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-G raduação 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

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.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CREATINA

1.1.1 O sistema da fosfocreatina

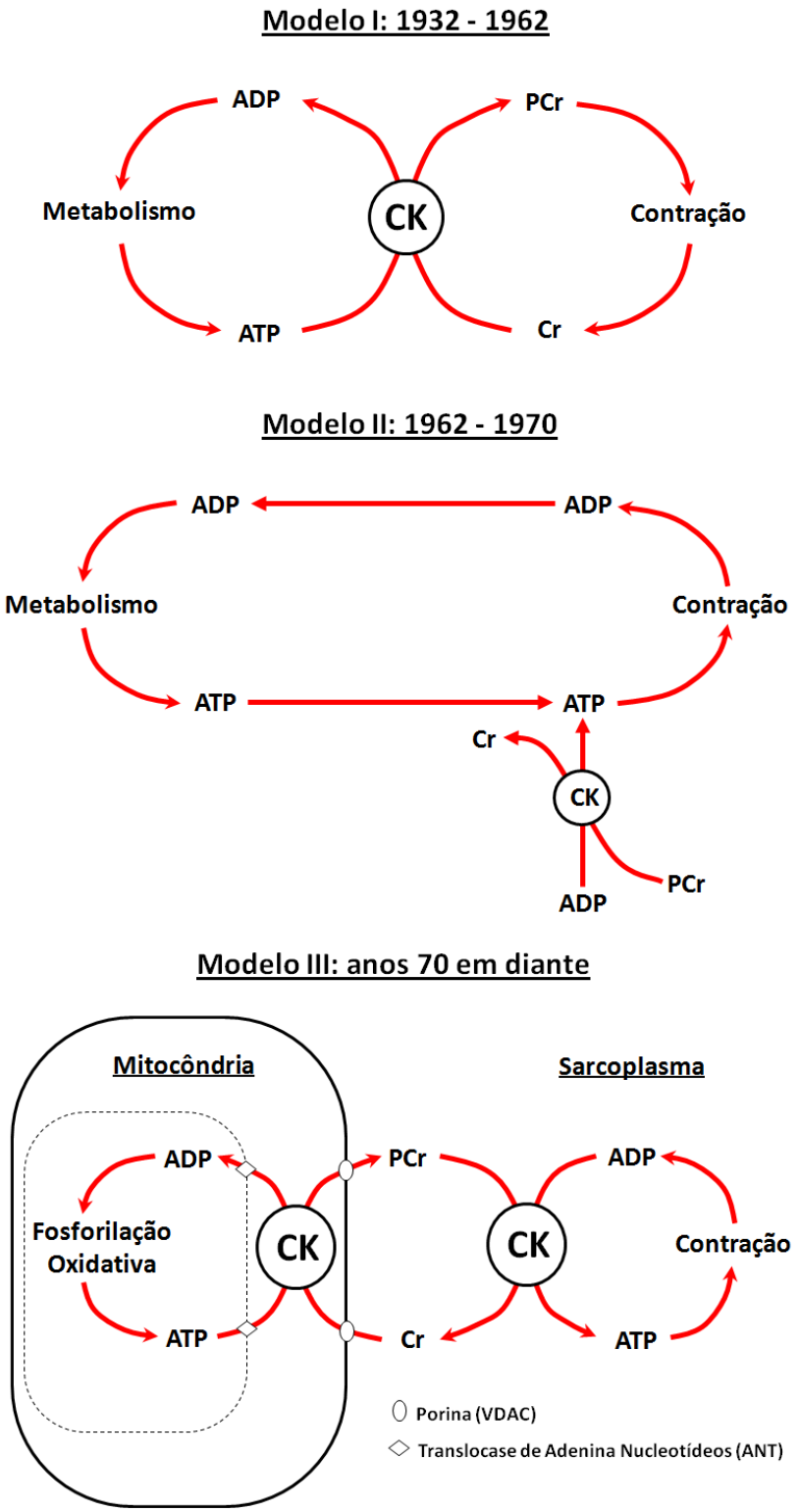
A contração muscular é reconhecida há muito tempo como um processo que depende da energia derivada de reações químicas na célula. Fletcher e Hopkins, em 1907, verificaram que os níveis de lactato no músculo esquelético aumentavam à medida que estes eram estimulados até a fadiga (FLETCHER; HOPKINS, 1907 [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

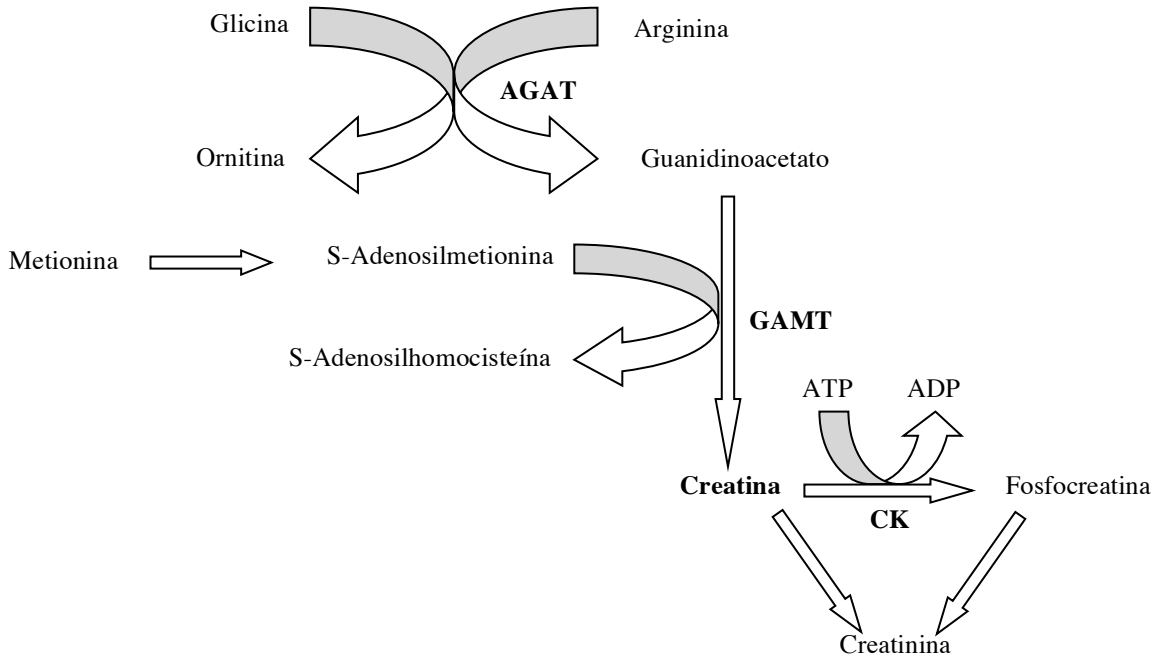
quais o sarcolema apresenta grande permeabilidade (JENNINGS et al., 1981). Uma vez que a CK recicla o ATP a partir do ADP, ela evita que este se acumule na célula e, em última instância, **impede a perda de nucleotídeos de adenina da célula**, mantendo, assim, o *pool* intracelular destes compostos (BESSMAN; 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

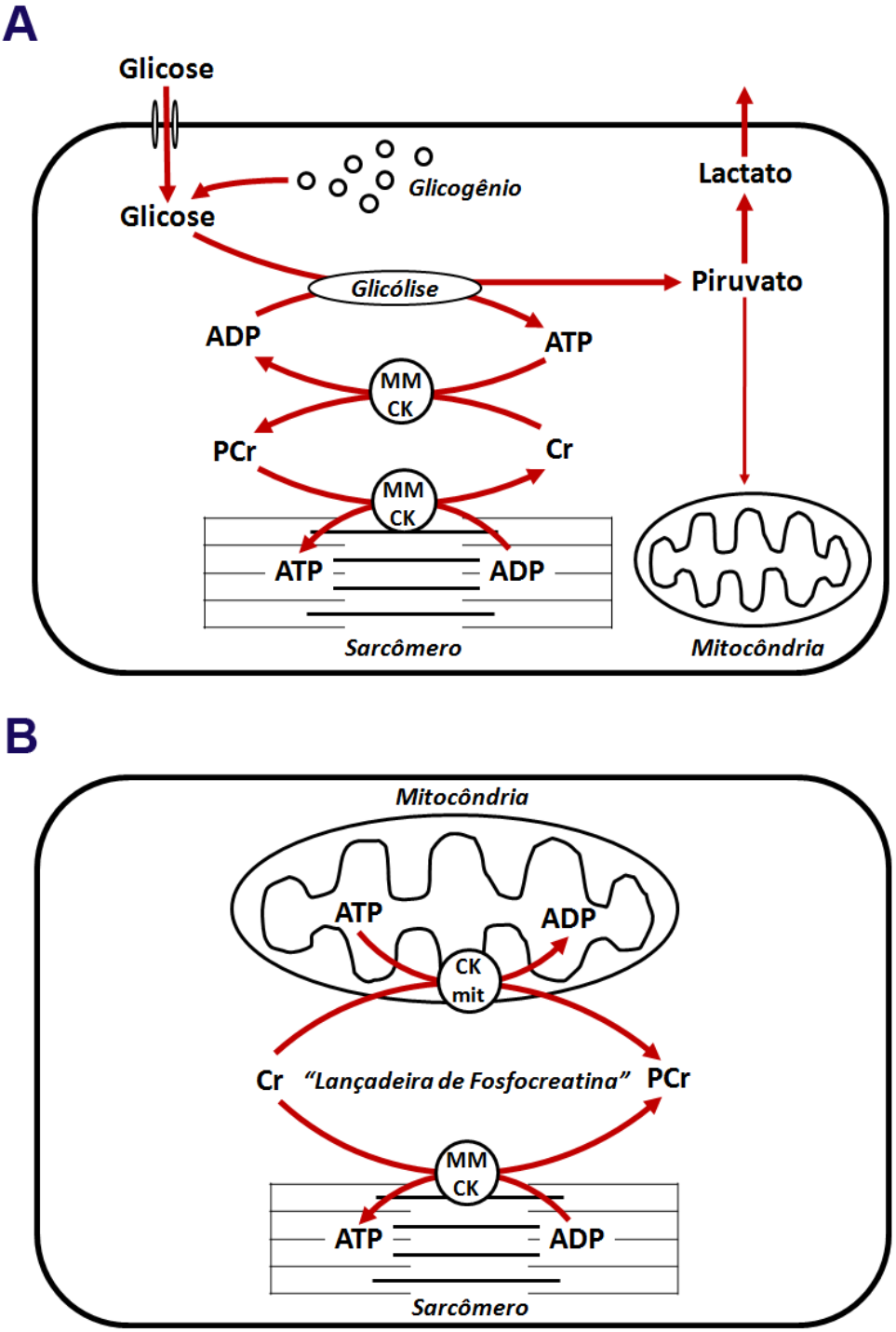
praticamente nenhuma estabilidade metabólica, apresentando rápida diminuição dos níveis de PCr durante o exercício intenso, o que causa um prejuízo notável na performance, devido à fadiga (VENTURA-CLAPIER et al., 1998; KUSHMERICK et al., 1992). Músculos oxidativos como o sóleo possuem níveis intermediários 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

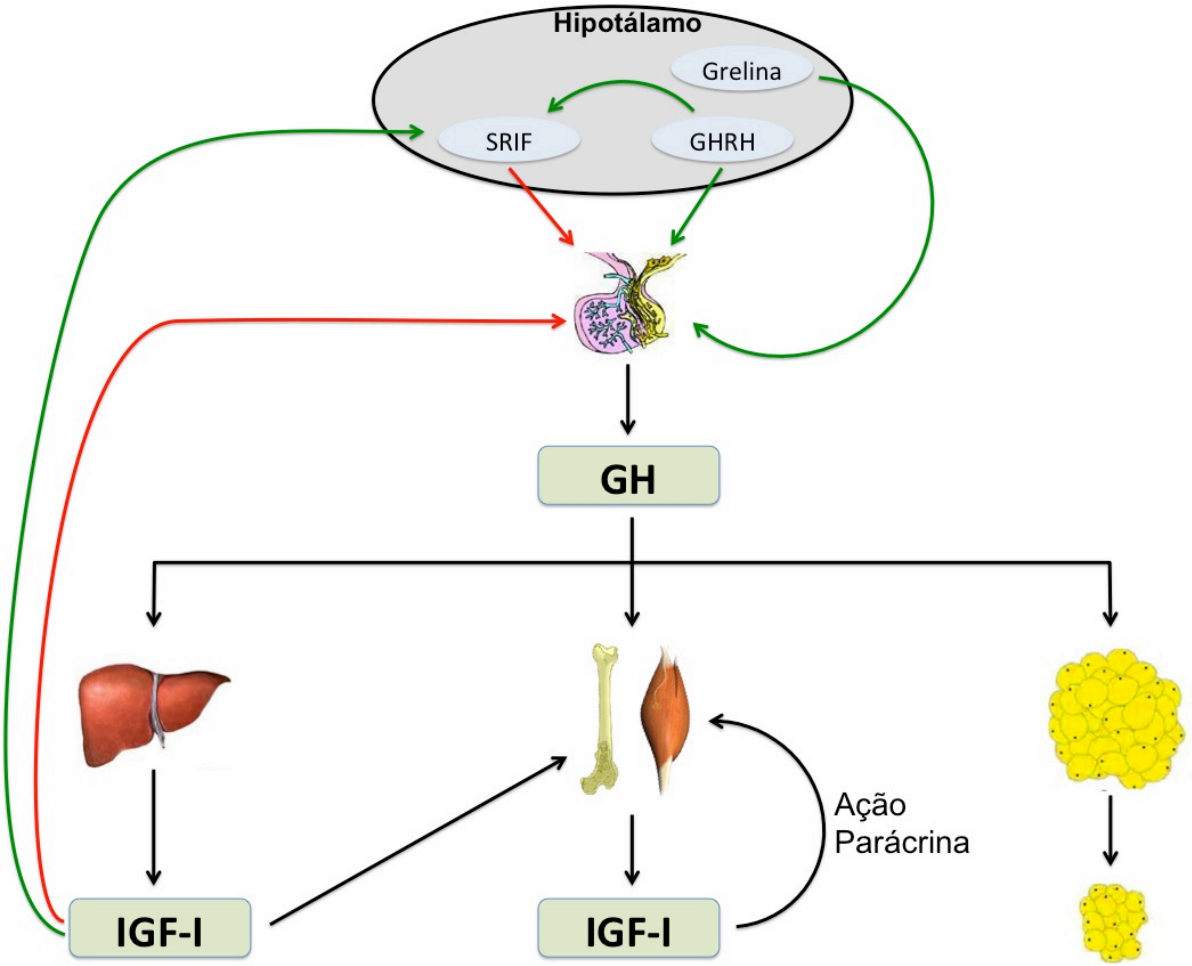
A secreção de hormônios da hipófise anterior (adenohipófise) é controlada pela produção hipotalâmica de hormônios liberadores e inibidores. No caso do GH, o hipotálamo produz GHRH (hormônio liberador de hormônio do crescimento), que chega à hipófise através de uma rede capilar que atravessa a eminência 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).

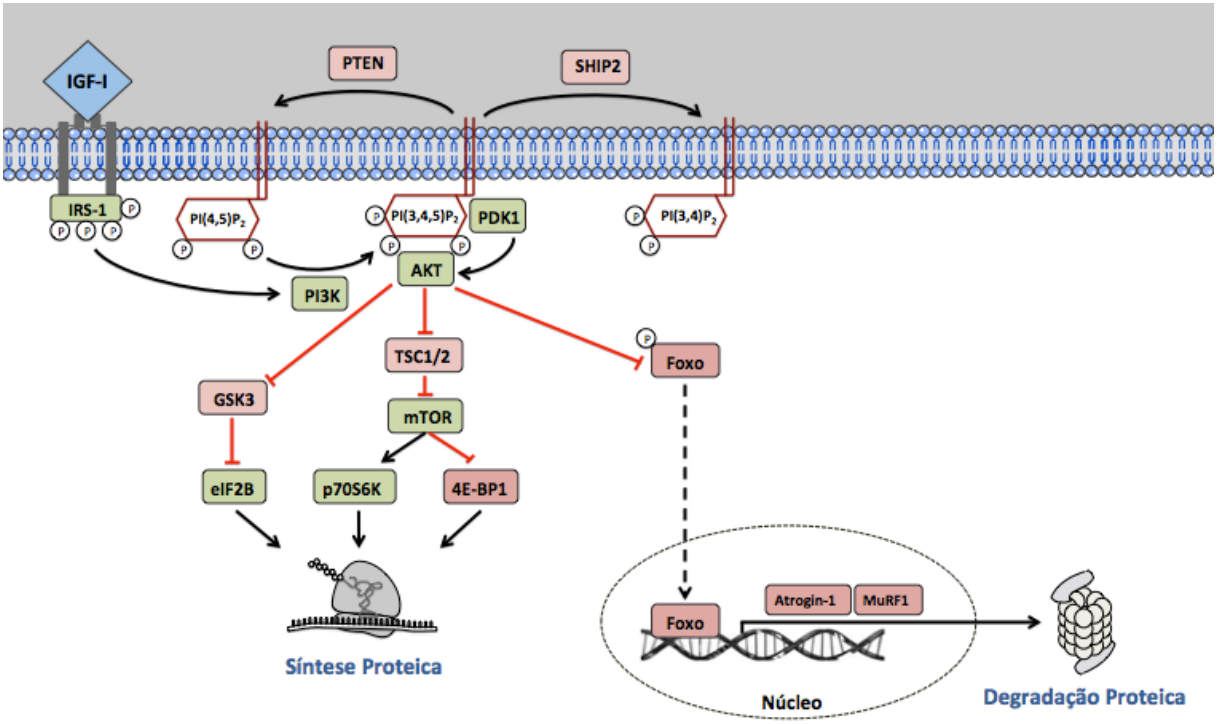
Mais recentemente, foi identificada uma isoforma expressa pelo músculo esquelético, processada através de *splicing* alternativo do gene do IGF-I. Esta isoforma, denominada de MGF (*mechano growth factor*) é expressa quando o músculo é submetido à sobrecarga (GOLDSPINK, 2003), ou seja, é regulada por

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 indizem 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).

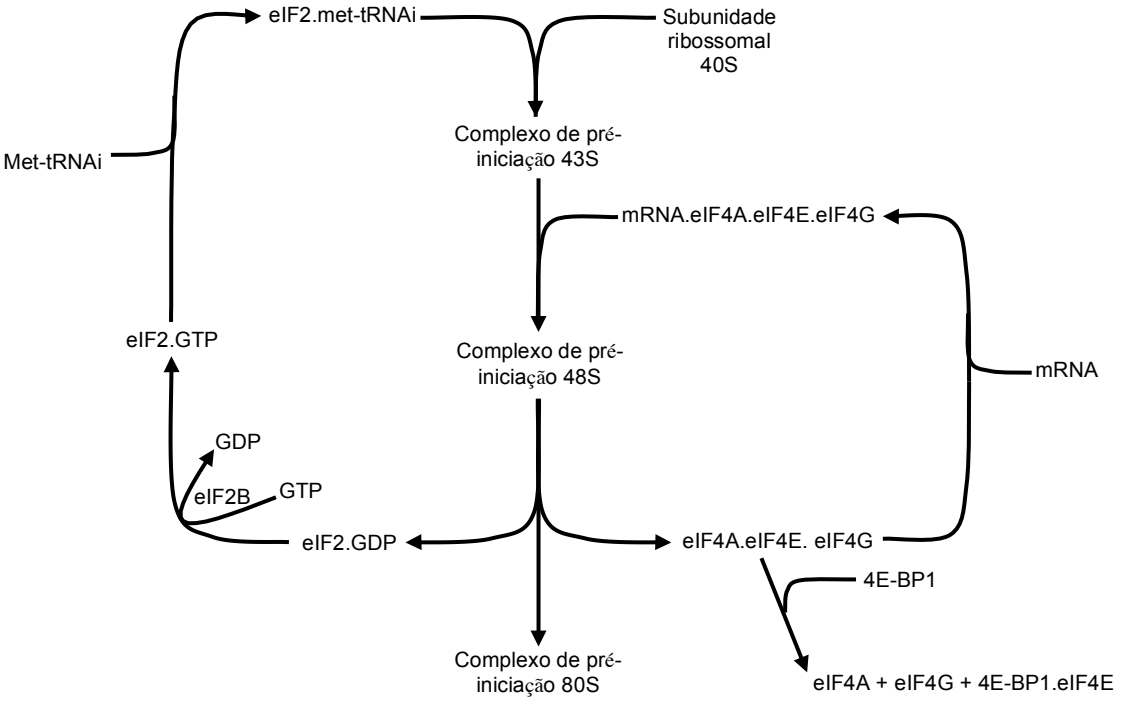
1.3.1 Controle traducional da síntese protéica

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.

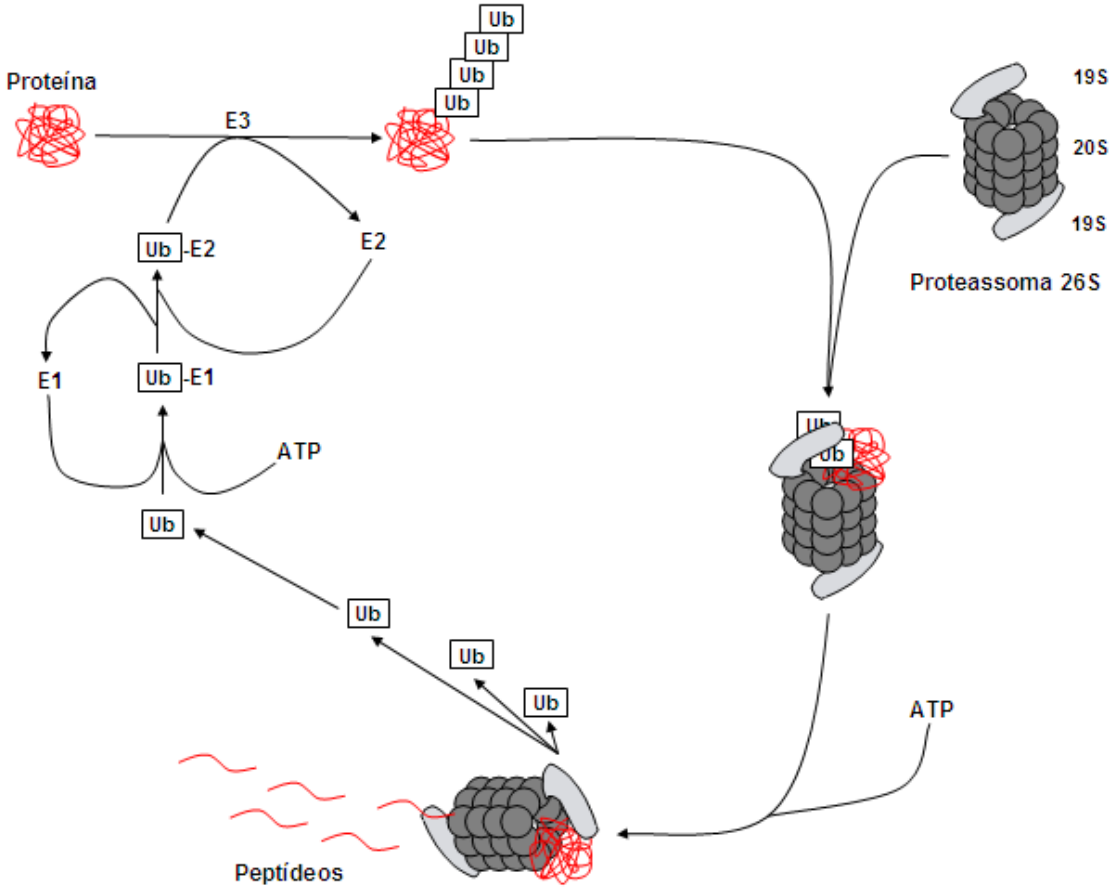
1.3.2 Papel do sistema ubiquitina-proteassoma na atrofia muscular

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.

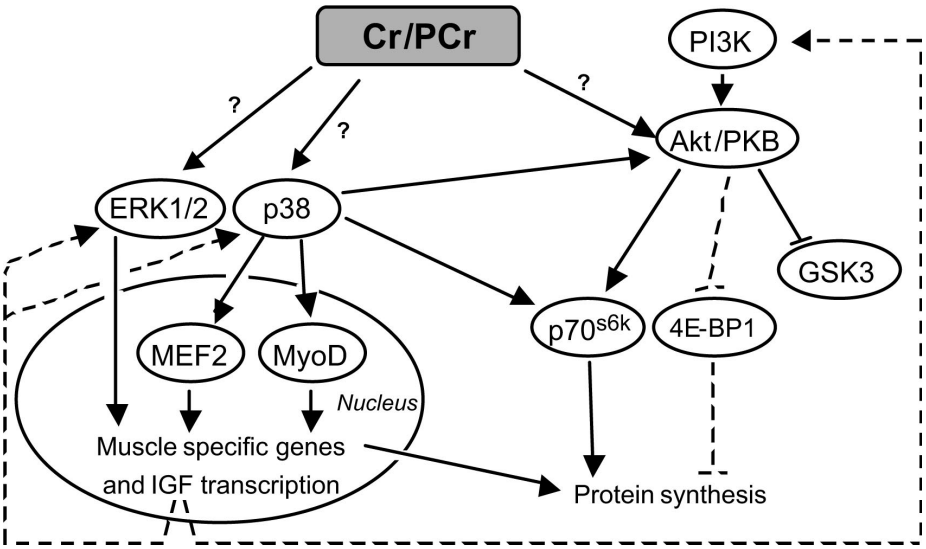
1.4 CREATINA E METABOLISMO PROTÉICO MUSCULAR

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.

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.