LUCAS GUIMARÃES FERREIRA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO A CURTO PRAZO DE CREATINA SOBRE O EIXO GH-IGF-I, FUNÇÃO NEUROMUSCULAR E VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO PROTÉICA MUSCULAR EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana, na sub-área: Fisiologia Endócrina, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

LUCAS GUIMARÃES FERREIRA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO A CURTO PRAZO DE CREATINA SOBRE O EIXO GH-IGF-I, FUNÇÃO NEUROMUSCULAR E VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO PROTÉICA MUSCULAR EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana, na sub-área: Fisiologia Endócrina, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profª Drª Maria Tereza Nunes

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ferreira, Lucas Guimarães.
Efeito da suplementação à curto prazo de creatina sobre o eixo GH-IGF-I, função neuromuscular e vias de síntese e degradação protéica muscular em ratos / Lucas Guimarães Ferreira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Regulação hormonal da expressão gênica.

Versão do título para o inglês: Effects of the short-term creatine supplementation upon GH-IGF-I axis, neuromuscular function and muscular protein synthesis and degradation pathways in ray.

1. Músculo esquelético 2. Hormônio do crescimento 3. Força muscular I. Nunes, Profa. Dra. Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB06/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Guimarães Ferreira.

Título da Tese: Efeito da suplementação à curto prazo de creatina sobre o eixo GH-IGF-I, função neuromuscular e vias de síntese e degradação protéica muscular em ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **106** nas fls. **74** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Tereza Nunes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeitos da suplementação de creatina sobre o metabolismo protéico muscular na desnervação em ratos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Lucas Guimarães Ferreira, Frederico Gerlinger Romero,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **17.11.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 23 de novembro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedico aos meus pais, Geraldo e Telma, pelo incentivo constante e amor incondicional. Aos meus irmãos, Eduarda, Mateus e Daniel e meu afilhado João Gabriel, pelo amor, cumplicidade e amizade. Vocês são tudo pra mim.

Dedico também a minha noiva, Isadora, pelo amor, companheirismo, amizade e apoio em todos os momentos. Você me inspira e torna meus dias mais felizes. Eu te amo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Maria Tereza, por ter me acolhido em seu laboratório e contribuído de forma marcante com a minha formação científica. Sou eternamente grato.

Ao professor Rui Curi, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu realizasse parte dos meus experimentos. Sua colaboração foi determinante para a realização deste trabalho. Admiro-o muito.

Aos grandes amigos que fiz no Instituto de Ciências Biomédicas da USP: Frederico Gerlinger, Rafael Croffi, Rafael Salgueiro, Caio Yogi, Mário Filho, Carlos Hermano Pinheiro, Nelo Zanchi, Kaio Vitzel, Renato Nachbar e Marco Aurélio Fortes. Nossos bons momentos jamas serão esquecidos.

À Leonice Poyares, nossa Lhô, sempre presente e disposta a ajudar. Sua importância vai muito além da bancada.

A todos com quem compartilhei inúmeros momentos no laboratório: Gisele, Fran, Jamile, Carol, Janaína, Ana Carolina, Rafael Prévide, Paula, Nicole e Aline.

Aos professores Ubiratan Machado, Rosângela Reichler e Antônio Carlos Oliveira, pelas importantes contribuições no exame de qualificação e ao professor Anselmo Moriscot, pela fundamental contribuição com as análises histológicas.

Aos professores colegas do Centro de Educação Física e Desportos da UFES, pelo apoio. Em especial aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental, os professores André Leopoldo, Ana Paula Leopoldo, Márcia Cunha, Adriano Maia, Edson Castardeli e Wellington Lunz.

A todos os funcionários do ICB-USP, por serem sempre tão solícitos e dedicados. Em especial à Monica da Silva Amaral e Valéria Maria Loro Pedullo da biblioteca do ICB-USP pela importante ajuda com as normas técnicas desta tese.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“O homem que não tem imaginação não tem asas”.

Muhammad Ali

RESUMO

FERREIRA, L. G. **Efeito da suplementação a curto prazo de creatina sobre o eixo GH-IGF-I, função neuromuscular e vias de síntese e degradação protéica muscular em ratos.** 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O ATP é a moeda corrente de energia no organismo, utilizado em diversos processos celulares, e indispensável para a manutenção da homeostase celular. Assim, mecanismos de regeneração do ATP, a partir de seu produto de hidrólise – o ADP – se fazem necessários. A fosfocreatina (PCr) é a fonte mais rápida de regeneração do mesmo, através da ação da enzima creatina quinase (CK). Desta forma, a principal função deste sistema é atuar como um tampão temporal de energia. Entretanto, após a identificação das diversas isoformas da CK com localização subcelular distinta e acopladas funcionalmente aos sítios geradores e utilizadores de ATP, outras funções para o sistema PCr/CK foram estabelecidas. Muitos estudos relatam efeito ergogênico da suplementação de creatina (Cr) no desempenho atlético e função muscular, apesar de algumas investigações falharem em demonstrar tais efeitos. O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de curto prazo com Cr sobre diversos parâmetros da função muscular, investigando alterações celulares e moleculares que auxiliem na compreensão de tais efeitos, como a morfologia do músculo esquelético, atividade do eixo GH-IGF-I, vias de sinalização que regulam a síntese e degradação protéica muscular e potencial antioxidante. Para tanto, ratos Wistar (200-250 g) foram suplementados com Cr (5g.kg de peso^{-1}.dia^{-1}, grupo Cr) ou água (grupo controle) por sonda intragástrica (gavagem) durante 6 dias. Parâmetros musculares como forças isotônicas e tetânicas máximas, tempo para o pico de força (TTP), tempo de relaxamento muscular e fadiga durante contrações de baixa (10Hz) e alta (100Hz) frequência foram obtidos através da eletroestimulação do nervo ciático. Além disso, foi avaliado a expressão gênica (por *Real Time* PCR) e proteica (*Western Blotting*) de componentes do eixo GH-IGF-I e da via de sinalização do IGF-I no músculo esquelético (via PI3K-Akt). Análises histológicas foram realizadas para a mensuração da área de secção transversa (AST) das fibras musculares, bem como a distribuição dos tipos de fibra (através da técnica da miosina ATPase). Por fim, mensurou-se o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) no músculo

esquelético, a expressão e atividade de enzimas oxidantes e o potencial da Cr em atuar como *scavenger* de EROs. A suplementação com Cr promoveu uma atenuação da fadiga durante contrações de baixa e alta frequência no tríceps sural, sóleo e extensor longo dos dedos (EDL). Além disso, o tempo de relaxamento muscular foi reduzido no grupo suplementado. A força máxima, entretanto, não foi alterada. A expressão proteica do GH na hipófise dos animais suplementados encontrou-se reduzida em relação ao controle, assim como a expressão gênica do IGF-I hepático, apesar de, na musculatura esquelética, esse fator de crescimento ter sua expressão aumentada. Houve aumento da AST nas fibras musculares tipo I no sóleo, bem como aumento no conteúdo de fibras tipo II neste músculo. O conteúdo de EROs no sóleo e EDL mostrou-se reduzido no grupo Cr, apesar da expressão e atividade das enzimas antioxidantes não terem sido alteradas. Ensaios *cell free* apontam para uma ação direta da molécula de Cr sobre o radical superóxido. Assim, os efeitos observados de atenuação da fadiga durante contrações musculares intensas e a redução do tempo de relaxamento podem se dever a uma ação antioxidante da Cr, e muito se assemelha à resposta observada quando animais são tratados com N-acetil-cisteína, um potente antioxidante.

Palavras-chave: Creatina. Músculo esquelético. Função neuromuscular. Espécies reativas de oxigênio. Hormônio do crescimento. Fator de crescimento semelhante à insulina.

ABSTRACT

FERREIRA, L. G. **Effects of short-term creatine supplementation upon GH-IGF-I axis, neuromuscular function and muscular protein synthesis and degradation pathways in rats.** 2013. 105 p. Ph. D. Thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The ATP is the energy unit of currency in the body, that is used in many cellular processes and it is indispensable for the maintenance of cellular homeostasis. Thus, the mechanisms of ATP regeneration from its hydrolysis product - ADP – are essential. Phosphocreatine (PCr) is known to be the fastest source for ATP regeneration, catalized by creatine kinase (CK). The main function of this system is to act as a temporal energy buffer. However, several other functions were assigned to PCr when different isoforms of CK were discovered, with distinct subcellular localization and functionally coupled with ATP generating and utilization sites. Several studies demonstrated an ergogenic effect of creatine (Cr) supplementation on athletic performance and muscular function, despite others did not corroborate this findings. This study aims to evaluate the effects of short-term Cr supplementation upon muscular functional parameters and cellular and molecular alterations that could explain such effects, such as skeletal muscle morphology, GH-IGF-I axis activity, protein synthesis and degradation signalling pathways and antioxidant potential in skeletal muscle. Wistar male rats (200 - 250 g) were supplemented with Cr (5g.kg body weight^{-1}.day^{-1}, Cr group) or water (control group) by gavage for 6 days. Functional parameters such as isotonic and tetanic force, time to peak of force (TTP), muscle relaxation time and fatigue during intense muscular contractions in low (10Hz) and high (100Hz) frequencies were obtained by direct electrostimulation of sciatic nerve. Gene and protein expression of GH-IGF-I axis and PI3K-Akt pathway were ebaluated by Real Time PCR and Western Blotting, respectivelly. Hystological analysis (myosin ATPase) were carried out to measurement of fiber cross-sectional area (CSA) and fyber type distribution. Also, oxigen reactive species (ROS) content in skeletal muscle, gene expression and activity of antioxidant enzymes and Cr scavenger action on ROS were evaluated. Cr supplementation promoted an anettuation of muscle fatigue diring intense contractions at low and high frequencies in triceps surae, soleus and EDL. The relaxation time was reduced in Cr group

compared to control. However, the maximum force was not stimulated by Cr supplementation. GH protein expression was reduced in supplemented animals, as well as IGF-I mRNA in the liver, but not in muscle, where its expression was stimulated by Cr. The fiber CSA in type I fibers of soleus muscle was greater in Cr group, and also the type II fiber content in the same muscle. In soleus and EDL the content of ROS was lower in Cr-supplemented animals compared to control, despite no alteration in gene expression and activity of antioxidant enzymes. Cell free experiments show a direct scavenger action of Cr on superoxide anion. Thus, the fatigue attenuation during intense contractions and the reduction of relaxation time observed in Cr-supplemented animals could result from a antioxidant properties of Cr. These effects was similar to that observed when N-Acetyl-Cysteine (a potent antioxant) was administered to adult rats prior to intense contractile activity.

Key words: Creatine. Skeletal muscle. Neuromuscular function. Reactive oxygen species. Growth hormone. Insulin-like growth factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos diferentes modelos atribuídos ao sistema PCr/CK ao longo dos anos..... 18

Figura 2 - Metabolismo da Creatina..... 23

Figura 3 - Representação esquemática das principais funções do sistema PCr/CK nos diferentes tipos de fibras musculares..... 26

Figura 4 - Representação do controle da secreção de GH e seus principais tecidos-alvo..... 31

Figura 5 - Representação da vias sinalização desencadeadas pelo IGF-1 relevantes para o estímulo da síntese e inibição da degração proteica..... 34

Figura 6 - Etapas do início da tradução gênica, mostrando os principais fatores de iniciação (eIFs) envolvidos na regulação desta etapa da síntese proteica..... 36

Figura 7 - Sistema ubiquitina-proteassoma..... 38

Figura 8 - Modelo hipotético para a sinalização desencadeada pela creatina…..... 41

Figura 9 - Suplementação de creatina previne a fadiga durante atividade contrátil isotônica prolongada no tríceps sural..... 59

Figura 10 - Suplementação de creatina previne a redução da capacidade de relaxamento durante atividade contrátil isotônica prolongada no tríceps sural..... 60

Figura 11 - Efeito da suplementação de creatina sobre a função do grupamento muscular tríceps sural submetido à eletroestimulação de alta frequência..... 61

Figura 12 - Efeito da suplementação de creatina sobre a função do músculo sóleo..... 63

Figura 13 - Efeito da suplementação de creatina sobre a função do músculo EDL..... 64

Figura 14 - Análises histológicas..... 65

Figura 15 - Distribuição dos tipos de fibras musculares..... 66

Figura 16 - Efeito da suplementação com creatina sobre a expressão do GH..... 67

Figura 17 - Efeito da suplementação com creatina sobre a expressão do IGF-I..... 67

Figura 18 - Comprovação da expressão do mRNA do transportador de creatina (CreaT) em hipófise de ratos..... 68

Figura 19 - Efeito da creatina sobre a expressão de GH em células GH3..... 69

Figura 20 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de componentes da via da Akt no músculo sóleo..... 69

Figura 21 - Efeito da suplementação de creatina sobre a atividade de componentes da via da Akt no músculo sóleo..... 70

Figura 22 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de ubiquitina ligases no músculo sóleo..... 70

Figura 23 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de componentes da via da Akt no músculo EDL..... 71

Figura 24 - Efeito da suplementação de creatina sobre a atividade de componentes da via da Akt no músculo EDL..... 71

Figura 25 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de ubiquitina ligases no músculo EDL..... 72

Figura 26 - Efeito da suplementação de creatina sobre o conteúdo de EROs no músculo esquelético..... 73

Figura 27 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de enzimas antioxidantes no músculo esquelético..... 74

Figura 28 - Efeito da suplementação de creatina sobre a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético..... 75

Figura 29 - Efeito *scavenger* da creatina sobre ânions superóxido..... 76

Figura 30 - Efeito scavenger da creatina sobre o peróxido de hidrogênio..... 77

Figura 31 - Efeitos da suplementação com N-acetil-cisteína sobre a fadiga durante atividade contrátil prolongada..... 85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO……...……..……. 17

1.1 CREATINA……...……...……... 17

1.1.1 O sistema da fosfocreatina……..... 17

1.1.1.2 O surgimento da teoria da “lançadeira de fosfocreatina”……..... 20

1.1.3 Metabolismo da creatina……..... 22

1.1.4 Efeito da suplementação de creatina sobre o desempenho e função contrátil……..... 27

1.1.5 Creatina e estresse oxidativo……..... 28

1.2 O EIXO GH-IGF-1……..... 29

1.2.1 Hormônio do crescimento……..... 29

1.2.2 Fator de crescimento semelhante à insulina I……..... 31

1.3 PLASTICIDADE MUSCULAR-ESQUELÉTICA….....…..... 34

1.3.1 Controle traducional da síntese protéica……..... 35

1.3.2 Papel do sistema ubiquitina-proteassoma na atrofia muscular..... 37

1.3.3 Papel do IGF-I na hipertrofia muscular..... 38

1.4 CREATINA E METABOLISMO PROTÉICO MUSCULAR……..... 40

2 OBJETIVOS……..... 43

3 JUSTIFICATIVA……..... 44

4 MATERIAL E MÉTODOS……..... 45

4.1 ANIMAIS E TRATAMENTO……..... 45

4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS……..... 45

4.3 DADOS MORFOMÉTRICOS……..... 46

4.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO..... 46

4.4.1 Contração isotônica……..……..……..... 47

4.4.1.1 Força máxima absoluta……..……..... 47

4.4.1.2 Força máxima relativa……..……..... 47

4.4.1.3 Velocidade de contração e relaxamento muscular……..... 47

4.4.1.4 Taxa de desenvolvimento de força……..……..... 47

4.4.2 Contração isométrica……..……..... 48

4.4.2.1 Força máxima absoluta……..……..... 48

4.4.2.2 Força máxima relativa……..……..……..... 48

4.4.2.3 Tempo de sustentação da contração isométrica……..... 48

4.4.2.4 Contrações isométricas repetidas……..……..... 48

4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS……..……..... 49

4.6 EXPERIMENTO *IN VITRO* COM CÉLULAS GH3……..... 49

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO mRNA……..……..... 50

4.7.1 Extração de RNA total……..……..... 50

4.7.2 *Real-time* PCR……..……..……..... 51

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA……..... 53

4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROs E POTENCIAL ANTI-OXIDANTE..... 53

4.9.1 Produção de EROs por músculos incubados……..... 53

4.9.2 Atividade das enzimas antioxidantes……..... 54

4.9.3 Avaliação da atividade antioxidante direta da creatina……....……..... 55

4.9.3.1 Efeito da creatina sobre o radical superóxido……..……..... 55

4.9.3.2 Efeito da creatina sobre o peróxido de hidrogênio……..... 55

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA……..……..……..... 55

5 RESULTADOS……..……..……..... 57

5.1 DADOS MORFOMÉTRICOS……..……..……..... 57

5.2 PARÂMETROS FUNCIONAIS……..……..... 57

5.2.1 Tríceps Sural……..……..... 57

5.2.2 Sóleo…….……..... 62

5.2.3 EDL…….……..... 63

5.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS…….……..... 65

5.4 EIXO GH-IGF-I…….……..... 67

5.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO…….……..... 69

5.5.1 Sóleo…….……..... 69

5.5.2 EDL…….……..... 71

5.6 ESTRESSE OXIDATIVO…….……..... 72

5.6.1 Produção de H_2O_2 pelo músculo esquelético……..... 72

5.6.2 Expressão de enzimas antioxidantes……..... 73

5.6.3 Atividade de enzimas antioxidantes……..... 75

5.6.4 Conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)..... 76

5.6.4 Creatina como antioxidante em sistemas *cell-free* ……..... 76

6 DISCUSSÃO…….……..... 78

7 CONCLUSÕES…….……..... 87

REFERÊNCIAS…….……..... 88

APÊNDICE - Artigo publicado.....……..……..... 97

1 INTRODUÇÃO

1.1 CREATINA

1.1.1 O sistema da fosfocreatina

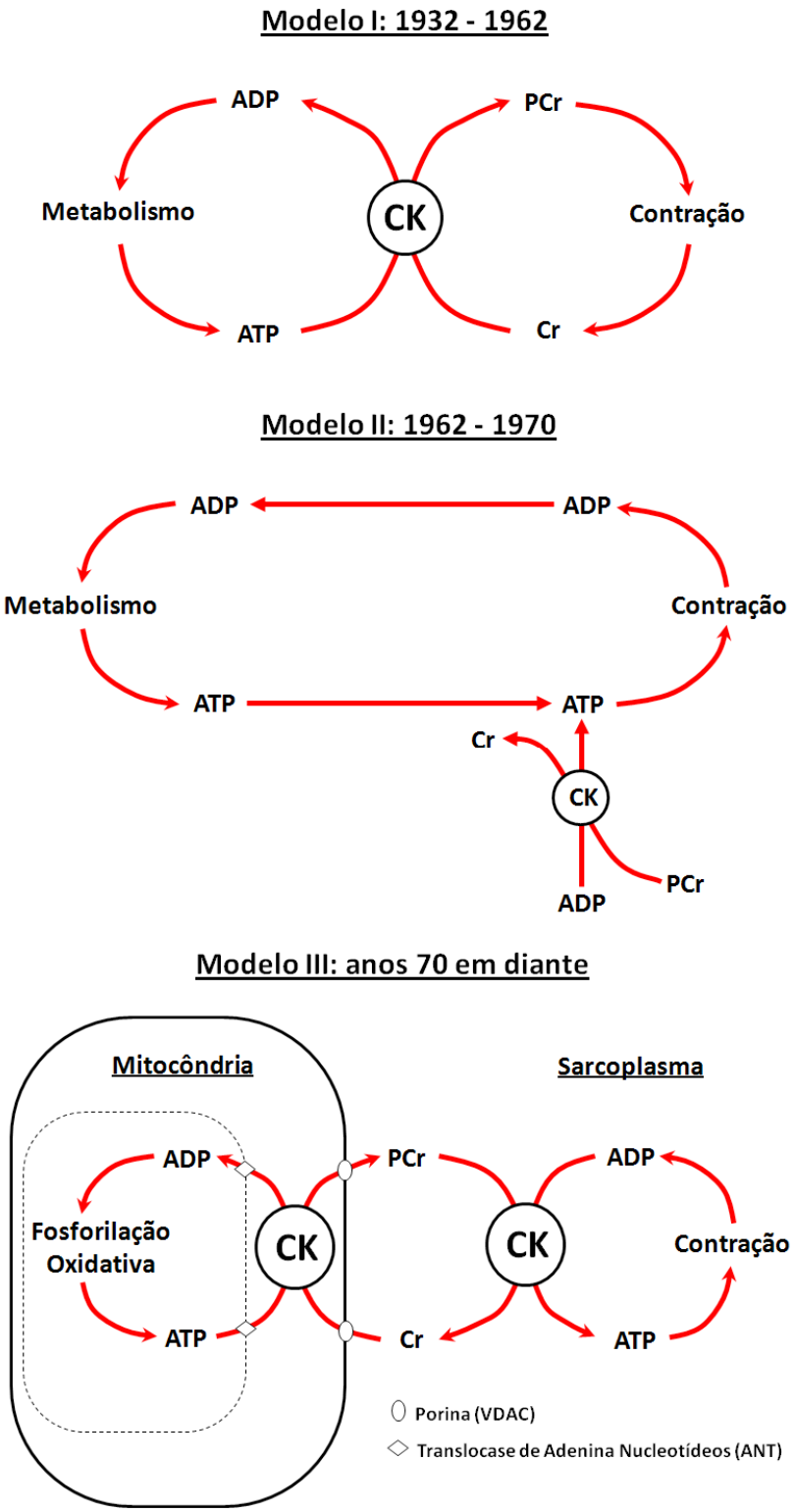
A contração muscular é reconhecida há muito tempo como um processo que depende da energia derivada de reações químicas na célula. Fletcher e Hopkins, em 1907, verificaram que os níveis de lactato no músculo esquelético aumentavam à medida que estes eram estimulados até a fadiga (FLETCHER; HOPKINS, 1907[1] apud BESSMAN; GEIGER, 1981). Posteriormente, foi demonstrado que o lactato era proveniente do glicogênio muscular, que fornece a energia necessária para o trabalho contrátil.

Mais tarde, em 1927, a fosfocreatina (PCr) foi identificada como constituinte do tecido muscular (EGGLETON; EGGLETON, 1927a; 1927b; FISKE e SUBBAROW, 1927). Lipmann e Meyerhof (1930[2]; apud BESSMAN; GEIGER, 1981) demonstraram que a hidrólise da PCr ocorre durante a contração muscular, havendo a liberação de creatina livre (Cr). Neste momento, atribuiu-se à PCr o papel de molécula capaz de prover a energia química para a contração. Ao ATP, descoberto pouco tempo depois, foi atribuída a função de regenerar a PCr, através da doação de um grupamento fosfato, via ação da enzima creatina quinase (CK, Modelo I, Figura 1A).

---

[1] Em FLETCHER, W. M.; HOPKINS, F. G. **J. Physiol**., v. 35, p. 247, 1907.
[2] Em LIPMANN, F.; MEYERHOF, O. **Biochem. Z.**, v. 227, p. 84, 1930.

Figura 1 - Representação dos diferentes modelos atribuídos ao sistema PCr/CK ao longo dos anos.



Fonte: Modificado de Neubauer (1998).

Em 1962, Cain e Davies, ao inibirem a CK com fluorodinitrobenzeno, verificaram que os níveis de PCr e Cr permaneciam constantes enquanto que os de ATP diminuíam rapidamente até que as contrações musculares não mais podiam ocorrer. Além disso, foi demonstrado que a actomiosina só era capaz de se contrair com a adição de ATP (ENGLEHARDT; LJUBIMOVA, 1939). Esses achados levaram à constatação de que o ATP era o elemento essencial para o processo contrátil, mas que a sua ressíntese estava vinculada à síntese de PCr, que passou a ser considerada um tampão, cuja principal função seria a de regenerar o ATP (Modelo II, Figura 1B e equação 1).

$$MgADP^{-} + PCr^{2-} + H^{+} \Leftrightarrow MgATP^{2-} + Cr \qquad \text{Equação (1)}$$

A chamada carga energética celular, proposta por Atkinson (1977), serve como um indicador do estado energético da célula, sendo influenciada pelos níveis de nucleotídeos de adenina. Uma vez que a razão entre as concentrações locais de ATP, ADP e AMP são reguladores-chave de muitos processos metabólicos celulares (ATKINSON, 1977; HARDIE, 2008), o simples aumento das concentrações intracelulares de ATP para estocagem de energia não seria uma estratégia eficiente, sendo necessários mecanismos capazes de regenerar o ATP, tornando-o disponível nos sítios utilizadores de energia na célula. Assim estabeleceu-se a primeira e mais conhecida função da fosfocreatina: **promover a rápida ressíntese de ATP**, quando a taxa de utilização deste excede sua capacidade de geração por outras vias metabólicas. Isto se faz importante, uma vez que dentre os sistemas energéticos, a hidrólise da PCr é responsável pela maior taxa de geração de ATP (30 $\mu mol.s^{-1}.g^{-1}$), muito superior à gerada através da respiração mitocondrial (2,5 $\mu mol.s^{-1}.g^{-1}$; WALLIMANN et al., 1992). Esta função mostra-se importante especialmente em fibras de contração rápida (tipo II, glicolíticas), no início da atividade contrátil em ritmo estável (*steady state*) ou durante contrações intensas.

Como apresentado na equação 1, a reação da CK, no sentido de utilização de PCr e geração de ATP, utiliza, além do ADP, próton H+. Em contrapartida, a hidrólise do ATP gera prótons H+. Desta forma, no início das contrações intensas, onde a hidrólise do ATP é intensa, o acoplamento entre as reações das ATPases e da CK pode prevenir a acidificação intracelular. Esta segunda função do sistema

CK/PCr, de **tamponar prótons H+**, parece de fundamental importância especialmente no início do exercício intenso, antes de as reações da glicogenólise serem ativadas (WALLIMANN et al., 1992).

1.1.1.2 O surgimento da teoria da “lançadeira de fosfocreatina”

Na ocasião em que Cain e Davies (1962) publicaram seu estudo, acreditava-se na teoria da distribuição homogênea do ATP no citoplasma, alcançando todos os sítios de utilização por rápida difusão. À PCr, restava a função de armazenamento energético, ou tampão temporal de energia. Na década de 70 surgiram, então, novas evidências sugerindo outras funções para este metabólito. Demonstrou-se que, no músculo esquelético, após cerca de 1 minuto da indução de isquemia, ocorria interrupção da contração muscular, apesar dos níveis intracelulares de ATP apresentarem-se diminuídos em somente cerca de 10%. Ainda, foi observado que nessa condição a PCr apresentou-se quase que completamente exaurida (GUDBJARNASON et al., 1970). Estudos posteriores demonstraram que no músculo cardíaco submetido à hipóxia ou tratamento com deoxiglicose onde, apesar da depleção de aproximadamente 70% do ATP citoplasmático, não foi verificado prejuízo significante da função contrátil (HOERTER et al., 1988; KUPRIYANOV et al., 1987; NEELY; GROTYOHANN, 1984). Estes dados sugerem que o ATP intracelular pode não estar homogeneamente distribuído pelo citoplasma ou ser capaz de se difundir de forma rápida e eficiente.

Já havia sido descrito, no momento, a presença de quatro diferentes isoformas de CK com localizações subcelulares distintas: as isoformas CK-M e CK-B (de *muscle* e *brain*, devido aos tecidos em que foram identificadas pela primeira vez) e duas mitocondriais (CKmit sarcomérica, encontrada no músculo, e CKmit ubíqua, no restante dos tecidos). *In vivo*, as isoformas citosólicas se combinam em dímeros, formando a CK-BB, CK-MB e CK-MM, sendo esta última a predominante no músculo esquelético (JACOBS et al., 1964). Estes achados, somados aos primeiros experimentos que demonstraram que o suprimento com Cr promovia um estímulo à respiração mitocondrial mostraram que o compartimento mitocondrial e o citoplasmático eram interconectados por um sistema organizado de transferência de energia, constituído de diferentes isoformas da CK. Assim, fundaram-se as bases da

chamada teoria da “lançadeira de fosfocreatina”, proposta formalmente por Bessman em 1972.

Neste modelo (Modelo III, Figura 1C), o fosfato de alta energia é transferido do ATP formado no processo de fosforilação oxidativa na mitocôndria (sítio de produção de ATP) para a Cr, via CK mitocondrial (CKmit), gerando PCr e ADP. A PCr se difunde para o citoplasma onde, via ação das isoformas citosólicas de CK (CK-BB, CK-MB e CK-MM), gera ATP e Cr. O ATP é então utilizado pelas ATPases citosólicas (sítios de utilização de ATP) enquanto que a Cr retorna para o interior da mitocôndria. A membrana mitocondrial possui uma permeabilidade muito maior à Cr que aos nucleotídeos de adenina, além dela estar presente em níveis mais altos no meio intracelular. O sistema de “lançadeira” permite à fosfocreatina desempenhar outra função: **participar da transferência do fosfato de alta energia, presente no ATP, da mitocôndria para o citossol** (BESSMAN; GEIGER, 1981; WALLIMANN et al., 1992).

A atividade contrátil envolve dois eventos principais: modificações iônicas, especialmente nas concentrações intracelulares de cálcio, e a ativação da miosina ATPase. Estes eventos formam um sistema de transdução químico-mecânica, que leva ao processo de excitação-contração, em que a despolarização da membrana desencadeia o influxo de cálcio. Assim, mais cálcio é liberado do retículo sarcoplasmático, levando à ativação da miosina ATPase e desencadeando o processo de contração muscular. O processo de relaxamento necessita da ativação de Ca^{2+}-ATPases do retículo sarcoplasmático, que resulta no bombeamento deste íon para o interior do retículo e no restauro dos níveis basais de cálcio intracelular. Desta forma, as principais reações químicas que utilizam ATP, no músculo esquelético e cardíaco, estão associadas ao acoplamento excitação-contração: a miosina ATPase nas miofibrilas, a Ca^{2+}-ATPase no retículo sarcoplasmático e a Na^{+}/K^{+}-ATPase no sarcolema. Foi demonstrado que a CK encontra-se localizada nestes sítios, acoplada funcionalmente a estas ATPases (WALLIMANN et al., 1992). Assim, é possível notar que a localização das isoformas da CK é de fundamental importância para que o sistema funcione de forma adequada, ou seja, para que o ATP produzido na mitocôndria seja efetivamente utilizado pelas ATPases citossólicas.

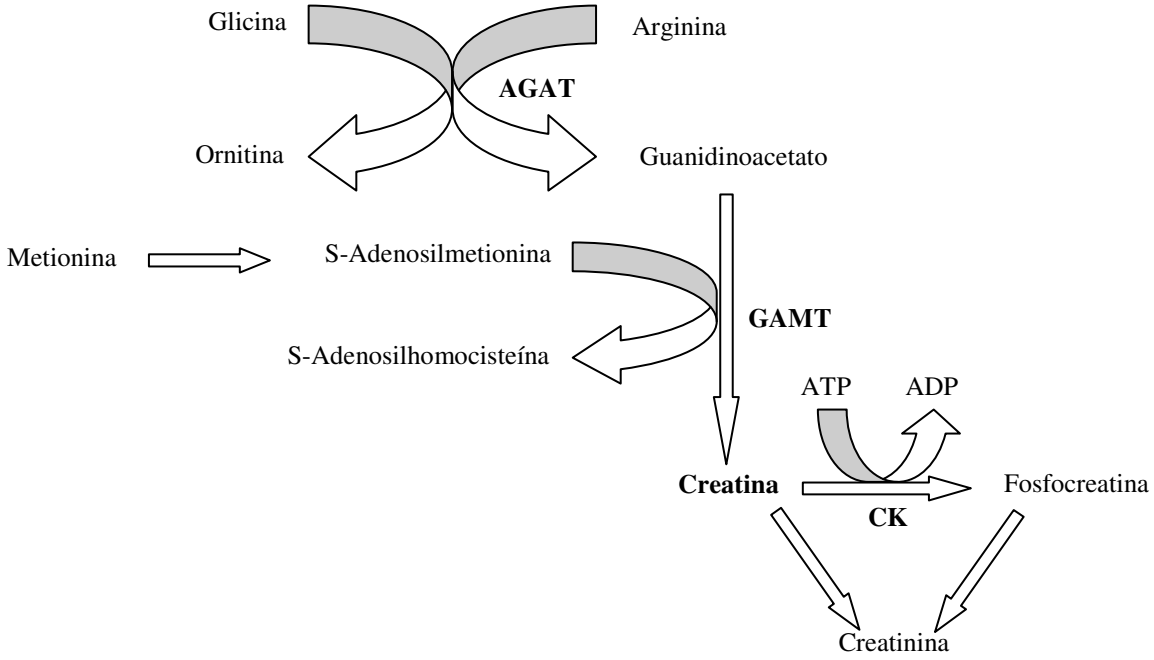
Quando ADP se acumula na célula, como resultado do aumento da taxa de hidrólise do ATP, ocorre a ativação da enzima Adenilato Quinase (AK), que catalisa a reação de formação de ATP e AMP a partir de duas moléculas de ADP. O AMP pode ser convertido em IMP e amônia e, posteriormente, inosina e adenosina, às quais o sarcolema apresenta grande permeabilidade (JENNINGS et al., 1981). Uma vez que a CK recicla o ATP a partir do ADP, ela evita que este se acumule na célula e, em última instância, **impede a perda de nucleotídeos de adenina da célula**, mantendo, assim, o *pool* intracelular destes compostos (BESSMAN; GEIGER, 1981; WALLIMANN et al., 1992). Além disso, através da ação da CKmit, mantém níveis adequados de ADP no interior da mitocôndria, possibilitando que este possa atuar de forma importante na regulação da respiração mitocondrial. De forma contrária, através da ação das CK citosólicas, **a inativação das ATPases por níveis elevados de ADP livre é impedida**, uma vez que este é convertido a ATP a partir da PCr (WALLIMANN et al., 1992).

1.1.3 Metabolismo da creatina

A creatina (Cr) é um composto que contém carbono, hidrogênio e nitrogênio, sintetizado nos rins, pâncreas e fígado (neste último principalmente) a partir de três aminoácidos: glicina, arginina e metionina (PERSKY et al., 2003). Sua biossíntese envolve a ação de duas enzimas, a arginina:glicina amidinotransferase (AGAT) e a guanidinoacetato metiltransferase (GAMT).

Diariamente, aproximadamente 2 g de Cr são convertidos, através de reação não-enzimática, em creatinina, que atravessa livremente a membrana celular sendo posteriormente excretada pelos rins (GREENHAFF, 1997; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). A reposição dos estoques se dá tanto por síntese endógena quanto pela ingestão na dieta onívora típica. Os estoques intracelulares de Cr total são cerca de 120-125 mmol/kg de peso seco, resultando em cerca de 120 g para um indivíduo de 70 kg, sendo 95% deste valor encontrado no músculo esquelético (PERSKY et al., 2003). Um resumo do metabolismo da creatina está exposto na figura 2.

Figura 2 - Metabolismo da Creatina



Fonte: Modificado de Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) e Persky et al. (2003).

Harris et al. (1974) mensuraram as concentrações de Cr e PCr no músculo quadríceps de adultos saudáveis e verificaram que dos estoques totais de Cr, aproximadamente 40% encontra-se na forma livre, e 60% na forma de PCr (49,0 $mmol.kg^{-1}$ e 75,5 $mmol.kg^{-1}$, respectivamente). Posteriormente, Tesch et al. (1989) demonstraram que os níveis de fosfocreatina de repouso nas fibras tipo II eram superiores àquelas encontradas na fibras tipo I (82,7 $mmol.kg^{-1}$ e 73,1 $mmol.kg^{-1}$, respectivamente). Além disso, após 30 segundos de exercício máximo, verificaram que os níveis de Cr nas fibras tipo II encontravam-se significativamente menores que nas do tipo I, confirmando a maior dependência a este sistema por fibras glicolíticas, e em exercício de alta intensidade.

No que diz respeito ao músculo cardíaco, este possui menor atividade total da CK e menores níveis de PCr que músculos esqueléticos. Entretanto, possui alta estabilidade metabólica, com pouquíssimas variações nos níveis de ATP e PCr mesmo durante trabalho intenso do miocárdio. De forma contrária, os músculos glicolíticos possuem maiores valores de atividade total da CK (300 a 700% mais que a verificada no miocárdio) e níveis de PCr (300 a 400%), apesar de apresentarem

praticamente nenhuma estabilidade metabólica, apresentando rápida diminuição dos níveis de PCr durante o exercício intenso, o que causa um prejuízo notável na performance, devido à fadiga (VENTURA-CLAPIER et al., 1998; KUSHMERICK et al., 1992). Músculos oxidativos como o sóleo possuem níveis intermediários no que diz respeito a estes fatores (SAKS et al., 2004).

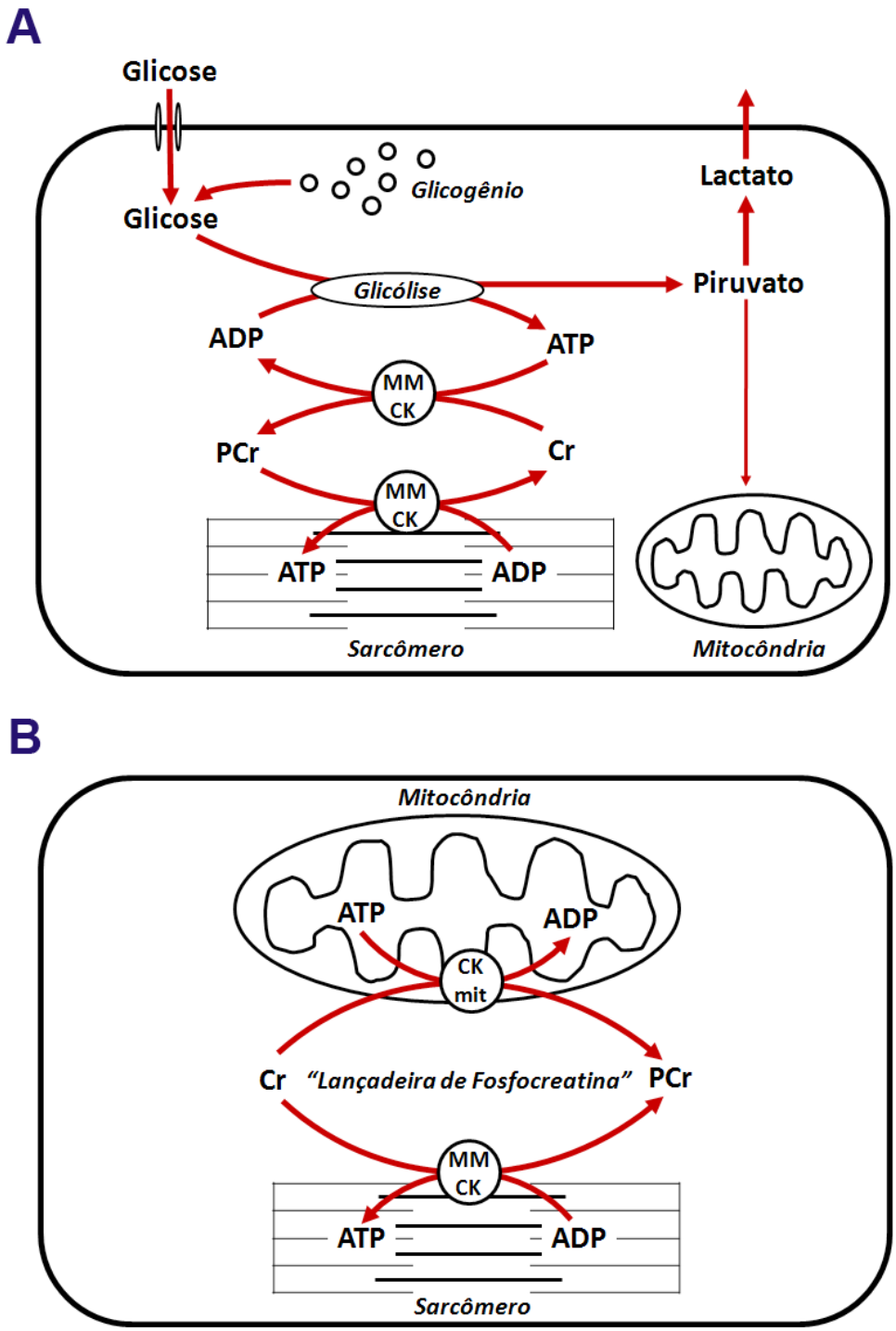
Estas diferenças ocorrem devido à organização estrutural e funcional distinta nos diferentes tipos de músculos. Enquanto que músculos com predominância de fibras glicolíticas possuem poucas mitocôndrias (apenas cerca de 2% do volume celular), atividade quase nula da isoforma mitocondrial da CK (CKmit) e alta atividade da CK citosólica em especial da isoforma CK-MM, o miocárdio possui alta densidade mitocondrial (30 a 40% do volume celular; SCHAPER et al., 1985) e alta atividade da CKmit (cerca de 40% da atividade total da CK; SAKS et al., 2004) que está acoplada funcionalmente a translocase de adenina nucleotídeos (ANT). No miocárdio, e em algum grau significativo também em músculos esqueléticos de predominância oxidativa, as mitocôndrias se organizam em complexos funcionais com o retículo sarcoplasmático e os sarcômeros, nas chamadas Unidades Energéticas Intracelulares (ICEUs – *Intracellular Energetic Units*; APAIX et al., 2003; SAKS et al., 2004). Nestes complexos, a comunicação entre o sítio produtor de ATP – mitocôndria – e os sítios utilizadores do mesmo, no citossol, é feita através de sistemas de transferência de energia, como o sistema de "lançadeira de fosfocreatina" citado anteriormente. Trata-se de um sistema funcional de organização espacial que confere uma alta eficiência metabólica, simplesmente colocando "a enzima certa no local certo" (SAKS et al., 2004).

A figura 3 ilustra as funções principais que desempenham a CK e a PCr nos diferentes tipos de fibras musculares. Nas fibras glicolíticas (A), onde a principal via de geração de ATP é a via glicolítica, a CK encontra-se acoplada funcionalmente à glicólise. A alta expressão da CK-MM, sua localização junto à banda M do sarcômero, a baixa expressão da CKmit e o alto conteúdo de PCr apontam para uma função primária de tampão temporal de energia nestes tipos de fibras musculares (WALLIMANN et al., 1992). Em contrapartida, nas fibras oxidativas e, em especial, no miocárdio (B), onde o ATP é gerado primariamente pela via oxidativa, há uma alta expressão da CKmit que é funcionalmente acoplada à geração de ATP

mitocondrial. Nestas fibras, a função principal seria a de tampão espacial de energia (SAKS et al., 2004; WALLIMANN et al., 1992).

Foi demonstrado que a suplementação com creatina monohidratada proporciona uma melhoria significativa em atividades de alta intensidade, ao aumentar os níveis intramusculares de Cr total (TCr) para cerca de 145 a 160 mmol/kg de peso seco (GREENHAFF et al., 1994), bem como proporcionar um aumento da ressíntese PCr durante a recuperação (WILLIAMS et al., 2000). A melhoria do desempenho é tanto maior quanto for o aumento destes níveis, ou seja, quanto maior for a diferença pré/pós-suplementação (GREENHAFF et al., 1994), o que explica o maior efeito ergogênico verificado em indivíduos vegetarianos, que não consomem Cr na dieta (BURKE et al., 2003; LUKASZUK et al., 2002). Além da utilização no meio esportivo, com vistas à melhoria do desempenho, a suplementação de Cr tem se mostrado com grande relevância clínica, auxiliando o tratamento de doenças como artrite, insuficiência cardíaca congestiva, distrofia muscular (síndrome muscular de Duchenne), doença de McArdle, doenças mitocondriais e doenças neurológicas (PERSKY et al., 2003).

Figura 3 - Representação esquemática das principais funções do sistema PCr/CK nos diferentes tipos de fibras musculares.



Diferenças do sistema de acoplamento funcional da CK com as ATPases citosólicas, representada aqui pela miosina ATPase no sarcômero. A) fibras glicolíticas; B) fibras oxidativas e miocárdio.

1.1.4 Efeito da suplementação de creatina sobre o desempenho e função contrátil

Exercícios de alta intensidade e curta duração dependem em grande parte do sistema da fosfocreatina para a geração de ATP (GREENHAFF, 1997; WILLIAMS, 2000). Sua bem conhecida função de tampão energético temporal estimulou o desenvolvimento de estudos avaliando os efeitos da suplementação de Cr sobre o conteúdo intramuscular deste metabólito e consequente impacto sobre o desempenho nestes tipos de atividade. De fato, conforme citado anteriormente, a suplementação oral de Cr é eficaz em promover um aumento intramuscular de Cr total (Cr livre e PCr) de cerca de 20% (OP'T EIJNDE et al., 2001). Os primeiros estudos utilizaram atividade de alta-intensidade em cicloergômetro por 10 a 30 s e demonstraram melhora da potência desenvolvida (BIRCH et al., 1994; CASEYet al., 1996; GREENHAFF et al., 1996).

Posteriormente, Volek et al. (1999) utilizaram 19 indivíduos saudáveis e os submeteram de forma randomizada a um protocolo de treinamento de força por 12 semanas com ou sem a suplementação de Cr. O grupo suplementado apresentou maiores aumentos de força em membros superiores (16 % vs 24%) e inferiores (24% e 32%). Além disso, a suplementação de Cr promoveu maiores aumentos na área de secção transversa em todos os tipos de fibras musculares (I, IIa e IIab). Outros estudos corroboraram estes achados, indicando que a suplementação de Cr poderia ser uma estratégia favorável para maximizar os ganhos de força e hipertrofia musculares em resposta ao treinamento (BECQUE et al., 2000; IZQUIERDO et al., 2002; JACOBS et al., 1997; KREIDER et al., 1998; MUJIKA et al., 2000; PEARSON et al., 1999; VANDENBERGHE et al., 1997; VOLEK et al., 1997;). Em contrapartida, outros estudos falharam em demonstrar efeitos ergogênicos da suplementação de Cr em humanos (BIWER et al., 2001; BURKE et al., 1996; DELECLUSE et al., 2003; FINN et al., 2001; FRANCAUX; POORTMANS, 1999; GILLIAM et al., 2000; SNOW et al., 1998; WILDER et al., 2001).

Além de seus possíveis efeitos sobre a função contrátil, a suplementação de Cr pode oferecer outros efeitos terapêuticos para o tratamento de distúrbios neuromusculares, neurológicos e metabólicos, dentre eles: aumento da ativação de células satélites (OLSEN et al., 2006), aumento da expressão do transportador de

glicose GLUT-4 (JU et al, 2004; OP 'T EIJNDE et al., 2001), aumento da expressão do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (DELDICQUE et al., 2005). Além disso, são relatados também efeitos antioxidante (LAWLER et al., 2006; MATTHEWS et al., 1998; SESTILI et al., 2006) e neuroprotetor da suplementação de Cr (YANG et al., 2009). Algumas destas ações serão discutidas em detalhes posteriormente.

1.1.5 Creatina e estresse oxidativo

Além de sua utilização no meio desportivo, a suplementação de Cr tem se mostrado uma estratégia benéfica no tratamento de algumas doenças crônicas como artrite, insuficiência cardíaca, distrofia muscular, doença de McArdle, doenças mitocondriais a distúrbios neurológicos (revisado por PERSKY et al., 2003 e TARNOPOLSKY, 2011). A maior parte destas doenças envolve um aumento do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, hidróxido de hidrogênio e radical hidroxil.

A produção de EROs pode exercer importantes funções no controle do metabolismo celular, como, por exemplo, promover adaptações favoráveis sobre o metabolismo lipídico e glicolítico em resposta ao treinamento físico (ADHIHETTY et al., 2003; PINHEIRO et al., 2010; SILVEIRA et al., 2006). Entretanto, o conteúdo elevado e constante de EROs no músculo esquelético é tóxico, infligindo dano celular e prejuízo no processo regenerativo (ROCHARD et al., 2000; SESTILI et al., 2009). Desta forma, o controle adequado da produção e inativação de EROs se faz importante.

Matthews et al. (1998) demonstraram pela primeira vez que a suplementação com Cr atenua a geração de radical hidroxil e peroxinitrito em ratos submetidos a administração crônica de ácido nitropropiônico, um modelo animal de doença de Huntington. Curiosamente, quando o N-acetil-cisteína (NAC), um potente antioxidante, foi utilizado neste modelo, os resultados foram similares (FONTAINE et al., 2000).

Lawler et al. (2002) utilizaram um sistema *cell-free* para demonstrar uma possível ação *scavenger* da Cr em diversas espécies reativas. Os autores sugeriram que a ação antioxidante da Cr poderia ser responsável por parte dos efeitos

ergogênicos da suplementação de Cr em atletas, como redução da fadiga muscular. Posteriormente, Sestili et al. (2006) utilizaram diferentes linhagens celulares, todas expressando o transportador de Cr, tratando-as com diferentes agentes geradores de espécies reativas (H_2O_2, tert-butil-hidroperóxido - tBOOH e peroxidonitrito). Tais agentes promoveram citotoxidade de moderada a severa. A pré-incubação com diferentes concentrações de Cr (0,1 a 10 mM) exerceu uma ação citoprotetora moderada, porém significante, de forma dose-dependente. Efeitos antioxidantes da suplementação de Cr na musculatura esquelética em condições *in vivo*, entretanto, ainda não haviam sido demonstradas.

1.2 O EIXO GH-IGF-I

1.2.1 Hormônio do crescimento

A secreção de hormônios da hipófise anterior (adenohipófise) é controlada pela produção hipotalâmica de hormônios liberadores e inibidores. No caso do GH, o hipotálamo produz GHRH (hormônio liberador de hormônio do crescimento), que chega à hipófise através de uma rede capilar que atravessa a eminência média e alcança a hipófise (NUNES, 2008). O GHRH liga-se a seu receptor na membrana dos somatotrofos, o que induz à síntese e secreção de GH (LARSEN et al., 2002; LAYCOCK; WISE, 1996). A somatostatina produzida pelo hipotálamo promove uma ação inibitória sobre a secreção de GH, enquanto que a grelina produzida no estômago e também no hipotálamo estimula a secreção do hormônio. O GH é secretado de forma pulsátil, com pulsos ocorrendo a cada 2 ou 3 horas e variando em amplitude. Os maiores pulsos ocorrem durante a noite, sendo associados com o estágio IV do sono, tipicamente nas fases iniciais do ciclo de sono (HARTMAN et al., 1991; MAHESHWARI et al., 2002; WINER et al., 1990).

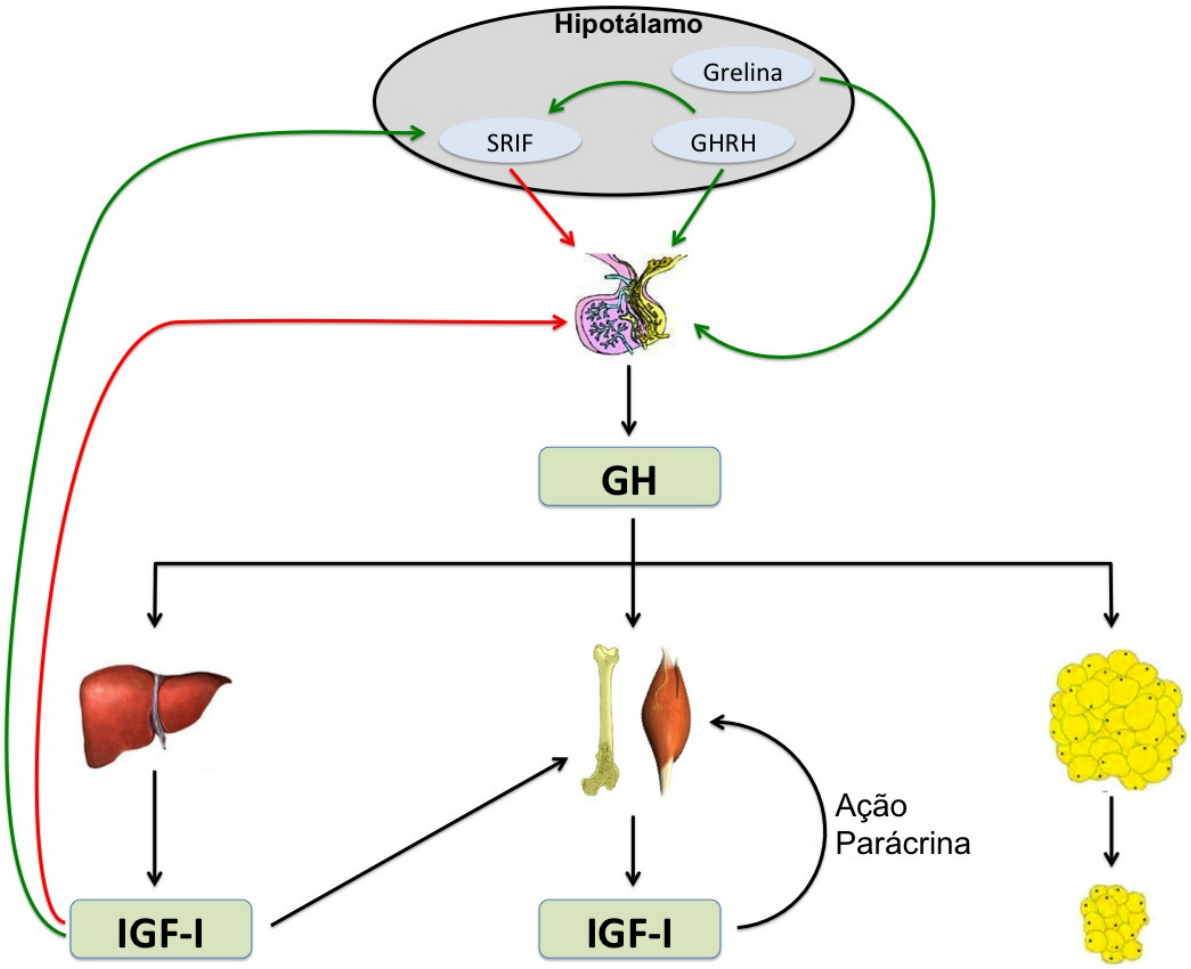
A principal isoforma de GH produzida pelos somatotrofos na adeno-hipófise é uma proteína de cadeia simples que, em humanos, consiste de 191 aminoácidos (BAUMANN, 1991). É sintetizado principalmente na forma de 22 kDa, mas outras isoformas, menos abundantes, também são expressas, como a de 20 kDa que representa aproximadamente de 5 a 10% da concentração total do GH (BAUMANN, 1991). Inicialmente é produzia uma molécula precursora de 27 kDa que é clivada à

forma final, e então armazenada em vesículas no interior dos somatotrofos para secreção posterior (LAYCOCK; WISE, 1996).

A ação do GH inicia-se com a ligação a seu receptor (GHR) nos tecidos-alvo. O GHR pertence à superfamília classe I dos receptores de citocina (BROOKS; WATERS, 2010), sendo particularmente abundante no fígado, mas também expresso em outros tecidos de forma ubíqua (MERTANI et al., 1995). O GH atua especialmente através da via da JAK-STAT, apesar de outras vias também serem ativadas pelo hormônio (BROOKS et al., 1989; LANNING; CARTER-SU, 2006).

As principais ações do GH dizem respeito à promoção do crescimento linear e regulação do metabolismo. Seus efeitos sobre o crescimento se dão especialmente pelo estímulo da síntese protéica, ocorrendo através do estímulo à produção de fatores de crescimento, dentre os quais o IGF-I. Estes são produzidos pelos tecidos-alvo, como osso e músculo, bem como pelo fígado, sendo este tecido o responsável pela secreção e elevação da concentração sistêmica destes fatores de crescimento (LARSEN et al., 2002; NUNES, 2008). Apesar de aparentemente menos importante para o crescimento muscular, o GH exerce também ação direta sobre a síntese protéica muscular. A figura 4 resume as ações e os mecanismos regulatórios sobre o GH.

Figura 4 - Representação do controle da secreção de GH e seus principais tecidos-alvo.



Setas verdes indicam estimulação; setas vermelhas indicam inibição.

1.2.2 Fator de crescimento semelhante à insulina I

Camundongos transgênicos que super-expressam IGF-I apresentam hipertrofia muscular, atenuação da atrofia relacionada à idade e melhoria da força muscular (BARTON-DAVIS et al., 1998; FIOROTO et al., 2003). Um mecanismo envolvido parece ser o aumento da replicação das células satélites e, conseqüentemente, do número de mionúcleos, evidenciado pelo aumento do conteúdo total de DNA (FIOROTO et al., 2003). Desta forma, está bem estabelecido que este hormônio exerce ação anabólica no músculo esquelético, levando à hipertrofia das fibras musculares.

Foi demonstrado que a hipertrofia de miotúbulos *in vitro* induzida por IGF-1 depende da via de sinalização celular iniciada pela PI3K e Akt, que leva à ativação da mTOR. Alvos desta proteína são a p70s6k e a 4E-BP1, envolvidas na etapa de iniciação da tradução. Desta forma, este hormônio promove a síntese protéica, ao estimular o início da tradução. Rapamicina, um inibidor seletivo da mTOR, bloqueou a hipertrofia e todos os modelos experimentais testados, sem causar atrofia em músculos controle. Em contrapartida, a inibição da via da calcineurina não bloqueou a hipertrofia nestes modelos (BODINE et al., 2001). Além de ativar a mTOR, o IGF-I, bem como a insulina, também ativam a via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), conforme ilustrado na figura 3.

A administração de IGF-I a animais em jejum provocou a inibição da expressão de proteínas envolvidas na proteólise dependente de proteassoma, que se mostrou elevada nos animais não tratados. Além disso, a adição deste hormônio inibiu a expressão destas proteínas também em células musculares em cultura submetidas a altas doses de glicocorticóides (DEHOUX et al., 2004). Assim, o IGF-I, além de seus efeitos anabólicos, atua também inibindo o processo de degradação protéica, via sistema ubiquitina-proteassoma, uma vez que a Akt modula a transcrição de ubiquitinas-ligases ao regular a translocação nuclear dos fatores de transcrição FoxO1 e FoxO3. Quando fosforilado pela Akt, as proteínas FoxO ficam retidas no citosol, permanecendo incapazes de estimular a transcrição de atrogin-1 e MuRF1, que são proteínas-chave no processo de proteólise dependente de proteassoma (FAVIER et al., 2008).

O IGF-I é produzido por diversos tecidos, em especial pelo fígado e músculo esquelético, e é importante para o desenvolvimento tanto embrionário quanto pós-natal (BAKER et al., 1993). O IGF-1 é capaz de estimular a proliferação, diferenciação e fusão das células satélites, apresentando-se assim possivelmente como um importante mediador da resposta ao treinamento de força. De fato, a expressão gênica do IGF-1 se relaciona com a hipertrofia das fibras musculares (ADAMS; HADDAD, 1996) e se mostrou elevada 48 horas após uma sessão de treinamento de força para membros inferiores (BAMMAN et al., 2001).

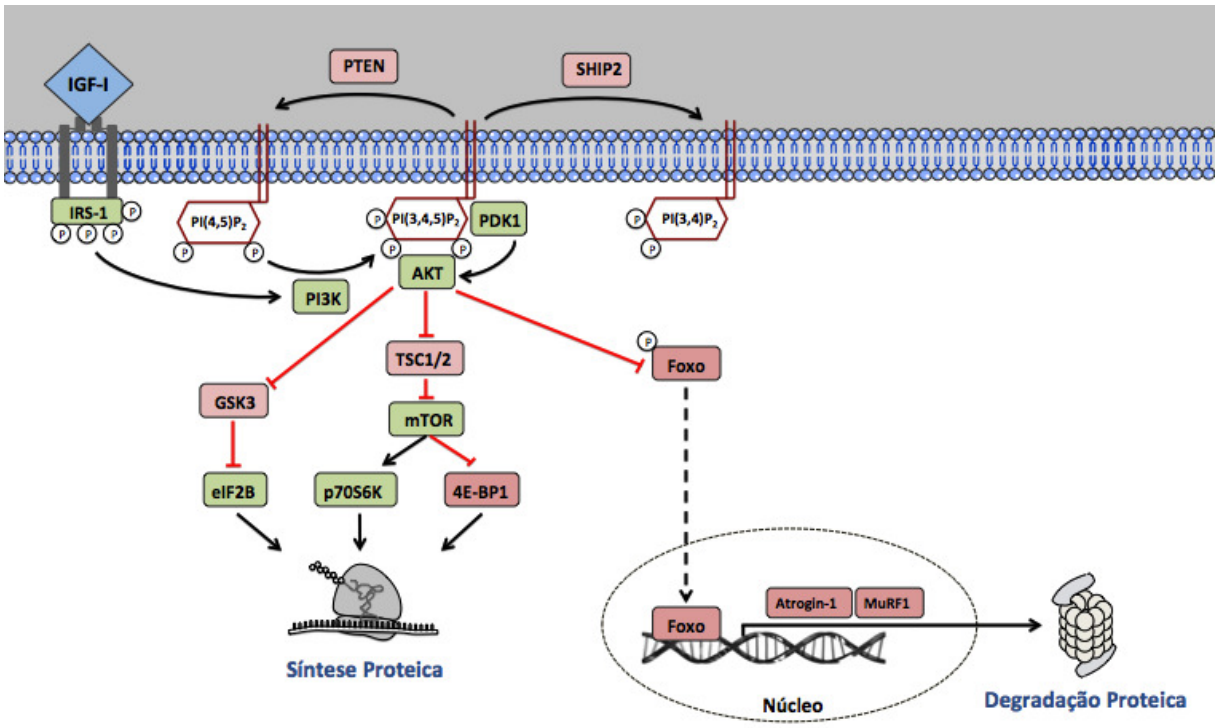
Mais recentemente, foi identificada uma isoforma expressa pelo músculo esquelético, processada através de *splicing* alternativo do gene do IGF-I. Esta isoforma, denominada de MGF (*mechano growth factor*) é expressa quando o

músculo é submetido à sobrecarga (GOLDSPINK, 2003), ou seja, é regulada por sinais mecânicos. A isoforma hepática, que também é produzida pelo músculo, é denominada IGF-1Ea (GOLDSPINK et al., 2006).

Apesar de o aumento da do IGF-1 no músculo esquelético ser suficiente para promover a hipertrofia (ADAMS; McCUE, 1998; MUSARO et al., 2001), o IGF-I proveniente do fígado não parece ser determinante para a hipertrofia muscular, como demonstrado por Yakar et al. (1999). Estes autores utilizaram camundongos transgênicos que não expressavam IGF-I hepático e, apesar da concentração plasmática bastante reduzida desse hormônio, não tiveram prejuízo no crescimento. Goldberg (1967) também já havia demonstrado que a hipertrofia muscular em resposta à tenotomia de músculos agonistas (modelo de hipertrofia compensatória) ocorria mesmo em animais hipofisectomizados que, desta forma, não produziam GH. E ainda, foi demonstrado que a administração de GH e/ou IGF-I não parece ser um estímulo eficaz para o aumento de massa muscular na ausência de sobrecarga mecânica (ALLEN at al., 1997; RENNIE, 2003; DOESSING et al., 2009).

A ligação do IGF-I a seu receptor resulta no recrutamento do substrato do receptor de insulina (IRS-1), na ativação da proteína quinase dependente de fosfatidil-inositol (PI3K) e, finalmente, da Akt (também chamada de PKB). A ativação da via intracelular da PI3K-Akt leva ao estímulo da síntese proteica e redução da proteólise no músculo esquelético através das proteínas mTOR e FoxO, respectivamente (figura 5). Estas vias de sinalização serão discutidas com maiores detalhes na sequência.

Figura 5 - Representação da vias sinalização desencadeadas pelo IGF-1 relevantes para o estímulo da síntese e inibição da degração proteica.



Proteínas que induzem a hipertrofia muscular são mostradas em verde, enquanto que as que inibibem a hipertrofia ou induzem a atrofia muscular são mostradas em vermelho.

1.3 PLASTICIDADE MUSCULAR-ESQUELÉTICA

O músculo esquelético tem sua forma e função alteradas em resposta a diversos estímulos que modificam a atividade contrátil (exercício, estimulação elétrica, desnervação), carga imposta sobre os músculos (exercícios com sobrecarga, microgravidade), suprimento de substratos (intervenções nutricionais) ou fatores externos como hipóxia e estresse térmico (FLUCK & HOPPELER, 2003). Os avanços nas técnicas de biologia molecular têm permitido a melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da plasticidade muscular, ou seja, de como este tecido se adapta às diferentes demandas impostas a ele (GOLDSPINK, 2003).

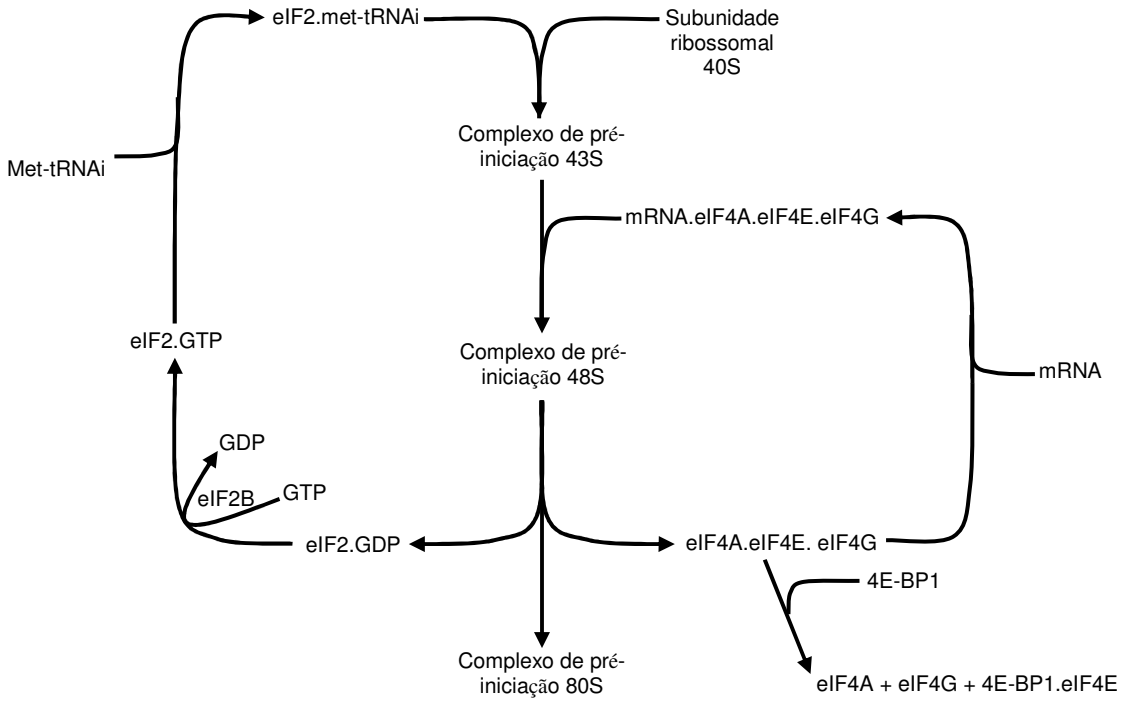
1.3.1 Controle traducional da síntese protéica

A modificação no conteúdo protéico e na constituição de diferentes isoformas de proteínas musculares durante um evento adaptativo pode ser controlado por intervenções em vários níveis, desde o DNA, até os produtos da tradução do mRNA, as proteínas. O ganho ou perda de proteínas no músculo esquelético é determinado pelo balanço entre dois processos opostos: síntese e degradação protéica.

Dentre as etapas da síntese protéica, um passo fundamental é a tradução do mRNA em proteína. Este é um processo complexo que se divide em três etapas: a) iniciação, na qual o metionil-tRNA iniciador (met-tRNAi - RNA transportador contendo o primeiro aminoácido, Metionina, da cadeia polipeptídica a ser formada) e o mRNA são ligados às subunidades ribossomais 40S e 60S; b) alongamento, o passo no qual os aminoácidos são incorporados à cadeia peptídica nascente; e c) terminação, quando o peptídeo completo é liberado do ribossomo. Estas etapas dependem de proteínas conhecidas como fatores de iniciação eucarióticos (eIFs), fatores de alongamento e fatores de liberação (JEFFERSON et al., 2001; KIMBALL et al., 2002).

A iniciação da tradução é um processo que envolve a interação de ao menos 12 fatores de iniciação, met-RNAi, mRNA, subunidades ribossomais e nucleotídeos ATP e GTP (figura 6). De todos os passos da iniciação, dois são regulados de forma especialmente importante. O primeiro é a ligação do met-tRNAi à subunidade ribossomal 40S, que é mediada pelo eIF2 e regulada por modificações na atividade de troca de guanina-nucleotídeo da eIF2B. O segundo passo regulatório é a ligação do mRNA à subunidade 40S e envolve proteínas eIF4. Grau de fosforilação de fatores como eIF4E, eIF4G e 4E-BP1 regulam esta etapa da iniciação. (JEFFERSON et al., 2001).

Figura 6 - Etapas do início da tradução gênica, mostrando os principais fatores de iniciação (eIFs) envolvidos na regulação desta etapa da síntese protéica.



Foi demonstrado que em ratos diabéticos há um declínio na taxa de síntese protéica muscular em conseqüência da diminuição da iniciação da tradução, devido a uma diminuição na atividade da eIF2B, e inibição da ligação do mRNA ao complexo de iniciação 43S, através da fosforilação da 4E-BP1, aumentando a disponibilidade de eIF4E ativa. O tratamento destes animais com insulina rapidamente restaura a taxa de tradução para valores iguais aos de animais controle (KIMBALL et al., 2002). Algumas intervenções, como a administração de aminoácidos, hormônios e o treinamento de força ativam vias de sinalização que ativam os fatores de iniciação da tradução, levando a um aumento do processo de síntese protéica (BAAR; ESSER, 1999; BODINE et al., 2001; WILKINSON et al., 2008). Desta forma, modificações no ritmo desta etapa da tradução do mRNA podem resultar no aumento ou declínio da taxa de síntese protéica e, conseqüentemente, na hipertrofia ou atrofia musculares.

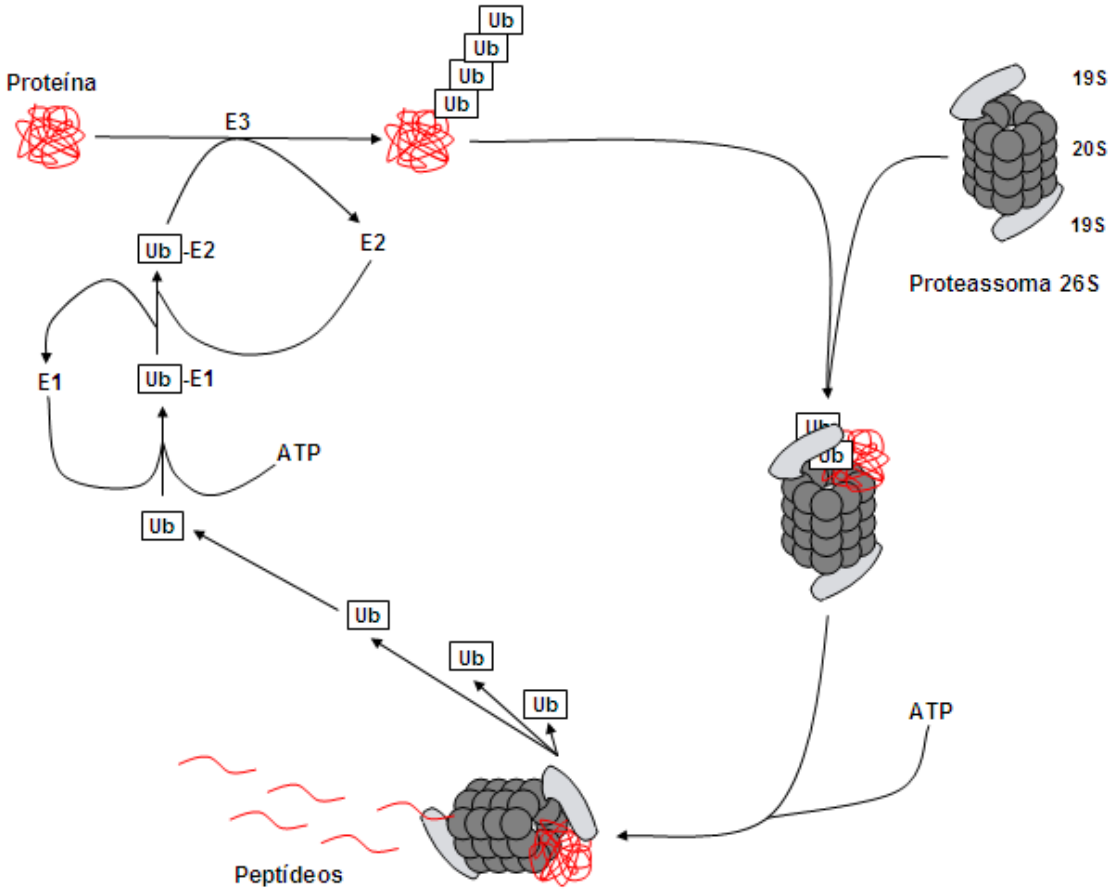
1.3.2 Papel do sistema ubiquitina-proteassoma na atrofia muscular

O sistema ubiquitina-proteassoma é o sistema proteolítico mais recentemente descoberto, sendo dependente de ATP. A vasta maioria das proteínas celulares é degradada através deste sistema (CAO et al., 2005). Este processo proteolítico envolve a participação de um complexo enzimático denominado proteassoma 26S, formado por 2 subunidades regulatórias (19S) e uma subunidade catalítica (20S). A subunidade 19S reconhece proteínas "marcadas" com uma cadeia de ubiquitina, um peptídeo de 76 aminoácidos (CIECHANOVER, 2005).

Três componentes enzimáticos são necessários para ligar a cadeia de ubiquitina nas proteínas destinadas à degradação: as enzimas E1 (ativadora de ubiquitina) e E2 (proteínas conjugadoras de Ub) preparam a Ub para conjugação, enquanto que as E3 (Ub-ligases), as enzimas-chave do processo, liga a Ub à proteína, que é então reconhecida pelo proteassoma 26S, um complexo proteolítico multi-unidades e multi-catalítico que degrada as proteínas ubiquitinadas em fragmentos menores (figura 7; CAO et al., 2005; CIECHANOVER, 2005).

Existe apenas uma proteína E1, algumas E2, e milhares de E3. Desta forma, esta última é o componente que confere especificidade ao sistema (CAO et al., 2005). Das diversas ubiquitina-ligases conhecidas, está bem estabelecido na literatura que atrogin-1 (MAFbx) e MuRF-1 têm grande importância no processo de atrofia muscular (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001, JONES et al., 2004; LECKER et al., 1999a; 1999b; 2004). A ubiquitinação das proteínas é um processo reversível. Enzimas desubiquitinadoras desempenham um importante papel na proteólise ubiquitina-dependente, catalisando a remoção da Ub das proteínas, livrando-as da degradação (KIM et al., 2003). Importante ressaltar que a ubiquitinação pode servir como sinal para outros processos celulares que não o reconhecimento pelo proteassoma. Este identifica principalmente cadeias de poliubiquitinas ligadas entre sí através da Lisina 47 (CIECHANOVER, 2005).

Figura 7 - Sistema ubiquitina-proteassoma.



Em condições que levam à atrofia muscular, desnervação, hipertireoidismo e sépse, a utilização de um inibidor de proteassoma (MG132) reduziu a proteólise muscular em 70%, 40-70% e 100%, respectivamente, demonstrando a importância do sistema ubiquitina-proteassoma em condições de intenso catabolismo protéico muscular (TAWA et al., 1997).

1.3.3 Papel do IGF-I da hipertrofia muscular

Conforme explicitado anteriormente, camundongos transgênicos que super-expressam IGF-I apresentam hipertrofia muscular, atenuação da atrofia relacionada à idade e melhoria na massa e força musculares (BARTON-DAVIS et al., 1998; FIOROTO et al., 2003), o que parece ser devido ao aumento da replicação das

células satélites e, conseqüentemente, do número de mionúcleos, evidenciado pelo aumento do conteúdo total de DNA (FIOROTO et al., 2003).

Foi demonstrado que a hipertrofia de miotúbulos *in vitro* induzida por IGF-I depende da via iniciada pela PI3K e Akt, que leva à ativação da mTOR. Foi demonstrado que animais transgênicos que possuíam uma forma da Akt constitutivamente ativa expressa condicionalmente na musculatura esquelética apresentaram aumento de cerca de 100% na área média das fibras musculares após 2 a 3 semanas (LAI et al., 2004). As proteínas p70s6k e a 4E-BP1 são alvos da mTOR. Desta forma, o IGF-I promove a síntese protéica, ao estimular a síntese de proteínas ribossomais e a etapa de início da tradução. Rapamicina, um inibidor seletivo da mTOR, bloqueou a hipertrofia em todos os modelos experimentais testados, sem causar atrofia em músculos controle. Em contrapartida, a inibição da via da calcineuria não bloqueou a hipertrofia nestes modelos (BODINE et al., 2001).

A administração de IGF-I a animais em jejum provocou a inibição da expressão de atrogin-1, que se mostrou elevada nos animais não tratados. Além disso, a adição deste hormônio inibiu a expressão desta ubiquitina-ligase também em células musculares em cultura submetidas a altas doses de glicocorticóides (DEHOUX et al., 2004). Assim, o IGF-I, além de seus efeitos anabólicos, parece atuar também inibindo o processo de degradação protéica, via sistema ubiquitina-proteassoma.

Bodine et al. (2001) demonstraram que durante a atrofia muscular por desuso ou desnervação há um prejuízo na tradução e, conseqüentemente, na síntese protéica, com o aumento da fosforilação da 4E-BP1 e queda na associação da eIF4E com a eIF4G, além diminuição da atividade da mTOR e S6K1. O contrário foi verificado nos músculos submetidos a estímulos de sobrecarga durante 14 dias, que levou à hipertrofia das fibras musculares. Em conjunto, estes dados mostram que em condições de diminuição ou aumento de demanda funcional do músculo esquelético – como no desuso ou treinamento, respectivamente – estas vias de síntese e degradação protéicas são importantes moduladores dos processos de remodelamento do tecido muscular.

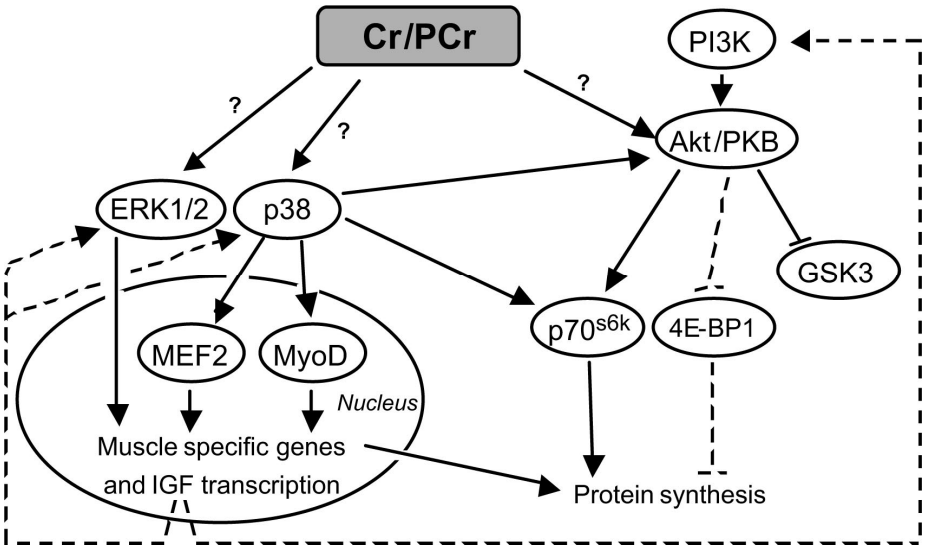
1.4 CREATINA E METABOLISMO PROTÉICO MUSCULAR

Em humanos, ganhos no desempenho em exercícios de força e potência, bem como ganho de massa muscular têm sido atribuídos à suplementação de Cr (BALSOM et al., 1995; GREEN et al., 1996; KREIDER et al., 1998; VANDENBERGHE et al., 1997; VOLEK et al., 1999). Buscou-se então avaliar os mecanismos celulares pelos quais esta suplementação poderia influenciar no aumento da síntese protéica e hipertrofia muscular. Ingwall, já na década de 70, demonstrou o efeito da Cr na síntese protéica muscular. Células de músculo esquelético e cardíaco, quando incubadas com creatina, apresentaram maior incorporação de leucina marcada à cadeia pesada da miosina (MHC). Além disso, o conteúdo protéico total mostrou-se elevado, após 2 a 4 dias de incubação com 5 mM de Cr (INGWALL et al., 1972; 1974; INGWALL & WILDENTHAL, 1976). Posteriormente, Vierck et al. (2003) mostraram que a fusão de células satélites miogênicas é aumentada quando creatina é adicionada ao meio durante a fase de diferenciação. Mais estudos são necessários para determinar a importância da creatina em condições *in vivo.*

Louis et al. (2004) incubaram células musculares C_2C_{12} com Cr, e verificaram um aumento da expressão do mRNA do IGF-I a partir de 24 horas, alcançando um aumento de 3,7 vezes após 72 horas. Além disso, houve hipertrofia das fibras musculares, evidenciada pelo aumento do diâmetro das fibras em cerca de 40% e aumento no conteúdo protéico total nos miotúbulos. Além do IGF-I, fatores de regulação da miogênese (MRFs – MyoD, Myf-5, MRF-4 e miogenina) tiveram sua expressão aumentada, o que já havia sido demonstrado anteriormente em outros estudos (HESPEL et al., 2001; WILLOUGHBY; ROSENE, 2003). Deldicque et al. (2007), também utilizando células C_2C_{12}, verificaram aumento da diferenciação, com maior incorporação de metionina marcada em proteínas sarcoplasmáticas (+ 20%) e miofibrilares (+ 50%) quando incubadas com 5 mM de creatina. Além disso, a expressão de MHC-II, troponina T e titina mostraram-se significativamente aumentadas. A Cr causou aumento da fosforilação da Akt em ~60%, GSK-3 em ~70%, p70s6k em ~50% e p38 em ~50%. O aumento da expressão de MHC-II não foi abolido quando se utilizou um inibidor do receptor de IGF-I, indicando que a ação da Cr não ocorre exclusivamente via aumento de IGF-I. Conforme discutido

anteriormente, estas proteínas estão envolvidas no processo de síntese protéica e, conseqüentemente, da hipertrofia muscular. O mesmo autor, entretanto, não conseguiu reproduzir estes resultados em experimento *in vivo* com humanos (DELDICQUE et al., 2008). Um resumo do modelo hipotético da ação da creatina nas vias de sinalização no músculo esquelético está representado na figura 8. É digno de nota que, até o momento, os dados literatura que comprovam este modelo são escassos.

Figura 8 - Modelo hipotético para a sinalização desencadeada pela creatina.



As linhas sólidas representam o efeito, enquanto as linhas tracejadas indicam ações não descritas à creatina.
Fonte: Deldicque et al. (2007).

Em humanos, a suplementação com Cr monohidratada também foi capaz de regular as concentrações de IGF-I. A suplementação resultou num aumento do mRNA de IGF-I muscular em repouso. Após uma sessão de exercício, a expressão também se mostrou elevada, mas sem diferença significativa entre o grupo suplementado e placebo (DELDICQUE et al., 2005). Já Burke et al. (2008) também verificaram que o exercício, independente da suplementação, foi eficaz em elevar o conteúdo de IGF-I muscular (+54%). Entretanto, o grupo que recebeu a suplementação com creatina monohidratada apresentou um aumento significativamente maior no conteúdo deste hormônio (+67%).

Menezes et al. (2007) administraram creatina monohidratada, dexametasona, ou ambos, a ratos adultos. O tratamento com dexametasona ocasionou atrofia de fibras musculares do tipo I, IIa e IIb, bem como um declínio no desempenho em exercício em esteira. A suplementação com Cr atenuou a diminuição da massa muscular e do desempenho em exercício provocada pelo hormônio. Também em um protocolo de atrofia muscular induzida por imobilização, em ratos, a suplementação foi capaz de reduzir a perda de massa muscular de forma significativa (AOKI et al., 2004). Entretanto, na literatura não se encontram dados referentes à ação da creatina sobre a atividade dos diferentes sistemas proteolíticos, e os referentes ao efeito desta sobre as vias de sinalização que levam ao aumento da síntese protéica ainda são escassos. Desta forma, o estudo das vias de sinalização poderia auxiliar na melhor compreensão dos efeitos anabólicos, bem como sobre o desempenho, atribuídos à utilização da Cr.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de curto prazo com Cr sobre diversos parâmetros da função muscular, investigando alterações celulares e moleculares que auxiliem na compreensão de tais efeitos, como a morfologia do músculo esquelético, atividade do eixo GH-IGF-I, vias de sinalização que regulam a síntese e degradação protéica muscular e potencial antioxidante.

3 JUSTIFICATIVA

Conforme discutido anteriormente, a atrofia muscular é observada em diversas situações como no câncer e caquexia, AIDS, imobilização, disfunções hormonais (como nas disfunções tireoidianas, diabetes e síndrome de cushing) e no envelhecimento. Acompanhado a isto, observa-se a redução da função muscular. Nestas situações, o processo de perda de massa muscular está diretamente relacionado à qualidade de vida e à sobrevida dos pacientes. Desta forma, intervenções farmacológicas, nutricionais ou terapêuticas se fazem importantes para diminuição da morbidade em situações de intenso catabolismo protéico muscular onde a função muscular é comprometida. O potencial terapêutico da suplementação com Cr vem sendo amplamente estudado em uma ampla gama de doenças e modelos experimentais, mas suas ações ainda não são completamente estabelecidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados ratos machos, da cepa Wistar, com 200 a 250 g, mantidos num ciclo claro/escuro de 12/12 h, aclimatados a 23°C, onde permaneceram em gaiolas coletivas (máximo de cinco animais por gaiola) com alimentação e água à vontade. O biotério no qual os animais foram mantidos situa-se no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

A suplementação de Cr foi feita por sonda intragástrica (gavagem) por 6 dias, sendo a dose total (5 $g.kg^{-1}.dia^{-1}$) dividida em 3 administrações diárias para evitar desconforto gastrintestinal (às 8:00, 13:00 e 18:00 hrs). Este protocolo de suplementação mostrou-se eficaz no aumento do conteúdo intramuscular de Cr total, além de exercer ações sobre a massa e função musculares (AOKI et al, 2004; BASSIT et al, 2010). Os animais controle receberam apenas água, nos mesmos horários, de forma a igualar as condições de tratamento.

4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

O sangue foi coletado imediatamente após o sacrifício, heparinizado, centrifugado e o plasma estocado a –20ºC para posteriores dosagens. Parte dos músculos sóleo e EDL, a hipófise e parte do fígado foram rapidamente removidos e imediatamente colocados em solução apropriada para extração do RNA e proteínas totais.

O músculo sóleo expressa predominantemente a isoforma I da cadeia pesada da miosina (MHC-I), que apresenta baixa atividade ATPásica, o que confere a esse músculo menor velocidade de contração (fibras lentas). Apresenta elevada capacidade oxidativa, com alta expressão de Mioglobina e enzimas mitocondriais (DOS SANTOS et al., 2001). Ao contrário, o EDL expressa mais a MHC-II que, apresenta elevada atividade ATPásica, conferindo maior velocidade de contração a este músculo. Ele é considerado um músculo glicolítico, apresentando poucas mitocôndrias, baixa expressão de mioglobina e de enzimas oxidativas (DOS

SANTOS et al., 2001). Foi nosso objetivo verificar se a administração de creatina promoveria efeitos diferenciais nesses dois tipos particulares de músculo esquelético.

4.3 DADOS MORFOMÉTRICOS

Os animais e as amostras de sóleo, EDL e coração foram pesados para determinação do peso corpóreo total e peso úmido dos músculos. Posteriormente, os músculos também foram desidratados em estufa a 38°C por 48 horas, a fim de se determinar o grau de hidratação celular.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

A análise funcional do músculo esquelético foi realizada através de eletroestimulação do tríceps sural, sóleo e EDL avaliada por meio de um transdutor de força.

Os animais anestesiados tiveram suas patas traseiras fixadas em uma plataforma de acrílico. A pata estimulada foi colocada a um ângulo de 60° da articulação do quadril, 60 ° da articulação do joelho e 90° da articulação do tornozelo. Um gancho foi colocado sob o tendão de Aquiles sendo conectado a um transdutor de força (*Grass Technologies, West Warwick, RI, USA*). Uma incisão de 2 mm foi feita na pele da região proximal lateral da coxa. O nervo ciático foi localizado e um eletrodo de prata acoplado a ele. Em seguida, a articulação do joelho foi estabilizada mecanicamente. Ajustou-se o comprimento de repouso do tríceps sural por tração mecânica para obter tensão máxima de contração muscular frente ao estímulo elétrico do nervo ciático pelo eletrodo de prata, que foi realizado utilizando-se o eletroestimulador *MultiStim System* D330 (*Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK*). A aquisição dos dados foi feita com o auxílio do *software* AqDados (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda) e sua análise é realizada com o auxílio dos *softwares* AqAnalysis (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda) e Microcal Origin™ (Microcal *Software*, Inc.). Para avaliar o sóleo e o EDL isoladamente, todos os músculos, com exceção do músculo de interesse, foram tenomectomizados.

4.4.1 Contração isotônica

4.4.1.1 Força máxima absoluta

A eletroestimulação foi realizada com freqüência de 1 HZ e duração de pulso de 500 µs. A voltagem ajustada para desenvolver força máxima de contração, sempre encontrada a 2 V. Foi realizada uma série de 3 contrações isotônicas e a força isotônica máxima foi calculada pela média de força (N) desenvolvida nas 3 contrações.

4.4.1.2 Força máxima relativa

A força isométrica máxima relativa foi calculada dividindo-se a força máxima absoluta obtida (N) pelo peso seco (g) do tríceps sural. A força máxima relativa é obtida em N / mg de tecido.

4.4.1.3 Velocidade de contração e relaxamento muscular

O período de tempo para atingir o pico de força (do inglês *time to peak* – TTP) foi considerado o tempo decorrente (ms) para o músculo relaxado atingir máxima força contrátil após o estímulo elétrico, sendo considerado parâmetro relacionado à velocidade de contração muscular. O tempo para metade do relaxamento (do inglês *half relaxation time* – HRT) foi considerado o período decorrente (ms) para o músculo reduzir sua força contrátil em 50% da força máxima, mediante relaxamento devido ao desligamento do estímulo elétrico. *O* HRT foi considerado parâmetro de velocidade de relaxamento muscular.

4.4.1.4 Taxa de desenvolvimento de força

Foi calculada dividindo-se a força máxima de contração isotônica obtida pelo TTP, que é o tempo necessário para se desenvolver a força máxima. A taxa de desenvolvimento de força é obtida em N / ms.

4.4.2 Contração isométrica

4.4.2.1 Força máxima absoluta

A eletroestimulação foi realizada na voltagem necessária para se alcançar a força máxima (2V), a uma freqüência de 100 Hz e duração de pulso de 500 µs. Nessa freqüência existe um fenômeno rápido de somação de estímulos no tríceps sural, que determina a contração tetânica. O ensaio de tetania dura o período de tempo necessário para que a força tetânica seja reduzida quase que completamente, devido à fadiga, o que leva poucos segundos. A força isométrica máxima é considerada a tensão máxima exercida durante o ensaio de tetania.

4.4.2.2 Força máxima relativa

A força máxima relativa de contração isométrica (tetania) foi calculada dividindo-se a força isométrica máxima absoluta obtida (N) pelo peso seco (g) do músculo. A força isométrica máxima relativa é obtida em N / mg de tecido.

4.4.2.3 Tempo de sustentação da contração isométrica

O tempo de sustentação da contração isométrica foi considerado o período decorrente (ms), após atingir o pico de força, para o músculo reduzir sua força contrátil em 50% da força isométrica máxima, mediante relaxamento por fadiga durante o ensaio de tetania.

4.4.2.4 Contrações isométricas repetidas

Para avaliação do desempenho contrátil intermitente, fez-se 5 ou 10 contrações tetânicas máximas, intervaladas por 10 segundos. Verificou-se a queda da força a cada contração e a variação total de força (força final – força inicial).

4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Para a realização das análises histológicas, os músculos sóleo e EDL foram retirados cuidadosamente do animal anestesiado e submersos em um tubo contendo Isopentano por aproximadamente 30 seg para crioproteção do tecido. Posteriormente, foram cortados em criostato a temperatura de -20° C, fixados em lâminas histológicas de vidro gelatinizadas e armazenadas em freezer -80° C.

Foi realizada análise dos tipos de fibra musculares e secção de área transversa (AST) das fibras após a realização da histoquímica para ATPase no tecido. Este procedimento se iniciou submetendo metade das amostras a solução contendo 751 mg de glicina, 585 mg de NaCl, 860 mg de $CaCl_2$, 9 mL de NaOH 1M e completada com água destilada até o volume final de 180 mL em pH 10,3 (este é o tampão glicina). A outra parte das amostras é colocada em solução contendo 1,20 g de acetato de sódio, 94 mL de água destilada, 0,6 mL de ácido acético glacial, 530 mg de $CaCl_2$ e completado para volume final de 200 mL com água destilada e pH de 4,3 (este é o tampão acetato). O tempo no qual as amostras ficam nas respectivas soluções é de 10 min em temperatura ambiente.

Todas as amostras foram colocadas em solução contendo 133 mg de ATP em 80 mL do tampão glicina descrito anteriormente em pH de 9,5. Ficarão por 35 min em estufa a 37° C. Após este período, as lâminas são lavadas e submersas em solução de sulfeto de amônio 3,5% por 3 min e fechadas com lamínulas.

Após este período, foi possível identificar os tipos de fibras musculares (I e II) por coloração distinta nas lâminas, que serão fotografadas em microscópio (aumento de 10x) para posterior análise da AST utilizando *software* específico (*Image Pro Plus*).

4.6 EXPERIMENTO *IN VITRO* COM CÉLULAS GH3

Células GH3 foram cultivadas em meio RPMI com Hepes e Bicarbonato de sódio, ambos 2 g/L, suplementado com L-glutamina 0,4 mM, Piruvato de Sódio 18 mM, 2ß-mercaptoetanol 192,5 nM, 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 100 µL/mL e penicilina 100 U/mL, sob uma atmosfera de 5% de CO_2 a uma temperatura de 37°C, até atingirem a confluência de aproximadamente 80%.

Para a avaliação dos efeitos da Cr sobre células somatotróficas, 5mM de Cr foram adicionados ao meio por 48 h, utilizando-se células sem Cr como controle (n = 6 por grupo). Ao final deste período, as proteínas totais foram extraídas e submetidas à análise da expressão proteica do GH conforme descrito posteriormente.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO mRNA

4.7.1 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada com base na metodologia de guanidina–fenol-clorofórmio e precipitação com isopropanol (MANIATIS et al., 1989).

Os músculos, hipófise e fígado foram removidos, colocados em 1,0 ml de solução D (4 M tiocianato de guanidina; 25 mM citrato de sódio, pH 7,0; 0,5 % lauril sarcosinato de sódio e 0,1 M 2-mercaptoetanol) e submetidos à homogeneização. O homogeneizado foi transferido para um tubo de 2,0 ml (eppendorf) e adicionado solução contendo: acetato de sódio 2 M, pH 4,0; fenol saturado em água e solução de clorofórmio- isoamil (49:1). Seguiu-se com incubação em gelo por 15 min e centrifugação a 10.000 g, por 20 min, em centrífuga refrigerada a 4º C.

Ao final da centrifugação, foram visualizadas três fases distintas. A fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para um outro tubo, adicionando-se igual volume de isopropanol a -20º C. Este material foi incubado por, no mínimo, uma hora à -20º C; fase em que se favorece a precipitação do RNA. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 g, a 4º C, por 20 min.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (RNA) dissolvido em solução D e em 1 volume de isopropanol a -20º C, seguindo-se incubação a -20º C por, no mínimo, uma hora. Após incubação, o tubo foi novamente submetido à centrifugação por 10 min, a 4º C, e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi ressuspenso em etanol 75 % e incubado por 15 min à temperatura ambiente e submetido à nova centrifugação a 10.000 g, por 5 min. O pellet foi submetido à secagem no Speed-Vac, e posteriormente dissolvido em 50 μL de água DEPC (dietilpirocarbonato, 0,1 %) e levado ao banho-maria, a 65º C por 15 min. Este material permaneceu

estocado a –80º C para uso posterior.

A concentração do RNA foi estimada por densidade óptica, através de espectrofotometria. Utilizou-se a absorbância a 260 nm para o cálculo de concentração do RNA, tendo como referência o valor de 40 μg/ ml para cada unidade de densitometria óptica. As amostras de RNA foram aliquotadas e liofilizadas no *Speed-Vac* para posterior utilização.

4.7.2 *Real-time* PCR

Para estimar a abundância dos valores relativos de mRNA dos diferentes genes utilizou-se o método de detecção em tempo real do produto do PCR pela quantificação de fluorescência avaliada pelo detector de seqüência Rotor Gene (*Quiagen*), baseado na metodologia corrente. As amplificações do RT-PCR foram executadas com 2 μl do produto da reação de transcrição reversa diluídos em um tampão de reação contendo: 5,00 μl de *SYBR Green (Invitrogen)*, 1,0 μl (10 μM) de cada *primer* (*sense* e *anti-sense*) e 1,00 μl de água MiliQ autoclavada. Todos os *primers* utilizados (tabela 1) foram otimizados para análise por *Real time RT-PCR* (temperatura de anelamento: 60º C) e estão listados na tabela 1. Os ciclos consistiram de duas fases: uma a 50 °C por 2 min (ativação da enzima) e outra a 95 °C por 10 min (desnaturação), seguidas por 45 ciclos de três fases: a primeira a 95 °C, por 20 seg (desnaturação), a segunda a 58 °C, por 30 seg (anelamento) e a terceira a 72 °C, por 30 seg (extensão).

Tabela 1: Primers utilizados para a avaliação da expressão gênica por *Real Time* PCR.

	Primers Sense (forward)	***Primers Antisense (reverse)***
GH	5'-GAGTTCGAGCG TGCCTACATTC-3'	5'-GCAGGAGAGCAGCCCATAGTTT-3'
IGF-I	5'-AAGCCTACAAAGTCAGCTCG-3'	5'-GGTCTTGTTTCCTGCACTT-3'
Akt1	5'-GCCCAAGCACCGTGTGACCA-3'	5'-GCGACCTGTGGCCTTCTCCT-3'
mTOR	5'-AGGGACCACTGTGCCAGAATCCA-3'	5'-TGAGAGAAATCCCGACCAGTGAGC-3'
Foxo1a	5'-GCCCAACCAAAGCTTCCCGC-3'	5'-ATGTTGCCTGCTCACTAACTCCTAGC-3'
MuRF-1	5'-GGACCGGCATGGGGTGTACG-3'	5'-TTTCTGCAGGGGCCGACTGG-3'
Atrogin-1	5'-CGGCACCTTCGTGAGCGACC-3'	5'-GTGCAGTATCCATGGCGCTCCT-3'
SOD1	5'-CCAGCGGATGAAGAGAGG-3'	5'-CCAATCACACCACAAGCC-3'
SOD2	5'-GACCTGCCTTACGACTATG-3'	5'-TACTTCTCCTCGGTGACG-3'
Catalase	5'-ATTGCCGTCCGATTCTCC-3'	5'-CCAGTTACCATCTTCAGTGTA G-3'
CreaT	5'-TCTCTGACCCTAGCCAAGGA-3	5'- GCTTGGAAGTGGAAGCCATA-3
GAPDH	5'-GATGGGTGTGAACCACGAGAAA-3'	5'-ACGGATACATTGGGGGTAGGA-3'
Ciclofilina	5'-GGATTCATGTGCCAGGGTGG-3'	5'-CACATGCTTGCCATCCAGCC3-3'

O ponto inicial do ciclo (CT) do *real-time* RT-PCR foi avaliado em triplicata para cada amostra. Os valores de CT correspondem ao número do ciclo do PCR e representam a intensidade da fluorescência emitida pelo produto do RT-PCR amplificado do gene alvo e são inversamente proporcionais ao conteúdo de mRNA da amostra. O valor da variação de CT (ΔCT) foi calculado subtraindo-se o valor do CT dos genes de interesse do valor do CT do gene usado como referência (Ciclofilina ou GAPDH). Para verificar a igualdade na quantidade de RNA total entre as amostras, todas elas foram normalizadas pela média da variação do valor de CT (ΔCT) dos animais controle, originando um valor chamado de $\Delta\Delta$CT. A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada usando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ e representadas em unidades arbitrárias (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA

Os músculos esqueléticos foram removidos e homogeneizados em 2,0 ml de solução de homogeneização (Tris base 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM, SDS 10%, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, ortovanato de sódio 10 mM) previamente aquecida em água fervente por 10 min no tubo Falcon de 50 ml por aproximadamente 8 segundos a 30.000 rpm. O homogeneizado foi transferido para um tubo de polipropileno, seguindo-se incubação por 15 minutos no gelo e centrifugação a 14.000 g, por 40 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido (fração citosólica), sendo utilizado para a dosagem de proteínas totais pelo método de *Bradford* (*Bio-Rad, Dye Reagent Concentrate*). As amostras, então, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas (*western blott*) a uma membrana de nitrocelulose, que após bloqueio com albumina (5%), foi incubada com anticorpo primário contra a proteína de interesse, seguido de lavagem com PBS e incubação com o anticorpo secundário especifico. A intensidade do sinal correspondente aos *blotts* é expressa em unidades arbitrárias (U.A.). A abundância dos sinais é estimado por meio de análise densitométrica (método semi-quantitativo), na qual a área correspondente ao sinal é integrada usando o programa *ImageJ*, sendo a intensidade relativa de cada banda avaliada pelo programa.

Para a avaliação da expressão protéica, utilizamos anticorpos para GH (*National Hormone and Pituitary Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Torrance, CA*) Akt total e fosforilada em resíduo Serina 473 (*Cell Signalling*) e 4E-BP1 total e fosforilada em resíduo Serina 65 (*Cell Signalling)*.

4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROs E POTENCIAL ANTI-OXIDANTE

4.9.1 Produção de EROs por músculos incubados

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada em músculos sóleo e EDL incubados. Com o animal sob anestesia, os músculos foram rapidamente removidos e imediatamente incubados em solução Krebs oxigenada

(95% O_2, 5% CO_2) na presença de 50 µM de reagente *Amplex® UltraRed* e 0,1 U/mL de HRP por 60 min. Na presença da peroxidase, o reagente *Amplex®* reage com H_2O_2 em estequiometria de 1:1 para produzir um produto fluorescente, a resorufina (ZHOU et al., 1997). A fluorescência deste produto é determinada em comprimento de onda de 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão). As mensurações de EROS normalizadas com a leitura de quantidade conhecida de H_2O_2 (10 µM – controle positivo) na presença ou ausência de catalase (300 U/mL), GPX (5 U/mL) e GSH (0,5 mM). Todas as medidas foram feitas em solução Krebs (1 mL) em pH 7,4 e temparatura de 37 ºC. O conteúdo de H_2O_2 foi calculado com base emu ma curva padrão e os resultados normalizados pelo peso dos músculos e expressos em percentagem do grupo controle, conforme descrito (PINHEIRO et al., 2010).

4.9.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas catalase e glutationa peroxidase (GPX) foram mensuradas conforme descrito anteriormente (AEBI, 1984; FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). Os músculos sóleo e EDL foram homogeneizados em 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0 com Polytron PT-3000 (Kinematica, AG, Littau, Switzerland). As amostras foram centrifugadas por 30 min a 13000rpm e 4°C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de atividade de ambas as enzimas.

A atividade da catalase foi determinada em espectrofotômetro através da mensuração da quebra do peróxido de hidrogênio a 30°C em 240 nm (AEBI, 1984). A atividade da GPX foi determinada como descrito por Flohé e Günzler (1984) através da taxa de oxidação do NADPH em espectrofotômetro em 340 nm a 37°C em solução contendo 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,15 mM de NADPH, glutationa redutase (0,24 U/mL) e 1 mM glutationa reduzida. A reação foi iniciada com a adição de t-butil hidroxiperóxido (1,2 mM).

4.9.3 Avaliação da atividade antioxidante direta da creatina

4.9.3.2 Efeito da creatina sobre o radical superóxido

Para a avaliação da ação da Cr sobre o radical superóxido, utilizamos solução Krebs oxigenada (95% O_2, 5% CO_2) e eletroestimulação elétrica (eletroestimulador *MultiStim System* D330 - *Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK*). Uma vez que a estimulação da solução Krebs promove a geração de radical superóxido, utilizamos diferentes concentrações de Cr (10, 20 e 40 mM) e mensuramos o conteúdo de H_2O_2 (formada a partir do radical superóxido) com o reagente *Amplex®* e HRP, conforme descrito anteriormente.

4.9.3.2 Efeito da creatina sobre o peróxido de hidrogênio

Para avaliar a ação direta da Cr sobre o H_2O_2, utilizou-se o *Amplex® UltraRed* e HRP conforme descrito anteriormente. Seguiu-se a leitura da fluorescência das seguintes condições adicionadas a 1 mL de tampão Krebs Ringer: a) *Amplex®* + HRP ("branco"); b) H_2O_2 (500nM) + *Amplex®* + HRP (controle); c) Creatina (10, 20 e 40 mM) + *Amplex®*+ HRP; e d) Creatina (10, 20 e 40 mM) + H_2O_2 (500nM) + *Amplex®* + HRP.

A condição "a" foi utilizada para determinar o ponto zero da curva ("branco"), a condição "b" é o controle, onde não há Cr para interagir com o H_2O_2 e, por fim, a condição "c" foi utilizada para certificarmo-nos de que a Cr não interfere com a fluorescência captada.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados morfométricos e de expressão gênica e protéica utilizou-se o teste t de *Student* não pareado. Nos parâmetros funcionais, utilizou-se o teste t de *Student* não pareado e a ANOVA 1 via de medidas repetidas para o fator tempo, com a análise *post-hoc* de Bonferroni. Nestes casos, assumiu-se significância estatística quando $p<0.05$. Uma vez que os valores de secção de área transversa das fibras musculares não apresentam distribuição normal, são

analisadas através do intervalo de confiança (IC) de 95% entre os grupos, considerando as diferenças significativas quando não há sobreposição entre os intervalos do IC (como utilizado por GEHRIG et al., 2008).

5 RESULTADOS

5.1 DADOS MORFOMÉTRICOS

A suplementação de Cr não provocou modificações no peso dos músculos sóleo e EDL e do coração, normalizados pelo peso corporal total dos animais, bem como no conteúdo de proteínas totais no sóleo e EDL (tabela 2).

Tabela 2: Dados morfométricos.

Parâmetro	Grupo Controle	Grupo Creatina	P
Peso do sóleo / peso corporal (%)	0,039 ± 0,0012	0,036 ± 0,001	0,15
Peso do EDL / peso corporal (%)	0,043 ± 0,001	0,042 ± 0,001	0,25
Peso do coração / peso corporal (%)	0,31 ± 0,008	0,33 ± 0,011	0,35
Proteínas totais Sóleo (µg/g de músculo)	214,5 ± 18,48	228,5 ± 7,09	0,52
Proteínas totais EDL (µg/g de músculo)	218,3 ± 8,70	213,0 ± 8,07	0,67

5.2 PARÂMETROS FUNCIONAIS

5.2.1 Tríceps Sural

A análise funcional do tríceps sural, responsável pelo movimento de flexão plantar na articulação do tornozelo, está descrita na tabela 3. O único parâmetro que se mostrou modificado em resposta à suplementação foi o tempo de sustentação da isometria, indicando que este grupamento muscular, quando o animal é suplementado com Cr, apresenta um atraso do aparecimento da fadiga neste tipo de contração. Os tempos para o pico de força isotônica e a força tetânica máxima mostraram-se distintos entre os grupos, mas as diferenças foram apenas próximas da significância estatística (p=0,09 e p=0,13, respectivamente).

Tabela 3: Parâmetros funcionais do tríceps sural.

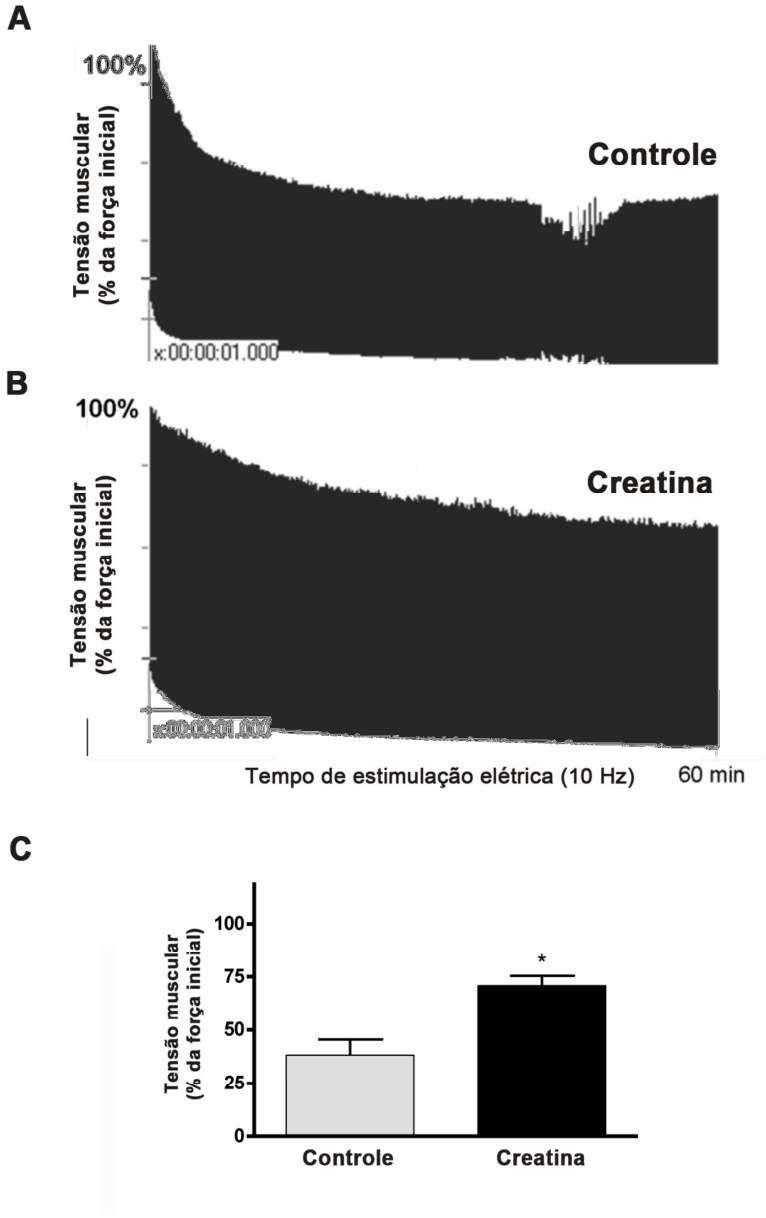
Parâmetro	Grupo Controle	Grupo Creatina	P
Força isotônica máxima (mN)	2669 ± 81,6	2638 ± 136,4	0,85
Tempo para o pico de força isotônica (ms)	28 ± 2,0	32 ± 2,0	0,09
Força tetânica máxima (mN)	11930 ± 488,5	11310 ± 207,8	0,13
Tempo para o pico de força tetânica (ms)	192 ± 16,9	178 ± 9,7	0,24
Tempo de sustentação da isometria (ms)	4,93 ± 0,23	5,47 ± 0,15	*0,04**

Nota: *p<0.05

Quanto ao tempo de sustentação da contração isométrica, os animais suplementados com Cr exibiram um aumento de cerca de 10% neste parâmetro, quando comparados aos animais controle (grupo controle: 4,93 ± 0,2 ms; grupo creatina: 5,47 ± 0,1; P=0,04).

Durante estimulação elétrica de baixa frequência por 60 minutos, observamos uma queda de 62% na força isotônica no grupo controle, enquanto que no grupo suplementado esta queda foi de apenas 29% (P<0,05; Figura 9).

Figura 9 - Suplementação de creatina previne a fadiga durante atividade contrátil isotônica prolongada no tríceps sural.

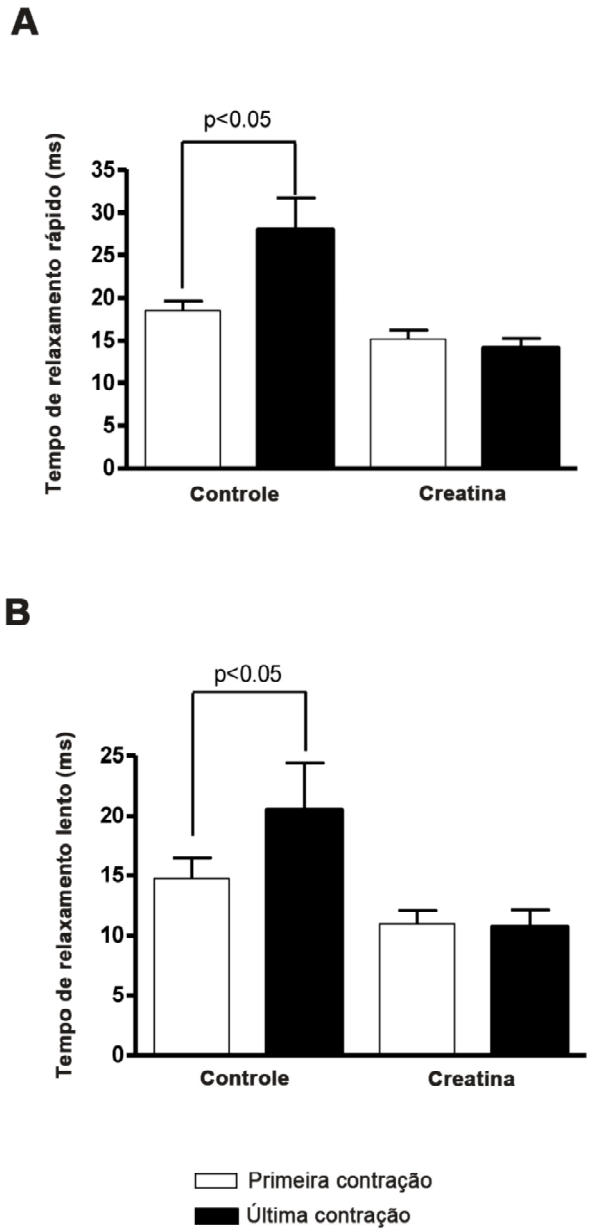


Miograma das contrações em rato controle (A); miograma das contrações em rato suplementado com creatina (B); força ao final dos 60 min de eletroestimulação em relação à primeira contração nos grupos controle e creatina (C). Resultados expressos como média ± EP. *P<0,05 vs Controle.

Quando se comparou o tempo de relaxamento no início e no fim da estimulação, verificamos que o aumento no tempo de relaxamento durante a atividade contrátil prolongada foi prevenida pela suplementação com Cr. No grupo controle, o HRT (*half relaxation time*) foi aumentado em 51% e o LRT (*late relaxation time*) em 39% ao final do período de estimulação. Em contrapartida, ambos os

tempos de relaxamento não foram alterados após os 60 min de eletroestimulação em baixa frequência no grupo suplementado (Figura 10).

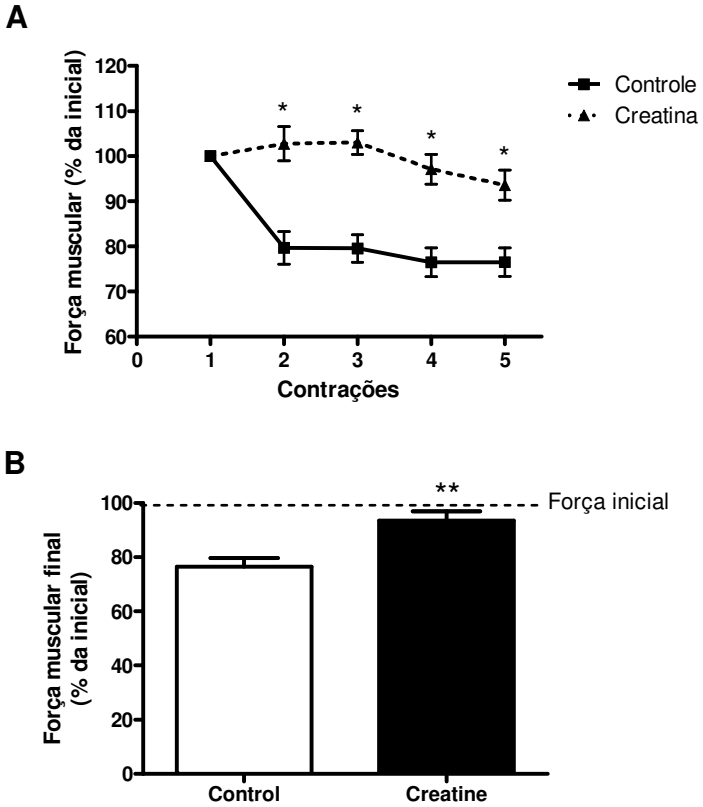
Figura 10 - Suplementação de creatina previne a redução da capacidade de relaxamento durante atividade contrátil isotônica prolongada no tríceps sural.



Efeito da creatina atenuando o aumento do tempo de relaxamento rápido (A) e lento (B) após 60 minutos de contrações intensas do tríceps sural. Resultados expressos como média ± EP.

Ao submetermos o tríceps sural ao ensaio de eletroestimulação de alta frequência, com contrações isométricas máximas intermitentes, verificamos que já a partir da segunda contração os animais suplementados apresentaram força superior aos animais controle (figura 11A). A figura 11B ilustra a diferença na queda de força entre os grupos (controle: 76,52 ± 3,14%; creatina: 93,58 ± 3,35%; p=0,003).

Figura 11 - Efeito da suplementação de creatina sobre a função do grupamento muscular tríceps sural submetido à eletroestimulação de alta frequência.



Desempenho em 5 contrações tetânicas máximas do tríceps sural, intervaladas por 10 segundos de recuperação (A); e variação da força tetânica máxima após as 5 contrações nos grupos controle e creatina (B). *p<0,05; e **p<0,01 vs controle.

5.2.2 Sóleo

Quando o músculo sóleo foi isolado, encontramos diferença na força isotônica máxima (p=0,005) e no tempo de relaxamento rápido (p=0,0008) com a suplementação. O tempo para o pico de força, assim como no ensaio com o tríceps sural, mostrou-se próximo à significância estatística (p=0,11), sendo maior no grupo suplementado (tabela 4).

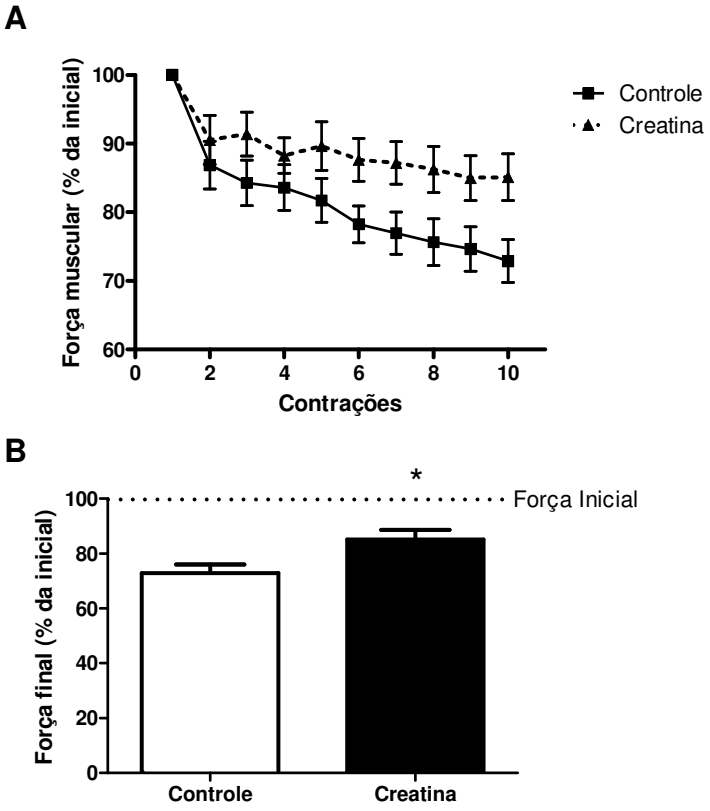
Tabela 4: Parâmetros funcionais do músculo sóleo.

Parâmetro	Grupo Controle	Grupo Creatina	P
Força isotônica máxima (mN)	631,4 ± 47,1	399,4 ± 48,1	*0,005***
Tempo para o pico de força isotônica (ms)	27,14 ± 2,86	32,50 ± 1,64	0,11
Força tetânica máxima (mN)	1680 ± 174,0	1571 ± 176,4	0,67
Tempo de sustentação da isometria (ms)	2,45 ± 0,56	2,85 ± 0,79	0,69
Tempo de relaxamento rápido (ms)	23,78 ± 1,99	12,42 ± 1,72	*0,0008****
Tempo de relaxamento lento (ms)	17,86 ± 2,52	19,49 ± 1,01	0,54

Nota: **p<0,01; ***p<0,001.

A queda na força tetânica máxima em 10 contrações máximas foi menor no grupo suplementado, mas a diferença não se mostrou significativa ao longo das contrações (figura 12A). A diminuição na força, ou seja, a força máxima menos a inicial, entretanto, foi significativamente maior no grupo suplementado (controle: 72,89 ± 3,12%; creatina: 85,12 ± 3,40%; p=0,016; figura 12B).

Figura 12 - Efeito da suplementação de creatina sobre a função do músculo sóleo.



Desempenho em 10 contrações tetânicas máximas do músculo sóleo, intervaladas por 10 segundos de recuperação (A); e variação da força tetânica máxima após as 10 contrações nos grupos controle e creatina (B). *p<0,05 vs controle.

5.2.3 EDL

No EDL, o único parâmetro que se mostrou alterado foi o tempo de relaxamento lento, sendo menor no grupo suplementado (p=0,012; tabela 5).

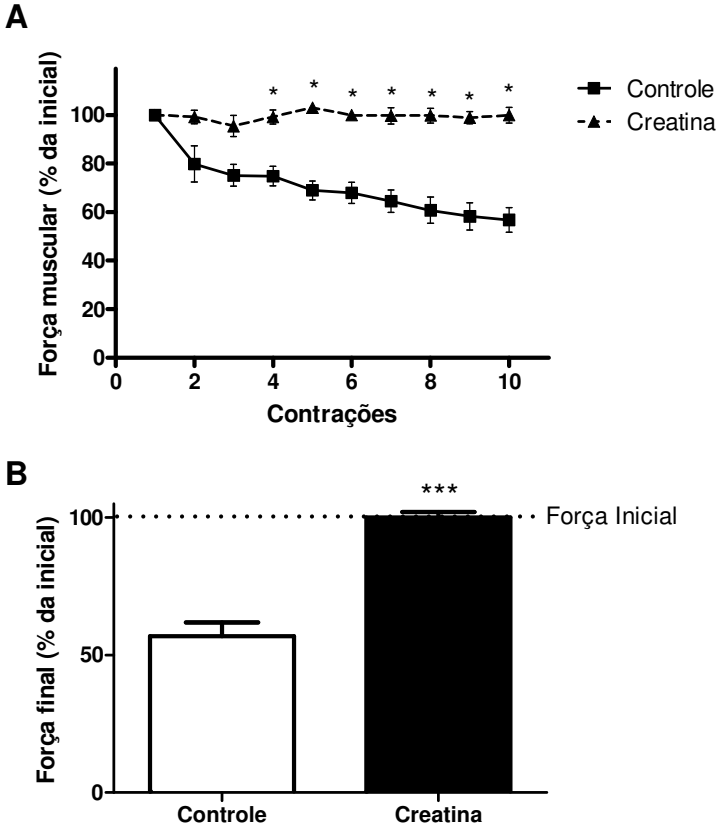
Tabela 5: Parâmetros funcionais do músculo EDL.

Parâmetro	Grupo Controle	Grupo Creatina	P
Força isotônica máxima (mN)	378 ± 58,4	377,7 ± 49,2	0,99
Tempo para o pico de força isotônica (ms)	30,0 ± 2,58	28,75 ± 2,26	0,72
Força tetânica máxima (mN)	1290 ± 178,3	1105 ± 159,1	0,46
Tempo de sustentação da isometria (ms)	1,91 ± 0,28	1,51 ± 0,43	0,50
Tempo de relaxamento rápido (ms)	23,67 ± 3,01	19,29 ± 2,15	0,25
Tempo de relaxamento lento (ms)	17,33 ± 0,95	12,28 ± 1,34	*0,012**

Nota: *p<0,05.

O ensaio de desempenho em contrações repetidas demonstrou, mais uma vez, que o músculo dos animais suplementados apresentou uma menor queda da força muscular. Como observado na figura 13A, a partir da quarta contração a força foi superior nos animais do grupo creatina. Quando se avalia a diferença entre a última e a primeira contração, verificamos que a suplementação impediu que a força decaísse no EDL (controle: 56,79 ± 5,07%; creatina: 99,90 ± 2,03%; p<0,0001; figura 13B).

Figura 13 - Efeito da suplementação de creatina sobre a função do músculo EDL.

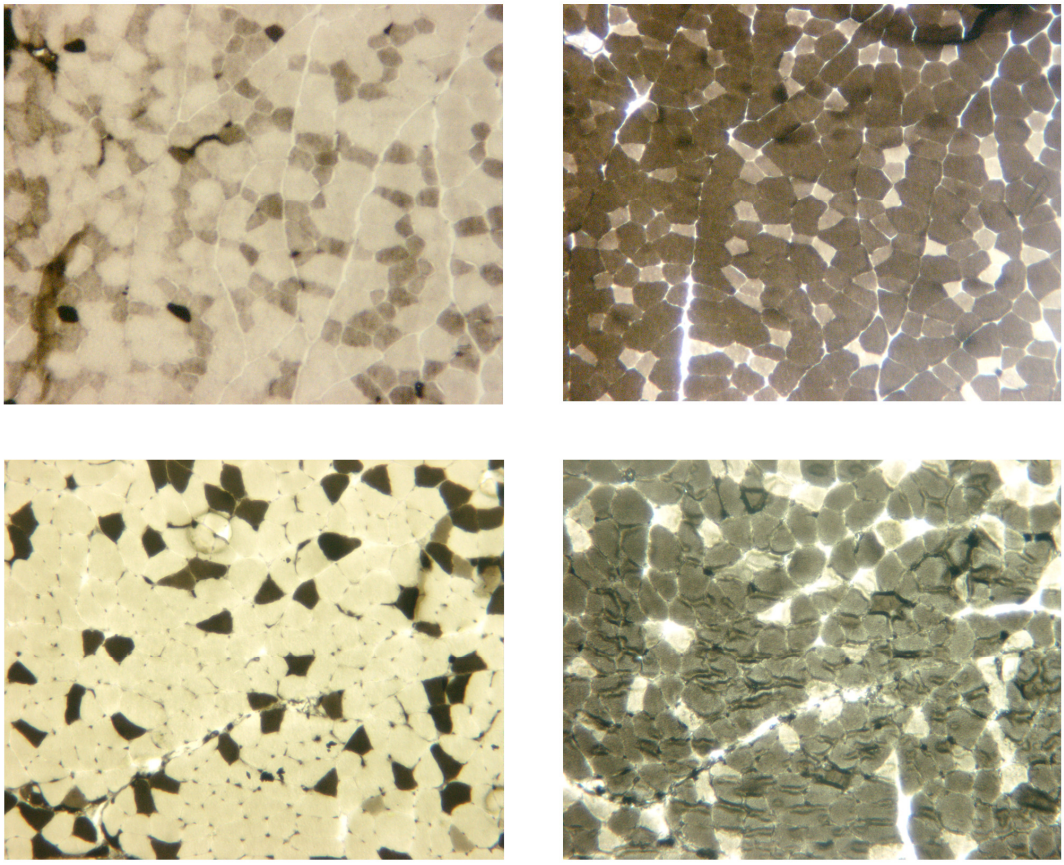


(A) desempenho em 10 contrações tetânicas máximas do músculo sóleo, intervaladas por 10 segundos de recuperação; e (B) variação da força tetânica máxima após as 10 contrações nos grupos controle e creatina. *p<0,05; e ***p<0,001 vs controle.

5.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A figura 14 ilustra os cortes histológicos. Conforme mostra a tabela 6, a suplementação de Cr promoveu um aumento significativo na área de secção transversa das fibras musculares do tipo I no músculo sóleo (controle: 2095 ± 12,25 μm^2; creatina: 2262 ± 13,27 μm^2). Entretanto, a suplementação não promoveu modificações significativas neste parâmetro nas fibras tipo II do músculo sóleo, bem como nas fibras tipo I e tipo II do músculo EDL.

Figura 14 - Análises histológicas.



Campos histológicos dos músculos EDL (acima) e sóleo (abaixo). As lâminas foram submetidas à técnica histológica da miosina ATPase, conforme descrito em materiais e métodos.

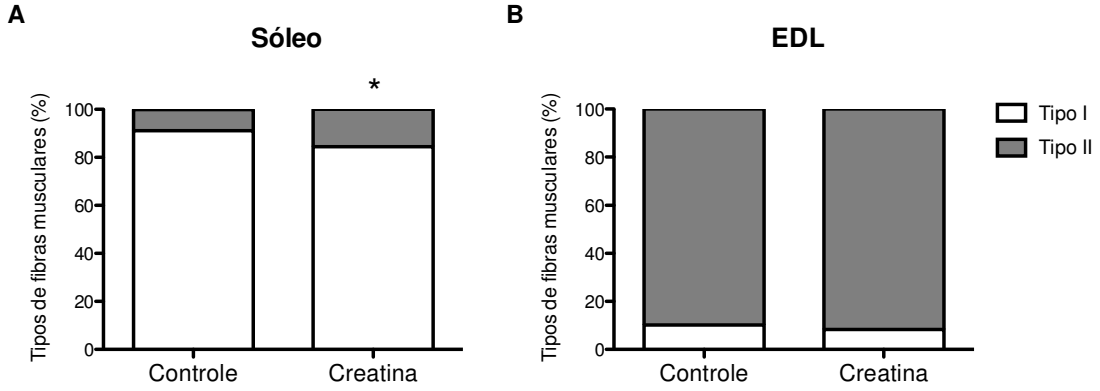
Tabela 6: Área de secção transversa (AST) nos músculos sóleo e EDL.

Parâmetro	Grupo Controle	Grupo Creatina
Sóleo: Fibras tipo I (μm^2)	2095 (2071-2119)	2262 (2236-2288)*
Sóleo: Fibras tipo II (μm^2)	1781 (1727-1835)	1787 (1733-1841)
EDL: Fibras tipo I (μm^2)	1169 (1112-1225)	1170 (1099-1240)
EDL: Fibras tipo II (μm^2)	2220 (2151-2289)	2101 (2049-2152)

Nota: Resultados expressos como Média (intervalo de confiança de 95%).

No que se refere à distribuição percentual nos tipos de fibras musculares, verificamos que a suplementação com Cr promoveu redução do conteúdo de fibras musculares do tipo I no sóleo (controle: 91,08 ± 0,97 %; creatina: 84,40 ± 2,44 %). No músculo EDL, entretanto, a distribuição dos tipos de fibras não foi alterada com a suplementação (figura 15).

Figura 15 - Distribuição dos tipos de fibras musculares.

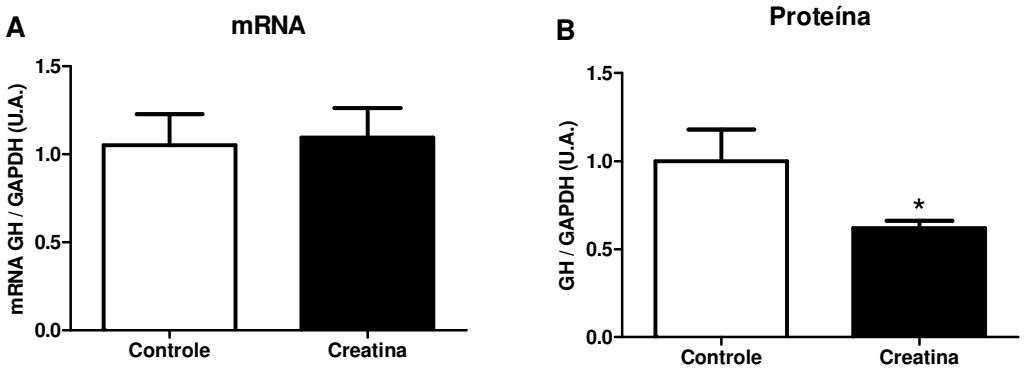


(A) músculo sóleo; e (B) EDL. *P<0,05 vs. grupo controle.

5.4 EIXO GH-IGF-I

A suplementação de creatina por 6 dias não alterou a expressão gênica do GH (controle: 1,00 ± 0,17; creatina: 1,10 ± 0,16; figura 16A). A expressão protéica do hormônio, entretanto, mostrou-se significativamente diminuída no grupo suplementado (em 30%; p=0,04; figura 16B).

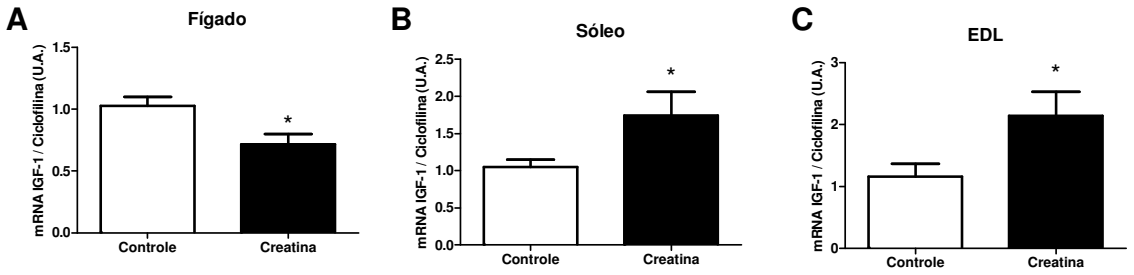
Figura 16 - Efeito da suplementação com creatina sobre a expressão do GH.



Expressão gênica (A) e protéica (B) do GH. *p<0,05.

No que diz respeito à expressão gênica do IGF-I, esta se mostrou diminuída no fígado (em 29%; figura 17A) e aumentada nos músculos sóleo e EDL (75 e 115%, figuras 17B e 17C, respectivamente).

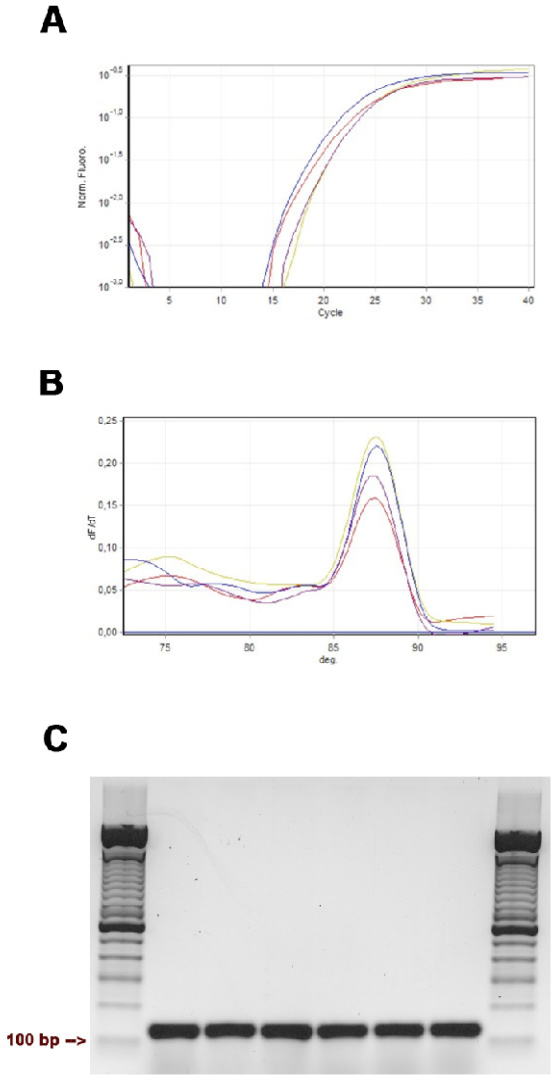
Figura 17 - Efeito da suplementação com creatina sobre a expressão do IGF-I.



Expressão gênica do IGF-I no (A) fígado, (B) sóleo e (C) EDL. *p<0,05.

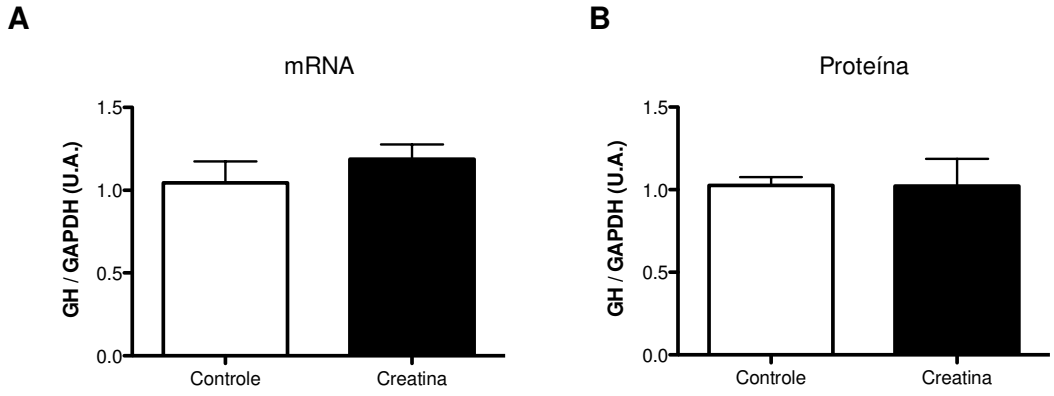
Uma vez que a suplementação com Cr promoveu modificações na expressão gênica do GH na hipófise de ratos, buscamos avaliar se a glândula expressa o transportador de Cr. Conforme ilustrado na figura 18, o mRNA do transportador está presente na glândula. Desta forma, uma possibilidade é a de que a Cr possa exercer alguma ação diretamente sobre a hipófise ou, mais precisamente, sobre o somatotrofo. A incubação de células somatotróficas GH3 com 5mM de Cr por 24 h, entretanto, não promoveu modificação na expressão gênica ou protéica do GH (figura 19).

Figura 18 - Comprovação da expressão do mRNA do transportador de creatina (CreaT) em hipófise de ratos.



Curvas de fluorescência normalizada (A), curvas de *melting* (B) e imagem do gel de agarose mostrando os fragmentos amplificados (127 bp) durante o PCR em tempo real (C).

Figura 19 - Efeito da creatina sobre a expressão de GH em células GH3.



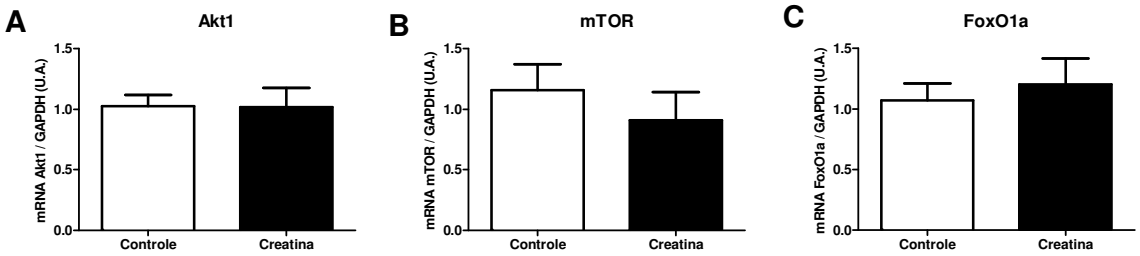
Expressão gênica (A) e protéica (B) do GH em células GH3.

5.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO

5.5.1 Sóleo

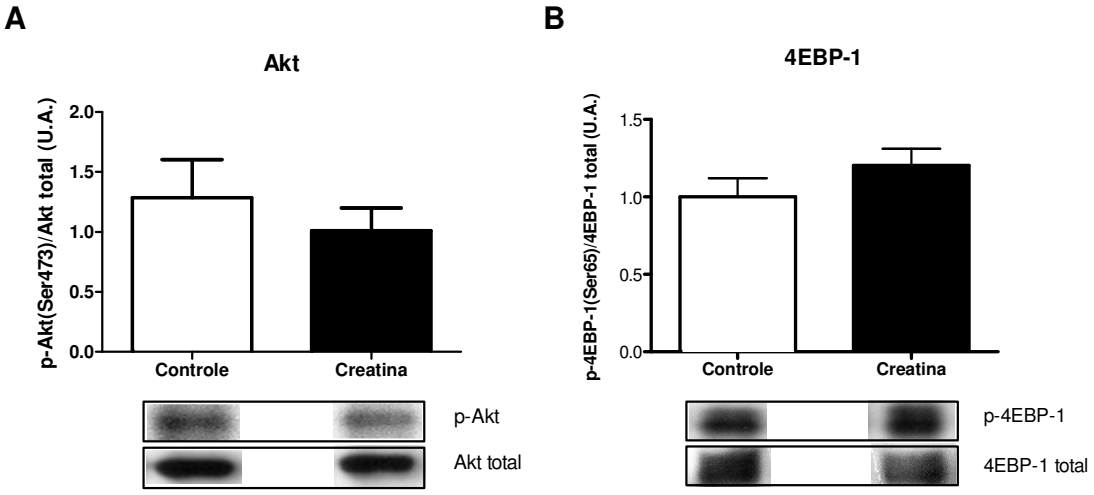
A suplementação de creatina não promoveu modificações na expressão gênica da Akt1, mTOR e FoxO1a no músculo sóleo (figura 20). Além disso, o grau de fosforilação em Serina 473 da Akt também não se mostrou alterado (figura 21).

Figura 20 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de componentes da via da Akt no músculo sóleo.



Efeito da suplementação com creatina sobre a expressão gênica da Akt1 (A), mTOR (B) e FoxO1a (C) no músculo sóleo.

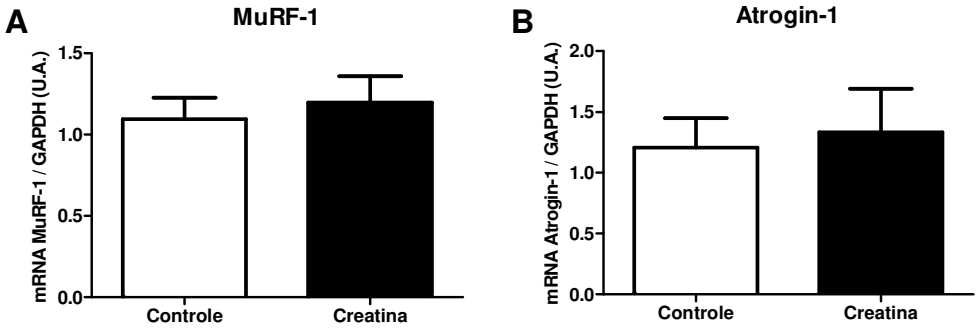
Figura 21 - Efeito da suplementação de creatina sobre a atividade de componentes da via da Akt no músculo sóleo.



Efeito da suplementação com creatina sobre a fosforilação no resíduo Serina 473 da Akt (A) e resíduo Serina 64 da 4EBP-1 (B) no músculo sóleo.

A expressão gênica das ubiquitina-ligases MuRF-1 e Atrogin-1 também não se mostrou alterada (figura 22).

Figura 22 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de ubiquitina ligases no músculo sóleo.

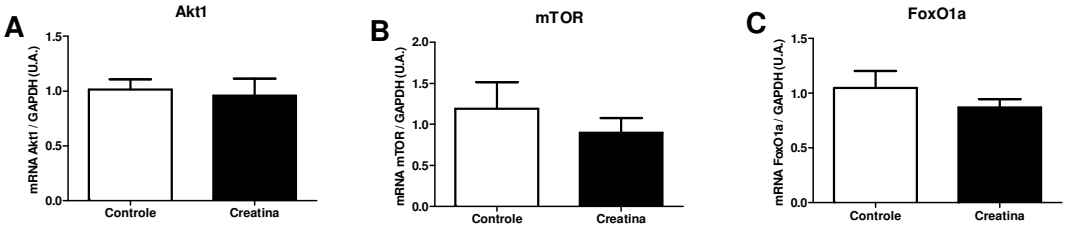


Efeito da suplementação com creatina monohidratada sobre a expressão gênica de MuRF-1 (A) e Atrogin-1 (B) no músculo sóleo.

5.5.2 EDL

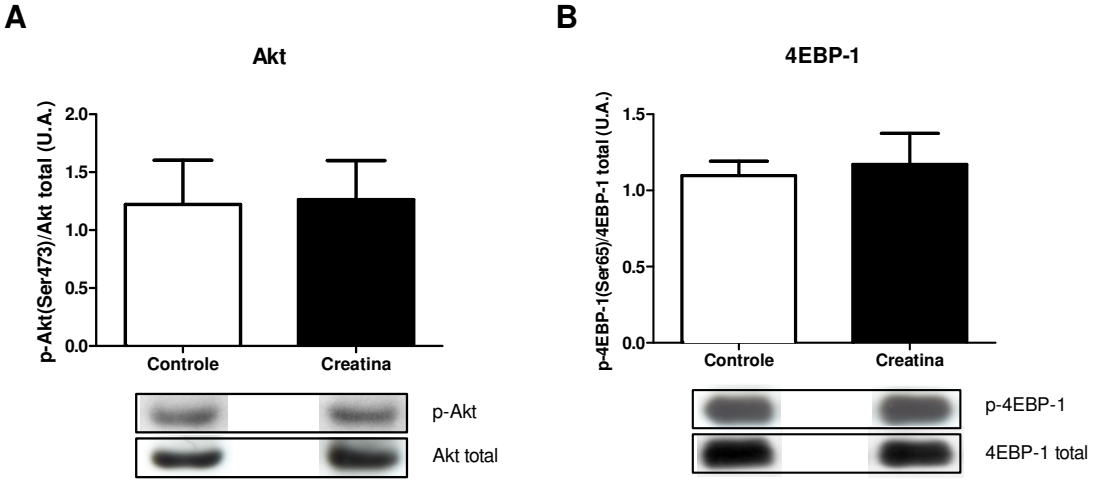
À semelhança do sóleo, no músculo EDL a expressão gênica da Akt1, mTOR e FoxO1a não se alterou com o tratamento (figura 23), assim como a fosforilação da Akt e 4E-BP1 (figura 24).

Figura 23 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de componentes da via da Akt no músculo EDL.



Efeito da suplementação com creatina sobre a expressão gênica da Akt1 (A), mTOR (B) e FoxO1a (C) no músculo sóleo.

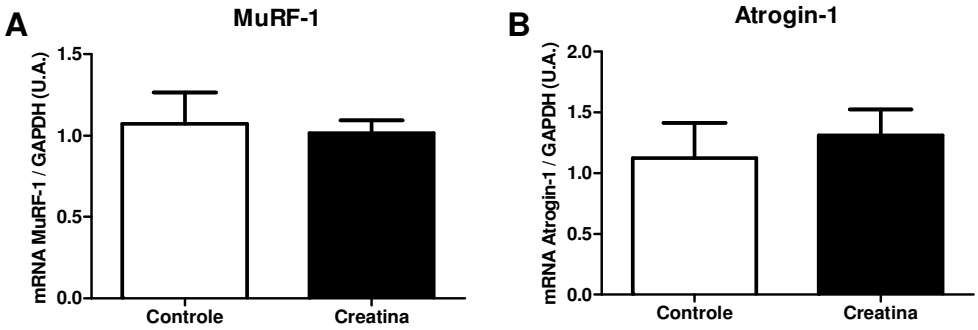
Figura 24 - Efeito da suplementação de creatina sobre a atividade de componentes da via da Akt no músculo EDL.



Efeito da suplementação com creatina sobre a fosforilação no resíduo Serina 473 da Akt (A) e resíduo Serina 64 da 4EBP-1 (B) no músculo sóleo.

A expressão gênica de MuRF-1 e Atrogin-1 também não se alterou no EDL, em resposta à suplementação (figura 25).

Figura 25 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de ubiquitina ligases no músculo EDL.



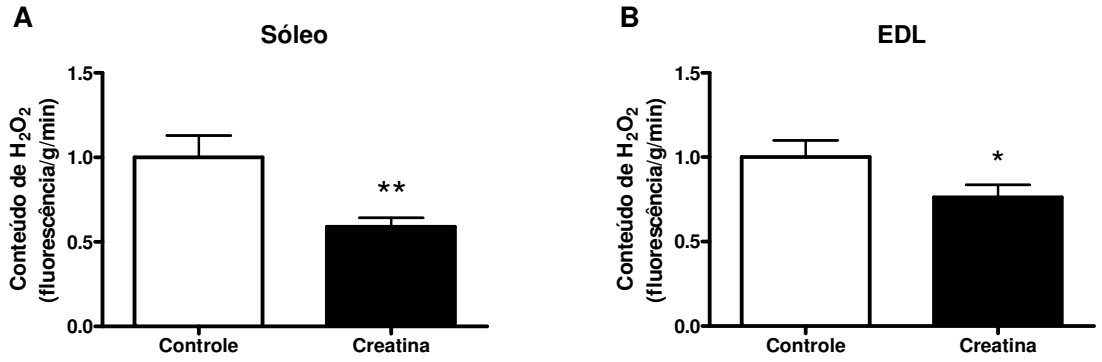
Efeito da suplementação com creatina monohidratada sobre a expressão gênica de MuRF-1 (A) e Atrogin-1 (B) no músculo EDL.

5.6 ESTRESSE OXIDATIVO

5.6.1 Produção de H_2O_2 pelo músculo esquelético

Conforme ilustrado na figura 26, os músculos sóleo e EDL incubados dos animais suplementados exibiram um conteúdo signficativamente menor de EROS quando comparados aos animais controle (redução de 41 e 24%, respectivamente).

Figura 26 - Efeito da suplementação de creatina sobre o conteúdo de EROs no músculo esquelético.

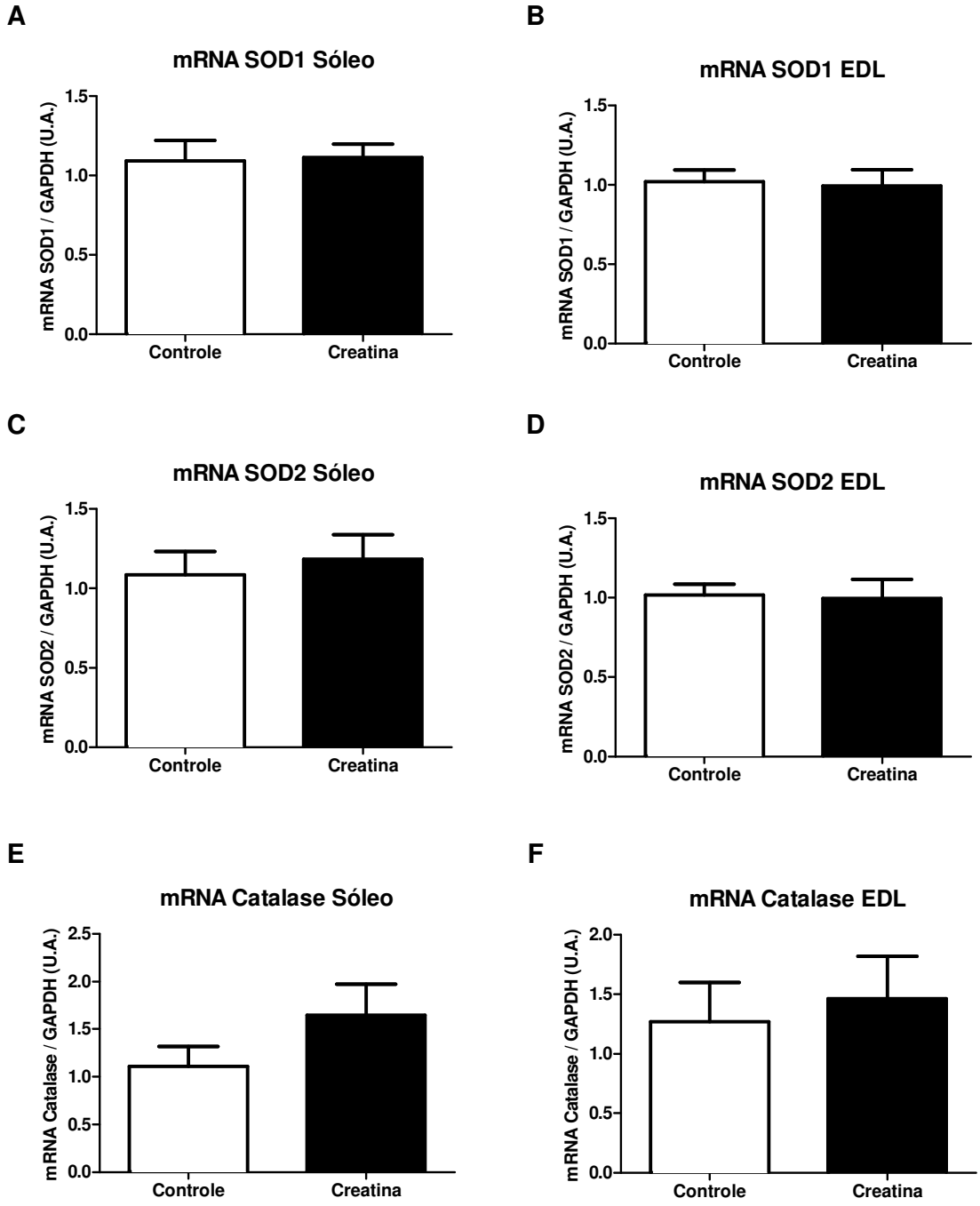


Conteúdo de espécies reativas de oxigênio no sóleo (A) e EDL (B) após 6 dias de suplementação oral com creatina. *P<0.05; and **P<0.01 vs Controle.

5.6.2 Expressão de enzimas antioxidantes

Apesar da redução do conteúdo de EROs nos músculos dos animais suplementados, a expressão gênica de enzimas antioxidantes não se mostrou alterada em nenhum dos músculos analisados (figura 27).

Figura 27 - Efeito da suplementação de creatina sobre a expressão gênica de enzimas antioxidantes no músculo esquelético.

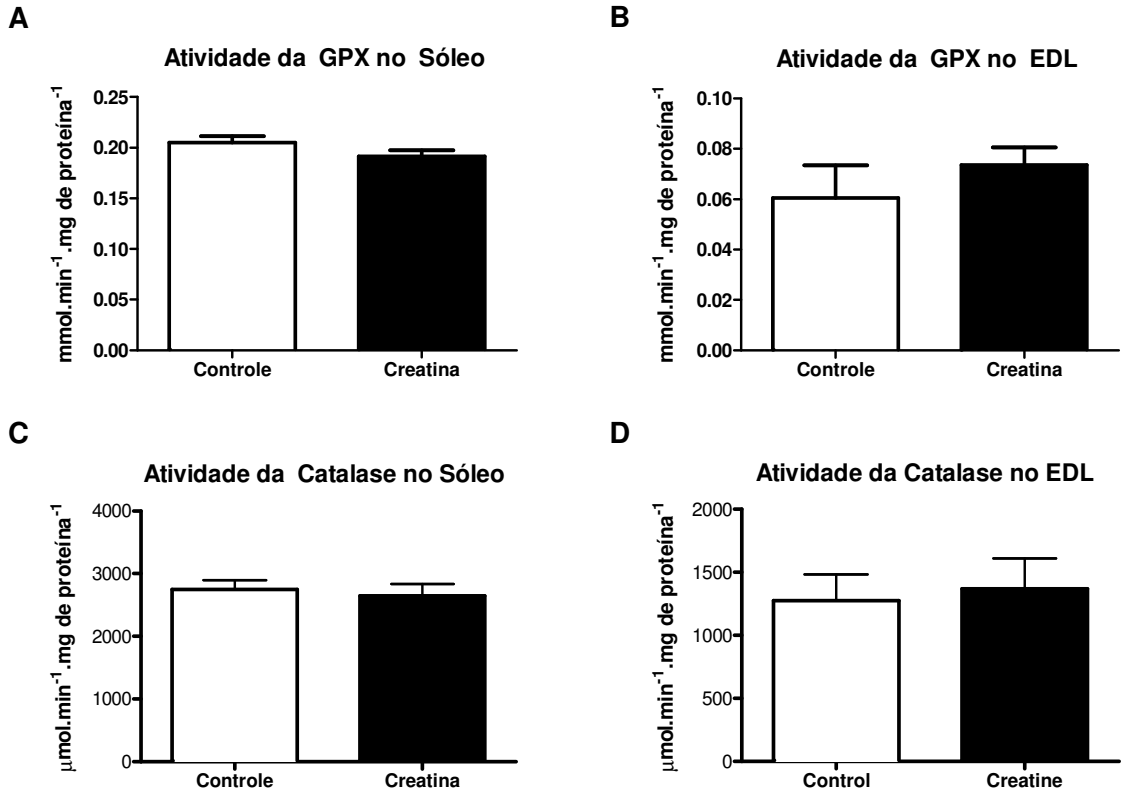


Expressão gênica das enzimas antioxidantes nos músculos sóleo e EDL. Resultado expresso em unidades arbitrárias (U.A.).

5.6.3 Atividade de enzimas antioxidantes

Assim como observado na expressão gênica, também a atividade de enzimas antioxidantes não se mostrou alterada no grupo suplementado, tanto no músculo sóleo quanto no EDL (figura 28).

Figura 28 - Efeito da suplementação de creatina sobre a atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético.



Atividade das enzimas antioxidantes GPX (A e B) e Catalase (C e D) nos músculos Sóleo e EDL. Resultado expresso em µmol/min/mg de proteína.

5.6.4 Conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A suplementação com Cr não promoveu modificações no conteúdo de TBARS tanto no sóleo quanto no EDL (tabela 7).

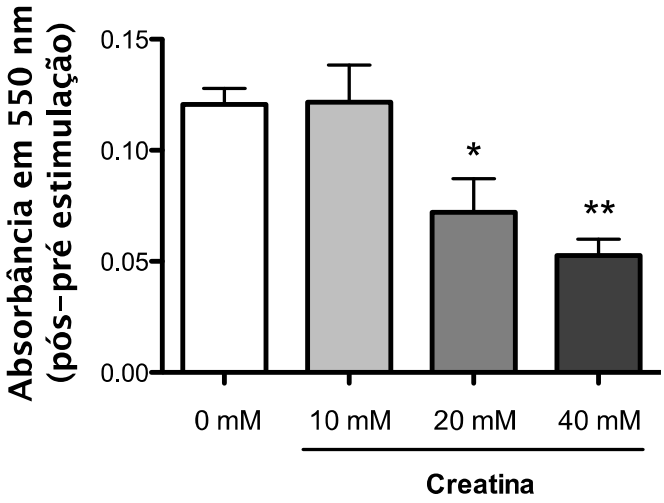
Tabela 7: Conteúdo de TBARS no músculo esquelético.

TBARS (MDA eq.mg de proteína)	Grupo Controle	Grupo Creatina	P
Sóleo	0.95 ± 0.33	0.90 ± 0.15	0,88
EDL	1.05 ± 0.24	0.91 ± 0.28	0,54

5.6.5 Creatina como antioxidante em sistemas *cell-free*

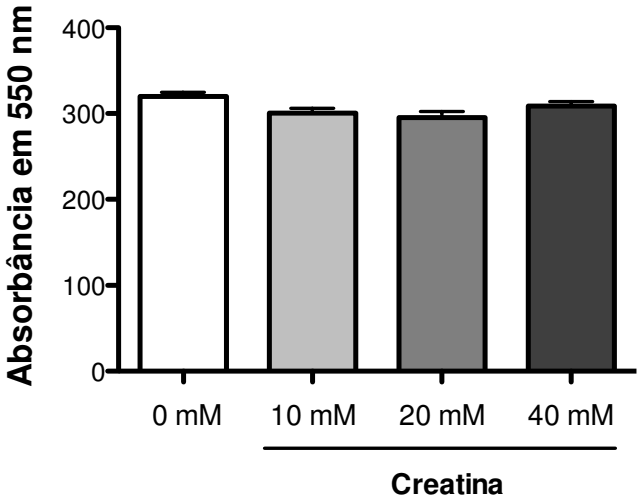
A Cr mostrou-se capaz de interagir com radical superóxido gerado por eletroestimulação de solução Krebs oxigenada nas concentrações de 20 e 40 mM (figura 29). Entretanto, no que diz respeito ao H_2O_2 não houve ação da Cr em nenhuma das concentrações utilizadas (figura 30).

Figura 29 - Efeito *scavenger* da creatina sobre ânions superóxido.



Efeito de diferentes concentrações de creatina sobre a produção de ânion superóxido após estimulação elétrica de solução Krebs oxigenada. Resultado expresso em diferença de absorbância (550 nm) pós-pré estimulação elétrica. *P<0,05 vs. controle.

Figura 30 - Efeito *scavenger* da creatina sobre o peróxido de hidrogênio.



Efeito de diferentes concentrações de creatina sobre o conteúdo de peróxido de hidrogênio em meio Krebs. Resultado expresso em absorbância (550 nm).

6 DISCUSSÃO

Nossos ensaios funcionais demonstraram que a suplementação com Cr monohidratada por 6 dias resulta em alterações em diversos parâmetros funcionais. Foi demonstrado que a administração de Cr promove uma maior taxa de ressíntese da PCr (GREENHAFF et al., 1994) e ATP (CASEY et al., 1996), o que tem auxiliado a compreensão do efeito ergogênico observado em atividades intermitentes. De fato, nossos ensaios de contrações isométricas máximas intermitentes, no sóleo e especialmente no EDL, corroboram estes efeitos. Além disso, há dados na literatura que sugerem que a suplementação de Cr resulta em maior acúmulo de glicogênio (VAN LOON et al., 2004) ou na sua menor utilização durante o exercício (SEWELL et al., 2008; ROSCHEL et al., 2010), sugerindo uma menor dependência da glicólise anaeróbica e, assim, atenuando o desenvolvimento da fadiga. Desta forma, o efeito que observamos sobre a fadiga em contrações máximas repetidas parece ocorrer por modificações metabólicas no músculo esquelético.

O nível de Cr intramuscular é importante na regulação da função contrátil, uma vez que sua depleção promove um prejuízo da mesma. Animais suplementados com β-GPA apresentam redução da força muscular específica e tempo de relaxamento prolongado, além de uma redução da taxa de forforilação oxidativa no músculo sóleo (O'GORMAN et al., 1996; PETROFSKY; FITCH, 1980; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). A deficiência da CK promove uma queda da força tetânica e prejudica a tanto a liberação quanto o sequestro de Ca^{2+}, sugerindo um importante papel fisiológico da Cr sobre o fluxo de Ca^{2+}durante a contração muscular (STEEGHS et al., 1997).

Durante o estímulo tetânico não há tempo para a recaptação completa de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, prolongando a fase de contração e a tensão produzida devido ao fenômeno de somação temporal (ALLEN et al., 1995). Nossos resultados mostram que a suplementação com Cr não modificou as forças isotônicas e tetânicas no músculo esquelético durante a eletroestimulação, mas promoveu melhorias na capacidade de relaxamento muscular e resistência à fadiga.

As forças absolutas e específicas da musculatura esquelética de ratos submetidos à estimulação elétrica não foi alterada com a suplementação de Cr. No que se refere às propriedades contráteis, a suplementação promoveu uma redução

do tempo de relaxamento sem, entretanto, alterar o tempo para o pico de força (parâmetro relacionado à velocidade de contração). Estes resultados estão de acordo com os relatados por Hespel et al (2002) e Van Leemputte et al. (1999) em humanos. Sobre esta questão, sabe-se que a taxa de desacoplamento das pontes cruzadas e a queda da concentração de Ca^{2-} sarcoplasmático são os principais fatores responsáveis em modular o tempo de relaxamento do músculo (VAN LEEMPUTTE et al., 1999). A proteína responsável pela recaptação deste íon é a Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático (Serca) (DE MEIS, 2002). A relação entre a suplementação de Cr e a expressão desta proteína é, no entanto, ainda desconhecida. De qualquer forma, é possível que o aumento dos níveis de PCr no músculo esquelético permita a Serca operar com maior eficiência termodinâmica, facilitando o relaxamento muscular (VAN LEEMPUTTE et al., 1999). Foi demonstrado que a CK encontra-se funcionalmente acoplada à Serca, otimizando a regeneração local de ATP, o que reforça esta hipótese (WALLIMANN et al., 1992).

A suplementação de curto prazo com Cr foi eficaz em atenuar a queda de força após 60 minutos de contrações em baixa frequência (1 Hz), bem como durante 5 ou 10 contrações tetânicas máximas (100 Hz), com 10 segundos de intervalo entre elas. Potenciais mecanismos envolvidos na melhoria do desempenho em resposta à suplementação de Cr são aumento do conteúdo de PCr intramuscular, maior resíntese de PCr durante o intervalo das contrações e aumento da eficiência metabólica (CASEY et al., 1996). O prolongamento do tempo de relaxamento durante atividade contrátil intensa e prolongada parece ser um importante fator que determina o declínio da produção de força nesta situação e pode ocorrer devido à redução da concentração citosólica de cálcio e/ou devido a uma taxa de desacoplamento mais lenta das pontes-cruzadas (ALLEN et al., 1995). Foi demonstrado que durante contrações tetânicas repetidas há uma correlação entre a redução dos níveis de ATP e PCr e a redução no tempo de relaxamento muscular (EDWARDS et al., 1975). Uma possível explicação para a ação da Cr sobre o tempo de relaxamento é a redução da acidose intracelular, uma vez que a Cr possui ação tamponante sobre íons de hidrogênio, já que estes são utilizados na reação da CK para a resíntese de ATP (EDMAN; MATTIAZZI, 1981). E ainda, que o acoplamento funcional da CK no retículo sarcoplasmático junto à Serca poderia resultar na redução da constante de Michaellis-Menten (Km) desta proteína, aumentando sua

eficiência metabólica e a recaptação de cálcio (KORGE; CAMPBELL, 1994). A redução no conteúdo EROs na musculatura esquelética que nós observamos em resposta a suplementação de Cr também pode ser importante para os efeitos observados sobre o tempo de relaxamento muscular, uma vez que as EROs parecem reduzir a atividade da Serca, atenuando, assim, a recaptação de Ca^{+} pelo retículo sarcoplasmático e consequentemente aumentando o tempo de relaxamento (ALLEN et al., 2008).

Sobre alterações no eixo GH-IGF-I, observamos uma significante queda da expressão protéica do GH, sem, entretanto, alteração na expressão do mRNA deste hormônio hipofisário. Isto pode ter ocorrido por modificação da meia-vida do mRNA, como verificado quando a cauda poli(A) do mesmo é encurtada, resultando em menor síntese da protéina que este mRNA codifica. Os mecanismos pelos quais a suplementação de Cr modula a expressão de GH são desconhecidos. Não havia sido relatado, até opresente, se células hipofisárias expressam o transportador de Cr (CreaT), proteína responsável pela captação do metabólito (SNOW; MURPHY, 2001). Através da análise por PCR em tempo real, demonstramos que o CreaT é expresso na hipófise de ratos, sugerindo uma possível ação do metabólito sobre as células hipofisárias. Entretanto, estudos adicionais são necessários para elucidar esta questão.

Há na literatura pouca informação sobre os efeitos da Cr sobre a síntese e liberação de GH. Schedel et al. (2000) demonstraram que em humanos a ingestão de 20 g de Cr monohidratada promoveu um aumento significativo da secreção de GH 6 horas após a administração do metabólito. Já Hoffman et al. (2006), não encontraram diferenças nos níveis basais de GH após 10 semanas de suplementação, associada ao treinamento intenso em atletas. De forma similar, Peyrebrune et al. (2005) não encontraram diferenças nos níveis basais de GH, apesar de relatarem que os indivíduos que ingeriram o metabólito não apresentaram a esperada elevação da secreção de GH após uma sessão de exercícios intensos, o que foi verificado nos que ingeriram placebo. Ao nosso conhecimento, estes são os poucos estudos que investigaram a influência da suplementação de Cr sobre a secreção de GH. Os resultados discrepantes observados podem se dever a diferenças metodológicas, como a utilização de humanos ou animais, treinados ou sedentários, além da dose e tempo de suplementação distintos.

No que diz respeito à expressão de IGF-I, esta se mostrou atenuada no fígado em resposta à suplementação de Cr. O GH é o principal estímulo para a síntese e secreção de IGF-I hepático (LARSEN et al., 2002) e, como o conteúdo hipofisário de GH esteve reduzido, podemos aventar que tenha ocorrido o mesmo com a secreção de GH, de modo que não foi surpreendente que a expressão do IGF-I hepático também estivesse reduzida. Na musculatura esquelética, em contrapartida, verificamos um significativo aumento da expressão gênica deste hormônio. Isto pode parecer paradoxal, mas está de acordo com o estudo de Louis et al. (2004) que verificou um efeito direto da Cr sobre a expressão do IGF-I em células musculares murinas em cultura. Além disso, Deldicque et al (2005), em humanos, também encontraram um aumento significativo da expressão de IGF-I na musculatura esquelética em resposta à suplementação. Após uma sessão de exercício, entretanto, não houve diferenças no aumento do IGF-I entre os grupos suplementado e placebo em resposta ao estímulo contrátil. Este estudo contrasta com o de Burke et al. (2008), que relata uma potencialização da suplementação de Cr por 7 dias sobre o aumento do IGF-I em resposta ao treinamento de força.

Apesar do aumento da expressão de IGF-I muscular, nossos resultados não apontam para o estímulo da via de sinalização da Akt/mTOR. A expressão gênica de várias proteínas da via não foi alterada e, mais importante, o grau de fosforilação da Akt e da 4E-BP1 não parece ter sido alterado. Sabe-se que o IGF-I é um potente estimulador desta via e, assim, esperávamos que estas proteínas estivessem mais ativadas. Estudos adicionais se fazem necessários para confirmar estes resultados. Neste contexto, Deldicque et al. (2007) verificaram que em células musculares C_2C_{12} a Cr foi capaz de aumentar a fosforilação da Akt em 60%. Estudo posterior do mesmo grupo, entretanto, não verificou alterações no estado de fosforilação da Akt e da 4EBP-1 quando utilizaram uma abordagem *in vivo* (DELDICQUE et al., 2008). Estudos *in vitro* são importantes para investigar efeitos diretos de determinado metabólito ou droga sobre o tecido. Em contrapartida, a utilização de estudos *in vivo* implica na interação de diversos fatores que podem, em conjunto, contribuir com o fenômeno observado. Desta forma, nossos resultados, assim como os de Deldicque et al. (2008), fornecem informações importantes, apesar de ainda incipientes, sobre os efeitos da Cr sobre vias de síntese e degradação protéicas musculares.

Conforme apresentado anteriormente, o IGF-I e capaz de inibir a proteólise dependente do sistema ubiquitina-proteassoma ao inibir a expressão das ubiquitina-ligases MuRF-1 e Atrogin-1 no músculo esquelético (SACHECK et al., 2004). Este efeito se dá através do estímulo da via Akt/FoxO (GLASS, 2010; FROST; LANG, 2007). Apesar do aumento da expressão de IGF-I muscular e em consonância com o resultado observado no grau de fosforilação da Akt em serina 473, resíduo importante para a fosforilação de FoxO pela Akt (GLASS, 2010; FROST; LANG, 2007), a expressão de MuRF-1 e Atrogin-1 não se mostrou alterada em nosso estudo. Deldicque et al. (2008), em humanos, também não encontraram modificação na expressão de Atrogin-1 em resposta à suplementação de Cr por 5 dias. Esta aparente discrepância nos resultados, de aumento do IGF-I sem alteração da via de sinalização classicamente ativada por ele, ainda não pode ser explicada, mas é corroborada pelos resultados de Deldicque et al. (2005, 2007, 2008). Serão necessárias investigações mais aprofundadas para compreender o efeito da Cr sobre as vias Akt/mTOR e Akt/Foxo/ubiquitina-ligases e sua relação com o IGF-I.

As análises histológicas dos músculos sóleo e EDL indicaram um aumento da área de secção transversa nas fibras tipo I e aumento no percentual de fibras tipo II no músculo sóleo. A esse respeito, Volek et al. (1999) não encontraram diferenças na distribuição dos tipos de fibras em humanos submetidos à suplementação de Cr e treinamento de força por 12 semanas em relação ao grupo placebo. Em contrapartida, Aoki et al. (2004) ao suplementar ratos com $5g.kg^{-1}$ de peso de creatina por 7 ou 14 dias, verificaram uma redução da expressão proteica de MHC I de 84% para 78% e 80%, respectivamente, no músculo sóleo, com aumento concomitante na expressão de MHC IIa. Estes resultados estão de acordo com nossos dados histológicos. O aumento das fibras musculares tipo II não está de acordo, entretanto, com o aumento na resistência à fadiga sem modificação na força isotônica máxima que encontramos em nossos ensaios funcionais, uma vez que este tipo de fibra apresenta reduzido potencial oxidativo e menor resistência à fadiga quando comparado às fibras musculares tipo I (LIEBER, 2009). E ainda, a hipertrofia das fibras tipo I no sóleo não foram traduzidas em aumento de força. Estes dados reforçam a idéia de que os resultados funcionais que encontramos na musculatura esquelética parecem se dever a efeitos metabólicos.

Demonstramos também que a suplementação oral de Cr reduz o conteúdo de EROs no músculo esquelético. Apesar de as propriedades antioxidantes da Cr já terem sido descritas anteriormente, tanto em experimentos *cell-free* quanto em ensaios *in vitro*, nosso trabalho demonstra um efeito *in vivo* sobre o estado redox do músculo esquelético, o que ainda não havia sido demonstrado.

O declínio no conteúdo de EROs observado após a suplementação com Cr pode ter ocorrido devido a três mecanismos: uma ação direta da molécula de Cr como *scavenger*; um estímulo da expressão e/ou atividade das enzimas antioxidantes, ou um efeito sobre a produção de EROs pelos sistemas geradores, na mitocôndria ou pela NADPH oxidase. Lawler et al. (2002) demonstraram pela primeira vez que a molécula de Cr poderia atuar diretamente contra diversas espécies reativas. Os autores utilizaram sistemas *cell-free* e observaram uma relação de dose-resposta entre a concentração de Cr e a capacidade *scavenger* antioxidante. Posteriormente, Sestili et al. (2006) testaram os efeitos da Cr sobre a citotoxidade causada por oxidantes em miotúbulos humanos e de camundongos. Apesar de não observarem alterações nas atividades da catalase e GPX, a Cr proporcionou uma atenuação dos efeitos citotóxicos de H_2O_2, butilhidroxiperóxido e peroxinitrito sobre estas linhagens celulares. Este trabalho demonstra um papel antioxidante da Cr, indicando uma ação direta contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Através de experimento *cell-free,* verificamos uma ação *scavenger* da Cr na musculatura esquelética sobre o ânion superóxido. Apesar de não verificarmos alterações na atividade e expressão das enzimas antioxidantes, como também descrito por Sestili et al (2006), o conteúdo de EROs foi significativamente menor nos músculos dos animais suplementados. Assim, o efeito sobre o radical superóxido que observamos suporta a proposição de que a redução do conteúdo de EROs nos músculos esqueléticos dos animais suplementados poderia ocorrer devido ao aumento da concentração intracelular de Cr que se observa com este protocolo de suplementação.

Além da ação *scavenger*, outro possível mecanismo é a atenuação da produção de EROs em resposta à suplementação de Cr. Foi demonstrado que em mitocôndrias isoladas o ADP é capaz de estimular a respiração mitocondrial ao modificar a razão [ADP]/[ATP], aumentado assim a síntese de ATP pelo complexo

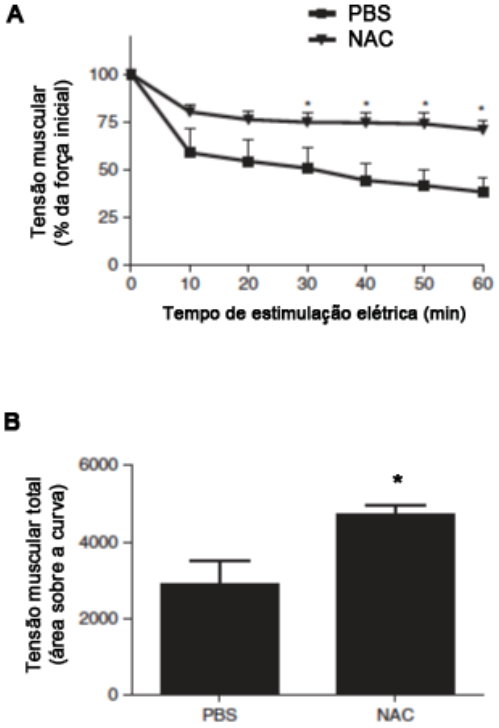
ATP sintase (BROWN, 1992). O sistema da CK possui papel importante no transporte energético entre os sítios de produção e consumo de ATP. No modelo denominado de “lançadeira de fosfocreatina” (BESSMAN; GEIGER, 1981), a CK mitocondrial converte o ATP formado na fosforilação oxidativa, produzindo ADP e PCr. Enquanto o ADP estimula a respiração mitocondrial, a PCr migra ao citosol onde promove a formação de ATP pela CK citosólica, próximo às ATPases (JACOBUS et al., 1982; WALLIMANN, 1982). Este sistema é importante uma vez que a PCr trafega mais facilmente pelo citosol que os nucleotídeos de adenina – ADP e ATP (YOSHIZAKI et al., 1990). Galina et al. (2006) demonstraram que a reciclagem do ADP promovida pela CK mitocondrial desempenha um papel antioxidante ao reduzir o potencial de membrana mitocondrial. Isto poderia acelerar a taxa de respiração mitocondrial, com atenuação do vazamento de elétrons o que, por sua vez, reduz a formação de radical superóxido e, consequentemente, de H_2O_2. Este mecanismo pode estar envolvido nos efeitos antioxidantes da suplementaçào de Cr, além da ação direta anteriormente discutida.

Além de seus efeitos sobre a hipertrofia, proliferação, diferenciação e sobrevivência de células musculares, o IGF-I também parece estar envolvido na proteção contra o estresse oxidativo (KOKOSZKO et al., 2008; YANG et al., 2010). Yang et al. (2010) demonstraram que o IGF-1 exerceu uma ação protetora contra a morte celular induzida por H_2O_2 além de promover a sobrevivência celular através da proteína anti-apoptótica Bcl2 e também das vias PI3K/Akt e ERK1/2 MAPK em células musculares C2C12 e L6E9. Podemos especular que aumento da expressão de IGF-1 no músculo esquelético em resposta à suplementação com Cr poderia ser ainda um possível mecanismo de ação antioxidante.

Em humanos, a infusão de 150 mg de de N-acetil-cisteína (NAC), um potente antioxidante, promoveu uma atenuação da fadiga em um protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência (10 Hz) do músculo tibial anterior por 30 minutos (REID et al., 1994). Por sua vez, McKenna et al. (2006) observaram que a infusão de NAC atenuou o declínio da atividade da Na^+-K^+ ATPase durante 45 minutos de exercício em cicloergômetro a 70% do $VO_{2máx}$, além de promover uma atenuação dos níveis plasmáticos de K^+. Também durante atividade com predominância do metabolismo anaeróbico - *sprints* intermitentes em alta-intesidade - a administração de NAC promoveu uma atenuação da fadiga (COBLEY et al., 2011).

É possível que EROs promovam uma redução na atividade da Serca, atenuando, assim, a recaptação de Ca^{+} pelo retículo sarcoplasmático (ALLEN et al., 2008). Outras proteínas relacionadas com o metabolismo de cálcio na musculatura esquelética também podem estar envolvidas, como o canal de rianodina (ALLEN et al., 2008). E ainda, EROs parecem exercer efeito direto sobre a estrutura e função dos miofilamentos (FERREIRA; REID, 2008). Estas modificações poderiam contribuir para a redução da força quando os níveis de ROS estão aumentados.

Figura 31 - Efeitos da suplementação com N-acetil-cisteína sobre a fadiga durante atividade contrátil prolongada.



Suplementação de N-acetil-cisteína (NAC) previne a fadiga durante atividade contrátil isotônica prolongada no tríceps sural. Dados expressos como média ± EP. *P<0.05 vs PBS (controle). Fonte: Pinheiro et al (2011).

Trabalhos anteriores utilizando modelos animais demonstraram que o mesmo protocolo de suplementação de Cr utilizados em nosso trabalho promove uma atenuação da fadiga muito similar à observada em resposta à administração de NAC (BASSIT et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011; Figura 31). Em ambos os casos, a intervenção reduziu o dano muscular induzido por 60 minutos de atividade contrátil

intensa. Assim, além das alterações metabólicas e/ou hormonais promovidas pela Cr que já foram demonstradas anteiormente (BASSIT et al., 2010; BURKE et al., 2003; DELDICQUE et al., 2005; 2007; 2008; GREENHAFF et al., 1994; KREIDER et al., 1998), apontamos também sua ação antioxidante como possivelmente implicada nos efeitos funcionais observados por nós e descritos na literatura, conforme discutido anteriormente. A prevenção do estresse oxidativo e/ou a proteção contra o dano celular em resposta a ele é apontada como uma estratégia em potencial para a cura ou atenuação do prejuízo funcional e perda de massa muscular em diversos quadros clínicos (ARTHUR et al., 2008; MARZETTI et al., 2009).

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram efeitos da suplementação oral de curto prazo com Cr monohidratada sobre o desempenho muscular. Estes resultados incluem a atenuação da fadiga (queda da força muscular) em contrações musculares intermitentes de baixa e alta frequência. No que diz respeito ao eixo GH-IGF-1, a suplementação pareceu exercer um efeito inibitório sobre o eixo, apesar do estímulo direto sobre a expressão do IGF-1 muscular, o que está de acordo com alguns relatos na literatura. Apesar do aumento do IGF-1 muscular, a via de sinalização da Akt e a expressão de ubiquitina ligases não foram moduladas. Parte dos efeitos funcionais observados pode ocorrer devido à ação antioxidante da suplementação de Cr, demonstrada *in vivo* com a redução do conteúdo de EROs nos músculos dos animais suplementados. Evidências anteriores, bem como nossos resultados aqui apresentados, apontam para uma ação direta da molécula de Cr sobre o ânion superóxido.

REFERÊNCIAS*

ADHIHETTY, P. J. et al. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. **Experimental Physiology**, v. 88, n. 1, p. 99–107, 2003.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALLEN, D. G.; LÄNNERGREN, J.; WESTERBLAD, H. Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. **Experimental Physiology**, v. 80, n. 4, p. 497-527, 1995.

AOKI, M. S. et al. Deleteriuos effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 1176–1183, 2004.

ARTHUR, P.G.; GROUNDS, M.D.; SHAVLAKADZE, T. Oxidative stress as a therapeutic target during muscle wasting: considering the complex interactions. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 4, p. 408–416, 2008.

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 1, p. C120–C127, 1999.

BAKER, J. et al. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 73-82, 1993.

BALSOM, P. D. et al. Skeletal muscle metabolism during short duration high intensity exercise: influence of creatine supplementation. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 154, n. 3, p. 303–310, 1995.

BAMMAN, M. M. et al. Mechanical load increases muscle IGF-1 and androgen receptor mRNA concentrations in humans. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 3, p. 383-390, 2001.

BARTON-DAVIS, E. et al. Viral mediated expression of IGF-I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15603, 1998.

BASSIT, R. A. et al. Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. **European Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 5, p. 945-955, 2010.

BAUMANN, G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 4, p. 424–449, 1991.

---

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BECQUE, M. D.; LOCHMANN, J. D.; MELROSE, D. R. Effects of oral creatine supplementation on muscular strength and body composition. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32**,** n. 3, p. 654-658, 2000.

BESSMAN, S. P.; GEIGER, P. J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. **Science**, v. 211, n. 4481, p. 448-452, 1981.

BIRCH, R.; NOBLE, D.; GREENHAFF, P. L. The influence of dietary creatine supplementation on performance during repeated bouts of maximal isokinetic cycling in man. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology,** v. 69, n. 3, p. 268–276, 1994.

BIWER, C. J. et al. The effect of creatine on treadmill running with high-intensity intervals. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 17, n. 3, p. 439-445, 2003.

BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROOKS, A. J.; WATERS, M. J. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 6, n. 9, p. 515–525, 2010.

BROOKS, A. J. et al. Growth hormone receptor; mechanism of action. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** v. 40, n. 10, p. 1984–1989, 2008.

BROWN, G. C. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. **The Biochemical Journal**, v. 284, p.1-13, 1992.

BURKE, D. G. et al. Effect of creatine supplementation and resistance-exercise training on muscle insulin-like growth factor in young adults**. International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism,** v. 18, n. 4, p. 389-398, 2008.

BURKE, D. G. et al. Effect of creatine and weight training on muscle creatine and performance in vegetarians. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 11, p. 1946-1955, 2003.

BURKE, L. M. et al. Effect of oral creatine supplementation on single-effort sprint performance in elite swimmers. **International Journal of Sports Nutrition**. v. 6, n. 3, p. 222-233, 1996.

CAO, P. R.; KIM, H. J.; LECKER, S. H. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 2088-2097, 2005.

CASEY, A. et al. Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism,** v. 271, n. 1, p. 31-37, 1996.

CIECHANOVER, A. Intracellular protein degradation: from a vague Idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 9, p. 1178-90, 2005.

DE MEIS, L. Ca^{2+}-ATPases (SERCA): energy transduction and heat production in transport ATPases. **Journal of Membrane Biology**, v. 188, n. 1, p. 1-9, 2002.

DEHOUX, M. et al. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogin-1/MAFbx during fasting and diabetes. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4806-4812, 2004.

DELDICQUE, L. et al. Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 2, p. 371-378, 2008.

DELDICQUE, L. et al. Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation**. Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, n. 5, p. 731-736, 2005.

DELDICQUE, L. et al. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. **American Journal of Physiology. Cell Physiology,** v. 293, n. 4, p. 1263-1271, 2007.

DELECLUSE, C., DIELS, R. GORIS, M. Effect of Creatine Supplementation on Intermittent Sprint Running Performance in Highly Trained Athletes. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 17, n. 3, p. 446-454, 2003.

DOS SANTOS, R. A.; GIANNOCCO, G.; NUNES, M. T. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitalis longus muscles of rats: concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. **Thyroid**, v. 11, n. 6, p. 545-550, 2001.

EDMAN, K. A.; MATTIAZZI, A. R. Effects of fatigue and altered pH on isometric force and velocity of shortening at zero load in frog muscle fibres. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 2, n. 3, p. 321-334, 1981.

EDWARDS, R. H.; HILL, D. K.; JONES, D. A. Metabolic changes associated with the slowing of relaxation in fatigued mouse muscle. **Journal of Physiology**, v. 251, n. 2, p. 287-301, 1975.

FINN, J.P. et al. Effect of creatine supplementation on metabolism and performance in humans during intermittent sprint cycling. **European Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 3, p. 238-243, 2001.

FIOROTTO, M. L.; SCHWARTZ, R. J.; DELAUGHTER, M. C. Persistent IGF-1 overexpression in skeletal muscle transiently enhances DNA accretion and growth. **FASEB Journal**, v. 17, n. 1, p. 59-60, 2003.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. Methods in **Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FLÜCK, M; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology,** v. 146, p. 159-216, 2003.

FRANCAUX, M.; POORTMANS, J. R. Effects of training and creatine supplement on muscle strength and body mass. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**. v. 80, n. 2, p. 165-168, 1999.

FROST, R. A.; LANG, C. H. Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. **Journal of Applied Physiology,** v. 103, n. 1, p. 378-387, 2007.

GEHRIG, S. M. et al. Insulin-like growth factor-I analogue protects muscles of dystrophic mdx mice from contraction-mediated damage. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 11, p. 1190-1198, 2008.

GILLIAM, J. D. et al. Effect of oral creatine supplementation on isokinetic torque production. **Medicine and Science in Sports and Exercise,** v. 32, n. 5, p. 993-996, 2000.

GLASS, D. J. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 346, p. 267-278, 2010.

GOLDSPINK, G. Gene expression in muscle in response to exercise. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 24, n. 2-3, p. 121-126, 2003.

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14440–14445, 2001.

GREEN, A. L. et al. Carbohydrate ingestion augments creatine retention during creatine feeding in humans. **Acta Physiologica Scadinavica**, v. 158, n. 2, p. 195–202, 1996.

GREENHAFF, P. L. The nutritional biochemistry of creatine. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 610-618, 1997.

GREENHAFF, P. L. et al. Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatineresynthesis. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism,** v. 266 n. 29, p. 725–730, 1994.

GREENHAFF, P. L. et al. Influence of oral creatine supplementation of muscle torque during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. **Clinical Science**. v. 84, n. 5, p. 565–571, 1993.

HARTMAN, M. L. et al. Temporal structure of in vivo growth hormone secretory events in humans. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism.** v. 260, n. 1, p. 101–110, 1991.

HESPEL, P.; OP'T EIJNDE, B.; VAN LEEMPUTTE, M. Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxationtime in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 2, p. 513-518, 2002.

HESPEL, P. et al. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. **Journal of Physiology**, v. 536, p. 625-633, 2001.

HOFFMAN, J. et al. Effect of creatine and beta-alanine supplementation on performance and endocrine responses in strength/power athletes. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism,** v. 16, n. 4, p. 430-446, 2006.

INGWALL, J. S.; MORALES, M. F.; STOCKDALE, F. E. Creatine and the control of myosin synthesis in differentiating skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 69, n. 8, p. 2250-2253, 1972.

INGWALL, J.S. et al. Specificity of creatine in the control of muscle protein synthesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 62, n. 1, p. 145-151, 1974.

INGWALL, J. S.; WILDENTHAL, K. Role of creatine in the regulation of cardiac protein synthesis. **The Journal of Cell Biology**. v. 68, n. 1, p. 159-163, 1976.

IZQUIERDO, M. et al. Effects of creatine supplementation on muscle power, endurance, and sprint performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, n. 2, p. 332-343, 2002.

JACOBS, I.; BLEUE, S.; GOODMAN, J. Creatine ingestion increases anaerobic capacity and maximum accumulated oxygen deficit. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 22, p. 231-243, 1997.

JACOBUS, W. E.; SAKS, V. A. Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 219, n. 1, p. 167-178, 1982.

JEFFERSON, L. S.; VARY, T. C.; KIMBALL, S. R. Regulation of protein metabolism in muscle. In: McEWEN, B. S.; GOODMAN, H. M. **Handbook of Physiology, Section 7:** The Endocrine System Vol. IV: Coping with the Environment: Neural & Endocrine Mechanisms. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 529-545.

JONES, S. W. et al. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. **FASEB Journal**, v. 18, n. 9, p. 1025-1027, 2004.

JU, J. S. et al. Creatine feeding increases GLUT4 expression in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 2, p. 347-352, 2005.

KIM, J. H. et al. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 1, p. 9-18, 2003.

KIMBALL, S. R.; FARREL, P. A.; JEFFERSON, L. S. Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 3, p. 1168-80, 2002.

KOKOSZKO, A. et al. Protective effects of GH and IGF-I against iron-induced lipid peroxidation in vivo. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, n. 6, p. 453-458, 2008.

KORGE, P.; CAMPBELL, K. B. Local ATP regeneration is important for sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump function. **American Journal of Physiology**. v. 267, n. 2, p. 357-366, 1994.

KREIDER, R.B. et al. Effects of creatine supplementation on body composition, strength, and sprint performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 1, p. 73-82, 1998.

LAI, K. M. et al. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9295-9304, 2004.

LANNING, N. J.; CARTER-SU, C. Recent advances in growth hormone signaling. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 7, n. 4, p. 225–235, 2006.

LARSEN, P. R. et al. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Elsevier Saunders; 10th ed, 2002. 1820 p.

LAWLER, J. M. et al. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochemical and Biophysical Research Communication,** v. 290, n. 1, p. 47–52, 2002.

LAYCOCK, J. F.; WISE, P. H. **Essential Endocrinology**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 1996. 436 p.

LECKER, S. H. et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB Journal**, v. 18, p. 39–51, 2004.

LECKER, S. H. et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitinproteasome pathway in normal and disease states. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1S, p. 227S–237S, 1999a.

LECKER, S. H. et al. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 10, p. 1411–1420, 1999b.

LIEBER , R. L. **Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 336 p.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOUIS, M. et al. Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory factor mRNA in C(2)C(12) cells**. FEBS Letters,** v. 557, n. 1-3, p. 243-247, 2004.

LUKASZUK, J. M. et al.Effect of creatine supplementation and a lacto-ovo-vegetarian diet on muscle creatine concentration. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**. v. 12, n. 3, p. 336-348, 2002.

MAHESHWARI, H. G. et al. Pulsatile growth hormone secretion persists in genetic growth hormone-releasing hormone resistance. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 282, n. 4, p. 943-951, 2002.

MARZETTI, E. et al. Sarcopenia of aging: underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction. **Biofactors**, v. 35, p. 28–35, 2009.

MENEZES, L. G. et al.Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 2, p. 698-703, 2007.

MERTANI, H. C. et al. Localization of growth hormone receptor messenger RNA in human tissues. **Endocrine**, v. 3, n. 2, p. 135–142, 1995.

MEYER, L. E. et al. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 49, p. 37361-37371, 2006.

MUJIKA, I. et al. Creatine supplementation does not improve sprint performance in competitive swimmers. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.28, n.11, p.1435-1441, 1996.

NUNES, M. T. A Glândula Hipófise. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

O'GORMAN, E. et al. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1276, n. 2, p. 161-170, 1996.

OP'T EIJNDE, B. et al. Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT4 protein content after immobilization. **Diabetes**, v. 50, n. 1, p. 18-23, 2001.

OP‘T EIJNDE, B.; et al. Effect of creatine supplementation on creatine and glycogen content in rat skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, p. 169-176, 2001.

PEARSON, D. R. et al. Long-term effects of creatine monohydrate on strength and power. **Journal of Strength and Conditioning Research**. v. 13, p. 187-192, 1999.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G.A.; HOCHHAUS, G. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 42, n. 6, p. 557-574, 2003.

PETROFSKY, J. S.; FITCH, C. D. Contractile characteristics of skeletal muscles depleted of phosphocreatine. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 384, n. 2, p. 123-129, 1980.

PEYREBRUNE, M. C. et al. Effect of creatine supplementation on training for competition in elite swimmers. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, n. 12, p. 2140-2147, 2005.

PINHEIRO, C. H.; VITZEL, K. F.; CURI, R. Effect of N-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 22, n. 1, p.24-33, 2012.

ROCHARD, P. et al. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2733–2744, 2000.

ROSCHEL, H. et al. Creatine supplementation spares muscle glycogen during high intensity intermittent exercise in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 6, 2010.

SACHECK, J. M. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v. 287, n. 4, p. 591-601, 2004.

SCHEDEL, J. M. et al. Acute creatine loading enhances human growth hormone secretion. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 40, n. 4, p. 336-342, 2000.

SESTILI, P. et al. Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 9, p. 1187–1204, 2009.

SESTILI, P. et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 40, p. 837–849, 2006.

SEWELL, D. A.; ROBINSON, T. M.; GREENHAFF, P. L. Creatine supplementation does not affect human skeletal muscle glycogen content in the absence of prior exercise. Journal of Applied Physiology, v. 104, n. 2, p. 508-512, 2008.

SILVEIRA, L. R. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 9, p. 969-976, 2006.

SNOW, R. J. et al. Effect of creatine supplementation on sprint exercise performance and muscle metabolism. **Journal of Applied Physiology**, v. 84**,** p. 1667-1673, 1998.

SNOW, R. J.; MURPHY, R. M. Creatine and the creatine transporter: a review. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 224, n. 1-2, p. 169-181, 2001.

STEEGHS, K. et al. Altered Ca2+ responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. **Cell**, v. 89, p. 93-103, 1997.

TARNOPOLSKY, M. A. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. **Amino Acids**, v. 40, n. 5, p. 1397-407, 2011.

TAWA, N. E.; ODESSEY, R.; GOLDBERG, A. L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 197–203, 1997.

VAN LEEMPUTTE, M.; VANDENBERGHE, K.; HESPEL, P. Shortening of muscle relaxation time after creatine loading. Journal of Applied Physiology. v. 86, n. 3, p. 840-844, 1999.

VAN LOON, L. J. et al. Creatine supplementation increases glycogen storage but not GLUT-4 expression in human skeletal muscle. Clinical Science, v. 106, n. 1, p. 99-106, 2004.

VANDENBERGHE, K. et al. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 16, p. 2055–2063, 1997.

VIERCK, J. L. et al. The effects of ergogenic compounds on myogenic satellite cells. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 35, n. 5, p. 769-776, 2003.

VOLEK, J.S. et al. Response of testosterone and cortisol concentrations to high-intensity resistance exercise following creatine supplementation. **Journal of Strength and Conditioning Research,** v. 11, p. 182-187, 1997.

VOLEK, J. S. Performance and muscle fiber adaptation to creatine supplementation and heavy resistance training. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 8, p. 1147–1156, 1999.

WALLIMANN, T. et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. Biochemical Journal. v. 281(pt 1), p. 21-40, 1992.

WILDER, N. et al. The effects of low-dose creatine supplementation versus creatine loading in collegiate football players. **Journal of Athletic Training,** v. 36, p. 124-129, 2001.

WILKINSON, S. B. et al. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signaling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. **Journal of Physiology**, v. 586, p. 3701–3717, 2008.

WILLIAMS, M. H.; KREIDER, R. B.; BRANCH, J. D. **Creatina**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2000. 271 p.

WILLOUGHBY, D. S.; ROSENE, J. M. Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 6, p. 923-929, 2003.

WINER, L. M.; SHAW, M. A.; BAUMANN, G. Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 70, p. 1678–1686, 1990.

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

YANG, S. Y. et al. Pretreatment with insulin-like growth factor i protects skeletal muscle cells against oxidative damage via PI3K/Akt and ERK1/2 MAPK pathways. **Laboratory Investigation**, v. 90, n. 3, p. 391-401, 2010.

YOSHIZAKI, K.; WATARI, H.; RADDA, G. K. Role of phosphocreatine in energy transport in skeletal muscle of bullfrog studied by 31P-NMR. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1051, n. 2, p. 144-150, 1990.

ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162–168, 1997.

APÊNDICE - Artigo Publicado

Eur J Appl Physiol
DOI 10.1007/s00421-012-2378-9

ORIGINAL ARTICLE

Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle

Lucas Guimarães-Ferreira · Carlos Hermano J. Pinheiro · Frederico Gerlinger-Romero · Kaio F. Vitzel · Renato T. Nachbar · Rui Curi · Maria Tereza Nunes

Received: 16 January 2012 / Accepted: 29 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract The effect of short-term creatine (Cr) supplementation upon content of skeletal muscle-derived-reactive oxygen species (ROS) was investigated. Wistar rats were supplemented with Cr (5 g/kg BW) or vehicle, by gavage, for 6 days. Soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles were removed and incubated for evaluation of ROS content using Amplex-UltraRed reagent. The analysis of expression and activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase 1 and 2, catalase and glutathione peroxidase) were performed. Direct scavenger action of Cr on superoxide radical and hydrogen peroxide was also investigated. Short-term Cr supplementation attenuated ROS content in both soleus and EDL muscles (by 41 and 33.7%, respectively). Cr supplementation did not change expression and activity of antioxidant enzymes. Basal TBARS content was not altered by Cr supplementation. In cell-free experiments, Cr showed a scavenger effect on superoxide radical in concentrations of 20 and 40 mM, but not on hydrogen peroxide. These results indicate that Cr supplementation decreases ROS content in skeletal muscle possibly due to a direct action of Cr molecule on superoxide radical.

Keywords Creatine · Reactive oxygen species · Antioxidant enzymes · Dietary supplementation · Skeletal muscle

L. Guimarães-Ferreira and C.H.J. Pinheiro contributed equally to this work.

Communicated by Michael Lindinger.

L. Guimarães-Ferreira (✉) · C. H. J. Pinheiro · F. Gerlinger-Romero · K. F. Vitzel · R. T. Nachbar · R. Curi · M. T. Nunes
Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, ICB-I, Cidade Universitária, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, Butantã, São Paulo, SP 05508-900, Brazil
e-mail: lucas@cefd.ufes.br

L. Guimarães-Ferreira
Exercise Metabolism Research Group, Department of Sports, Center of Physical Education and Sports, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

Introduction

Creatine (Cr) is synthesized in the kidney, pancreas and liver (especially in the later) from glycine, arginine and methionine (Persky et al. 2003). Its biosynthesis involves the action of two enzymes: arginine/glycine amidinotransferase (AGAT) and guanidinoacetate methyltransferase (GAMT). Daily, about 2 g of Cr are converted, through non-enzymatic reaction, in creatinine that freely cross cell membrane and is subsequently excreted by kidneys (Greenhaff 1997; Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). The replenishment of Cr pool occurs both by endogenous synthesis as by food intake in a typical omnivorous diet.

Cr has important role in metabolism and contractile function in skeletal muscle. Total intracellular Cr content (both free and phosphorylated forms) is about 120–125 mmol/kg dry weight and 95 % of this amount is founded in skeletal muscle (Persky et al. 2003). Phosphocreatine (PCr) acts as an intracellular energy buffer, restoring ATP pool and also to buffer hydrogen ions associated with lactate production in fatiguing skeletal muscle (Stricker 1998; Feldman 1999). This energy buffer system is predominantly used at the beginning of muscle work, as well in efforts of very short duration and high intensity, when a faster ATP regeneration is required. Cr–PCr system is important to the strength production and relaxation

Published online: 14 March 2012

capacity of skeletal muscle. The Cr depletion by β-guanidino-propionic acid (β-GPA) administration impairs contractile function in rat skeletal muscle (Petrofsky and Fitch 1980).

Apart from the use in sports, Cr supplementation has shown positive clinical effects in the treatment of some chronic diseases such as arthritis, congestive heart failure, muscular dystrophy, McArdle disease, mitochondrial diseases and neurological disorders (Persky et al. 2003). Most of these clinical disorders involve a dramatic increase in content of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH·). Matthews et al. (1998) showed by the first time that oral Cr supplementation attenuates the generation of both hydroxyl radical and peroxynitrite in rats submitted to chronic administration of nitropropionic acid, an animal model of Huntington's disease. This effect was similar to that observed when *N*-acetylcysteine (NAC), a potent unspecific antioxidant, was used in this model (Fontaine et al. 2000). The authors, however, did not attribute this protective effect to neither a direct ROS scavenger nor augmentation of antioxidant capacity in cells. Later, Lawler et al. (2002) utilizing non-cellular systems provided evidence that Cr acts as a radical scavenger, quenching diverse aqueous radical and reactive species. Moreover, Sestili et al. (2006) utilizing various cell lineages demonstrated similar results. However, the in vivo antioxidant effects of Cr supplementation in skeletal muscle tissue were not demonstrated yet.

The aim of this study was to evaluate the effects of short-term oral Cr supplementation on content of skeletal muscle-derived ROS as well in gene expression and activity of some antioxidant enzymes. This data help to explain in vivo effects of Cr supplementation, in terms of antioxidant potential, as well direct Cr effects upon ROS, in cell-free experiments. This data could contribute to explain in vivo effects of Cr supplementation, in terms of antioxidant potential, as well direct Cr effects upon ROS, in acellular systems.

Methods

Animals

Male Wistar rats (6–8 weeks and weighing 200–250 g) were obtained from the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo. The animals were maintained in groups of five with water and food ad libitum in a room with 12/12 h light–dark cycle at 22 °C. All experimental procedures were carried out in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, DC). The experimental protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research (CEEA) of the Institute of Biomedical Sciences/University of São Paulo.

Creatine supplementation protocol

Creatine monohydrate supplementation (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) was carried out by gavage, at the dose of 5 g/kg body weight/day, divided in 3 daily doses, for 6 days (creatine group). The control group received the same volume of vehicle (tap water) by the same route. This dose was chosen because it was capable of significantly increasing intracellular Cr pool (Op 't Eijnde et al. 2001; Aoki et al. 2004) and induces functional effects on rat skeletal muscle (Bassit et al. 2010). According to Op 't Eijnde et al. (2001) an increase in free Cr (30 %), phosphocreatine (15 %) and total Cr (20 %) content are observed after 5 days of supplementation. These effects were similar to the dose commonly used in humans (Casey et al. 1996; Greenhaff et al. 1994).

Measurement of muscle-derived ROS

The rats were supplemented with Cr to evaluate the effects on content of muscle-derived ROS.

The content of muscle-derived ROS was evaluated in incubated soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles. The measurement of ROS content during organ incubation was used to evaluate the impact of Cr supplementation on antioxidant capacity of skeletal muscle. Under anesthesia, muscles were quickly removed and immediately incubated in oxygenated (95 % O_2–5 % CO_2) Krebs solution in the presence of 50 µM Amplex® UltraRed reagent (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) and 0.1 U/mL horseradish (HRP) for 60 min. Amplex® dye has been used to measurement ROS in skeletal muscle preparations (Pinheiro et al. 2010, 2012). In the presence of peroxidase, the Amplex® reagent reacts with H_2O_2 in a 1:1 stoichiometry to produce the red-fluorescent oxidized product, resorufin (Zhou et al. 1997). HRP also catalyzes the decomposition of H_2O_2 to the hydroxyl radical, which is then reduced to water as a result of irreversible chemical oxidation of Amplex Red. Thus, this probe is specific for H_2O_2 detection. Amplex Red reagent is a highly sensitive and stable substrate for HRP with selectivity for H_2O_2. Resorufin is also stable and its long-wave spectrum results in reduced interference from autofluorescence in most biological samples. Amplex Red is widely used for the

measurement of low levels of H_2O_2 in various biological samples and another advantage of this assay is that HRP is active over a wide pH range (Rhee et al. 2010). The fluorescence of resorufin was determined in 530 nm wavelength (excitation) and 590 nm wavelength (emission). Measurements of ROS were calibrated using a known dose of exogenous H_2O_2 (10 μM, positive control) in the presence or absence of CAT (300 U/mL), GPX (5 U/mL) and GSH (0.5 mM). All measurements were conducted in Krebs solution (1 mL), pH 7.4, at 37 °C. The content of H_2O_2 was calculated from the standard curve and the results were normalized in relation to muscle weight and expressed as percentage of control as described (Pinheiro et al. 2012).

Total mRNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted from soleus and EDL muscles as previously described (Gerlinger-Romero et al. 2011). Two micrograms of total RNA were used to synthesize the first strand complementary DNA (cDNA) using oligo-dT primers and the M-MLV reverse transcriptase kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription reaction was performed at 70 °C for 10 min, followed by 37 °C for 60 min, and 10 min at 95 °C. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed using the SYBR® Green PCR master mix kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and the primers for superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD; forward: 5′-AAGCCT ACAAAGTCAGCTCG-3′, reverse: 5′-GGTCTTGTTTCC TGCACTT-3′), mitochondrial manganese superoxide dismutase (Mn-SOD; forward: 5′-GGATTCATGTGCCAGG GTGG-3′, reverse: 5′-CACATGCTTGCCATCCAGCC-3′), catalase (Forward: 5′-GGATTCATGTGCCAGGGTGG-3′, reverse: 5′-CACATGCTTGCCATCCAGCC-3′), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; forward: 5′-GGATTCATGTGCCAGGGTGG-3′, reverse: 5′-CAC ATGCTTGCCATCCAGCC-3′) as internal control. The reaction conditions consisted of two steps at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of three steps: 20 s denaturation at 95 °C, 60 s annealing at 58 °C and 20 s at 72 °C, as described (Lawler et al. 2002). SYBR Green-based real-time PCR analysis was carried out with the Rotor-gene Q detector (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA aliquots are routinely sham reverse transcribed (i.e., reverse transcriptase omitted) to ensure the absence of products other than those from the reverse transcribed mRNAs. The relative abundance of Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, catalase and GAPDH mRNAs was calculated, using the $2-\Delta\Delta Ct$ method (Livak and Schmittgen 2001), and the results were expressed in arbitrary units (AU).

Analysis of antioxidant enzyme activities

The activities of catalase and glutathione peroxidase (GPX) were measured as previously described (Aebi 1984; Flohé and Günzler 1984). Soleus and EDL muscles were homogenized in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, with a Polytron PT-3100 (Kinematica AG, Littau, Switzerland). The samples were centrifuged for 20 min at 13,000 rpm, 4 °C, and the supernatant were used for activity assays of both enzymes. Catalase activity was determined on spectrophotometer by measuring the breakdown of hydrogen peroxide at 30 °C and 240 nm (Aebi 1984). GPX activity was determined as described by Flohé and Günzler (1984), following the rate of NADPH oxidation, at 340 nm, 37 °C, in an assay medium containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.15 mM NADPH, glutathione reductase (0.24 U/mL) and 1 mM reduced glutathione. The reaction was initiated by the addition of *t*-butyl hydroperoxide (1.2 mM).

Measurement of ROS scavenger action of Cr

The cell-free experiment consisted in analysis of quenching on H_2O_2 added to solution and superoxide generated by electrolysis of oxygenated Krebs solution. In these experiments, we evaluated the scavenger properties of Cr with no incubated organ producing ROS.

To evaluate the effects of Cr on H_2O_2, Amplex® Ultrared and HRP were utilized as describe above. Fluorescence was obtained in 4 conditions, in triplicates: (a) Amplex® + HRP (blank condition); (b) H_2O_2 (500 nM) + Amplex® + HRP (control condition); (c) creatine (10, 20 and 40 mM) + Amplex® + HRP (condition without H_2O_2); and creatine (10, 20 and 40 mM) + H_2O_2 (500 nM) + Amplex® + HRP. Results were expressed in absorbance (550 nm) normalized to blank condition. We use a Cr range (10–40 mM) that represents physiological levels of total Cr found within muscle cells (Kushmerick et al. 1992; McKenna et al. 1999; Lawler et al. 2002).

The effect of Cr on electrolysis-induced superoxide production was also evaluated**.** Krebs solution was previously oxygenated using 95 % O_2–5 % CO_2 gas mixture prior to electrical stimulation using 50 Hz of frequency, 0.5 ms pulse duration and 50 V for 10 min using silver electrodes in the presence of ferricytochrome *c* (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). This condition leads to formation of ROS due to electrolysis, predominantly the hydroxyl radical and the superoxide anion radical at the side of the anode and cathode (Lecour et al. 1998). Superoxide production was monitored by ferricytochrome *c* reduction followed by sample read in a spectrophotometer at 550 nm using Krebs solution with no electrical stimulation as blank (Azzi et al. 1975).

Determination of muscle TBARS content

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were measured as previously described (Winterbourn et al. 1985). Muscles were homogenized using scissor in saline buffer and the precipitated proteins were removed by centrifugation at 12,000*g* for 10 min. The supernatant (500 μL) was mixed with 500 μL thiobarbituric acid (1 % in 50 mM NaOH) and 500 μL of HCl at 25 %. The samples were then heated in a boiling water bath for 10 min and, after cooling, TBARS were extracted with 1.5 mL of n-butanol. The mixture was centrifuged at 12,000*g* for 10 min and the absorbance of the supernatant was determined at 532 nm. Thiobarbituric acid reacts with products of lipid peroxidation, mainly malondialdehyde, producing a colored compound. The results were expressed as micromoles of TBARS content relative to milligram of the total protein determined using Bradford's method (Bradford 1976).

Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SEM and the significance level was set at 5 % ($P = 0.05$) with 8–10 animals per group ($n = 8$–10). The statistical analysis was performed using an unpaired Student's *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA), when appropriate (Prism GraphPad, Version: 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Results

Oral Cr supplementation during 6 days did not change muscle morphology: body weight and soleus and EDL wet weights/body weight (Table 1).

The hydrogen peroxide production by skeletal muscles was significantly lower in Cr-supplemented animals. This production was 59 and 76.3 % of the control values in soleus and EDL muscles, respectively (Fig. 1). In spite of this effect, supplementation did not change the levels of the antioxidant enzymes mRNA (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, and catalase) in either soleus or EDL muscles (Fig. 2), as well GPX and catalase activities (Table 2).

TBARS content was not affected by Cr supplementation in soleus (control: 0.95 ± 0.33; Cr: 0.90 ± 0.15 MDA eq.mg of protein^{-1}) and EDL (control: 1.05 ± 0.24; Cr: 0.91 ± 0.28 MDA eq.mg of protein^{-1}) muscles.

In cell-free experiments, Cr exerted a direct scavenger effect on superoxide radical in concentrations of 20 and 40 mM (Fig. 3a). This effect, however, was not verified on hydrogen peroxide in any concentration of Cr (Fig. 3b).

Table 1 Morphometrical parameter in control and Cr-supplemented groups

Morphometric parameter	Control group	Creatine group	*P* value
Body weight (g)	292.6 ± 5.31	290.2 ± 9.29	0.83
Soleus wet weight/body weight (%)	0.036 ± 0.001	0.039 ± 0.001	0.15
EDL wet weight/body weight (%)	0.042 ± 0.001	0.043 ± 0.001	0.25

Discussion

Although the antioxidant properties of Cr have been previously demonstrated, in either cell-free or in vitro experiments, we reported herein that short-term Cr supplementation decreased ROS content in slow and fast-twitch skeletal muscles. It is the first demonstration of direct in vivo effects of Cr upon muscle redox state. The antioxidant effects of Cr could be due to modulation of expression and/or activities of antioxidant enzymes; a direct scavenger effect on ROS; or a modulation of ROS production in specific sites. We demonstrated herein that Cr supplementation did not change expression and activities of antioxidant enzymes. However, a direct scavenger effect of Cr on superoxide radical but not in hydrogen peroxide was observed.

The decline of ROS content in skeletal muscles after Cr supplementation may be explained by: a direct ROS scavenger action by Cr molecule; a stimulation of antioxidant enzymes expression and/or activities; or an effect upon ROS production through mitochondria or NADPH oxidase. Lawler et al. (2002) demonstrated that Cr molecule exerts a scavenger action on diverse radical and reactive species (superoxide anions and peroxynitrite, but not on hydrogen peroxide). These authors utilized cell-free systems and found a direct dose–response relationship between Cr concentration and antioxidant scavenger activity. Later, Sestili et al. (2006) tested the effects of Cr on the cytotoxicity caused by exogenous oxidants in human and murine myotubes. In spite of no alterations in the activities of catalase and GPX, Cr attenuated the cytotoxic effects of H_2O_2, butylhydroperoxide and peroxynitrite upon these cells corroborating with the results reported in the present study. This work provided information on the role of Cr as an antioxidant, indicating that the mechanism is dependent on a direct scavenging effect on free radicals. Our results also confirm this mechanism of Cr antioxidant action in skeletal muscle.

Skeletal muscles with predominance of oxidative fibers exhibit higher activities of antioxidant enzymes compared to

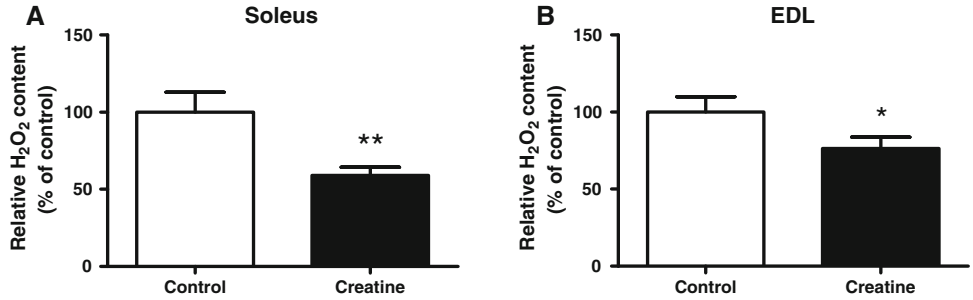


Fig. 1 Content of reactive oxygen species (ROS) in soleus (**a**) and EDL (**b**) muscles after 6 days of oral creatine supplementation. Data are expressed as mean ± SEM. $*P < 0.05$; and $**P < 0.01$ versus control group

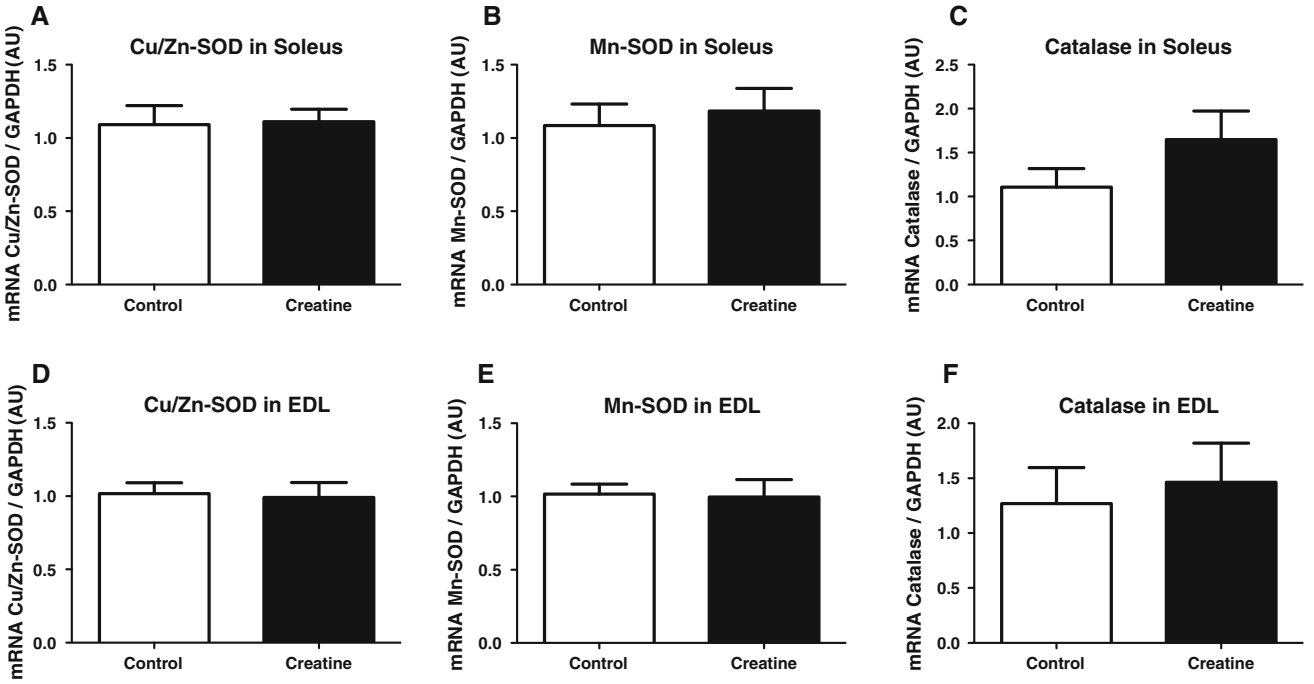


Fig. 2 Gene expression of antioxidants enzymes SOD1, SOD2 and catalase in soleus (**a**, **b** and **c**) and EDL (**d**, **e** and **f**) after 6 days of oral Cr supplementation. Data are expressed as mean ± SEM

Table 2 Activity of antioxidant enzymes GPX and catalase in soleus and EDL muscles after 6 days of oral Cr supplementation

Activity of antioxidant enzymes (μmol min^{-1} mg of $protein^{-1}$)	Control group	Creatine group	*P* value
GPX in soleus	1,052 ± 32.34	982.3 ± 30.15	0.16
GPX in EDL	302.8 ± 64.40	367.7 ± 34.87	0.37
Catalase in soleus	19.93 ± 2.07	17.15 ± 1.38	0.35
Catalase in EDL	8.71 ± 1.38	9.52 ± 1.42	0.69

glycolytic fibers (Oh-Ishi et al. 1995). Our results support these findings. Muscle fibers with higher oxidative capacity, such as predominantly in soleus, also have higher ROS production and this is an important stimulus to expression of antioxidant enzymes (see Dröge 2002 for review). Despite differences among oxidative and glycolytic skeletal muscles neither the soleus nor the EDL exhibits altered expression and activities of antioxidant enzymes in response to Cr supplementation, indicating that its redox action may occur by other mechanism. In the presence of Cr, the content of reduced cytochrome *c* was low indicating a direct scavenger effect of Cr on superoxide radical. Low content of superoxide results in low content of its ROS derivatives such as H_2O_2 (Dröge 2002). This effect of Cr on superoxide radical supports the proposition that the decrease of ROS content in skeletal muscles from supplemented animals may be due to an increase in intracellular Cr content.

Previous works of our group have demonstrated that Cr supplementation promotes significant attenuation of acute muscle fatigue similar to that observed when the antioxidant NAC was administered to adult rats prior to intense contractile activity (Bassit et al. 2010; Pinheiro et al. 2012). In both, the intervention decreased the markers of contraction-induced muscle injury. These results point to a possible

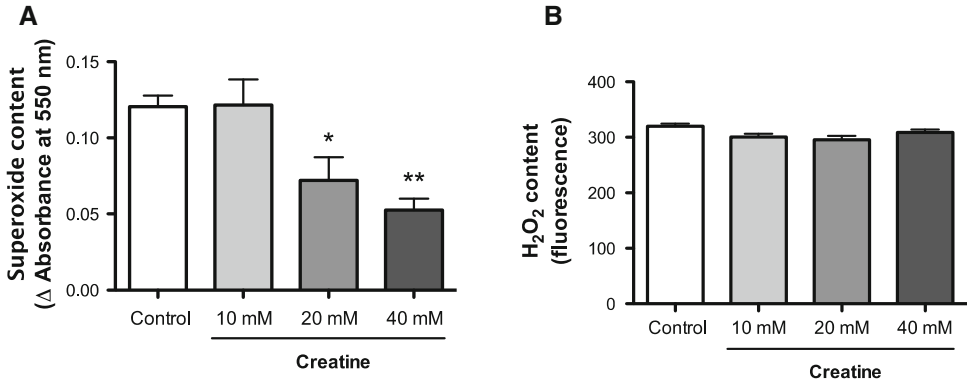


Fig. 3 Scavenger effects of creatine on reactive oxygen species. Effect of creatine upon electrolysis-induced superoxide production in oxygenated Krebs solution (**a**); and lack of scavenger effect of creatine on hydrogen peroxide (500 nM) (**b**). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ versus control. Data are expressed as mean ± SEM

antioxidant action of Cr in skeletal muscle tissue in addition to the metabolic and/or hormonal alterations already demonstrated (Greenhaff et al. 1994; Deldicque et al. 2005; Olsen et al. 2006). The decrease in ROS production was not enough to reduce the TBARS content. We believed that in a specific condition where TBARS is substantially elevated characterizing a chronic oxidative stress, Cr supplementation may exert an effect in this parameter.

Conclusion

We reported herein in vivo effect of short-term Cr supplementation on ROS content in skeletal muscle. In spite of no alterations in expression and activities of antioxidant enzymes, Cr appears to act directly as an ROS scavenger. These results support the proposition that Cr has antioxidant properties in skeletal muscle. ROS production has an important role in muscle wasting and contractile dysfunction observed in chronic diseases as diabetes, muscular dystrophy, chronic heart failure and obstructive pulmonary disease (for review see Moylan and Reid 2007). Thus, the decrease in ROS content in skeletal muscle in response to Cr supplementation suggests a possible therapeutic application in neuromuscular chronic diseases and stimulates further investigations focusing this issue.

Acknowledgments We are thankful to Leonice Lourenço Poyares for technical support. L.G-F., F.G-R., K.F.V. and R.T.N. are recipients of fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). C.H.J.P. is recipient of fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). M.T.N. and R.C. are recipients of fellowships from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

References

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105:121–126

Aoki MS, Lima WP, Miyabara EH, Gouveia CH, Moriscot AS (2004) Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. Clin Nutr 23:1176–1183

Azzi A, Montecucco C, Richter C (1975) The use of acetylated ferricytochrome *c* for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. Biochem Biophys Res Commun 65:597–603

Bassit RA, Pinheiro CH, Vitzel KF, Sproesser AJ, Silveira LR, Curi R (2010) Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. Eur J Appl Physiol 108:945–955

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Casey A, Constantin-Teodosiu D, Howell S, Hultman E, Greenhaff PL (1996) Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. Am J Physiol 271:E31–E37

Deldicque L, Louis M, Theisen D, Nielens H, Dehoux M, Thissen JP, Rennie MJ, Francaux M (2005) Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. Med Sci Sports Exerc 37:731–736

Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82:47–95

Feldman EB (1999) Creatine: a dietary supplement and ergogenic aid. Nutr Rev 57:45–50

Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105:114–121

Fontaine MA, Geddes JW, Banks A, Butterfield DA (2000) Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitropionic acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: insights into Huntington's disease. J Neurochem 75:1709–1715

Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, Giannocco G, Nunes MT (2011) Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMβ) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. Growth Horm IGF Res 21:57–62

Greenhaff Pl (1997) The nutritional biochemistry of creatine. J Nutr Biochem 8:610–618

Greenhaff PL, Bodin K, Soderlund K, Hultman E (1994) Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. Am J Physiol 266:E725–E730

Kushmerick MJ, Moerland TS, Wiseman RW (1992) Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. Proc Natl Acad Sci USA 89:7521–7525

Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine. Biochem Biophys Res Commun 290:47–52

Lecour S, Baouali AB, Maupoil V, Chahine R, Abadie C, Javouhey-Donzel A, Rochette L, Nadeau R (1998) Demonstration of the production of oxygen-centered free radicals during electrolysis using E. S. R. spintrapping techniques: effects on cardiac

function in the isolated rat heart. Free Radic Biol Med 24:573–579

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(−delta delta C(T)) method. Methods 25:402–408

Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF (1998) Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. J Neurosci 18:156–163

McKenna MJ, Morton J, Selig SE, Snow RJ (1999) Creatine supplementation increases muscle total creatine but not maximal intermittent exercise performance. J Appl Physiol 87:2244–2252

Moylan JS, Reid MB (2007) Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. Muscle Nerve 35:411–429

Oh-Ishi S, Kizaki T, Yamashita H, Nagata N, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H (1995) Alterations of superoxide dismutase iso-enzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle. Mech Ageing Dev 84:65–76

Olsen S, Aagaard P, Kadi F, Tufekovic G, Verney J, Olesen JL, Suetta C, Kjaer M (2006) Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. J Physiol 573:525–534

Op 't Eijnde B, Richter EA, Henquin JC, Kiens B, Hespel P (2001) Effect of creatine supplementation on creatine and glycogen content in rat skeletal muscle. Acta Physiol Scand 171:169–176

Persky AM, Brazeau GA, Hochhaus G (2003) Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. Clin Pharmacokinet 42:557–574

Petrofsky JS, Fitch CD (1980) Contractile characteristics of skeletal muscles depleted of phosphocreatine. Pflugers Arch 384:123–129

Pinheiro CH, Silveira LR, Nachbar RT, Vitzel KF, Curi R (2010) Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. Free Radic Biol Med 48:953–960

Pinheiro CH, Vitzel KF, Curi R (2012) Effect of *N*-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. Scand J Med Sci Sports 22:24–33

Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. Mol Cells 29:539–549

Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V (2006) Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. Free Radic Biol Med 40:837–849

Stricker PR (1998) Other ergogenic agents. Clin Sports Med 17:283–297

Winterbourn CC, Gutteridge JM, Halliwell B (1985) Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O_2. Free Radic Biol Med 1:43–49

Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. Physiol Rev 80:1107–1213

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal Biochem 253:162–168