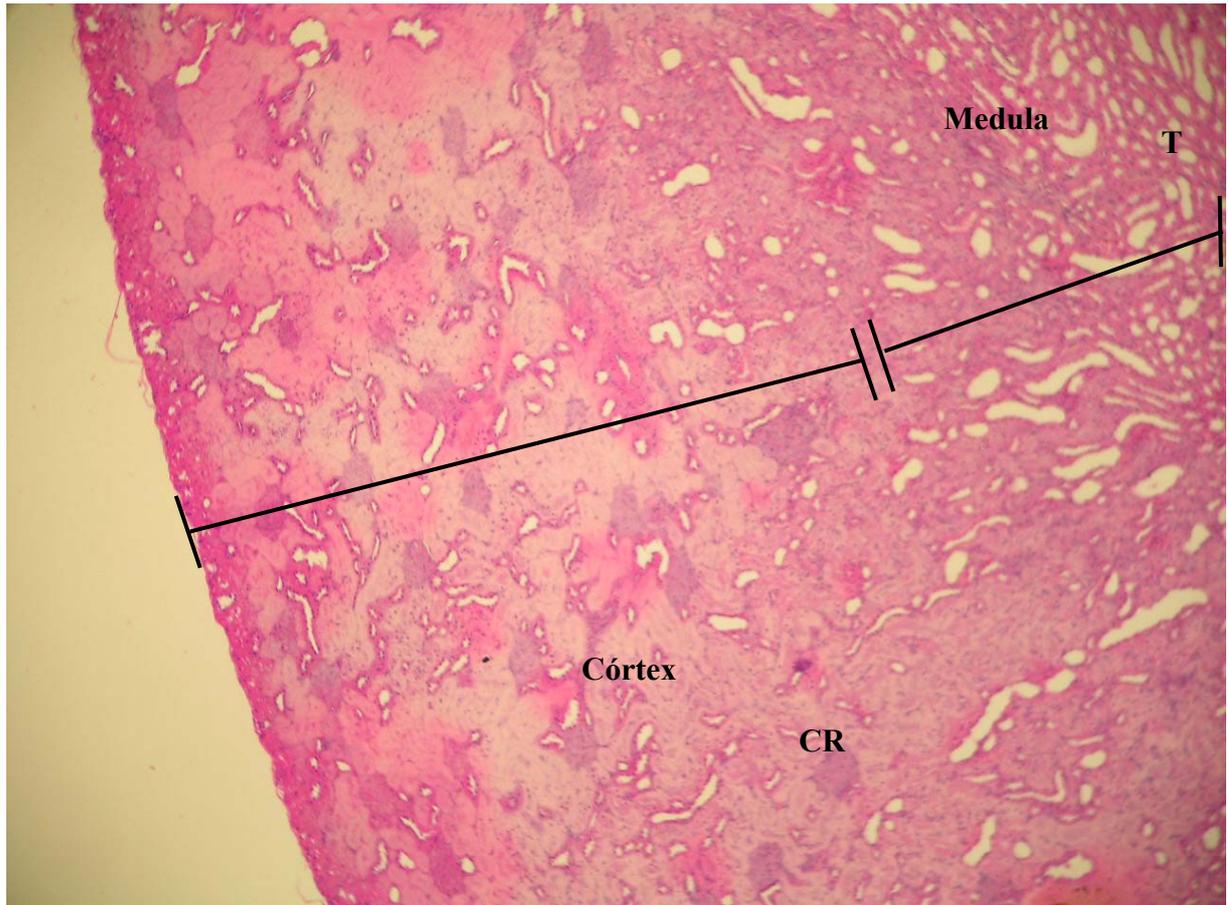


Figura 41. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-8. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) indefinidos em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração não condizentes com o padrão de normalidade (H & E – 100x).

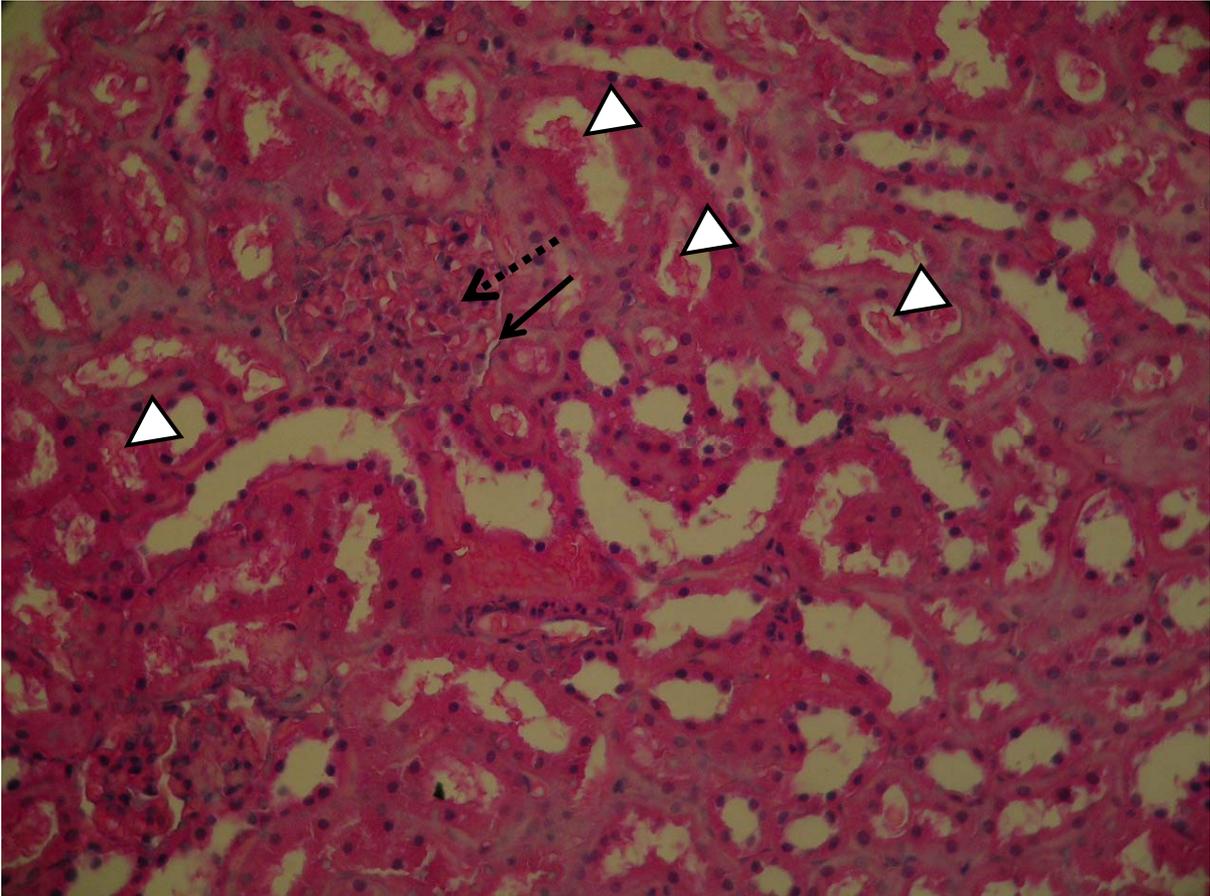


Figura 42. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE-8. Corpúsculos Renais com contorno de difícil delimitação e irregular da Cápsula de Bowman (seta contínua). Capilares glomerulares (seta tracejada) congestionados e espaço intra-capsular não preservado. Túbulos Renais (cabeças de setas) exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide), mas espaço tubular indefinido e com presença de células sanguíneas (H & E – 400x).

Nas figuras 43 e 44 temos as fotomicrografias do tecido renal do grupo CRE+NAT-8. Os animais do grupo CRE+NAT-8, embora suplementados com Cr não apresentaram qualquer evidência de histomorfologia renal alterada.

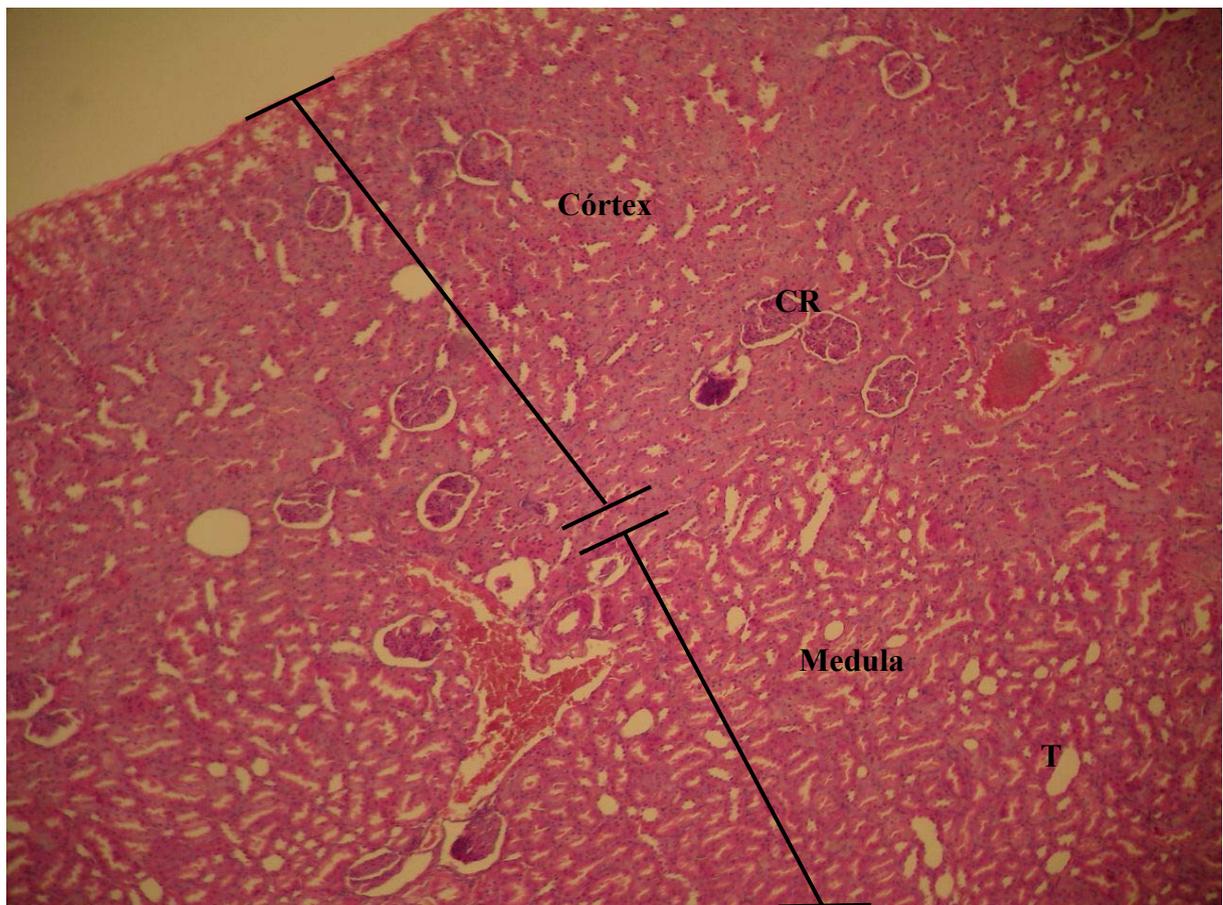


Figura 43. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-8. Delimitação da zona cortical e medular renal. Observar presença de Corpúsculos Renais (CR) em zona cortical e Túbulos (T) em zona medular. Parênquima renal com morfologia e aspecto de coloração condizentes com o padrão de normalidade (H & E – 100x).

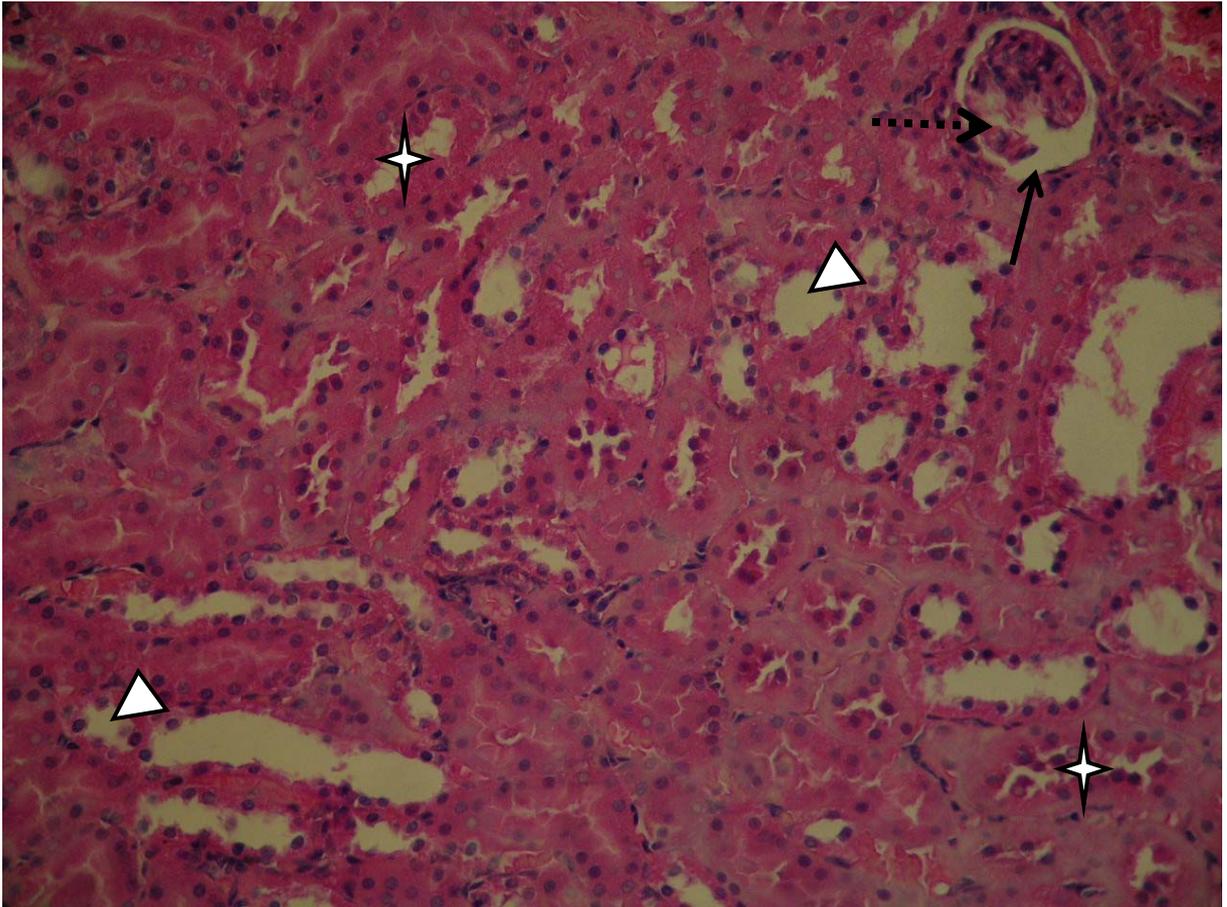


Figura 44. Fotomicrografia de tecido renal de rato Wistar do grupo CRE+NAT-8. Corpúsculos Renais com contorno delgado e definido da Cápsula de Bowman (seta contínua). Capilares glomerulares (seta tracejada) não congestionados e com espaço intra-capsular preservado. Túbulos renais exibindo regularidade morfológica celular (epitélio cubóide) e lúmen distinto. Observar Túbulo Contorcido Proximal (estrelas) com suas células grandes e apresentando orla em escova, formada por numerosos microvilos paralelos. Comparar com o Túbulo Contorcido Distal (cabeças de setas) (H & E – 400x).

4.9 Histomorfologia Hepática

Com exceção do grupo CRE-8 (figura 45), no qual observamos possíveis indícios de injúria tecidual, todos os outros grupos, independentemente do período experimental analisado, não apresentaram alterações histomorfológicas hepáticas (figuras 46, 47, 48 e 49).

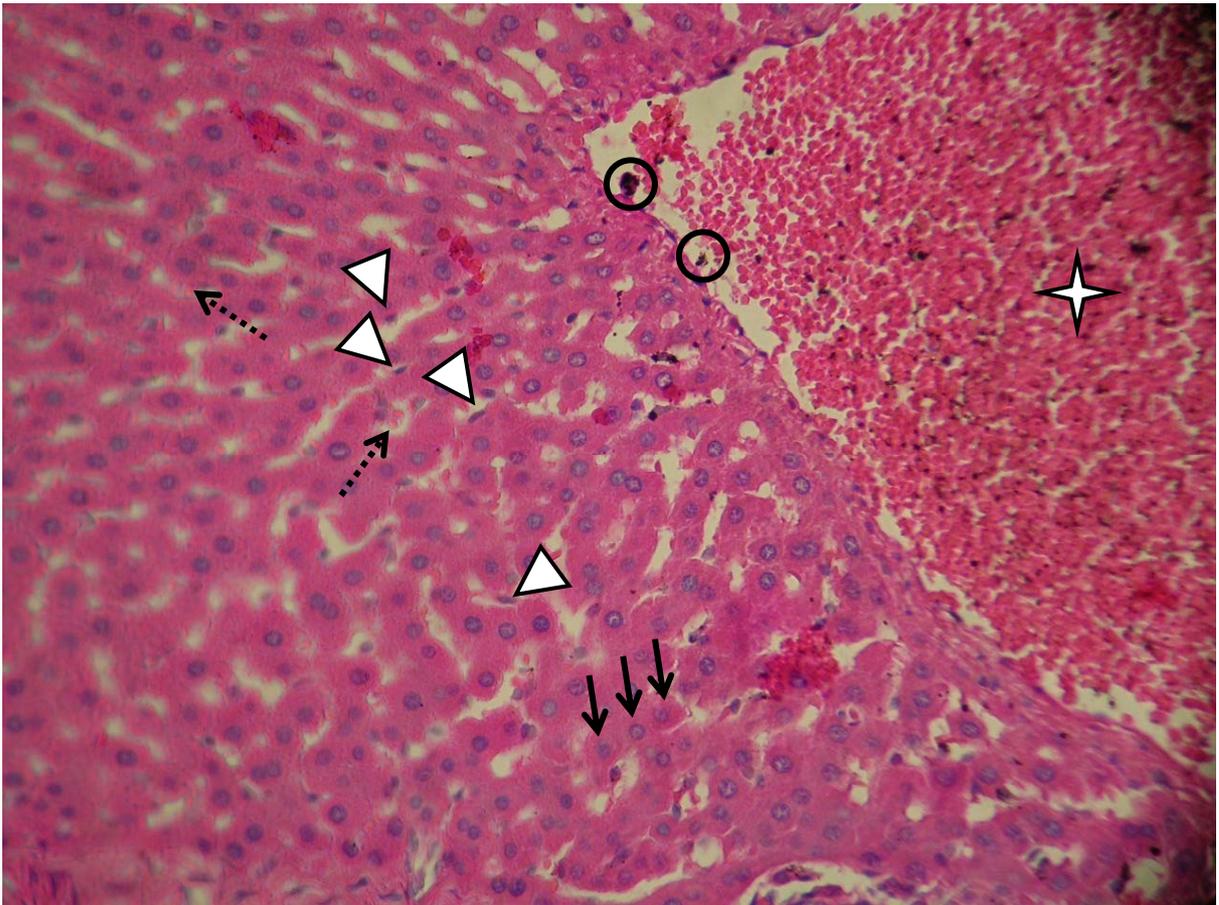


Figura 45. Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo CRE-8. Hepatócitos (setas contínuas) distribuídos em placas interconectadas radialmente a partir da veia centrolobular (estrela) congesta e com alguns polimorfonucleares em posição periférica (delimitações circulares). Hepatócitos separados por capilares sinusóides (setas tracejadas) com freqüentes células de Kupffer (cabeças de setas) e com lúmen expandido pelo incremento de eritrócitos (H & E – 400x).

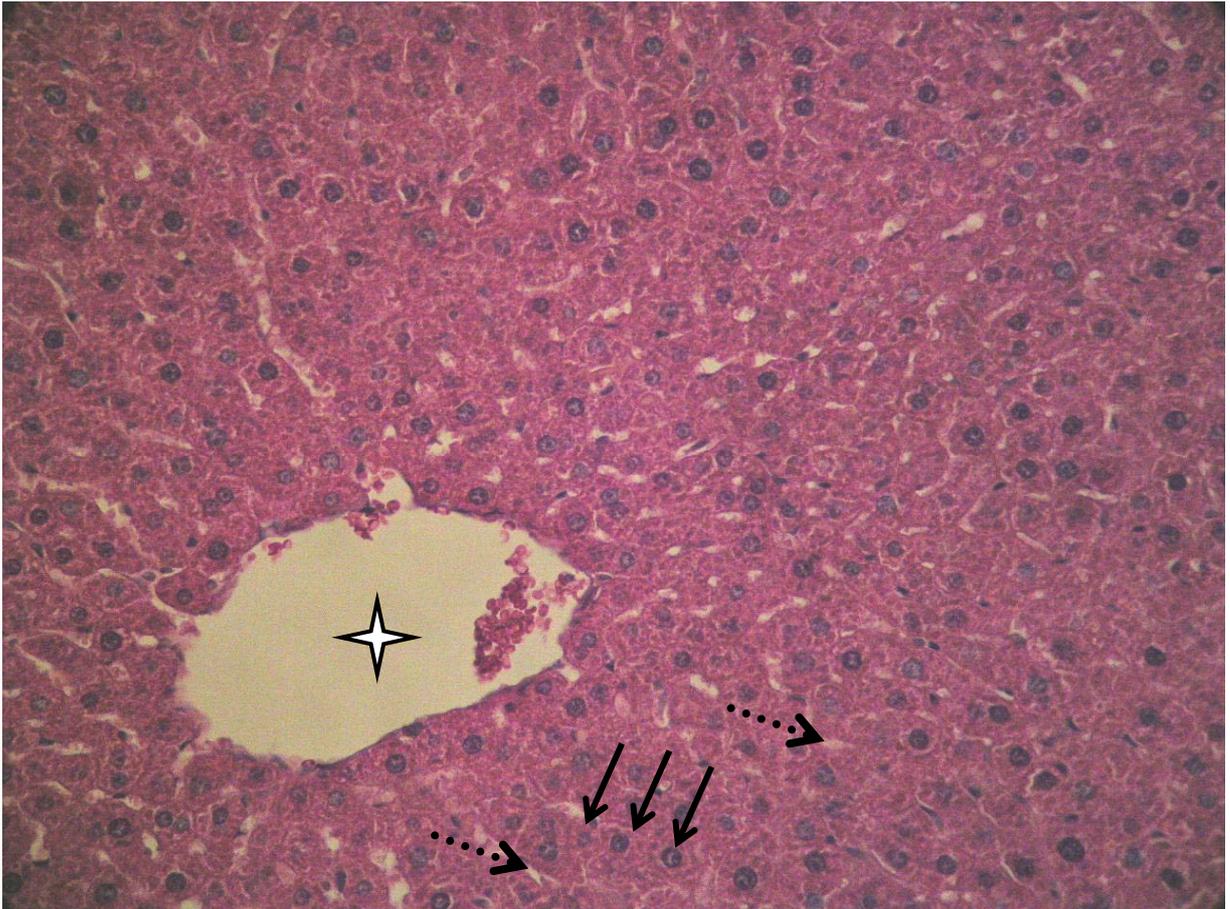


Figura 46. Fotomicrografia de tecido hepático de um rato Wistar do grupo CON. Hepatócitos (setas contínuas) distribuídos em placas interconectadas radialmente a partir da veia centrolobular (estrela) e separados por delgados capilares sinusóides (setas tracejadas). Os hepatócitos se apresentam morfologicamente regulares e contendo um núcleo esférico grande de posição central com um distinto nucléolo (H & E - Grande Aumento – 400x).

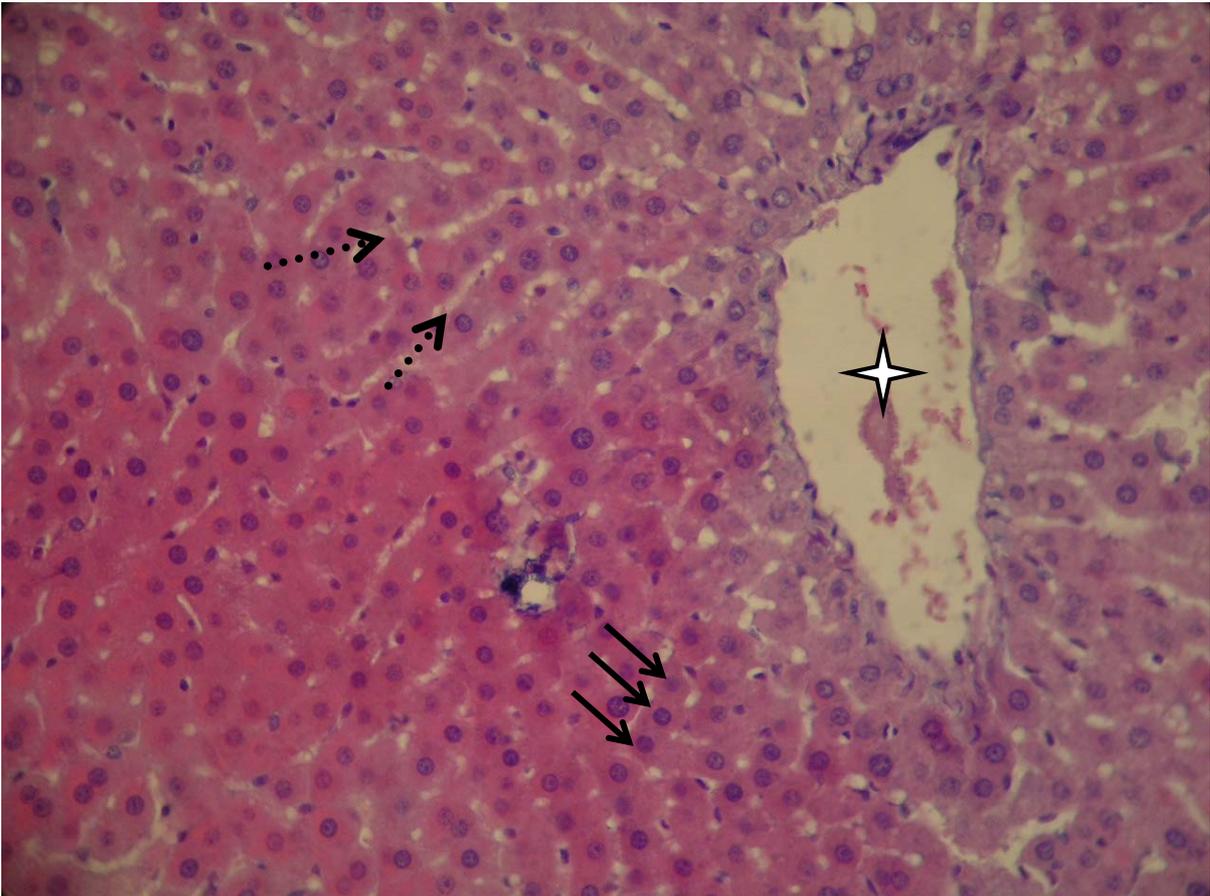


Figura 47. Fotomicrografia de tecido hepático de um rato Wistar do grupo NAT. Hepatócitos (setas contínuas) distribuídos em placas interconectadas radialmente a partir da veia centrolobular (estrela) e separados por delgados capilares sinusóides (setas tracejadas). Os hepatócitos se apresentam morfologicamente regulares e contendo um núcleo esférico grande de posição central com um distinto nucléolo (H & E – 400x).

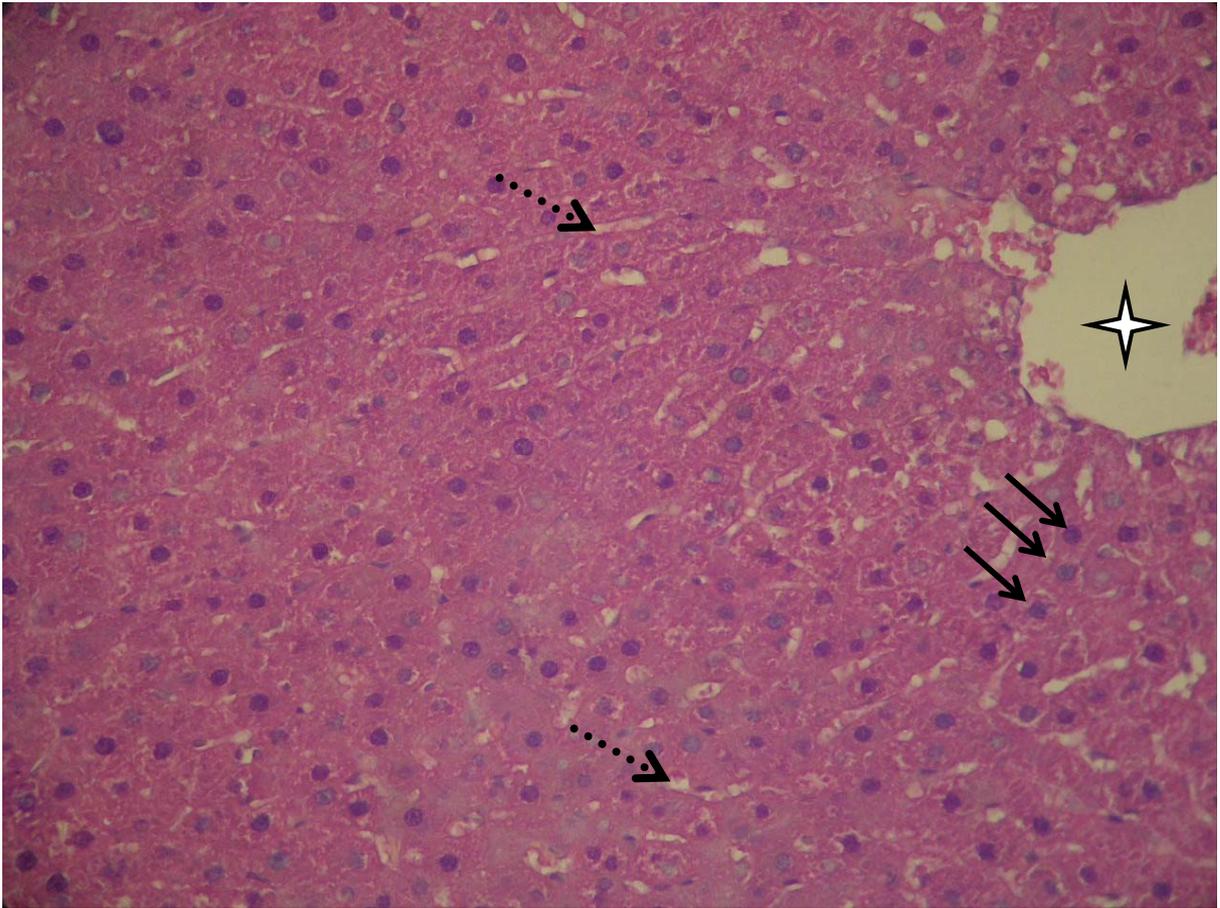


Figura 48. Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo CRE-4. Hepatócitos (setas contínua) distribuídos em placas interconectadas radialmente a partir da veia centrolobular (estrela) e separados por delgados capilares sinusóides (setas tracejadas). Os hepatócitos se apresentam morfologicamente regulares e contendo um núcleo esférico grande de posição central com um distinto nucléolo (H & E – 400x).

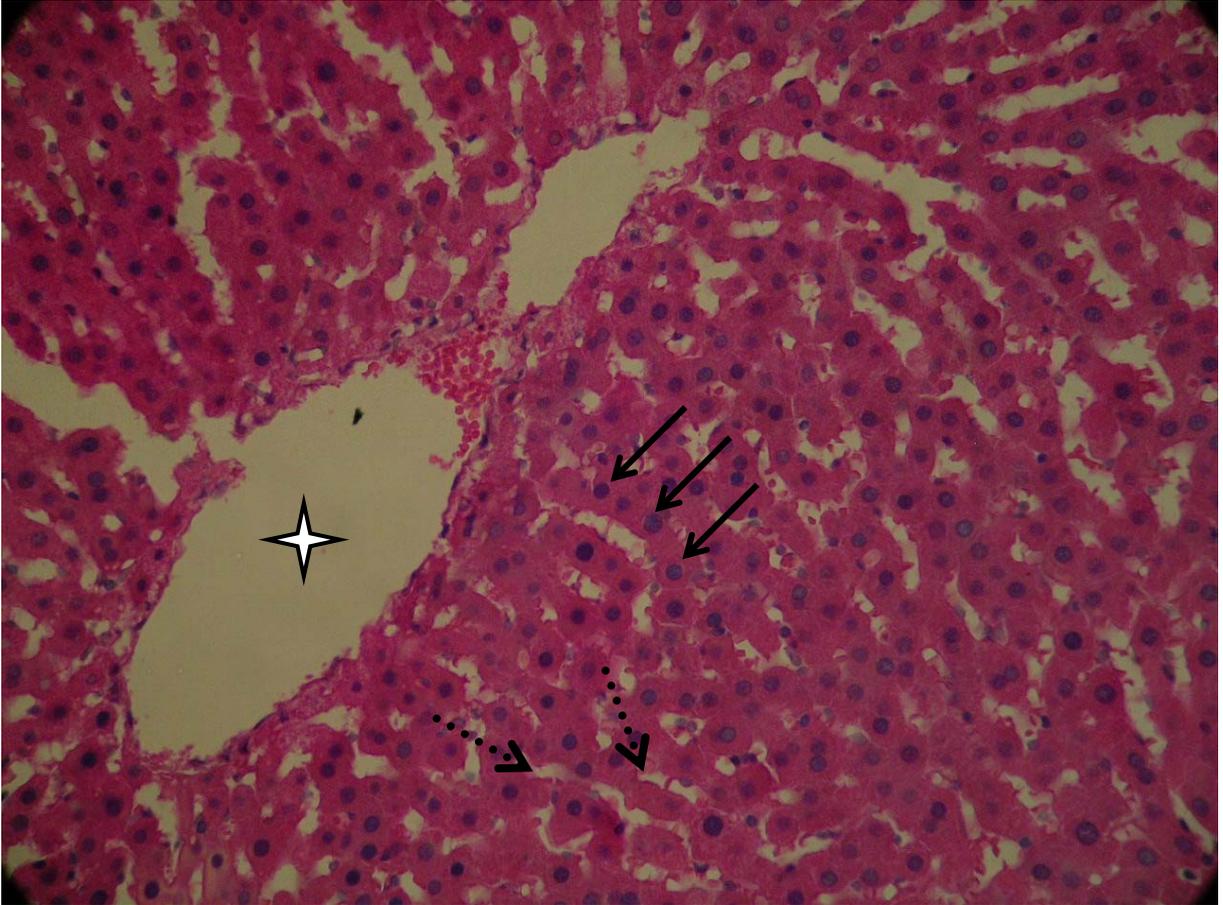


Figura 49. Fotomicrografia de tecido hepático de um rato Wistar do grupo CRE+NAT. Hepatócitos (setas contínuas) distribuídos em placas interconectadas radialmente a partir da veia centrolobular (estrela) e separados por delgados capilares sinusóides (seta tracejada). Os hepatócitos se apresentam morfologicamente regulares e contendo um núcleo esférico grande de posição central com um distinto nucléolo (H & E – 400x).

5. DISCUSSÃO

Segundo Bembem e Lamont (2005), os estudos em humanos envolvendo a suplementação de Cr são usualmente divididos em duas fases: (1) fase inicial com a suplementação de doses elevadas de Cr (20 a 30g dia) durante 5 a 7 dias (Fase de Carregamento), substituída logo em seguida, (2) pela fase de manutenção, com doses de Cr reduzidas a 1/5 da dose inicial (4 a 6g dia), durante várias semanas. No entanto, como utilizamos ratos neste estudo, e, a taxa do metabolismo basal, conversão e assimilação de compostos orgânicos é bem mais intensa nestes animais (IPSIROGLU *et al.*, 2001), houve a necessidade de extrapolação das doses de Cr para a real atividade e necessidade metabólica da população estudada. A escolha do regime adotado para a dosagem da suplementação de Cr neste estudo foi feita a partir dos trabalhos realizados em ratos de Aoki *et al.* (2004), Tarnopolky *et al.*, (2003), Ipsiroglu *et al.* (2001), Op'T Eijnde *et al.*, (2001) e Brannon *et al.* (1997). Estes autores observaram que as doses de 5g e 1g de Cr por cada quilograma de massa corporal do animal promoveram efeitos ergogênicos associados a incrementos intramusculares de Cr, equivalentes aos encontrados em humanos nas fases de carregamento e de manutenção, respectivamente.

Adotamos a natação como forma de submeter os animais à atividade física, já que Peyrebrune *et al.* (2005) e Theodorou *et al.* (2005), observaram que um percentual muito alto de atletas que praticam natação utilizam a Cr como recurso ergogênico. Além disto, este modelo de atividade física em ratos é amplamente descrito na literatura (MORIFUJI *et al.*, 2005; MARTINS-PINGE *et al.*, 2005), e apresenta poucas discussões relacionadas à suplementação de Cr (THEODOROU *et al.*, 2005; ANOMASIRI *et al.*, 2004). Poucos estudos discutem os efeitos da suplementação de Cr sobre a resistência metabólica aeróbica e, neste estudo, o interesse foi avaliar justamente este aspecto. Assim, a carga de trabalho para o

treinamento físico foi ajustada individualmente a 80% da carga máxima suportada durante o TCM. Segundo Franco (2004), Sampaio-Barros *et al.* (2003) e Viru (1994) nesta faixa de treinamento, os animais realizariam uma atividade física com predomínio metabólico aeróbico.

Como já mencionado, os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno. Esta conduta foi adotada por permitir um controle mais adequado e preciso da ingestão diária de ração e água para cada animal (GUZMÁN-SILVA *et al.*, 2004; PRUDENCIO *et al.*, 1993). Nossos resultados mostraram que o consumo diário de ração e água não foi alterado pela suplementação de Cr, ou seja, todos os animais consumiram ao longo dos períodos experimentais valores semelhantes de ração e água. No entanto, a massa corporal dos animais suplementados (CRE e CRE+NAT) apresentou valores estatisticamente superiores ao compararmos com os animais não suplementados (CON e NAT). Assim, consideramos que o ganho de massa corporal observado nos animais suplementados foi decorrente da própria suplementação, já que a ingestão de ração e água foi semelhante entre os grupos. O incremento da massa corporal poderia ser justificado pelo fato da Cr ser uma substância osmoticamente ativa e assim o aumento do conteúdo intracelular desta substância poderia induzir o fluxo de água para dentro da célula, aumentar a água intracelular e, concomitantemente a massa corporal (POWERS *et al.*, 2003; ZIEGENFUSS *et al.*, 2002). Além disso, a hidratação celular e a própria CP parecem estimular a síntese protéica ou diminuir a degradação de proteínas, possivelmente aumentando a Massa Isenta de Gordura MIG (VOLEK ; KRAEMER, 1996).

Ao analisarmos a Eficiência Alimentar, podemos perceber que a primeira semana de suplementação (Fase de Carregamento) parece ser crucial para a assimilação da Cr e responsável pelo ganho de peso dos animais suplementados, já que somente neste período foi observada diferença quanto esta análise. Este achado nos permite justificar a importância de

inicialmente suplementar a Cr com doses elevadas, como já relatado por Peyrebrune *et al.* (2005). Estes autores argumentam que para a Cr ser um ergogênico eficaz, o nível plasmático da mesma deve ser aumentado para facilitar o transporte intramuscular, e incrementar o estoque de Cr até seu limite máximo de armazenamento. Isto só é possível com a suplementação com doses elevadas do composto.

Embora o ganho de massa corporal tem sido citado em alguns estudos como um efeito adverso resultante da suplementação de Cr (BEMBEN ; LAMONT, 2005), observamos possíveis efeitos ergogênicos da suplementação de Cr. Nossos resultados mostraram que a suplementação de Cr deve ser associada à atividade física para incrementar o rendimento físico. Esta condição pôde ser observada pelo fato dos animais que praticaram a natação (NAT-8) sem a suplementação apresentarem escores superiores de tolerância de carga durante o TCM em relação aos animais suplementados e sedentários (CRE-8); este resultado pôde ser confirmado através dos animais dos grupos CRE+NAT que sempre toleraram mais carga que os animais dos outros grupos. Efeitos ergogênicos em atividades de longa duração associados à suplementação de Cr são atribuídos fundamentalmente ao fato da Cr ser um aceptor mitocondrial de ATP que incrementa a ressíntese citosólica de CP (MUJIKI ; PADILLA, 1997). Através deste mecanismo de lançadeira a capacidade muscular de refosforilação imediata de ADP e tamponamento de íons hidrogênio é incrementada, favorecendo a evolução do exercício físico (WALKER, 1979). Outros achados da literatura relevantes para a utilização da Cr em exercícios de longa duração são o aumento da atividade da CS, um marcador da capacidade aeróbica (BRANNON *et al.*, 1997), e a atenuação do incremento plasmático de amônia e hipoxantina, ambos marcadores de perda de adenina pelo músculo esquelético sem eficácia na geração de ATP durante o exercício físico prolongado (MCCONELL *et al.*, 2005; Mujika ; Padilla, 1997).

Alguns autores indicaram que a suplementação de Cr pode interferir tanto com a homeostasia glicêmica (YOUNG ; YOUNG, 2002; ROONEY *et al.*, 2002; OP'T EIJNDE *et al.*, 2001;) como com a produção de lactato (CEDDIA ; SWEENEY, 2004), parâmetros importantes durante a atividade física prolongada, sendo portanto avaliados. Observamos que após o TCM, a concentração sanguínea de glicose foi reduzida pronunciadamente nos grupos CRE+NAT, indicando que os animais deste grupo utilizaram de uma forma mais eficaz a glicose plasmática. Sherman e Wimer (1991), observaram que a proporção relativa de carboidratos oxidados durante uma sessão de exercício é criticamente afetada pelos carboidratos da dieta e pelo conteúdo inicial de glicogênio muscular. Além disto, Stanley e Connet (1991) demonstraram que a glicose sanguínea pode fornecer de 20 a 50% do substrato energético utilizado pelo músculo durante atividades físicas prolongadas.

Alguns estudos têm demonstrado que a suplementação de Cr pode influenciar a captação de glicose pelos músculos esqueléticos (CEDDIA ; SWEENEY, 2004, ROCIC *et al.*, 1995). Robinson *et al.* (1999) encontraram uma relação existente entre a concentração de glicogênio muscular e o próprio acúmulo da Cr suplementada. Entretanto, o mecanismo fisiológico que explica como a suplementação de Cr incrementa o conteúdo de glicogênio muscular, e interfere com a homeostase glicêmica permanece desconhecido. Conforme estudos *in vitro* usando ilhotas de Langerhans isoladas de ratos (ROONEY *et al.* 2002; MARCO *et al.*, 1976; ALSEVER, 1970) e células musculares incubadas (GEMPEL *et al.*, 1996) têm sugerido que a Cr aumenta a secreção de insulina. Durante o exercício físico, altas concentrações de insulina são liberadas na corrente sanguínea promovendo uma maior expressão do GLUT-4 e favorecendo a captação muscular de glicose (MACLEAN *et al.*, 2000). Foi hipotetizado que se a Cr estimula a liberação de insulina, possivelmente influenciaria a expressão do receptor GLUT-4 e facilitaria a captação intramuscular de glicose plasmática. Op't Eijnde *et al.* (2001) identificaram um incremento de 40% na expressão de

receptores GLUT-4 após a suplementação com Cr em músculos de indivíduos submetidos a um programa de reabilitação.

Com relação ao lactato, observamos novamente que após o TCM a concentração plasmática de lactato era reduzida pronunciadamente nos grupos CRE+NAT, indicando que os animais deste grupo toleravam fisicamente melhor o teste. Acredita-se que com o incremento da concentração intramuscular de Cr gerada pela suplementação, o sistema de obtenção de energia ATP-CP torna-se mais duradouro, retardando a glicólise anaeróbica e conseqüentemente a formação de ácido láctico (KREIDER, 2003; STROUD *et al.*, 1994). Foi observado que altas concentrações intramusculares de Cr e CP, atenuaram a atividade da LDH (PERSKY; BRAZEAU, 2001), reduzindo a formação de lactato. Além disto, com o incremento do sistema de fosforilação oxidativa gerado pelo treinamento, a oxidação da glicose é obtida preferencialmente pelo sistema aeróbico, o qual não gera lactato (CEDDIA ; SWEENEY, 2004). É importante ressaltar que é necessário a associação da atividade física com a suplementação de Cr para a eficácia de todos os mecanismos supracitados (BEMBEN ; LAMONT, 2005; KREIDER, 2003), o que justifica nossos achados.

Embora tenha sido demonstrado que a suplementação de Cr incrementa o desempenho físico, inclusive em atividades físicas de longa duração, a preocupação com o uso indiscriminado e não orientado da suplementação de Cr quanto possíveis efeitos colaterais não é descartada. A maioria dos estudos indica que a suplementação de Cr em humanos parece ser relativamente segura a curto prazo e a longo prazo, desde que consumida nas doses recomendadas (BIZZARINI ; DE ANGELIS, 2004; KREIDER *et al.*, 2003; SCHILLING *et al.*, 2001; MIHIC *et al.*, 2000; ROBINSON *et al.* 2000; TERJUNG *et al.*, 2000; POORTMANS ; FRANCAUX, 1999). Entretanto, dois relatos de casos de nefrotoxicidade (KOSHY *et al.*, 1999; PRITCHARD ; KAIRA, 1998), um estudo em animais hipertensos (EDMUNDS *et al.*, 2000) e até mesmo a carcinogênese associada à suplementação de Cr

(WYSS ; KADDURAH-DAOUK, 2000; YOSHIDA ; OKAMOTO, 1980), justifica a cautela com a utilização deste auxílio ergogênico.

Devido a inconsistência científica quanto aos efeitos adversos da Cr, observamos a influência da suplementação de Cr sobre tecidos metabolicamente relacionados (rim e fígado) através de dosagem bioquímica de enzimas constituintes destes tecidos e análise histomorfológica. Após a primeira semana de estudo observamos diferenças somente nas concentrações séricas das enzimas AST, LDH e CQ, as quais estavam significativamente aumentadas nos grupos que praticavam a natação (NAT-1 e CRE+NAT-1). É estabelecido que o exercício físico de longa duração e intensidade pode gerar dano muscular (HOWATSON et al., 2005; PEAKE et al., 2005), e elevação plasmática das enzimas AST, LDH e CQ podem indicar lesão muscular (UCHIYAMA *et al.*, 2006; JAMURTAS *et al.*, 2005; VAN DER MEULEN et al., 1991). Como foi verificado que somente os grupos que realizavam a natação apresentaram elevação destas enzimas, consideramos a própria atividade física responsável pelo fenômeno. Contudo, após a quarta semana experimental somente o grupo NAT-4 continuou apresentando valores enzimáticos significativamente superiores de LDH e CQ. O fato da concentração enzimática de AST não diferir após 4 semanas pode ser justificado por sua localização citoplasmática e mitocondrial (GAYOTTO ; ALVES, 2001). Como a atividade física promoveu um dano agudo, que gera recuperação gradual por ativação de células satélites (DARR ; SCHULTZ, 1987), somente o conteúdo citoplasmático desta enzima deve ter sido extravasado para o plasma. Para Gayotto e Alves (2001) esta resposta de AST é característica de dano agudo com evolução para o restabelecimento de integridade tecidual. Dangot *et al.* (1999) observaram incremento da ativação de células satélites musculares após a suplementação de Cr e este achado poderia justificar o porque da não resposta similar nos animais do grupo CRE+NAT-4, já que a ativação destas células contribui com o processo de regeneração do tecido muscular esquelético (DARR ; SCHULTZ, 1987).

Ao analisarmos a função renal através das concentrações plasmáticas de uréia e creatinina observamos que somente o grupo CRE-4 e CRE-8 apresentaram valores estatisticamente superiores em relação os demais grupos, ao final da quarta e oitava semanas respectivamente. Estes resultados associados aos achados histomorfológicos renais dos animais dos grupos CRE-4 e CRE-8, que revelaram especialmente na zona cortical a presença de corpúsculos renais indefinidos de difícil delimitação, capilares congestos e espaços intra-capsular e tubular não preservados, indicam dano tecidual.

A literatura indica a disfunção renal em decorrência da suplementação oral de Cr é somente observada em populações que apresentaram com prévia alteração funcional deste sistema (EDMUNDS *et al.*, 2000; PRITCHARD ; KAIRA, 1998) e que parece não aumentar o estresse renal em indivíduos saudáveis e fisicamente ativos (GROENEVELD *et al.*, 2005; PLINE ; SMITH, 2005; POORTMANS *et al.*, 2005; TAES *et al.* 2003). Realmente, os animais que realizaram o nado concomitantemente a suplementação de Cr (CRE+NAT) tiveram valores plasmáticos das enzimas renais e achados histomorfológicos semelhantes aos animais do grupo CON. Se analisarmos as vias metabólicas de síntese endógena de Cr, podemos observar que a arginina, um dos aminoácidos precursores desta síntese, também serve como precursor para produção de uréia. A suplementação poderia fornecer uma fonte adicional de arginina e incrementar a produção de uréia (DESHMUKH *et al.*, 1991). No entanto, a própria suplementação de Cr pode suprimir significativamente a síntese de Cr (WALKER, 1979), o que contrabalançaria e impediria qualquer elevação na produção de uréia pela suplementação (ÖÖPIK *et al.*, 1996). A elevação da concentração plasmática de creatinina observada nos grupos CRE-4 e CRE-8 poderia ser decorrente da própria suplementação de Cr, como relatado por Poortmans *et al.* (1997) e gerar um falso-positivo de nefrotoxicidade (YOSHIZUMI ; TSOUROUNIS, 2004). No entanto, estudo recente não indica elevação de creatinina após a suplementação de Cr (POORTMANS *et al.*, 2005).

Greenhaff (1997), observou que a captação muscular de Cr é saturada após a Fase de Carregamento, caso a necessidade intramuscular não seja incrementada com a atividade física. Com isso, a elevação de Cr extracelular induz a expressão de uma proteína que funcionalmente inativa os transportadores de Cr (GUERRERO-ONTIVEROS ; WALLIMANN, 1998). Como resultado, a maior parte da creatina absorvida é excretada integralmente na urina (MAGANARIS ; MAUGHAN, 1998). Desta forma, acreditamos que os animais sedentários alcançaram sua capacidade máxima de armazenamento intramuscular de Cr, e esta, foi eliminada em doses elevadas pelos rins sem ser convertida em creatinina. Estes aspectos supracitados justificaram o fato da elevação de uréia e creatinina acontecer somente nos grupos suplementados e sedentários, não sendo portanto decorrente da suplementação e sim de fatores ligados a agressão renal, resultado evidenciado pelo aspecto histomorfológico.

Ao analisarmos a função hepática através das concentrações plasmáticas de ALT, AST, GGT e fosfatase alcalina, observamos que somente o grupo CRE-8 apresentou valores estatisticamente superiores em relação os demais grupos, indicando possível agressão tecidual. Estes resultados foram confirmados através dos achados histomorfológicos hepáticos dos animais do grupo CRE-8, que revelaram VCL congesta e com presença de polimorfonucleares em região periférica deste vaso, hepatócitos separados por capilares sinusóides com freqüentes células de Kupffer e com lúmen expandido pelo incremento de células sanguíneas.

A literatura indica que a suplementação oral de Cr parece não aumentar o estresse hepático em indivíduos saudáveis e fisicamente ativos (KREIDER *et al.*, 2003; MAYHEW *et al.*, 2002; ROBINSON *et al.* 2000; WALDRON *et al.* 2002). Novamente, os animais que realizavam o nado concomitantemente a suplementação de Cr (CRE+NAT) tiveram valores plasmáticos de enzimas hepáticas e achados histomorfológicos semelhantes aos animais do

grupo CON. Tarnopolsky *et al.* (2003), a partir de observações histológicas de fígados de ratos e camundongos indicaram que a suplementação de Cr a longo prazo poderia induzir, por um mecanismo desconhecido, hepatotoxicidade. O mecanismo exato de como a Cr pode gerar dano tecidual ainda é desconhecido, mas as pesquisas apontam para a possibilidade de conversão química da Cr em formoldeído, um agente tecidualmente agressor (YU ; DENG, 2000). Poortmans *et al.* (2005), observaram incremento de compostos citotóxicos, como o formoldeído, em amostras urinárias após a suplementação de Cr. Neste sentido, o acúmulo de Cr em tecidos metabolicamente pouco capazes de converter a Cr em creatinina e enzimaticamente capazes de realizarem os processos de metilação, como os rins e fígado, poderia favorecer o aparecimento de citotóxicos, devido ao acúmulo do substrato Cr (CLAYTON *et al.*, 2004). Como já mencionado, a suplementação de Cr a longo prazo estimula mecanismo de regulação lenta (*down regulation*) principalmente dos receptores musculares de Cr impedindo a captação adicional deste nutriente (GUERRERO-ONTIVEROS; WALLIMANN, 1998). Desta forma, a suplementação a longo prazo incrementa enormemente as concentrações deste composto em tecidos que apresentam valores basais muito baixos de Cr celular, como os rins e o fígado (IPSIROGLU *et al.*, 2001), favorecendo a possível conversão em compostos citotóxicos. Se a Cr suplementada for constantemente utilizada como fonte de energia muscular adicional, principalmente através da atividade física, o seu acúmulo em outros tecidos poderia ser minimizado e desfavorecendo sua toxicidade. Assim, justificamos e consideramos que a suplementação de Cr, se utilizada como recurso ergogênico, deve ser sempre associada à atividade física evitando possíveis efeitos colaterais. No entanto, estudos futuros são evidentemente necessários para melhor elucidar a interação da Cr suplementada a longo prazo, em tecidos metabolicamente relacionados como os rins e fígado, bem como suas conseqüências para a saúde, especialmente em populações sedentárias e que usufruam do composto.

6. CONCLUSÕES

Desta forma, este estudo nos permite concluir que:

(1) A suplementação de Cr a curto prazo e a longo prazo, se associada a atividade física, ocasiona:

- Incremento de tolerância à carga durante o Teste de Carga Máxima;
- Redução das concentrações de sanguíneas de glicose após o Teste de Carga Máxima;
- Retardo do acúmulo de lactato sanguíneo após o Teste de Carga Máxima;
- Manutenção da integridade funcional renal e hepática.

(2) A suplementação de Cr a longo prazo, se não associada a atividade física, promove:

- Prejuízo da função renal (após quatro semanas de suplementação);
- Prejuízo da função hepática (após oito semanas de suplementação).

(3) A suplementação de Cr promove aumento de massa corporal.

Referências

AHRENDT, D.M. Ergogenic aids: counseling the athlete. **Am. Fam. Physician.** v. 63, n. 5, p. 842-843, 2001.

ALSEVER, R.N.; GEORG, R.H.; SUSSMAN, K.E. Stimulation of insulin secretion by guanidinoacetic acid and other guanidine derivatives. **Endocrinology.** v. 86, n. 2, p. 332-336, 1970.

ANDRES, R.H.; DUCRAY, A.D.; PEREZ-BOUZA, A.; SCHLATTNER, U.; HUBER, A.W.; KREBS, S.H.; SEILER, R.W.; WALLIMANN, T.; WIDMER, H.R. Creatine supplementation improves dopaminergic cell survival and protects against MPP⁺ toxicity in an organotypic tissue culture system. **Cell Transplant.** v.14, n.8, p. 537-550, 2005.

ANDREWS, R.; GREENHAFF, P.; CURTIS, S.; PERRY, A.; COWLEY, A.J. The effect of dietary creatine supplementation on skeletal muscle metabolism in congestive heart failure. **European Heart Journal.** v. 19, n. 4, p. 617-622, 1998.

ANOMASIRI, W.; SANGUANRUNGSIRIKUL, S.; SAICHANDEE, P. Low dose creatine supplementation enhances sprint phase of 400 meters swimming performance. **J. Med. Assoc. Thai.** v. 87, n. 2, p. 228-232, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA apresenta proposta de regulamento para venda de nutrientes isolados. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/nutrientes.htm> Acesso em: 19 nov. 2005.

AOKI, M.S.; LIMA, W.P.; MIYABARA, E.H.; GOUVEIA, C.H.; MORISCOT, A.S. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. **Clin. Nutr.** v. 23, n. 5, p. 1176-83, 2004.

APARELHO URINÁRIO. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004a. p. 371-387.

BALABAN, R. S. Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. **American Journal of Physiology.** v. 258, n. 3, p. 377-389, 1990.

BALSOM, P.; SODERLUND, K.; EKBLÖM, B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. **Sports Medicine.** v. 18, n. 4, p. 268-280, 1994.

BAKER, M.A.; HORVATH, S.M. Influence of water temperature on oxygen uptake by swimming rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 19, n. 6, p. 1215-1218, 1964.

BARBOSA, A.M.; do AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S. COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**. v. 42, n. 5, p. 515-523, 2003.

BEMBEN, M.G.; LAMONT, H.S. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. **Sports Med**. v. 35, n. 2, p. 107-125, 2005.

BENDER, A.; AUER, D.P.; MERL, T.; REILMANN, R.; SAEMANN, P.; YASSOURIDIS, A.; BENDER, J.; WEINDL, A.; DOSE, M.; GASSER, T.; KLOPSTOCK, T. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. **J. Neurol**. v. 252, n. 1, p. 36-41, 2005.

BENDERMACHER, B.L.; WILLIGENDAEL, E.M.; TEIJINK, J.A.; PRINS, M.H. Medical management of peripheral arterial disease. **J. Thromb. Haemost**. v. 3, n. 8, p. 1628-1637, 2005.

BIZZARINI, E.; DE ANGELIS, L. Is the use of oral creatine supplementation safe? **J. Sports Med. Phys. Fitness**. v. 44, n. 4, p. 411-416, 2004.

BLEI, M.L.; CONLEY, K.E.; KUSHMERICK, M.J. Separate measures of ATP utilization and recovery in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**. v. 475, n. 3, p. 203-222, 1993.

BOGDANIS, G.C.; NEVILL, N.E.; BOOBIS, L.H; LAKOMY, H.K.; NEVILL, A.M. Recovery of power output and muscle metabolites following 30 s of maximal sprint cycling in man. **Journal of Physiology**. v. 482, n. 2, p. 467-480, 1995.

BRANNON, T.A.; ADAMS, G.R.; GONNIFF, C.L.; BALDWIN, K.M. Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 29, n. 4, p. 489-495, 1997.

BRZOSKA, M.M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J.; PILAT-MARCINKIEWICZ; SAWICKI, B. Liver and kidney Function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. **Alcohol & Alcoholism**. v. 38, n. 1, p. 2-10, 2003.

CARDOSO, C.V.P. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3> Acesso em: 24 jul. 2004.

CASEY, A.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; HOWELL, E.; GREENHAFF, P.L. Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. **American Journal of Physiology**. v. 271, n. 1, p. 31-37, 1996.

CASEY, A.; GREENHAFF, P.L. Does dietary creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance? **Am. J. Clin. Nutr.** v. 72, n. 2, p. 607-617, 2000.

CEDDIA, R.B.; SWEENEY, G. Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. **J. Physiol.** v. 555, n. 2, p. 409-421, 2004.

CLARK, H.R.; BARKER, M.E.; CORFE, B.M. Nutritional strategies of mountain marathon competitors – an observational study. **Int. J. Sports Exerc. Metab.** v. 15, n. 2, p. 160-172, 2005.

CLAYTON, T.A.; LINDON, J.C.; EVERETT, J.R.; CHARUEL, C.; HANTON, G. LE NET, J.L.; PROVOST, J.P.; NICHOLSON, J.K. Hepatoxin-induced hypercreatinemia and hypercreatinuria: their relationship to one another, to liver damage and to weakened nutritional status. **Arch. Toxicol.** v. 78, n. 2, p. 86-96, 2004.

DANGOTT, B.; SCHULTZ, E.; MOZDZIAK, P.E. Dietary Creatine Monohydrate Supplementation Increases Satellite cell Mitotic Activity During Compensatory Hypertrophy. **Int. J. Sports Med.** v. 21, n. 1, p. 13-16, 2000.

DARR, K.C.; SCHULTZ, E. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal-muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 63, n. 5, p. 1816-1834, 1987.

DESHMUKH, D.R.; MEERT, K.; SARNAIK, A.P.; MARESCAU, B.; DE DEYN, P.P. Guanidino compound metabolism in arginine-free diet induced hyperammonemia. **Enzyme.** v. 45, n. 3, p. 128-136, 1991.

EDMUNDS, J.W.; JAYAPALAN, S.; DIMARCO, N.M.; SABOORIAN, M.H.; AUKEMA, H.M. Creatine supplementation increases renal disease progression in Han:SPRD-cy rats. **Am. J. Kidney Dis.** v. 37, n. 1, p. 73-78, 2001.

EKBLOM, B. Effects of creatine supplementation on performance. **American Journal of Sports Medicine.** v. 24, p. 38-39, 1996.

ELLENDER, L.; LINDER, M.M. Sports pharmacology and ergogenic aids. **Prim. Care.** v. 32, n. 1, p. 277-292, 2005.

ENGELHARDT, M.; NEUMANN, G.; BERBALK, A.; REUTER, I. Creatine supplementation in endurance sports. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v. 30, n. 7, p. 1123-1129, 1998.

ESTRUTURA E FUNCAO DO FIGADO E DAS VIAS BILIARES. In: GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001a. p. 03-41.

FOGELHOLM, M.; SARIS, W.H.M. Making weight for sports participation. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 155, n. 3, p. 387-395, 1998.

FOUILLOT, J.P. Doping and dietary supplements. **Bull Acad. Natl. Med.** v. 188, n. 6, p. 933-942, 2004.

FRANCO, A.D. **Avaliação dos níveis plasmáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e da atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos de ratos Wistar submetidos a diferentes intensidades relativas do treinamento com natação**. 2004. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.

GEMPEL, K.; BRDICZKA, D.; KADDURAH-DAOUK, R. WALLIMANN, T. KAUFHOLD, P.; GERBITZ, K.D. The creatine analogue cyclocreatine increases insulin secretion in INS-1 cells via a K⁺ channel independent mechanism. **Diabetologia**. v. 39, n. 1, p. 31-37, 1996.

GREEN, A.L.; SIMPSON, E.J.; LITTLEWOOD, J.J.; MACDONALD, I.A.; GREENHAFF P.L. Carbohydrate ingestion augments creatine retention during creatine feeding in humans. **Acta. Physiol. Scand.** v. 158, n. 2, p. 195-202, 1996.

GREENHAFF, P.L. The nutritional biochemistry of creatine. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 11, p. 610-618, 1997.

GROENEVELD, G.J.; BEIJER, C.; VELDINK, J.H.; KALMIJN, S.; WOKKE, J.H.; VAN DEN BERG, L.H. Few adverse effects of long-term creatine supplementation in a placebo-controlled trial. **Int J Sports Med**. v. 26, n. 4, p. 307-313, 2005.

GUERRERO-ONTIVEROS, M.L.; WALLIMANN, T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: Down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 184, n.1-2, p. 427-437, 1998.

GUIMBAL, C.; KILIMANN, M.W. A Na⁺-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart, and kidney: cDNA cloning and functional expression. **J. Biol. Chem.** v. 268, n. 12, p. 8418-8421, 1993.

GUZMÁN-SILVA, M.A.; WANDERLEY, A.R.; MACÊDO, V.M.; BOAVENTURA, G.T. Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. **Rev. Nutr.** v. 17, n. 1, p. 59-69, 2004.

HARRIS, R.C.; SODERLUND, K.; HULTMAN, E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. **Clin. Sci.** v. 83, n. 3, p. 367-374, 1992.

HAVENETIDIS, K.; BOURDAS, D. Creatine supplementation: effects on urinary excretion and aerobic performance. **J Sports Med Phys Fitness.** v. 43, n.3, p. 347-355, 2003.

HOWATSON, G.; GAZE, D.; VAN SOMEREN, K.A. The efficacy of ice massage in the treatment of exercise-induced muscle damage. **Scand J Med Sci Sports.** v. 15, n. 6, p. 416-22, 2005.

IPSIROGLU, S.O.; STROMBERGER, C.; ILAS, J.; HÔGER, H.; MÛHL, A.; IPSIROGLU-STOCKLER, S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. **Life Science.** v. 69, n. 15, p. 1805-1815, 2001.

IRVING, R.A.; NOAKES, T.D.; BURGER, S.C.; MYBURGH, K.H.; QUERIDO, D.; VAN ZYL-SMIT, R. Plasma volume and renal function during and after running. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v. 22, n. 5, p. 581-587, 1990.

JAMURTAS, A.Z.; THEOCHARIS, V.; TOFAS, T.; TSIOKANOS, A.; YFANTI, C.; PASCHALIS, V.; KOUTEDAKIS, Y.; NOSAKA, K. Comparison between leg and arm eccentric exercises of the same relative intensity on indices of muscle damage. **Eur J Appl Physiol.** v. 95, n. 2-3, p. 179-85, 2005.

JEONG, K.S.; PARK, S.J.; LEE, C.S.; KIM, T.W.; KIM, S.H.; RYU, S.Y.; WILLIAMS, B.H.; VEECH, R.L.; LEE, Y.S. Effects of cyclocreatine in rat hepatocarcinogenesis model. **Anticancer Res.** v. 20, n. 3, p. 627-1633, 2000.

KAMBER, M.; KOSTER, M.; KREIS, R.; WALKER, G.; BOESCH, C.; HOPPELER, H. Creatine supplementation - part I: Performance, clinical chemistry, and muscle volume. **Med Sci Sports Exerc.** v. 31, n. 12, p. 1763-1769, 1999.

KARLSSON, J.; UNGELL, A.; GRASJO, J.; ARTURSSON, P.) Paracellular drug transport across intestinal epithelia: Influence of charge and induced water flux. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 9, n. 1, p. 47-56, 1999.

KOSHY, K.M.; GRISWOLD, E.; SCHNEEBERGER, E.E. Interstitial nephritis in a patient taking creatine. **N Engl J Med.** v. 340, n. 10, p. 814–815, 1999.

KREIDER, R.B. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. **Mol. Cell Biochem.** v. 244, n.1-2, p. 89-94, 2003.

KREIDER, R.B.; MELTON, C.; RASMUSSEN, C.J.; GREENWOOD, M.; LANCASTER, S.; CANTLER, E.C.; MILNOR, P.; ALMADA, A.L. Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes. **Mol Cell Biochem.** v. 244, n. 1-2, p. 95–104, 2003.

KUSHMERICK, M.J.; MOERLAND, T.S.; WISEMAN, R.W. Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 89, n. 16, p. 7521–7525, 1992.

LAMONTE, M.J.; BLAIR, S.N.; CHURCH, T.S. Physical activity and diabetes prevention. **J. Appl. Physiol.** v. 99, n. 3, p. 1205-1213, 2005.

LOMBARDO, J.A. Supplements and athletes. **South Med. J.** v. 97, n. 9, p. 877-879, 2004.

MACCONELL, G.K.; SHINEWELL, J.; STEPHENS, T.J.; STATHIS, C.G.; CANNY, B.J.; SNOW, R.J. Creatine supplementation reduces inosine monophosphate during endurance exercise in humans. **Med Sci Sports Exerc.** v. 37, n. 12, p. 2054-2061, 2005.

MACLEAN, P.S.; ZHENG, D.; DOHM, G.L. Muscle glucose transporter (GLUT 4) gene expression during exercise. **Exerc Sport Sci Rev.** v. 28, n. 4, p. 148-152, 2000.

MAGANARIS, C.N.; MAUGHAN, R.J. Creatine supplementation enhances maximum voluntary isometric force and endurance capacity in resistance trained men. **Acta Physiologica Scandinavica.** v. 163, n. 3, p. 279-287, 1998.

MARCO, J.; CALLE, C.; HEDO, J.A.; VILLANUEVA, M.L. Glucagon-releasing activity of guanidine compounds in mouse pancreatic islets. **FEBS Lett.** v. 64, n. 1, p. 52-54, 1976.

MARTINS-PINGE, M.C.; BECKER, L.K.; GARCIA, M.R.; ZOCCAL, D.B.; NETO, R.V.; BASSO, L.S.; DE SOUZA, H.C.; LOPES, O.U. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Auton Neurosci.** v. 122, n. 1-2, p. 21-28, 2005.

MAYHEW, D.L.; MAYHEW, J.L.; WARE, J.S. effects of long-term creatine supplementation on liver and kidney functions in American college football players. **Int. J. Sports Nutr. Exerc. Metab.** v. 12, n. 4, p. 453-460, 2002.

MEYER, R.A.; BROWN, T.R.; KUSHMERICK, M.J. Phosphorus nuclear magnetic resonance of fast- and slow-twitch muscle. **Am J Physiol.** v. 248, n. 3, p. 279–287, 1985.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS: PROVAS DE FUNCAO HEPÁTICA. In: GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares.** São Paulo: Editora Atheneu, 2001b. p.139-150.

MIHIC, S.; MACDONALD, J.R.; MCKENZIE, S.; TARNOPOLSKY, M.A. Acute creatine loading increases fat-free mass, but does not affect blood pressure, plasma creatinine, or CK activity in men and women. **Med Sci Sports Exerc.** v. 32, n. 2, p. 291–296, 2000.

MILLMAN R.B.; ROSS, E.J. Steroid and nutritional supplement use in professional athletes. **Am. J. Addict.** v. 12, n. 2, p. 48-54, 2003.

MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; FILHO, N.P.; FROTA, A. R.; ELY, P. B.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 18, n. 3, p. 232- 237, 2003.

MORALES-GONZALES, J.A.; GUTIERRES-SALINAS, J.; YANEZ, L.; VILLAGOMEZ-RICO, C.; BADILLO-ROMERO, J.; HERNANDEZ-MUNOZ, R. Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration: role of route and timing of administration. **Dig. Dis. Sci.** v. 44, n. 10, p. 1963-1974, 1999.

MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. **Nutrition.** v. 21, n. 10, p. 1052-1058. 2005.

MUJKA, I.; PADILLA, S. creatine supplementation as na ergogenic aid for sports performance in highly trained athletes: a critical review. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v. 38, p. 1435-1441, 1997.

NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S.; SATO, Y.; JI, L.L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **J. Appl. Physiol.** v. 88, n. 2, p. 649-654, 2000.

O FÍGADO COMO ÓRGÃO. In: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997b. p. 799-802.

ODOOM, J.E.; KEMP, G.J.; RADDA, G.K. The regulation of total creatine content in a myoblast cell line. **Mol Cell Biochem.** v. 158, n. 2, p.179–188, 1996.

ÖÖPIK, V.; TIMPMANN, S.; MEDIJAINEM, L.; ALEKSEJEVA, T. 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.; RICHTER, E.A.; HENQUIN, J.C.; KIENS, B.; HESPEL, P. Effect of creatine supplementation on creatine and glycogen content in rat skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.** v. 171, p. 169-176, 2001.

ÓRGÃOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTIVO. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004b. p. 324-334.

OS RINS E OS LÍQUIDOS CORPORAIS. In: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997a. p. 275-384.

OSORIO, R.A.; SILVEIRA, V.L.; MALDJIAN, S.; MORALES, A.; CHRISTOFANI, J.S.; RUSSO, A.K.; SILVA, A.C.; PICARRO, I.C. Swimming of pregnant rats at different water temperatures. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.** v. 135, n. 4, p. 605-611, 2003a.

OSORIO, R.A.; CHRISTOFANI, J.S.; D'ALMEIDA, V.; RUSSO, A.K.; PICARRO, I.C. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** v. 135, n. 1, p. 89-95, 2003b.

PEAKE, J.; NOSAKA, K.; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exerc. Immunol. Rev.** v. 11, p. 64-85, 2005.

PERSKY, A.M.; BRAZEAU, G.A. Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate. **Pharmacol. Rev.** v. 53, n. 2, p. 161-176, 2001.

PEYREBRUNE, M.C.; NEVILL, M.E.; DONALDSON, F.J.; COSFORD, D.J. The effects of oral creatine supplementation on performance in single and repeated sprint swimming. **Journal of Sports Science.** v. 16, n. 3, p. 271-279, 1998.

PEYREBRUNE, M.C.; STOKES, K.; HALL, G.M.; NEVILL, M.E. Effect of creatine supplementation on training for competition in elite swimmers. **Med Sci Sports Exe.** v. 37, n. 12, p. 2140-2147, 2005.

PLINE, K.A.; SMITH, C.L. The effect of creatine intake on renal function. **Ann Pharmacother.** v. 39, n.6, p. 1093-1096, 2005.

POORTMANS, J.R.; AUQUIER, H.; RENAUT, V.; DURUSSEL, A. SAUGY, M.; BRISSON, G.R. Effect of short-term creatine supplementation on renal responses in men. **European Journal of Applied Physiology**. v 76, n. 6, p. 566-567, 1997.

POORTMANS, J.R.; FRANCAUX, M. Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. **Med Sci Sports Exerc**. v 31, n. 8. p. 1108–1110, 1999.

POORTMANS, J.R.; KUMPS, A.; DUEZ, P.; FOFONKA, A.; CARPENTIER, A.; FRANCAUX, M. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. **Med Sci Sports Exerc**. v. 37, n. 10, p. 1717-1720, 2005.

POOTEIGER, J.A.; CARPER, M.J.; RANDALL, J.C.; MAGEE, L.J.; JACOBSEN, D.J.; HULVER, M.W. Changes in Lower Leg Anterior compartment Pressure before, during, and after creatine supplementation. **Journal of Athletic Training**. v. 37, n. 2, p. 157-163, 2002.

POWERS, M.E.; ARNOLD, B.L.; WELMANT, A.L.; PERRIN, D.H.; MISTRY, D.; KAHLER, D.M.; KRAEMER, W.; VOLEK, J. Creatine supplementation increases total body water without altering fluid distribution. **Journal of Athletic Training**. v. 38, n. 1, p. 44-50, 2003.

PRITCHARD, N.R.; KAIRA, P.A. Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. **Lancet**. v. 352, n. 9111, p. 1252-1253, 1998.

PRUDENCIO, R.M.C.; VARELA-MOREIRAS, G.; RUIZ-ROSO, C.M.B. The effects of the chronic administration of acetylsalicylic acid and acetaminophen on feeding efficiency in rats. **Nutr. Hosp**. v. 8, n. 6, p. 372-377, 1993.

QIN, W.; KHUCHUA, Z.; CHENG, J.; BOERO, J.; PAYNE, R.M.; STRAUSS, A.W. Molecular characterization of the creatine kinases and some historical perspectives. **Mol Cell Biochem**. v. 184, n. 1-2, p. 153-67, 1998.

RADDA, G.K. Control of energy metabolism during muscle metabolism. **Diabetes**. v. 45, n. 1, p. 88-92, 1996.

ROBINSON, T.M.; SEWELL, D.A.; HULTMAN, E.; GREENHAFF, P.L. Role of submaximal exercise in promoting creatine and glycogen accumulation in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol**. v. 87, n. 2, p. 518-522, 1999.

ROBINSON, T.M.; SEWELL, D.A.; CASEY, A.; STEENGE, G.; GREENHAFF, P.L. Dietary creatine supplementation does not affect some haematological indices, or indices of muscle damage and hepatic and renal function. **Br. J. Sports Med**. v. 34, p. 284-288, 2000.

ROCIC, B.; VUCIC, M.; MESIC, R.; ROCIC, P.; COCE, F. Hypoglycemic effect of creatine in insulin dependent diabetic patients. **Diabetologia Croatia**. v. 24, n. 1, p. 117-120, 1995.

ROGATTO, G.P.; OLIVEIRA, C.A.M.; SANTOS, J.W.; MANCHADO, F.B.; NAKAMURA, F.Y.; MORAES, C.; ZAGATTO, A.M.; FARIA, M.C.; AFONSO, M.; MELLO, M.A.R. Influência da ingestão de espirulina sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esporte**. v. 10, n. 4, p. 258-263, 2004.

ROONEY, K.; BRYSON, J.; PHUYAL, J.; DENYER, G.; CATERSON, I.; THOMPSON, C. Creatine supplementation alters insulin secretion and glucose homeostasis in vivo. **Metabolism**. v. 51, n. 4, p. 518-522, 2002.

ROSSITER, H.B.; CANNELL, E.R.; JAKMAN, P.M. The effect of oral creatine supplementation on the 1000-m performance of competitive rowers. **Journal of Sports Science**. v. 14, n. 2, p. 175-179, 1996.

SAHLIN, K. Metabolic changes limiting muscle performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 28, n. 3, p. 323-343, 1998.

SCHIMMEL, L.; KHANDEKAR, V.S.; MARTIN, K.J.; RIERA, T.; HONAN, C.; SHAW, D.G.; KADDURAH-DAOUK, R. The synthetic phosphagen cyclocreatine phosphate inhibits the growth of a broad spectrum of solid tumors. **Anticancer Res**. v. 16, n. 1, p. 375-380, 1996.

SAKS V.A.; VENTURA-CLAPIER, R.; ALIEV, M.K. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1274, n. 3, p. 81-88, 1996.

SAMPAIO-BARROS, M.M.; FARIAS-SILVA, E.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. **Stress**. v. 6, n. 2, p. 127-132, 2003.

SCHILLING, B.K.; STONE, M.H.; UTTER, A.; KEARNEY, J.T.; JOHNSON, M.; COGLIANESE, R.; SMITH, L.; O'BRYANT, H.S.; FRY, A.C.; STARKS, M.; KEITH, R.; STONE, M.E. Creatine supplementation and health variables: a retrospective study. **Med Sci Sports Exerc**. v. 33, n. 2, p. 183-188, 2001.

SCHULZE, A. Creatine deficiency syndromes. **Mol. Cell. Biochem**. v. 244, n. 1-2, p. 143-50, 2003.

SILVA, C.C.; GOLDBERG, T.B.L.; TEIXEIRA, A.S. O exercício físico potencializa ou compromete o crescimento longitudinal de crianças e adolescentes? Mito ou verdade?. **Rev. Bras. Med. Esporte.** v. 10, n. 6, p. 520-524, 2004.

SCHEDDEL, J.M.; TANAKA, H.; KIYONAGA, A.; SHINDO, M.; SCHUTZ, Y. Acute creatine ingestion in human: Consequences on serum creatine and creatinine concentrations. **Life Sci.**, v. 65:, n. 23, p. 2463–2470, 1999.

SILVER, M.D. Use of ergogenics aids by athletes. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.** v. 9, n. 1, p. 61-70, 2001.

SORA, I.; RICHMAN, J.; SANTORO, G.; WEI, H.; WANG, Y.; VANDERAH, T.; HORVATH, R.; NGUYEN, M.; WAITE, S.; ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. The cloning and expression of a human creatine transporter. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V.. 204, n. 1, p. 419-427, 1994.

SHERMAN, W.M.; WIMER, G.S. Insufficient dietary carbohydrate during training: does it impair athletic performance? **Int. J. Sport Nutr.** V. 1, n. 1, p. 28-44, 1991.

STANLEY, W.C.; CONNETT, R.J. Regulation of muscle carbohydrate metabolism during exercise. **FASEB J.** v. 5, n. 8, p. 2155-2159, 1991.

STROUD, M.A.; HOLLIMAN, D.; BELL, D.; GREEN, A.L.; MACDONALD, I.; GREENHAFF, P.L. Effect of oral creatine supplementation on respiratory gas exchange and blood lactate accumulation during steady-state incremental treadmill exercise and recovery in man. **Clinical Science.** v. 87, n. 6, p. 707-710, 1994.

SYLLUM-RAPOPORT, I.; DANIEL, A.; RAPOPORT, S. Creatine transport into red blood cells. **Acta Biologica et Medica Germanica.** v. 39, n. 7, p. 771-779, 1980.

TAES, Y.E.C.; DELANGHE, J.R.; WUYTS, B.; VAN DE VOORDE, J.; LAMEIRE, N.H. Creatine supplementation does not affect kidney function in an animal model with pre-existing renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation.** v. 18, n. 2. p. 258-264, 2003.

TARNOPOLSKY, M.A.; BOURGEOIS, J.M.; SNOW, R.; KEYS, S.; ROY, B.D.; KWIEEIN, J.M.; TURNBULL, J. Histological assessment of intermediate-and long term creatine monohydrate supplementation in mice and rats. **Am J. Physiol Regul Integr. Comp. Physiol.** v. 285, n. 4, p. 762-769, 2003.

TARNOPOLSKY, M.A.; MAHONEY, D.J.; VAJSAR, J.; RODRIGUEZ, C.; DOHERTY, T.J.; ROY, B.D.; BIGGAR, D. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology.** v. 62, n. 10, p. 1771-1777, 2004.

TEIXEIRA, G.N. **Caracterização da Hepatotoxicidade produzida pelo veneno de cascavel da região do Vale do Paraíba em fígado de ratos.** 2003. 74f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba ,São José dos Campos, 2003.

TERJUNG, R.L.; CLARKSON, P.; EICHNER, E.R.; GREENHAFF, P.L.; HESPEL, P.J.; ISRAEL, R.G.; KRAEMER, W.J.; MEYER, R.A.; SPRIET, L.L.; TARNOPOLSKY, M.A.; WAGENMAKERS, A.J.; WILLIAMS, M.H. American College of Sports Medicine roundtable. The physiological and health effects of oral creatine supplementation. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 32; n. 3, p. 706–717, 2000.

THEOCHARIS, S.E.; MARGELI, A.P.; SKALTSAS, S.D.; SPILIOPOULOU, C.A.; KOUTSELINIS, A.S. Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study. **Toxicology.** v. 161, n. 1-2, p. 129-138, 2001.

THEODOROU, A.S.; HAVENETIDIS, K.; ZANKER, C.L.; O'HARA J.P.; KING, R.F.; HOOD, C.; PARADISIS, G.; COOKE CB. Effects of acute creatine loading with or without carbohydrate on repeated bouts of maximal swimming in high-performance swimmers. **J Strength Cond Res.** v. 19, n. 2, p. 265-269, 2005.

TOKISH, J.M.; KOCHER, M.S.; HAWKINS, R.J. Ergogenic aids: a review of basic science, performance, side effects, and status in sports. **Am. J. Sports Med.** v. 32, n. 6, p. 1543-1553, 2004.

TOUITOU, Y.; PORTALUPPI, F.; SMOLENSKY, M.H.; RENSING, L. Ethical principles and standards for the conduct of human and animal biological rhythm research. **Chronobiol Int.** v. 21, n. 1, p. 161-170, 2004.

UCHIYAMA, S.; TSUKAMOTO, H.; YOSHIMURA, S.; TAMAKI, T. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. **Pflugers Arch.** v. 10, p.1-8, 2006.

UENO, N.; OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; NISHIDA ,M.; OHNO, H. Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice: GDP binding and UCP mRNA expression. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.**, v. 95, n.1 , p. 92-104, 1997.

VANDENBERGUE, K.; GORIS, M.; VAN HECKE, P.; VAN LEEMPUTTE, M.; VAN GERVEN, L.; HESPEL, P. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. **Journal of Applied Physiology.** v. 83, n. 6, p. 2055-2063, 1997.

VAN DER MEULEN, J.H.; KUIPERS, H.; DRUKKER, J. Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. **J Appl Physiol.** v. 71, n. 3, p. 999-1004, 1991.

VANDENBERGUE, K.; VAN HECKE, P.; VAN LEEMPUTTE, M.; VANSTAPEL, F.; HESPEL, P. Phosphocreatine resynthesis is not affected by creatine loading. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v 31, n.2, p. 236-242, 1999.

VIEIRA, R.P. **Efeitos do Decanoato de Nandrolona sobre o fígado de ratos.** 2003. 96f. Dissertação (Mestrado de Ciências Biológicas). Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.

VIRU, M. Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles. **J Sports Med Phys Fitness.** v. 34, n. 3, p. 217-227, 1994.

VOLEK, J.S.; KRAEMER, W.J. Creatine supplementation: Its effects on human muscular performance and body composition. **Journal of Strength and Conditioning Research.** v. 10, n. 1, p. 200, 210, 1996.

VOLEK, J.S.; DUNCAN, N.D.; MAZZETTI, S.A.; PUTUKIAN, M.; GOMEZ, A.L.; KRAEMER, W.J. No effect of heavy resistance training and creatine supplementation on blood lipids. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.** v. 10, n. 2, p. 144-156, 2000.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 35, n. 11, p. 1389-1394, 2002.

WALDRON, J.E.; PENDLAY, G.W.; KILGORE, T.G.; HAFF, G.G.; REEVE, J.S. Concurrent creatine monohydrate supplementation and resistance training does not affect markers of hepatic function in trained weightlifters. **Journal of Exercise Physiology.** v. 5, n.1, p. 01-11, 2002.

WALKER, J.B. Creatine: Biosynthesis, regulation and function. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Bio.** v. 50, n. 1, p. 177-242, 1979.

WALSH, B. M.; TONKONOGLI, K.; SÖDERLUND, E.; HULTMAN, V.; SAHLIN K. The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. **J. Physiol.** V. 537, n. 3, p. 971-978, 2001.

WILDER, N.; DEIVERT, R.G.; HAGERMAN, F.; GILDERS, R. The effects of low-dose creatine supplementation versus creatine loading in collegiate football players. **Journal of Athletic Training.** v. 36, n. 2, p. 124-129, 2001.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine Metabolism. **Physiological Reviews**. v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

YOSHIDA, D.; OKAMOTO, H. Formation of mutagens by heating creatine and glucose. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 96, n. 2, p. 844-847, 1980.

YOSHIZUMI, W.M.; TSOUROUNIS, C. Effects of creatine supplementation on renal function. **J. Herb. Pharmacother**. v. 4, n. 1, p. 1-7. 2004.

YOUNG, J.C.; YOUNG, R.E. The effect of creatine supplementation on glucose uptake in rat skeletal muscle. **Life Science**. v. 71, n. 15, p. 1731-1737, 2002.

YU, P.H.; DENG, Y. Potential cytotoxic effect of chronic administration of creatine, a nutrition supplement to augment athletic performance. **Med. Hypotheses**. v. 54, n. 7, p. 726-728, 2000.

ZARAGOZA, A.; ANDRES, D.; SARRION, D.; CASCALES, M. Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. **Chem. Biol. Interact**. v. 124, n. 2, p. 87-101, 2000.

ZIEGENFUSS, T.N.; LEMON, P.W.R.; ROGERS, M.R.; ROSS, R.; YARASHESKI, K.E. Acute creatine ingestion: Effects on muscle volume, anaerobic power, fluid volumes, and protein turnover. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 29, n. 5, p. 127-134, 1997.

ZIEGENFUSS, T.N.; LOWERY, L.M.; LEMON, P.W.R. Acute fluid volume changes in men during three days of creatine supplementation. **Journal of Exercise Physiology**. v. 1, n. 3, p. 1-9, 1998.

ZIEGENFUSS, T.N.; ROGERS, M.; LOWERY, L.; MULLINS, N.; MENDEL, R.; ANTONIO, J.; LEMON, P. Effects of creatine loading on anaerobic performance and skeletal muscle volume in NCAA Division I athletes. **Nutrition**. v. 18, n. 5, p. 397-402, 2002.