ANDRÉ REGIS MACEDO

Efeitos da suplementação de creatina combinada ou não ao treinamento físico em mulheres idosas: estudo clínico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Macedo, André Regis

Efeitos da suplementação de creatina combinada ou não ao treinamento físico em mulheres idosas : estudo clínico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo / André Regis Macedo. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Creatina 2.Terapia por exercício 3.Mulheres
4.Envelhecimento 5.Idoso 6.Sarcopenia 7.Ensaio clínico controlado aleatório

USP/FM/DBD-326/14

Dedicatória

Dedico esta tese à toda minha família , em especial aos meus pais pelo dom da vida , educação e amor; aos meus irmãos, cunhada e sobrinhos queridos , e ao Jeff por estar sempre ao meu lado.

À minha segunda família: Dona Renée Pogorelski (in memoriam) que muito me incentivou; aos queridos Sylvia Pogorelski e Richard Kallish pela eterna amizade; e à Arlete Schinazi e família. Obrigado pelo carinho.

A todos os meus amigos, que alguns a distância nos separou, mas estão sempre presentes no meu coração, e àqueles que o destino nos aproximou e são a minha família também. A vida é sempre melhor com amigos.

Agradecimentos

Agradeço à Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) pela oportunidade de crescimento profissional.

Em especial, à minha orientadora Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira, pela oportunidade, paciência, carinho e por todos os momentos dedicados a mim, onde aprendi e continuo aprendendo, não só em termos científicos, mas como exemplo de dedicação, humanismo, integridade, competência e humildade.

Muito obrigado à Liliam Takayama , que desde o início sempre esteve ao meu lado, me ajudando com as tarefas mais simples até as mais complexas, e que sem ela não teria concretizado este trabalho. Minha eterna gratidão e amizade.

Agradeço aos profissionais da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE – USP), em especial aos Profs.(a) Drs.(a) Bruno Gualano, Hamilton Roschel e Fabiana Benatti, por todos os conhecimentos adquiridos, colaboração e realização deste projeto. Aos profissionais educadores físicos e colaboradores Christiano Robles Rodrigues Alves e Carlos Alberto Merege Filho na elaboração e execução do projeto.

À todos os profissionais, médicos, residentes, nutricionistas , educadores físicos, estagiários e secretários do Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE), em especial às Dra. Ana Lúcia de Sá Pinto e Dra. Fernanda Rodrigues Lima , o meu agradecimento.

À todos os amigos, profissionais e funcionários do Laboratório de Reumatologia (LIM - 17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) , que me ajudaram direta ou indiretamente na elaboração e realização deste projeto, o meu sempre obrigado.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**LISTA DE TABELAS****LISTA DE GRÁFICOS****LISTA DE FIGURAS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Características relacionadas ao envelhecimento.....	02
1.2	A importância do exercício no envelhecimento.....	03
1.3	A proposta da suplementação de creatina como adjuvante ou não do exercício físico e seus efeitos no processo de envelhecimento.....	04
2	OBJETIVOS.....	06
3	MÉTODOS.....	08
3.1	Desenho Experimental.....	09
3.2	Aprovação por comissão de ética.....	09
3.3	Recrutamento e seleção de pacientes.....	10
3.4	Teste Ergométrico.....	10
3.5	Critérios de exclusão.....	11
3.6	Suplementação de Creatina e vendamento.....	11
3.7	Avaliação do consumo alimentar.....	12
3.8	Programa de treinamento físico.....	13
3.9	Avaliação da Força Muscular: LEG PRESS.....	14
3.10	Avaliação da Força Muscular : SUPINO.....	15
3.11	Avaliação da força de preensão:HAND GRIP.....	15
3.12	Avaliação da capacidade física funcional.....	15
3.13	Densidade mineral óssea e composição corporal.....	16
3.14	Marcadores do metabolismo ósseo.....	18
3.15	Cálculo da amostra e análise estatística.....	19

4	RESULTADOS.....	20
4.1	Participantes.....	21
4.2	Eficácia do vendamento.....	24
4.3	Aderência ao treinamento físico.....	24
4.4	Consumo alimentar.....	25
4.5	Força muscular.....	26
4.6	Capacidade física funcional.....	30
4.7	Composição corporal.....	33
4.8	Densidade mineral óssea.....	36
4.9	Marcadores do metabolismo ósseo.....	36
4.10	Incidência de sarcopenia.....	38
4.11	Efeitos Adversos.....	40
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÕES.....	48
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8	APÊNDICE.....	57

1RM	1 repetição máxima
CR	Creatina
PCR	Fosfocreatina
PL	Placebo
TR	Treinamento de resistência
P1NP	Propeptídeo do colágeno tipo I (marcador de formação óssea)
CTX	Telopectídeo C-terminal (marcador de reabsorção óssea)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC- FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LACRE	Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia

Tabela 1	Dados antropométricos, comorbidades e uso de medicações...	23
Tabela 2	Consumo alimentar dos grupos no período basal e após 24 semanas de intervenção.....	25
Tabela 3	Dados da variação das medidas de força muscular (final-inicial).....	26
Tabela 4	Dados da variação das medidas de capacidade física funcional (final-inicial) nos 4 grupos.....	30
Tabela 5	Dados da Avaliação da massa magra dos membros superiores e inferiores.....	34
Tabela 6	Comparação da porcentagem (%) de gordura após 24 semanas de intervenção nos 4 grupos.....	35
Tabela 7	Dados da variação da DMO da coluna lombar , colo do fêmur, fêmur total e corpo total, após intervenção.....	37
Tabela 8	Dados da variação dos marcadores de formação e reabsorção óssea , após intervenção.....	38
Tabela 9	Dados da variação da incidência de sarcopenia (pré e pós intervenção).....	39

Gráfico 1	Medidas da variação da força muscular : <i>Leg Press</i>	27
Gráfico 2	Medidas da variação da força muscular : <i>Supino</i>	28
Gráfico 3	Medidas da variação da força muscular : <i>Hand Grip</i>	29
Gráfico 4	Variação do teste <i>Berg Balance Scale</i>	31
Gráfico 5	Variação do teste <i>Timed Up & Go</i>	32
Gráfico 6	Variação do teste <i>Sit and Up</i> ou <i>Timed-stands</i>	33
Gráfico 7	Variação da massa magra apendicular (final- inicial)	35
Gráfico 8	Comparação do efeito da intervenção na porcentagem (%) de gordura nos 4 grupos.....	36
Gráfico 9	Variação do marcador de formação óssea (P1NP).....	38
Gráfico 10	Variação do marcador de reabsorção óssea (CTX).....	39
Gráfico 11	Variação da incidência de sarcopenia.....	40

Figura 1	Fluxograma de participantes.....	21
-----------------	----------------------------------	----

Resumo

Macedo, AR. Efeitos da suplementação de creatina combinada ou não ao treinamento físico em mulheres idosas: estudo clínico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: O envelhecimento cada vez maior da população mundial é responsável pelo aumento na prevalência de sarcopenia, osteoporose e incapacidade física em indivíduos idosos mais vulneráveis. **OBJETIVOS:** Avaliar a eficácia da suplementação de creatina (CR), associada ou não ao treinamento de resistência ou força (RT) em mulheres idosas. **MÉTODOS:** 60 mulheres voluntárias acima de 60 anos de idade, sedentárias, participaram do estudo clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, durante 24 semanas, divididas em quatro grupos : placebo (PL), com suplementação de creatina (CR), placebo com treinamento de resistência (PL + RT) e suplementação de creatina com treinamento de resistência (CR + RT). As voluntárias foram avaliadas antes e depois de 24 semanas de intervenção. A força muscular foi avaliada por testes de uma repetição máxima (1RM). Outras variáveis foram incluídas como massa magra apendicular, massa óssea, marcadores de metabolismo ósseo e testes de capacidade física funcional. **RESULTADOS:** As alterações no teste de 1RM leg press foram significativamente maiores no grupo CR + RT (+ 19.9%) do que os grupos PL (+ 2.4%) e CR (+ 3.7%), mas não no grupo PL + RT (+ 15%) ($p = 0.002$, $p = 0.002$, e $p = 0.357$, respectivamente). O grupo CR + RT também demonstrou ganhos superiores no teste de 1RM supino (+ 10%) quando comparado com o grupo PL (- 3.1%, $p = 0.03$). Os grupos PL, CR, e PL + RT tiveram mudanças comparáveis no 1RM supino. O grupo CR + RT (+ 1.31%) apresentou melhora significativa na massa magra apendicular em relação aos grupos PL (- 1.2%), CR (+ 0.3%), e PL + RT (- 0.2%) ($p \leq 0.05$). Os grupos CR e PL + RT obtiveram ganhos comparáveis na massa magra apendicular ($p = 0.62$), porém superiores aos observados no grupo PL. Massa gorda, massa óssea e marcadores séricos de metabolismo ósseo não obtiveram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0.05$). **CONCLUSÕES:** Suplementação de creatina a longo prazo combinado com treinamento de resistência pode melhorar massa magra

apendicular e função muscular, mas não massa óssea, em mulheres idosas vulneráveis.

DESCRITORES: creatina, terapia por exercício, mulheres, envelhecimento, idoso, sarcopenia, ensaio clínico controlado aleatório

Summary

Macedo, A.R. Effects of creatine supplementation combined or not with exercise training in older women: a clinical, randomized, double-blind , placebo-controlled trial.

INTRODUCTION: The increasing aging of the world population is responsible for the increase in the prevalence of sarcopenia, osteoporosis and physical disability in vulnerable elderly. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to examine the efficacy of creatine supplementation, associated or not with resistance training, in vulnerable older women. **METHODS:** Sixty subjects were assigned to compose a 24-week, double-blind, randomized, placebo controlled trial, and were divided into 4 groups : placebo (PL), creatine supplementation (CR), placebo with resistance training (PL + RT), and creatine supplementation with resistance training (CR + RT). The subjects were assessed at baseline (Pre) and after 24 weeks (Post). The primary outcome was muscle strength, as assessed by one-maximum (1-RM) tests. Secondary outcomes included appendicular lean mass, bone mass, biochemical bone markers, and physical function tests. **RESULTS:** The changes in 1-RM leg press were significantly greater in the CR + RT group (+ 19.9%) than in PL (+ 2.4%) and the CR groups (+ 3.7%), but not than in the PL + RT group (+ 15%) ($p = 0.002$, $p = 0.002$, and $p = 0.357$, respectively). The CR + RT group also showed superior gains in 1-RM bench press (+ 10%) when compared with the PL group (- 3.1%, $p = 0.03$). The PL, CR and PL + RT had comparable changes in 1-RM bench press. The CR + RT group (+ 1,31%) showed greater appendicular lean mass accrual than the PL (- 1,2%), the CR (+ 0.3%), and the PL + RT groups (- 0.2%) ($p \leq 0.05$). The CR and the PL + RT groups experienced comparable gains in appendicular lean mass ($p = 0.62$), but superior to those seen in the PL group. Fat mass, bone mass and serum bone markers did not significantly differ between the groups ($p > 0.05$). **CONCLUSIONS:** Long-term creatine supplementation combined with resistance training can improve appendicular lean mass and muscle function, but not bone mass, in older vulnerable women.

DESCRIPTORS: creatine, exercise therapy, women, aging, elderly, sarcopenia, randomized controlled trial

1. Introdução

1.1 Características relacionadas ao envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado por modificações do sistema músculo esquelético, como a perda progressiva da massa muscular e redução de força (sarcopenia) (Doherty, 2003; Ferri et al., 2003), fragilidade óssea (osteoporose) (Rlis et al., 1996), e função cognitiva prejudicada (Bixby et al., 2007). Estas características relacionadas ao envelhecimento geralmente levam a uma diminuição da capacidade de realizar atividades da vida diária, aumento do risco de quedas (Tinetti et al., 1988), e consequentemente, mortalidade (Ruiz et al., 2008).

A gravidade da perda de massa magra (sarcopenia) foi definida em 3 estágios: 1) pré-sarcopenia : baixa massa muscular; 2) Sarcopenia: baixa massa muscular mais diminuição da força muscular; 3) Sarcopenia grave : baixa massa muscular, perda força muscular e diminuição da performance física diária (Cruz-Jentoft A.J. et al, 2010). A massa muscular diminui, a partir dos 40 anos, em cerca de 5 % a cada década e acelera após os 65 anos, principalmente nos membros inferiores (Forbes G.B. et al., 1970; Tzankoff S.P. et al., 1977; Fleg J.L. et al., 1988; Janssen I., et al., 2000). As fibras musculares do tipo II (anaeróbias, de contração rápida) atingem um declínio de 20 a 50 % a partir dos setenta anos, consistente com processo neuropático crônico, caracterizado por denervação e reinervação progressiva (Larsson L., 1978; Doherty T.J., 2003).

A prevalência de Osteoporose é de 30% da população feminina acima de 50 anos de idade (Melton III I.J., et al., 1992) e a sarcopenia é de 10 a 40% mulheres pós menopausadas (Abellan van Kan G., 2009). De acordo com

Freitas EV 2002, a população mundial está envelhecendo, o percentual de idosos aumentará em 200 % nos países em desenvolvimento até 2025. No Brasil, o aumento da população idosa, segue a tendência mundial.

Dessa forma, a prevenção deve ser a principal preocupação, porque é difícil recuperar o tecido muscular após várias décadas. Por esse motivo, é importante fazer a manutenção da massa muscular no início da idade adulta, reduzindo o risco de desenvolver sarcopenia.

1.2 A importância do exercício no envelhecimento

Prescrição de exercícios físicos tem sido considerada uma das mais importantes e promissoras estratégias não farmacológicas na prevenção de comorbidades secundárias ao envelhecimento, melhorando a capacidade física, preservando e aumentando da massa muscular (Ferri et al., 2003).

Entretanto, ainda é observada a perda de massa óssea e muscular nos idosos, até mesmo para aqueles que mantêm a atividade física frequente. Por isso evidências sugerem que a suplementação de creatina (CR) tem surgido como uma intervenção dietética eficiente, capaz de atenuar os fatores relacionados com a idade no músculo e na função cognitiva (Rawson and Venezia, 2011).

1.3 A proposta da suplementação de creatina como adjuvante ou não do exercício físico e seus efeitos no processo de envelhecimento

A creatina (CR) é um composto orgânico derivado de aminoácidos. Cerca de 95 % de seu conteúdo localiza-se no músculo esquelético, sendo o restante distribuído entre cérebro, intestino, músculo liso e testículos. É sintetizada no fígado, rins e pâncreas, podendo ainda ser obtida pela alimentação, especialmente através do consumo de carne vermelha e peixes (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). O principal mecanismo de ação da CR é o de servir como um repositório energético rápido durante a contração muscular. Uma vez dentro das células, a CR é convertida durante o repouso em fosfocreatina (PCR) pela enzima creatinaquinase. Dessa forma, uma grande reserva de PCR fica disponível para a regeneração imediata de ATP hidrolisado durante curtos períodos de atividade intensa. Além disso, a PCR pode funcionar como um tampão energético ao lançar fosfatos de alta energia entre a mitocôndria e outros locais de utilização de ATP dentro da célula (Wyss and Wallimann, 1994).

A utilização de CR por via oral é capaz de elevar os conteúdos de CR e de PCR dentro do músculo, desse modo aumentando o fornecimento de energia e, conseqüentemente, a força e a função muscular (Wyss e Kaddurah Daouk, 2000). Pode ainda aumentar a massa magra por meio do aumento do volume de treino (Terjung et al., 2000), bem como pela ativação de células satélites (Olsen et al., 2006) e de determinados fatores de crescimento muscular (Deldicque et al., 2005). Os efeitos benéficos dessa suplementação

sobre o desempenho em atividades cotidianas já foram comprovados em adultos e idosos saudáveis (Terjung et al., 2000) e possivelmente decorrem da acentuação da força máxima, potência e volume do treino, podendo levar ao aumento da capacidade funcional.

Tomando por base os achados acima descritos, pode se especular que a suplementação de CR beneficie também pacientes com osteoporose e sarcopenia, que frequentemente apresentam fraqueza muscular e comprometimento da capacidade física funcional (Gotshalk et al. 2008).

Vários tratamentos não-farmacológicos tem sido propostos para a manutenção e aumento de massa óssea, entretanto o ganho em mulheres na pós-menopausa, quando presente, foi inadequado (Nikander et al., 2010).

Outra limitação potencial reside no fato desta população possuir baixas concentrações de CR e fosfocreatina, importantes fonte de energia para a realização de atividades resistidas de alta intensidade (Larsson et al., 1982)

Este aumento da vulnerabilidade feminina relacionada ao envelhecimento, juntamente com predominância em idosos do sexo feminino, torna-os um alvo importante para a investigação e medidas preventivas de saúde.

2. Objetivos

Avaliar o efeito da suplementação de creatina, combinada ou não a um programa de exercícios físicos resistidos, por um período de 6 meses, em mulheres acima de 60 anos em relação a :

- densidade mineral óssea
- marcadores do metabolismo ósseo
- composição corporal (massa magra, porcentagem de gordura)
- força muscular
- capacidade física funcional e mobilidade

3. Métodos

3.1 Desenho experimental

Este ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo (PL) foi conduzido entre julho de 2010 a novembro de 2011, na cidade de São Paulo (Brasil), de acordo com as diretrizes do “*Consolidated Standards of Reporting Trials*” (CONSORT).

As participantes foram aleatoriamente distribuídas para a suplementação de creatina (CR) ou placebo (PL) e submetidas a um programa de treinamento físico por 24 semanas. No período basal e após 24 semanas, foram realizadas avaliações densitométricas e laboratoriais (marcadores do metabolismo ósseo), testes de força muscular e avaliação da capacidade física funcional.

3.2 Aprovação por comissão de ética

Este estudo foi cadastrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o nº 0184/09. Aprovado pela CAPPesq em sessão de 25/03/2009.

3.3 Recrutamento e seleção de pacientes

Realizou-se uma pré-triagem em indivíduos do sexo feminino, com idade de 60 anos ou mais, sedentárias (com ausência de atividade física há pelo menos 1 ano) e com o diagnóstico de osteopenia com T-score igual ou menor -1,5 DP ou osteoporose, segundo os critérios da Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (ISCD). Todos os participantes foram classificadas como "aparentemente vulnerável", de acordo com Estudo Canadense de Saúde e Envelhecimento (CSHA) escala fragilidade clínica (Rockwood et al., 2005), que varia a partir de 1 ("muito em forma") a 7 ("gravemente mal"), com "aparentemente vulnerável" sendo classificado como 4. Essas voluntárias foram recrutadas através de anúncios colocados no Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina USP.

3.4 Teste ergométrico

As voluntárias foram submetidas a testes ergométricos, aos quais foram realizados em esteira. Foi adotado o protocolo escalonado e contínuo de Bruce. As voluntárias receberam, por escrito, todas as instruções relevantes à execução do teste. Durante o teste, foram verificadas as respostas pressóricas por meio de esfigmomanômetro de coluna de mercúrio; cronotrópicas e eletrocardiográficas, por meio de eletrocardiograma; percepção subjetiva de

esforço, com auxílio da escala de Borg. Todos os testes foram conduzidos sob a supervisão de um médico cardiologista.

Todas as pacientes voluntárias que se adequaram ao perfil supracitado, foram informadas sobre os detalhes do projeto e aquelas que aceitaram, foram incluídas no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo).

3.5 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo indivíduos que apresentaram doenças ou outros fatores que comprometessem o metabolismo ósseo tais como: hiperparatireoidismo, hipotireoidismo, síndrome de má-absorção, insuficiência renal e hepática, etilismo, doenças cardíacas ou musculoesqueléticas que impedissem a realização do treinamento físico, uso de glicocorticoide e uso prévio de bisfosfonatos nos últimos 6 meses.

3.6 Suplementação de creatina e vendamento

Os suplementos foram providenciados conforme o modelo duplo-cego. A randomização foi realizada através de sequências geradas por computador em blocos de quatro à medida que as pacientes foram aprovadas na seleção. Apenas um pesquisador sem contato com qualquer tipo de avaliação ou

análise dos dados foi responsável pelo ingresso e alocação das pacientes no estudo. Os grupos foram revelados apenas ao término da análise estatística.

Os suplementos foram fornecidos dentro de envelopes contendo 5 g de PL (dextrose) ou monohidrato de creatina (CR), (ambos da Probiotica, São Paulo, Brasil) em forma de pó.

Nos primeiros 5 dias (fase de carregamento), as pacientes fizeram uso diário de 20 g de suplemento, divididas em 4 tomadas (café da manhã, almoço, jantar e as 22 horas). Após essa fase, foi utilizada uma dose diária de 5g durante o almoço até o final do estudo. As pacientes foram orientadas a dissolver os suplementos em suco, de forma a mascarar tanto a solubilidade quanto o gosto da dextrose. Os envelopes foram codificados de forma que nem os pesquisadores nem as participantes reconhecessem o suplemento utilizado até o final das análises.

Com o propósito de confirmar a adesão à suplementação, ao final do estudo foi perguntado a cada participante que suplemento ela acreditava que havia sido ingerido. A porcentagem de acerto foi comparada entre os grupos para verificar a eficácia do vendamento.

3.7 Avaliação do consumo alimentar

No período basal e após as 24 semanas de intervenção foram conduzidas avaliações nutricionais por meio de recordatórios alimentares realizados em três dias diferentes (dois dias da semana e um em final de

semana), para que a variação da ingestão que habitualmente ocorre nesse período constasse na avaliação. A fim de auxiliar a quantificação das porções alimentares durante o recordatório, foram utilizados desenhos de uma cartilha de alimentos desenvolvida e validada por nosso grupo (Polacow et al., 2003) e um livro contendo fotos de 100 porções alimentares reais. Os recordatórios foram aplicados por uma nutricionista treinada e tabulados com o auxílio do programa de computador “Virtual Nutri” (São Paulo, Brazil).

3.8 Programa de treinamento físico

O programa de treinamento físico foi iniciado no mesmo dia do começo da suplementação. As sessões de treino ocorreram duas vezes por semana no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia do HC-FMUSP (LACRE), sempre sob a supervisão de profissionais de educação física.

Cada sessão de treino durava cerca de 25 minutos. Iniciava-se com breve aquecimento em esteira e em seguida eram realizados programa de treinamento de resistência composta de leg press, cadeira extensora, agachamento, remada sentada, supino, sentar-se e levantar-se.

3.9 Avaliação da Força Muscular: LEG PRESS

Foi utilizado o teste de uma repetição máxima (1RM) seguindo as recomendações da Sociedade Americana de Fisiologistas do Exercício (Brown e Weir, 2001) em máquina de “leg press” horizontal (Kiko’s, São Paulo, Brasil).

Cada sessão era antecedida por um período de aquecimento, inicialmente em esteira (Queens, São Paulo, Brasil) por 10 minutos a 5 km/h e depois na própria máquina de “leg press” com oito repetições a 50% da 1RM estimada seguidas de mais três repetições a 70% da 1RM estimada. Havia descansos de 2 minutos entre cada parte do aquecimento (esteira, 50% 1RM e 70% 1RM) e de mais 3 minutos antes do teste propriamente dito. Eram realizadas até cinco tentativas para se atingir 1RM, sempre com estímulos verbais para se atingir a carga máxima, com intervalo de 3 minutos entre as tentativas.

Todas as avaliações foram conduzidas por profissionais de educação física familiarizados com o procedimento. É importante notar que uma única sessão de teste de força pode promover adaptações neurais, levando a ganhos de força (Enoka, 1988) e consequentemente superestimando os efeitos de uma dada intervenção. A fim de evitar tal viés, tem-se recomendado utilizar sessões de familiarização (Ploutz-Snyder e Giamis, 2001). O número de sessões necessárias para reduzir esse erro de medida varia de acordo com a população estudada. Uma vez que não havia nenhum estudo padronizando tal técnica, as avaliações foram repetidas em sessões com intervalos de 72 a 96 horas, tantas

vezes fossem necessárias até atingir uma variação menor que 5% do valor alcançado na sessão prévia (Bazzucchi et al., 2004).

3.10 Avaliação da força muscular : SUPINO

Para avaliar a força muscular dos membros superiores, foi realizado o teste “Supino”, que é um exercício de levantamento de peso que é voltado principalmente para o desenvolvimento dos músculos peitoral, agonistas, deltoide, serrátil anterior e coracobraquial e tríceps braquial

3.11 Avaliação da força de preensão: HAND GRIP

Foi realizada a medida face-a-face com o participante sentado ou em pé confortavelmente. O avaliador posiciona o braço a ser testado de modo que o cotovelo estivesse em um ângulo reto. Os participantes seguraram o equipamento dinamômetro para preensão na mão dominante e não dominante; apertavam bem forte durante alguns segundos. Os participantes tinham cerca de 30 s a 1 min de recuperação entre cada avaliação. (Chan JP et al, 2015)

3.12 Avaliação da capacidade física funcional

Para avaliar a força nas atividades da vida diária foram empregados os seguintes testes funcionais:

- a) A mobilidade funcional foi avaliada pelo teste do levantar e caminhar ***Timed Up & Go Test (TUGT)***, que registra o tempo que um indivíduo leva para levantar-se de uma cadeira, andar três metros, voltar e sentar-se novamente. Idosos sem déficit de equilíbrio são capazes de completar o teste em menos de 10 segundos (Podsiadlo et al., 1991).
- b) O teste ***Sit and Up*** ou ***Timed-stands test*** adaptado (Newcomer et al., 1993), no qual foi contabilizado, em 30 segundos, o número de vezes que o sujeito consegue levantar e sentar de uma cadeira utilizando apenas os membros inferiores.
- c) A escala de equilíbrio de Berg (***Berg Balance Scale – BBS***) , para avaliar o desempenho do equilíbrio funcional. Baseada em 14 itens comuns das atividades da vida diária, com escore máximo de 56 (cada item possui uma escala ordinal de 5 alternativas que variam de 0 a 4 pontos). Simples com duração aproximada de 15 minutos. Escore menor ou igual a 45 é considerado equilíbrio alterado (Berg et al., 1989; Miyamoto et al., 2004)

3.13 Densidade mineral óssea e composição corporal

A densidade mineral óssea das pacientes foram medidas na região da coluna lombar, fêmur total, colo do fêmur e corpo total.

Na composição corporal foram analisadas: a massa magra dos membros superiores e inferiores, massa gorda, conteúdo mineral ósseo e a % de gordura. Foi utilizado o equipamento de densitometria óssea QDR 4500-Discovery (Hologic Inc. Bedford, Mineapolis, EUA) no laboratório de Metabolismo ósseo da Disciplina de Reumatologia - FMUSP. O erro de precisão das medidas foi determinado com base nos padrões dos protocolos da Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (ISCD) (Shepherd et al., 2006). Determinaram-se como mudança significativa, com 95% de confiança, os valores de 0,033 g/cm² na coluna lombar, 0,047 g/cm² no colo do fêmur, 0,039 g/cm² no fêmur total e 0,010 g/cm para corpo total. A densidade mineral óssea foi expressa em g/cm², e as medidas da composição corporal em kg e porcentagem (%).(Lopes et al, 2011).

A identificação da massa magra apendicular (ASM), foi calculada como a soma da massa magra dos membros superiores (braços) e inferiores (pernas), definindo como músculo esquelético, todo o tecido não gordo e não ósseo. Sarcopenia foi definida baseada na medição da massa magra apendicular (ASM) ajustado para a altura, e massa gorda total (Newman et al., 2003). A regressão linear foi utilizada para modelar a associação entre ASM em altura (em metros) e massa gorda (em quilogramas). Foram utilizados os resíduos de modelos de regressão linear para identificar aqueles indivíduos cuja quantidade de ASM (obtidos de DXA) foi menor do que o esperado (obtida por uma equação (resultante do modelo) de uma determinada quantidade de massa gorda. O resíduo positivo indicaria um indivíduo com relativamente boa massa muscular enquanto que valores negativos indicariam indivíduo

relativamente sarcopênico. A equação resultante obtida de um modelo de população de mulheres brasileiras foi (Domiciano et al., 2013):

$$\text{Massa magra apendicular (ASM) (Kg)} = -14,51 + 17,27 \times \text{altura (m)} + 0,20 \times \text{massa gorda (Kg)}.$$

O percentil 20 foi definido como ponto de corte para sarcopenia (Domiciano et al., 2013; Newman et al., 2003). Este ponto de corte corresponde a um resíduo de -1,45 num estudo de cohort de população de mulheres brasileiras (Domiciano et al., 2013).

3.14 Marcadores do metabolismo ósseo

Amostras de sangue foram coletadas, pela manhã, em jejum de 12 horas. O soro e plasma foram aliquotados e mantidos no freezer -80°C do Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina.

Foram realizados os ensaios de CTx sérico: marcador de reabsorção óssea (produto da degradação do colágeno de tipo I) e P1NP sérico: marcador de formação (Propeptídeo amino-terminal do procolagénio total tipo 1), por eletroquimioluminescência – (Elecys E411 da Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). O limite de detecção do CTx foi 10 ng/L e o coeficiente de variação intra- e inter-ensaio foi de 2,5 % e 3,4% respectivamente. Em relação ao marcador P1NP o limite de detecção foi de 5 ug/L e o coeficiente de variação intra- e inter-ensaio foi de 2,2 % e 1,8% respectivamente.

3.15 Cálculo da amostra e análise estatística

O tamanho da amostra foi estimado utilizando-se o software G-Power® (versão 3.1.2). Com base no estudo de Gotshalket et al, 2008, determinou-se que 56 pacientes seriam necessários para proporcionar um poder de 95% com 5% de significância e um tamanho do efeito estimado de 0,59. Dessa maneira, ampliamos nossa população de estudo para 74 participantes.

One-way ANOVA não mostrou diferenças significativas entre grupos no início do estudo. Além disso, os testes de Shapiro-Wilk revelou que os dados foram distribuídos normalmente. Todos os valores das variáveis dependentes foram convertidos em escores delta (ou seja, valores de Pós-Pré) e, posteriormente, testado por um one-way ANOVA. No grupos Pós, o teste Tukey foi utilizado quando necessário. Foi aplicado o teste de Fisher para avaliar as possíveis diferenças entre grupos, na proporção de indivíduos que adivinharam corretamente o seu suplemento, bem como o da incidência de doenças crônicas, uso de suplementos ou medicamentos. A incidência de sarcopenia foi relatada de forma descritiva. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão e nível de confiança de 95% (95% CL). O nível de significância foi previamente fixado em $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Participantes

Cento e noventa e oito mulheres se candidataram para o estudo, porém apenas 74 atingiram os critérios de inclusão e foram aleatoriamente alocadas em um dos 4 grupos do estudo. Dessas, 3 pacientes do grupo PL, 3 do grupo CR, 4 do PL+TR e 4 do CR+TR foram excluídas por motivos pessoais durante a intervenção do estudo. Participaram, portanto, até o final do estudo 60 mulheres. (Figura 1)

Figura 1 - Fluxograma de participantes

Na tabela 1 são mostrados as características basais dos grupos , ou seja, os dados antropométricos, comorbidades e uso de medicações destas participantes no início do estudo, divididas nos 4 grupos de intervenção. Não foi observada diferença significativa entre estas variáveis nos 4 grupos de pacientes.

Tabela 1 - Dados antropométricos, comorbidades e uso de medicações

VARIÁVEIS	GRUPO PL	GRUPO CR	GRUPO PL+TR	GRUPO CR+TR	P
Idade (anos)	66 ± 5,98	66 ± 4,80	63 ± 3,58	67 ± 5,61	0,219
Peso (kg)	64 ± 9,74	64,3 ± 10,2	66,7 ± 8,76	66,5 ± 7,13	0,804
Altura (m)	1,55 ± 0,07	1,53 ± 0,05	1,53 ± 0,04	1,54 ± 0,06	0,961
IMC (kg/m) ²	27,15 ± 5,61	27,09 ± 3,52	28,24 ± 3,54	28,01 ± 2,08	0,794
Gordura (%)	36,4 ± 5,5	36,7 ± 4,2	39,8 ± 3,7	37,1 ± 3,5	0,14
Massa muscular (kg)	38,9 ± 4,5	39,5 ± 5,5	38,2 ± 3,6	39,8 ± 3,0	0,78
DMO (T-score)	-1,9 ± 0,9	-1,7 ± 1,1	-1,7 ± 0,6	-1,9 ± 0,6	0,82
COMORBIDADES (n,%)					
Hipertensão	8 (53,3)	9 (60,0)	3 (20,0)	4 (26,7)	0,13
Diabete mellitus	1 (6,7)	2 (13,3)	2 (13,3)	1 (6,7)	1,00
Dislipidemia	3 (20,0)	4 (26,7)	0 (0)	1 (6,7)	0,15
MEDICAÇÕES (n,%)					
Anti-hipertensivo	7 (46,7)	8 (53,3)	3 (20)	4 (26,7)	0,22
Hipoglicêmicos oral	1 (6,7)	2 (13,3)	2 (13,3)	1 (6,7)	1,00
Hipolipidêmicos	3 (20,0)	5 (33,3)	1 (6,7)	1 (6,7)	0,21
Antidepressivo	2 (13,3)	3 (20,0)	2 (13,3)	0 (0)	0,49
Vitamina B12	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	1 (6,7)	0,36
Cálcio ou Vitamina D	2 (13,3)	1 (6,7)	1 (6,7)	4 (26,7)	0,40

IMC: índice de massa corpórea, DMO: densidade mineral óssea

Dados apresentados como média ± desvio padrão

4.2 Eficácia do vendamento

Apenas oito (53,3 %) pacientes do grupo PL , nove (60,0 %) do grupo CR, seis (40,0 %) do grupo PL + TR e oito (53,3 %) do grupo CR + TR conseguiram identificar corretamente o suplemento utilizado . Não foi observado diferença significativa entre os grupos para a taxa de acerto ($p = 0,77$) .

4.3 Aderência ao treinamento físico

A aderência ao programa de treinamento físico foi comparável entre os grupos de treinos (83,9 +/- 6,1 % e 84,4 +/- 8,0 %) para os grupos PL + TR e CR + TR respectivamente ; Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,52$) .

4.4 Consumo alimentar

Os dados de consumo alimentar são mostrados na tabela 2. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das variáveis analisadas ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Consumo alimentar dos grupos no período basal e após 24 semanas de intervenção

	PL (n=15)		CR (n=15)		PL+TR (n=15)		CR+TR (n=15)	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
Energia (KCAL)	1461±202	1548±315	1257±318	1307±367	1438±343	1342±469	1462±246	1541±502
Carboidrato (g/dia)	197 ± 37	214 ± 52	162 ± 50	161 ± 43	190 ± 57	172 ± 57	194 ± 47	210 ± 96
Carboidrato (%)	54 ± 8	56 ± 10	52 ± 10	50 ± 6	54 ± 10	52 ± 4	53 ± 8	53 ± 9
Proteína (g/dia)	61 ± 17	68 ± 19	54 ± 17	62 ± 21	58 ± 18	54 ± 15	56 ± 13	60 ± 21
Proteína (%)	17 ± 4	18 ± 5	17 ± 3	19 ± 3	17 ± 3	17 ± 5 0	15 ± 3	16 ± 4 1
Gordura (g/dia)	48 ± 14	47 ± 18	44 ± 15	46 ± 15	48 ± 15	15 49 ± 23	52 ± 15	51 ± 11
Gordura (%)	29 ± 7	27 ± 8	32 ± 9	32 ± 6	29 ± 9	32 ± 7	32 ± 6	32 ± 8
Cálcio (mg/dia)	502 ± 210	561 ± 241	578 ± 343	537 ± 262	529 ± 203	542 ± 424	478 ± 193	415± 228

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

4.5 Força muscular

Após 24 semanas de intervenção, podemos observar que a avaliação da força muscular apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos baseado na tabela 3 e gráficos 1, 2 e 3 :

Tabela 3 - Dados da variação das medidas de força muscular (final - inicial)

VARIÁVEIS	GRUPO PL (n =15)	GRUPO CR (n = 15)	GRUPO PL+TR (n = 15)	GRUPO CR+TR (n = 15)	P
Δ Legpress,	1,50 $\pm$ 10,13	1,25 $\pm$ 5,67	9,93 $\pm$ 9,88	15,85 $\pm$ 10,82	0,001
Δ Supino	-1,09 $\pm$ 3,33	0,08 $\pm$ 3,34	1,80 $\pm$ 4,60	3,38 $\pm$ 3,52	0,031
Δ Hand Grip	-0,41 $\pm$ 2,32	0,58 $\pm$ 2,98	1,00 $\pm$ 2,17	1,80 $\pm$ 2,24	0,049

A avaliação do teste **Leg Press** demonstrou que após 24 semanas de suplementação de CR associada ao treino houve um ganho significativo no grupo CR+TR em relação ao grupo PL e CR, mas não em relação ao grupo PL+TR ($p = 0,002$, $p = 0,002$ e $p = 0,357$, respectivamente). (Gráfico 1)

Não houve diferença significativa no teste **Leg Press** entre os grupos PL, CR e PL+TR ($P > 0,05$). (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Medidas da variação da força muscular (final – inicial) : Leg Press

A avaliação das medidas de força muscular com o teste **Supino** demonstrou que após 24 semanas de intervenção, o grupo CR+TR teve ganho superior quando comparado com os outros grupos PL ($P < 0,03$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PL e CR +TR ($P > 0,03$). (Gráfico 2)

Gráfico 2 - Medidas da variação da força muscular (final – inicial) : Supino

A avaliação das medidas de força muscular com o teste **Hand grip** revelou que após 24 semanas de intervenção, houve um ganho significativo do grupo CR+TR em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$). (Gráfico 3)

Gráfico 3 - Medidas da variação da força muscular (final – inicial): *Hand Grip*

4.6 Capacidade física funcional

Na avaliação das medidas de capacidade física funcional, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todos os testes avaliados, como se pode notar na tabela 4 e nos gráficos 4, 5 e 6 .

Tabela 4 - Dados da variação das medidas de capacidade física funcional (final - inicial) nos 4 grupos

VARIÁVEIS	GRUPO PL	GRUPO CR	GRUPO PL+TR	GRUPO CR+TR	P
Δ Berg Balance	-1,15 $\pm$ 3,13	-0,77 $\pm$ 1,73	2,21 $\pm$ 2,69	2,50 $\pm$ 1,7	0,001
Δ Time Up & Go	0,07 $\pm$ 0,42	0,01 $\pm$ 0,83	-0,51 $\pm$ 0,72	-0,46 $\pm$ 0,60	0,05
Δ Sit & Up	0,00 $\pm$ 0,85	0,50 $\pm$ 1,00	1,33 $\pm$ 1,49	1,62 $\pm$ 1,66	0,01

A avaliação do teste **Berg Balance Scale** mostrou diferença significativa entre os 4 grupos após 24 semanas de intervenção. ($p = 0,001$). Observou-se diferença significativa entre os grupos de treino : CR+TR e PL+TR com os grupos sem treino: PL e CR ; CR+TR em comparação ao grupo PL ($p=0,001$) , PL+TR em comparação ao grupo PL ($p=0,004$), CR+TR com CR ($p=0,005$) e PL+TR com CR ($p=0,012$). (Gráfico 4) .

Gráfico 4 - Variação do teste *Berg Balance Scale* (final – inicial)

A avaliação do teste **Timed up & Go** revelou uma tendência a diferença nos 4 grupos após 24 semanas de intervenção ($p>0,05$). (Gráfico 5)

Gráfico 5 - Variação do teste **Timed Up & Go** (final – inicial)

A avaliação do teste **Sit and Up** ou **Timed-stands** mostrou diferença entre os 4 grupos após 24 semanas de intervenção ($p=0,01$). Observou-se diferença significativa entre o grupo CR+TR quando comparado com o grupo PL ($p=0,02$). (Gráfico 6)

Gráfico 6 - Variação do teste **Sit and Up** ou **Timed-stands** (final – inicial)

4.7 Composição corporal

Na avaliação da composição corporal, podemos demonstrar neste estudo que em relação a massa magra apendicular, após 24 semanas de intervenção, o grupo CR+TR teve um ganho significativo da massa magra nestas regiões (membros superiores e inferiores) em comparação aos grupos PL, CR, PL+TR, ($p < 0,001$, $P = 0,05$ e $P = 0,02$ respectivamente). O CR e os grupos PL + RT tiveram um ganho de massa magra que foram superiores ao grupo de PL ($p = 0,01$ e $p = 0,04$, respectivamente). O ganho de massa foi principalmente nos membros inferiores. (Tabela 5, Gráfico 7)

Tabela 5 - Comparação da massa magra apendicular após 24 semanas de intervenção

	Grupo PL n=15	Grupo CR n=15	Grupo PL+TR n=15	Grupo CR+TR n=15	P
Δ Massa magra-MSE, Kg	-0,04 $\pm$ 0,14	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,13	0,05 $\pm$ 0,01	0,14
Δ Massa magra-MSD, Kg	0,03 $\pm$ 0,14	0,09 $\pm$ 0,13	0,07 $\pm$ 0,15	0,09 $\pm$ 0,17	0,83
Δ Massa magra-MIE, kg	-0,14 $\pm$ 0,39	-0,10 $\pm$ 0,34	0,08 $\pm$ 0,33	0,12 $\pm$ 0,34	0,08
Δ Massa magra-MID, Kg	-0,18 $\pm$ 0,38	0,06 $\pm$ 0,27	0,11 $\pm$ 0,24	0,11 $\pm$ 0,29	0,01

Gráfico 7 - Variação da massa magra apendicular (final - inicial)

Em relação à porcentagem (%) de gordura, após 24 semanas de intervenção, não foi observado diferença significativa entre os 4 grupos (Tabela 6, Gráfico 8) .

Tabela 6 - Comparação da porcentagem (%) de gordura após 24 semanas de intervenção nos 4 grupos

	Grupo PL n=15	Grupo CR n=15	Grupo PL+TR n=15	Grupo CR+TR n=15	<i>P</i>
Δ % Gordura	0,67 ± 2,30	-0,08±1,92	0,38 ± 0,80	0,02 ± 1,50	0,404

Gráfico 8 - Comparação do efeito da intervenção na porcentagem (%) de gordura nos 4 grupos

4.8 Densidade mineral óssea

Não houve mudança estatisticamente significativa na densidade mineral óssea (DMO) em todas as regiões analisadas após 24 semanas de intervenção neste trabalho. (Tabela 7)

Tabela 7 - Dados da variação da DMO da coluna lombar , colo do fêmur, fêmur total e corpo total, após intervenção (final – inicial)

	Grupo PL n=15	Grupo CR n=15	Grupo PL+TR n=15	Grupo- CR+TR n=15	P
Δ DMO L1-L4, g/cm ²	0,005±0,019	0,0019±0,09	0,001±0,022	0,009±0,022	0,264
Δ DMO colo de fêmur, g/cm ²	0,000±0,022	-0,004±0,021	0,008±0,025	-0,007±0,025	0,573
Δ DMO fêmur total, g/cm ²	0,048±0,181	-0,008±0,017	0,002±0,018	-0,005±0,018	0,455
Δ DMO corpo total, g/cm ²	0,007±0,022	-0,005±0,015	0,003±0,016	-0,010±0,020	0,330

4.9 Marcadores do metabolismo ósseo

Não houve mudança significativa na avaliação dos marcadores de formação óssea (P1NP) e reabsorção óssea (CTX) após 24 semanas de intervenção. (Tabela 8, Gráfico 9 e 10)

Tabela 8 - Dados da variação dos marcadores de formação e reabsorção óssea, após intervenção (final – inicial)

	Grupo PL n=15	Grupo CR n=15	Grupo PL+TR n=15	Grupo CR+TR n=15	P
Δ P1NP (ng/ml)	-0,96 $\pm$ 16,69	1,45 $\pm$ 6,681	7,39 $\pm$ 18,12	1,97 $\pm$ 27,15	0,419
Δ CTX (ng/ml)	0,01 $\pm$ 0,15	0,02 $\pm$ 0,11	0,03 $\pm$ 0,08	-0,01 $\pm$ 0,24	0,841

Gráfico 9 - Variação do marcador de formação óssea (P1NP) (final – inicial)

Gráfico 10 - Variação do marcador de reabsorção óssea (CTX) (final – inicial)

4.10 Incidência de sarcopenia

Após a intervenção, observou-se um aumento da incidência de sarcopenia no grupo PL (n = + 2). No grupo PL+TR não houve diferença desta frequência. Nos grupos CR e CR+TR houve uma diminuição da incidência de sarcopenia (n = - 1 e n = - 2 , respectivamente). (Tabela 9, Gráfico 11).

Tabela 9 - Dados da variação da incidência de sarcopenia (pré e pós intervenção)

	Grupo PL (n=15)	Grupo CR (n=15)	Grupo PL+TR (n=15)	Grupo CR+TR (n=15)	<i>P</i>
Sarcopenia PRÉ n, %	6 (40)	5 (33)	8 (53)	4 (26,6)	
Sarcopenia PÓS n, %	8 (53,3)	4 (26,6)	8 (53)	2 (13,3)	
Δ Sarcopenia (final-inicial)	2	- 1	0	- 2	0,511

Gráfico 11 - Variação da incidência de sarcopenia

4. 11 Efeitos Adversos

Ao longo do estudo, nenhum indivíduo relatou efeito colateral. Os exames não revelaram efeitos adversos potencialmente associados com a suplementação de creatina ou treinamento de resistência. Além disso, os parâmetros sanguíneos (ou seja, uréia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e creatina quinase) mantiveram-se dentro da normalidade e não se alterou ao longo do tempo (dados não mostrados).

5. Discussão

Este estudo é original, pois avalia o efeito em longo prazo (ou seja, 24 semanas) da suplementação de creatina em indivíduos idosos. Além disso, avalia esta intervenção em idosos sedentários vulneráveis com baixa massa óssea e outras doenças crônicas. As principais conclusões deste estudo foram que a suplementação com creatina, particularmente quando combinada com treinamento de resistência, foi capaz de aumentar a força muscular e a massa magra apendicular. Mais importante também, o número de indivíduos considerados sarcopênicos no início da intervenção dos grupos suplementados com creatina (ou seja, CR e CR + TR, $n = -3$) diminuíram em comparação ao número de sarcopênicos dos grupos placebo (PL e PL + TR, $n = +2$). No seu conjunto, estes dados confirmam a especulação de que a combinação da suplementação de creatina e treinamento de resistência pode ter relevância terapêutica em pessoas idosas mais vulneráveis, com fraqueza e perda de massa muscular induzidas pelo próprio envelhecimento, nos quais são fatores independentes, fortemente associados ao risco de quedas (Tinetti et al., 1988), e deste modo levando a diminuição da mortalidade (Ruiz et al., 2008).

Há um número crescente de estudos demonstrando que tanto a suplementação de creatina de forma aguda (≤ 7 dias) quanto a suplementação crônica (acima de 14 semanas) podem melhorar a função muscular e resistência à fadiga em idosos saudáveis (Rawson and Venezia, 2011). Além disso, alguns estudos têm sugerido que este suplemento dietético, juntamente com um programa de treinamento de resistência, pode aumentar o ganho de massa magra em pessoas mais velhas (Aguiar et al., 2013). No entanto, esses estudos tiveram algumas limitações, incluindo : o tamanho reduzido da amostra (por exemplo, normalmente, $n \leq 25$), curto período de suplementação (≤ 14

semanas), combinação de creatina com outros suplementos dietéticos (por exemplo, proteínas e ácido linoleico conjugados), amostras excessivamente heterogêneas (como idade entre 56 a 71 anos; sem distinção entre homens e mulheres) e uma caracterização fenotípica incompleta das amostras (por exemplo: sem descrição clara do nível de atividade física, doenças crônicas associadas e uso de medicamentos). (Rawson and Venezia, 2011). Neste sentido, o presente estudo amplia o conhecimento sobre a aplicação da creatina nos idosos, fornecendo evidências do efeito benéfico deste nutriente associado com treinamento de resistência numa amostra bem caracterizada de mulheres idosas vulneráveis. Estes resultados também confirmam um estudo anterior em que a suplementação de creatina adicionado a um programa de treinamento de resistência em membros inferiores, resultou na melhora clínica e da capacidade física funcional (avaliado pelo *Timed-stands test*) em pacientes idosos com osteoartrite de joelho (Neves et al., 2011).

Outro achado interessante deste estudo refere-se ao ganho de massa magra pela suplementação de creatina combinada com o treino de resistência, no qual foi observado em outros estudos anteriores envolvendo populações idosas (Aguiar et al., 2013; Brose et al., 2003; Candow et al., 2008; Chrusch et al., 2001; Tarnopolsky et al., 2007), porém não em todos (Eijnde et al., 2003). Em apoio aos resultados atuais, Aguiar et al. (2013) relataram recentemente melhorias na massa livre de gordura (+ 3,2%) em mulheres idosas saudáveis, que foram suplementadas com creatina concomitantemente a um programa de treinamento de resistência por 12 semanas. ; No entanto, as diferenças relativas às amostras selecionadas (ou seja, sujeitos vulneráveis no estudo

atual contra indivíduos saudáveis no estudo de Aguiar et al.), casuística e tempo de intervenção, se opõem a quaisquer comparações entre os estudos.

Tem sido demonstrado que a creatina na dieta pode modular a transcrição de fatores de regulação miogênica (por exemplo: IGF-1, Myo-D, miogenina, MRF-4, Myf5) (Deldicque et al., 2005), aumentar a eficiência da tradução de proteínas (Deldicque et al., 2007), e aumentar a ativação, proliferação e diferenciação de células satélites (Olsen et al., 2006), que, em última análise, contribuiria para um balanço proteico mais positivo. Ao contrário destas observações moleculares, dois estudos utilizando a técnica isotópica não mostraram qualquer influência da suplementação de creatina em curto prazo, combinada ou não com treinamento de resistência, no balanço protéico em indivíduos jovens e saudáveis (Louis et al., 2003 b,c), sugerindo que a ingestão aguda de creatina é incapaz de modular a síntese de proteínas miofibrilares e/ou o catabolismo. No entanto, tem-se especulado que a suplementação de creatina de forma crônica possa agir com mais eficácia no anabolismo muscular, através do reforço do volume de treino de resistência, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pessoas com incapacidade física (Gualano et al., 2012 ; Rawson and Venezia, 2011). Novos estudos deverão avaliar o mecanismo subjacente ao aumento da massa magra induzida pela creatina em indivíduos mais velhos.

Além do objetivo de avaliar o papel da suplementação de creatina sobre a massa magra , força muscular e capacidade física funcional, também houve a finalidade de reunir o conhecimento sobre o possível efeito terapêutico deste nutriente na perda de massa óssea. Há evidências de que o sistema

creatina/ATP/creatinaquinase desempenha um papel crucial na bioenergética da diferenciação e ativação de células semelhantes à osteoblastos (Gerber et al., 2005). Além disso, estudos experimentais revelaram que a suplementação de creatina pode melhorar parâmetros biomecânicos ósseos (como exemplo: a carga para fratura de fêmur), densidade mineral óssea em ratos saudáveis (Antolic et al., 2007), bem como aumentar o conteúdo mineral ósseo em ratas ovariectomizadas (de Souza et al. 2011). Os escassos estudos clínicos disponíveis também apoiaram o papel da creatina positivamente na remodelação óssea. Louis et al.(2003a) e Tarnopolsky et al. (2004) relataram diminuição da reabsorção óssea em pacientes com distrofia muscular suplementados com a creatina. Além disso, Chilibeck et al. (2005) verificaram aumento do conteúdo mineral ósseo após a suplementação de creatina em indivíduos com treino de resistência.

Todos esses dados levam à especulação de que a suplementação de creatina em longo prazo, em particular em associação com o exercício, pode atenuar a perda óssea em mulheres idosas com osteopenia ou osteoporose. No entanto, os nossos resultados não revelaram qualquer efeito da creatina ou treinamento resistido sobre a massa óssea e nem sobre os marcadores ósseos séricos. Existem algumas explicações para a falta de eficácia da intervenção deste estudo. Em primeiro lugar, estudos prévios demonstram que o exercício físico pode aumentar densidade mineral óssea em adolescentes e adultos jovens, mas não em mulheres na pós-menopausa, sugerindo que o exercício é menos eficaz em condições caracterizadas por baixa massa óssea (Nikander et al., 2010). Pode-se especular que isso vale também para a suplementação de creatina. Entretanto, outros ensaios clínicos, com indivíduos com menor

gravidade de perda de massa óssea devem ser realizados no intuito de testar esta hipótese. Em segundo lugar, tem-se postulado que o aumento de massa óssea induzida pela creatina possa ser secundária a um aumento de massa muscular, o que promoveria uma maior tensão sobre os ossos (Chilibeck et al., 2005). Portanto, é plausível supor que nosso protocolo de treinamento com a suplementação de creatina não foi suficientemente intenso para promover efeito benéfico no tecido ósseo, maximizando a massa muscular em um determinado ponto, o que levaria a um ganho de massa óssea. Finalmente, e talvez o mais importante, o tamanho da amostra foi subestimado e o período de seguimento tenha sido muito curto a fim de detectar alterações significativas na massa óssea.

Este estudo apresentou algumas limitações. Primeiro não fomos capazes de medir o conteúdo de creatina muscular ou de fosforilcreatina. Embora a literatura tenha demonstrado que em indivíduos mais velhos tenham uma resposta eficaz para a suplementação de creatina em termos de acúmulo de creatina e fosforilcreatina intramuscular (Brose et al., 2003; Rawson et al., 2002). Permanece controverso, se indivíduos mais velhos e mais jovens, respondam igualmente a este suplemento (Rawson and Venezia, 2011). Mais estudos envolvendo idosos deverão reavaliar os efeitos da suplementação de creatina sobre a função e massa muscular concomitantemente para avaliações musculares de creatina/fosforilcreatina. Em segundo lugar, pelas características da amostra, os resultados atuais não podem ser estendidos para idosos que dependem completamente de outras pessoas para as atividades da vida diária, ou idosos em estado terminal. O efeito benéfico

potencial da suplementação de creatina nesta população deve continuar por ser investigado.

Em terceiro lugar, os ganhos de função muscular e massa magra apendicular observados no nosso estudo poderiam ter relevância clínica mais evidente com relação à redução do risco de quedas, fraturas, internações hospitalares, e, eventualmente, mortalidade; o presente estudo não abordou nenhum desses desfechos. Assim, futuros ensaios clínicos com amostras maiores envolvendo gerações mais velhas, devem investigar o efeitos da suplementação de creatina, juntamente com o treinamento de resistência, incluindo a qualidade de vida e sobrevida.

Em conclusão, a suplementação de creatina a longo prazo combinado com treinamento de resistência foi capaz de melhorar a massa magra apendicular e função muscular, mas não a massa óssea, em mulheres idosas. A suplementação de creatina por si só levou a melhorias na massa magra apendicular, mas não a função muscular, quando comparados com o placebo. Estes resultados salientam o potencial terapêutico da suplementação de creatina, especialmente em associação com treino de resistência compensando o declínio da massa muscular e da capacidade física funcional no envelhecimento.

6. Conclusões

O presente estudo demonstrou que:

- 1) A suplementação de creatina a longo prazo combinado com o treinamento de resistência em mulheres idosas vulneráveis , foi capaz de:
 - melhorar a massa magra apendicular
 - melhorar a capacidade física funcional

- 2) A suplementação de creatina isoladamente melhorou a massa magra apendicular mas não a capacidade física funcional em relação ao grupo placebo.

- 3) A suplementação de creatina combinada ou não com treinamento físico de resistência não foi efetiva na melhora da densidade mineral óssea e nos marcadores de remodelamento ósseo.

7. Referências Bibliográficas

- 1 - Abellan van Kan G., 2009. Epidemiology and consequences of sarcopenia. *J. Nutr. Health Aging.* 8, 708-712.
- 2 - Aguiar, A.F., Januario, R.S., Junior, R.P., et al. 2013. Long-term creatine supplementation improves muscular performance during resistance training in older women. *Eur. J. Appl. Physiol.* 4, 987–996.
- 3 - Antolic, A., Roy, B.D., Tarnopolsky, M.A., et al., 2007. Creatine monohydrate increases bone mineral density in young Sprague-Dawley rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 5, 816–820.
- 4 - Bixby, W.R, Spalding, T.W., Haufler, A.J., et al., 2007. The unique relation of physical activity to executive function in older men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 8, 1408 – 1416.
- 5 - Berg, K.O., Wood-Dauphinee, S.L., Williams, J.I., et al., 1989. Measuring balance in the elderly : Preliminary development of an instrument. *Physiotherapy Canada* 41, 304-311.
- 6 - Brose, A., Parise G., Tarnopolsky, M.A., 2003. Creatine supplementation enhances isometric strength and body composition improvements following strength exercise training in older adults. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 1, 11-19.
- 7 - Candow, D.G., Little, J.P., Chilibeck, P.D., et al. 2008. Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. *Med. Sci. Sports Exerc.* 9, 1645–1652.
- 8 - Candow DG, Chilibeck PD, Facci M, Abeysekara S, Zello GA. Protein supplementation before and after resistance training in older men. *Eur J Appl Physiol.* 2006 ; 97 (5):548-56

-
- 9 - Carvalho J. Força muscular em idosos II: efeito de um programa complementar de treino na força muscular de idosos de ambos os sexos. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*. 2004;4 (1) 5
- 10- Chan JP, Thalamuthu A, Oldmeadow C, Armstrong NJ, Holliday EGM, McEvoy M, Kwok JB, Assareh AA, Peel R, Hancock SJ, Reppermund S, Menant J, Trollor JN, Brodaty H, Schofield PR, Attia JR, Sachdev PS, Scott RJ, Mather KA. Age (Dordr). 2015 Feb;37(1):9745. doi: 10.1007/s11357-015-9745-5. Epub 2015 Feb 1. Genetics of hand grip strength in mid to late life
- 11 - Chilibeck, P.D., Chrusch, M.J., Chad, K.E., et al., 2005. Creatine monohydrate and resistance training increase bone mineral content and density in older men. *J. Nutr. Health Aging* 5, 352–353.
- 12 - Chrusch, M.J., Chilibeck, P.D., Chad K.E., et al., 2001. Creatine supplementation combined with resistance training in older men. *Med. Sci. Sports Exerc.* 12, 2111–2117.
- 13 - Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., et al., 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis (Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People). *Age and Ageing*. 4, 412- 423.
- 14 - de Souza, R.A., Xavier, M., da Silva, F.F., et al., 2011. Influence of creatine supplementation on bone quality in the ovariectomized rat model: an FT-Raman spectroscopy study. *Lasers Med. Sci.* 2, 487-495.
- 15 - Deldicque, L., Theisen, D., Bertrand, L., et al., 2007. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. *Am. J Physiol. Cell Physiol.* 4, C1263–C1271.

-
- 16 - Deldicque, L., Louis, M., Theisen, D., et al., 2005. Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 5, 731-736.
- 17 - Doherty TJ. Invited review: Aging and Sarcopenia. *J Appl. Physiol.* 2003;95(4):1717-27.
- 18 - Domiciano, D.S., Figueiredo, C.P., Lopes, J.B., et al. 2013. Discriminating sarcopenia in community-dwelling older women with high frequency of overweight/obesity: the Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH). *Osteoporos. Int.* 2, 595–603.
- 19 - Eijnde, B.O., Van Leemputte, M., Goris, M., et al., 2003. Effects of creatine supplementation and exercise training on fitness in men 55-75 yr old. *J. Appl. Physiol.* 2, 818-828.
- 20 - Freitas EV, Py L, Néri AL, Cançado FAX, Gorzoni ML, Rocha SM Tratado de Geriatria e Gerontologia. Local: Guanabara-Koogan; 2002
- 21 - Ferri A, Scaglioni G, Pousson M, Capodaglio P, Van Hoecke J, Narici MV. Strength and power changes of the human plantar flexors and knee extensors in response to resistance training in old age. *Acta Physiol Scand.* 2003;177 (1), 69–78
- 22 - Gualano, B., Roschel, H., Lancha-Jr, A.H., et al., 2012. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids.* 2, 519–529.
- 23 - Gerber, I., ap Gwynn, I., Alini, M., et al., 2005. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *Eur. Cell Mater.* 8 – 22.

-
- 24- Larsson, J., Lennquist, S, Lovén L, Lewis DH, Liljedahl SO. Systemic metabolic effects observed in muscle tissue after high energy missile trauma. *Acta Chir Scand Suppl.* 1982; 508:323-6
- 25 - Lopes, J.B., Danilevicius, C.F., Takayama, L., et al., 2011. Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly. *Osteoporos Int.* 2, 711–719.
- 26 - Louis, M., Poortmans, J.R., Francaux, M., et al., 2003b. No effect of creatine supplementation on human myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis after resistance exercise. *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* 5, E1089–E1094.
- 27 - Louis, M., Poortmans, J.R., Francaux, M., et al., 2003c. Creatine supplementation has no effect on human muscle protein turnover at rest in the postabsorptive or fed states. *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* 4, E764–E770
- 28 - Louis, M., Lebacq, J., Poortmans, J.R., et al., 2003a. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve* 5, 604–610.
- 29 - Matsudo, S.M., Matsudo, V.K.R., Barros Neto, T.L.. 2000. Impacto do envelhecimento nas variáveis antropométricas, neuromotoras e metabólicas da aptidão física. *Revista Brasileira de Ciências e Movimento.* 4, 21-32.
- 30 - Melton, III I.J., Chrischilles, E.A., et al., 1992. How many women have osteoporosis ? *Journal of Bone and Mineral Research* 9, 1005-1010.
- 31 - Miyamoto, S.T., Lombardi Jr. I, Berg, K.O., et al. 2004. Brazilian version

- of the Berg balance scale. *Braz J Med Biol Res.* 37, 1411-1421.
- 32 - Neves Jr. M., Gualano, B., Roschel, H., et al. 2011. Beneficial effect of creatine supplementation in knee osteoarthritis. *Med. Sci. Sports Exerc.* 8, 1538–1543.
 - 33 - Newcomer, K.L., Krug, H.E., Mahowald, M.L., 1993. Validity and reliability of the timed-stands test for patients with rheumatoid arthritis and other chronic diseases. *J. Rheumatol.* 1, 21-27.
 - 34 - Newman, A.B., Kupelian, V., Visser, M., et al., 2003. Sarcopenia: alternative definitions and associations with lower extremity function. *J. Am. Geriatr. Soc.* 11, 1602-1609.
 - 35 - Nikander, R., Sievänen, H., Heinonen, A., et al., 2010. Targeted exercise against osteoporosis: a systematic review and meta-analysis for optimising bone strength throughout life. *BMC Med.* 47.
 - 36 - Olsen, S., Aagaard, P., Kadi, F., et al., 2006. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *J. Physio.* Pt 2, 525-534.
 - 37- Ploutz-Snyder LL, Giamis EL, Formikell M, Rosenbaum AE. **Resistance** training reduces susceptibility to eccentric exercise-induced muscle dysfunction in older **women**. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001 Sep;56(9):B384-90.
 - 38 - Podsiadlo, D., Richardson S., 1991. The timed “Up & Go” : a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J. Am. Geriatr Soc.* 2, 142-148.
 - 39 - Rawson, E.S., Clarkson, P.M., 2000. Acute creatine supplementation in older men. *Int. J. Sports Med.* 1, 71-75.

-
- 40- Rawson, E.S., Venezia, A.C., 2011. Use of creatine in the elderly and evidence for effects on cognitive function in young and old. *Amino Acids* 5, 1349-1362.
- 41 - Rawson, E.S., Wehnert, M.L., Clarkson, P.M., 1999. Effects of 30 days of creatine ingestion in older men. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 2, 139-144.
- 42 - Rawson, E.S., Clarkson, P.M., Price, T.B., et al., 2002. Differential response of muscle phosphocreatine to creatine supplementation in young and old subjects. *Acta Physiol. Scand.* 1, 57–65.
- 43 - Riis, B.J., Hansen, M.A., Jensen, A.M., et al., 1996. Low bone mass and fast rate of bone loss at menopause: equal risk factor for future fracture: a 15-year follow –up study. *Bone* 1, 9-12.
- 44 - Ruiz, J.R., Sui, X., Lobelo, F., et al., 2008. Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. *BMJ* a439.
- 45 - Shepherd, J.A., Lu, Y., Wilson, K., et al., 2006. Cross-calibration and minimum precision standards for dual-energy X-ray absorptiometry: the 2005 ISCD Official Positions. *J. Clin Densitom.* 1, 31–36
- 46 - Tarnopolsky, MA., 2000. Potential benefits of creatine monohydrate supplementation in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 6, 497-502.
- 47 - Tarnopolsky, M., Zimmer, A., Paikin, J., et al., 2007. Creatine monohydrate and conjugated linoleic acid improve strength and body composition following resistance exercise in older adults. *PLoS One.* 10, e991.

- 48 - Tarnopolsky, M.A., Mahoney, D.J., Vajsar, J., et al., 2004. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 10, 1771–1777.
- 49 - Terjung, R.L., Clarkson, P., Eichner, E.R., et al., 2000. American College of Sports Medicine roundtable. The physiological and health effects of oral creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 3, 706-717.
- 50 - Tinetti M.E., Speechley, M., Ginter, S.F., 1988. Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *N. Engl. J. Med.* 26, 1701-1707.
- 51 - Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., et al., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 21-40.
- 52- Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R., 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 3, 1107-1213.
- 53 - Wyss, M., Wallimann, T., et al., 1994. Creatine metabolism and the consequences of creatine depletion in muscle. *Mol. Cell Biochem.* 133-134:51-66.

8. Apêndice

Creatine supplementation and resistance training in vulnerable older women: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial

Bruno Gualano^{a,b}, André Regis Macedo^a, Christiano Robles Rodrigues Alves^a, Hamilton Roschel^{a,b}, Fabiana Braga Benatti^b, Liliam Takayama^a, Ana Lucia de Sá Pinto^a, Fernanda Rodrigues Lima^a, Rosa Maria Rodrigues Pereira^{a,*}

^a School of Medicine, Division of Rheumatology, University of São Paulo, Brazil

^b School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2013

Received in revised form 20 January 2014

Accepted 5 February 2014

Available online 13 February 2014

Section Editor: Andrzej Bartke

Keywords:

Diet

Resistance training

Aging

Elderly

Creatine

ABSTRACT

This study aimed to examine the efficacy of creatine supplementation, associated or not with resistance training, in vulnerable older women. A 24-week, double-blind, randomized, placebo-controlled trial was performed. Sixty subjects were assigned to compose the following groups: placebo (PL), creatine supplementation (CR), placebo with resistance training (PL + RT), and creatine supplementation with resistance training (CR + RT). The subjects were assessed at baseline and after 24 weeks. The primary outcome was muscle strength, as assessed by one-repetition maximum (1-RM) tests. Secondary outcomes included appendicular lean mass, bone mass, biochemical bone markers, and physical function tests. The changes in 1-RM leg press were significantly greater in the CR + RT group (+19.9%) than in the PL (+2.4%) and the CR groups (+3.7%), but not than in the PL + RT group (+15%) ($p = 0.002$, $p = 0.002$, and $p = 0.357$, respectively). The CR + RT group showed superior gains in 1-RM bench press (+10%) when compared with all the other groups ($p \leq 0.05$). The CR + RT group (+1.31%) showed greater appendicular lean mass accrual than the PL (−1.2%), the CR (+0.3%), and the PL + RT groups (−0.2%) ($p \leq 0.05$). The CR and the PL + RT groups experienced comparable gains in appendicular lean mass ($p = 0.62$), but superior to those seen in the PL group. Changes in fat mass, bone mass and serum bone markers did not significantly differ between the groups ($p > 0.05$). In conclusion, creatine supplementation combined with resistance training improved appendicular lean mass and muscle function, but not bone mass, in older vulnerable women. ClinicalTrials.gov: NCT01472393.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging is associated with impaired cognitive function (Bixby et al., 2007), loss of muscle mass, and muscle weakness (Ferri et al., 2003). These aging-related features commonly lead to an impaired ability to perform activities of daily living, increased fall risk (Tinetti et al., 1988), and consequently, mortality (Ruiz et al., 2008).

Even though aging is an inexorable maturational process, malnutrition and physical inactivity are well-known factors that can aggravate muscle function impairment in the elderly. In this regard, exercise training has been considered one of the most important cornerstones in the management of disabilities and co-morbidities secondary to aging, improving physical function and increasing lean mass

(Ferri et al., 2003). Furthermore, creatine supplementation has emerged as one of the few efficient dietary interventions capable of attenuating aging-related declines in muscle and cognitive function (Rawson and Venezia, 2011).

Creatine plays an important role in rapid energy provision during muscle contraction involving the transfer of N-phosphoryl group from phosphorylcreatine to ADP in mitochondria to regenerate ATP through a reversible reaction catalyzed by phosphorylcreatine kinase (CK). In addition to its function as a temporal energy buffer, phosphorylcreatine also acts as a spatial energy buffer to shuttle high-energy phosphates between mitochondria and cellular ATP utilization sites (Wallimann et al., 1992). Both in younger (Harris et al., 1992) and older (Rawson et al., 2008) individuals, creatine supplementation is able to increase intramuscular creatine and phosphorylcreatine content, thereby enhancing mitochondrial energy provision and consequently muscle strength and function (for a review, see Gualano et al. (2012)). Furthermore, creatine supplementation has been thought to augment lean mass by increasing training volume (Tarnopolsky et al., 2007) as well as by activating satellite cells (Olsen et al., 2006) and specific muscle growth factors (e.g., IGF-1, 4EBP-1) (Deldicque et al., 2005).

* Corresponding author at: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 3º andar, sala 3105, Divisão de Reumatologia, Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira César, São Paulo, SP 01246-903, Brazil. Tel.: +55 11 3061 7213/3061 7490; fax: +55 11 3061 7490.
E-mail address: rosamariarp@yahoo.com (R.M.R. Pereira).

Interestingly, both in vitro and animal studies have revealed a potential role of creatine supplementation in stimulating the development and differentiation of bone cells (Funanage et al., 1992; Gerber et al., 2005). Despite the fact that clinical evidence supporting this hypothesis is still scarce, Louis et al. (2003a) reported increased bone mineral density by 3% and reduced urinary concentrations of cross-linked N-telopeptides of type I collagen (NTx) (i.e., a marker of bone resorption) by 30% in creatine-supplemented patients with Duchenne dystrophy. Furthermore, Candow et al. (2008) demonstrated that creatine supplementation attenuated urinary NTx concentrations by 27% in older males undergoing resistance training. Altogether, these data support the therapeutic application of creatine supplementation as a measure to counteract the decline in muscle strength, lean mass and bone mass secondary to aging.

In fact, a growing number of investigations have demonstrated that in older adults, acute or short-term creatine supplementation, irrespective of exercise training, increases body mass, enhances fatigue resistance, increases muscle strength, and improves the performance of activities of daily living (Gotshalk et al., 2008; Rawson and Clarkson, 2000; Rawson et al., 1999; Stout et al., 2007). Importantly, the combination of creatine supplementation and resistance training seem to act synergistically in offsetting the cluster of disturbances associated with aging to a greater extent than resistance training alone (Candow et al., 2008; Eijnde et al., 2003; Tarnopolsky et al., 2007). Notwithstanding the unequivocal relevance of these findings, the studied volunteers appear to be predominantly physically active, independent adults (Rawson and Venezia, 2011), while little is known regarding the efficacy of creatine supplementation, combined or not with resistance training, in vulnerable older subjects (i.e., those who commonly complain of being “slowed up” or have disease symptoms (Rockwood et al., 2005)).

Thus, the aim of this study was to examine the efficacy of creatine supplementation, associated or not with resistance training, in physically inactive older women with osteopenia or osteoporosis.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

A 24-week, double-blind, randomized, parallel-group, placebo controlled trial was conducted between July 2010 and November 2011 in Sao Paulo (Brazil), according to the guidelines of the Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT). This study is part of a clinical trial primarily aimed to explore the effects of long-term creatine supplementation on physical function and body composition (in particular, bone mass) in older subjects (registered at clinicaltrials.gov as NCT01472393).

The subjects were randomly assigned (1:1:1:1) to compose either one of the following groups: 1) placebo supplementation (PL; $n = 15$), 2) creatine supplementation (CR; $n = 15$), 3) placebo supplementation combined with resistance training (PL + RT; $n = 15$) or 4) creatine supplementation combined with resistance training (CR + RT; $n = 15$). We assigned subjects to treatment sequence by using a computer-generated randomization code with a block of four. The subjects from the CR + RT and the PL + RT groups undertook a supervised exercise training program for 24 weeks. The subjects were assessed at baseline (Pre) and after 24 weeks (Post). The primary outcomes were the physical function measures, as assessed by one-repetition maximum (1-RM) tests. Secondary outcomes included bone mass, biochemical bone markers, appendicular lean mass, and physical function tests. Adverse events were recorded throughout the trial and blood parameters (urea, creatinine, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and creatine kinase) were assessed before and after the intervention. Possible differences in dietary intake were assessed by three 24-h dietary recalls.

2.2. Subjects

The subjects were recruited into the study by advertising at local health centers. The sample was comprised by postmenopausal women aged ≥ 60 years with osteopenia or osteoporosis (T-score < -1.5 at the lumbar spine, femoral neck or total femur). The exclusion criteria were: participation in physical exercise training over the past 2 years, previous use of creatine supplementation, use of drugs that could affect bone metabolism (e.g., glucocorticoid and bisphosphonates), uncontrolled cardiovascular diseases and/or musculoskeletal disturbances that could preclude exercise participation. All the participants were classified as “apparently vulnerable” (i.e., people who commonly complain of being “slowed up” or have disease symptoms), according to the Canadian Study of Health and Aging (CSHA) clinical frailty scale (Rockwood et al., 2005), which varies from 1 (“very fit”) to 7 (“severely ill”), with “apparently vulnerable” being classified as 4.

The study was approved by the Local Ethical Committee and all of the subjects signed the informed consent. All of the procedures were in accordance with the Helsinki Declaration revised in 2008.

2.3. Creatine supplementation protocol and blinding procedure

The subjects from the CR and the CR + RT groups received 20 g/day of creatine monohydrate (Probiótica, Sao Paulo, Brazil) for five days divided into four equal doses, followed by single daily doses of 5 g for the next 23 weeks. The subjects from the PL and the PL + RT groups were given the same dose of dextrose. During the loading phase, supplements were presented in four packages and patients were instructed to ingest the supplement packages at breakfast, lunch, dinner and before bed time. During the maintenance phase, patients consumed the supplement as a single dose during their lunch. They were asked to dissolve the supplements preferably in juice, in order to mask both the low solubility of creatine and the taste of dextrose. The supplement packages were coded so that neither the investigators nor the participants were aware of the contents until completion of the analyses. The supplements were provided by a staff member of our research team who did not have any participation in the data acquisition, analyses, and interpretation. In order to verify the purity of the creatine used, a sample was analyzed by HPLC and purity was established as 99.9%.

2.4. Exercise training

The subjects from the CR + RT and the PL + RT groups engaged in a 24-week supervised resistance training program. Exercise sessions occurred twice-a-week and were monitored by two fitness professionals. The exercise program was performed in an intrahospital gymnasium (Laboratory of Assessment and Conditioning in Rheumatology, School of Medicine, University of Sao Paulo). Resistance training program was comprised of leg press, leg extension, squat, seated row, bench press, lat-pull down, and sit-up exercises. The subjects were required to perform three sets of 8–12 RM, except during the first week, when a reduced volume of two sets of 15–20 RM for each exercise was performed. From the second week on, progression in the absolute exercise load was implemented when the subject could perform more than 12 repetitions on a given exercise set.

2.5. Muscle strength assessments

The subjects underwent two familiarization sessions for strength tests, separated for at least 72 h. Prior to the 1-RM test, two light warm-up sets interspaced for 2 min were performed. Afterwards, the patients had up to five attempts to achieve the 1-RM load, with a three-minute interval between attempts. 1-RM tests were conducted for the leg press and bench press exercises.

2.6. Physical function assessments

Physical function was measured by the timed-stands test and the timed-up-and-go tests. The timed-up-and-go test assesses the time that a subject requires to rise from a standard arm chair, walk to a line on the floor 3 m away, turn, return, and sit down again (Newcomer et al., 1993), whereas the timed-stands test evaluates the number of stand-ups that a subject can perform from a standard armless chair for 30 s (Podsiadlo and Richardson, 1991).

2.7. Food intake assessment

Food intake was assessed by means of three 24-h dietary recalls undertaken on separate days (two week days and one weekend day) using a visual aid photo album of real foods. Energy and macronutrient intake were analyzed by the software Virtual Nutri (Sao Paulo, Brazil).

2.8. Bone mineral density and body composition

Bone mineral density and body composition was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA), using a Hologic QDR 4500A densitometry equipment (Hologic Inc. Bedford, MA, USA, Discovery model). Bone mineral density was determined at the following sites: the lumbar spine, femoral neck, total femur, and whole body. The precision errors for bone mineral density measurements were determined based on the standard protocols from The International Society for Clinical Densitometry (ISCD) (Shepherd et al., 2006). The least significant change is considered to be 0.033 g/cm², 0.047 g/cm², 0.039 g/cm², and 0.010 g/cm² for the lumbar spine, the femoral neck, the total femur, and the whole body, respectively (Lopes et al., 2011).

Additionally, appendicular lean mass was calculated as the sum of arms and legs lean soft-tissue mass, assuming as skeletal muscle all of the non-fat and non-bone tissue. Sarcopenia was defined based on appendicular lean mass adjusted for height and total fat mass (Newman et al., 2003). In brief, linear regression was used to model the association between the appendicular lean mass and fat mass. The residuals from linear regression models were used to identify individuals whose appendicular lean mass was lower than expected for a given fat mass value. Positive fat-adjusted appendicular lean mass indicates a relatively muscular individual, whereas negative values indicate a relatively sarcopenic individual. The resultant equation obtained from a Brazilian women population was as follows (Domiciano et al., 2013):

$$\text{Appendicular lean mass (kg)} = -14.51 + 17.27 \times \text{height (m)} + 0.20 \times \text{fat mass (kg)}.$$

The 20th percentile was defined as the cut-off point for sarcopenia (Domiciano et al., 2013; Newman et al., 2003). This cut-off corresponded to a residual of -1.45 in a Brazilian women cohort (Domiciano et al., 2013).

All of the DXA measurements were performed by the same experienced technologist.

2.9. Serum bone markers

Blood samples were collected following a 12-h overnight fast (between 8:00 and 10:00 a.m.), and stored at -70°C for subsequent analyses. Type I collagen C-telopeptide (CTX) and Procollagen type I N-propeptide (PINP) serum concentrations were determined by an automated Roche electrochemiluminescence system (E411, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The serum CTX limit of detection was 10 ng/L and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 2.5% and 3.4%, respectively. Serum PINP intra-assay and inter-assay CVs were 2.2% and 1.8%, respectively, with a limit of detection of 5 µg/L.

2.10. Sample size estimation and statistical analysis

The sample size was estimated with the assistance of the G-Power® software (version 3.1.2). Based on data from a previous study (Gotshalk et al., 2008), we determined that 56 patients would be needed to provide 95% power ($\alpha = 0.05$; estimated effect size of 0.59) for muscle strength, which was the primary outcome of this clinical trial. In order to account for midtrial withdrawals, we enlarged our study population to 74 participants.

One-way ANOVA did not show any significant differences between groups at baseline. In addition, Shapiro–Wilk tests revealed that data were normally distributed. All values from the dependent variables were converted into delta scores (i.e., Post–Pre values) and thereafter tested by a one-way ANOVA. Tukey post-hoc was used when necessary. Fisher's test was applied to assess the possible differences between groups in the proportion of subjects who correctly guessed their supplements as well as the in the incidence of chronic diseases and use of supplements and medications. The sarcopenia incidence was reported descriptively. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation and 95% confidence level (95% CL), except when otherwise stated. The significance level was previously set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Subjects

The flowchart of participants is shown in Fig. 1. A total of 198 subjects were screened for participation and 74 met the inclusion criteria. These patients were randomly assigned into the PL ($n = 18$), CR ($n = 18$), PL + RT ($n = 19$), and CR + RT ($n = 19$) groups. Fourteen subjects withdrew due to personal reasons ($n = 3$, $n = 3$, $n = 4$, and $n = 4$ from the PL, CR, PL + RT, and CR + RT groups, respectively). Therefore, 60 subjects completed the trial and were analyzed (CR = 15 per group). Participants' characteristics are expressed in Table 1.

3.2. Assessment of blinding, adherence to the exercise program and food intake

Eight (53.3%), 9 (60.0%), 6 (40.0%), and 8 (53.3%) subjects from the PL, CR, PL + RT, and CR + RT groups, respectively, correctly identified the supplement. No significant differences between the groups were noticed ($p = 0.77$). The adherence to the exercise program was comparable between the trained groups ($83.9 \pm 6.1\%$ and $84.4 \pm 8.0\%$ for the PL + RT and the CR + RT groups, respectively; $p = 0.52$). Total energy and macronutrient intake did not significantly between groups ($p > 0.05$) (Table 2).

3.3. Muscle strength and physical function assessments

Fig. 2 shows the muscle strength and physical function data. All of the groups presented comparable physical function at baseline ($p > 0.05$). After the intervention, the increase in 1-RM leg press was significantly greater in the CR + RT group (Pre: 83.8 ± 19.4 , Post: 97.7 ± 21.7 kg; $+19.9\%$) than in the PL (Pre: 74.1 ± 19.9 , Post: 76.3 ± 19.7 kg; $+2.4\%$) and the CR groups (Pre: 74.9 ± 17.2 , Post: 77.7 ± 17.7 kg; $+3.7\%$), but not than in the PL + RT group (Pre: 75.5 ± 14.2 , Post: 85.5 ± 13.9 kg; $+15.0\%$) ($p = 0.002$, $p = 0.002$, and $p = 0.357$, respectively). There were no significant differences in 1-RM leg press changes between the PL, CR and PL + RT groups ($p > 0.05$). The CR + RT group had superior gains in 1-RM bench press (Pre: 33.9 ± 5.6 , Post: 36.5 ± 7.1 kg, $+10\%$) when compared with all the other groups ($p < 0.05$). There were no statistical differences in 1-RM bench press changes between the PL (Pre: 31.2 ± 6.3 , Post: 29.6 ± 4.9 kg), the CR (Pre: 32.1 ± 7.1 , Post: 32.6 ± 7.0 kg), and the PL + RT groups (Pre: 31.2 ± 7.9 , Post: 33.0 ± 4.9 kg) ($p > 0.05$).

Fig. 1. Flowchart of subjects.

The CR + RT group had superior gains in the timed-stands performance when compared with the PL group ($p = 0.02$). The remaining between group comparisons were not significantly different (PL – Pre: 13.7 ± 2.3 , Post: 13.8 ± 1.9 repetitions; CR – Pre: 13.4 ± 2.0 , Post: 14.0 ± 0.9 repetitions; PL + RT – Pre: 13.7 ± 2.3 , Post: 15.0 ± 1.9 repetitions; and CR + RT – Pre: 14.7 ± 2.7 , Post: 16.2 ± 3.4 repetitions; $p > 0.05$). The changes in performance for the timed-up-and-go test were comparable across the experimental groups (absolute data not shown; $p > 0.05$).

3.4. Bone mineral density, serum bone markers, body composition, and sarcopenia incidence

Changes in bone mineral density and bone mineral content (Table 3) did not significantly differ between the groups in any assessed sites. Similarly, no changes in serum CTX and PINP concentrations (absolute data not shown) were detected after the intervention (Fig. 3, bottom panels).

Fig. 3 (upper panels) also illustrates the body composition data. The CR + RT group (Pre: 16.8 ± 2.3 , Post: 17.1 ± 2.0 kg; $+1.31\%$) had

greater appendicular lean mass accrual than the PL (Pre: 17.2 ± 1.3 , Post: 17.0 ± 1.5 kg; -1.2%), the CR (Pre: 16.8 ± 1.9 , Post: 16.9 ± 1.9 kg; $+0.3\%$), and the PL + RT groups (Pre: 17.4 ± 1.5 , Post: 17.3 ± 1.5 kg; -0.2%) ($p < 0.0001$, $p = 0.05$, and $p = 0.002$, respectively). The CR and the PL + RT groups experienced comparable appendicular lean mass gains ($p = 0.62$), which were superior to those seen in the PL group ($p = 0.01$ and $p = 0.04$, respectively). Fat mass did not significantly change between the groups (absolute data not shown; $p > 0.05$).

At baseline, 6, 5, 8, and 4 subjects from the PL, CR, PL + RT, and CR + RT, respectively, were classified as sarcopenic. Following the intervention, sarcopenia incidence increased in the PL group ($n = 2$), remained unchanged in the PL + RT group, and decreased in both the CR group ($n = 1$) and the CR + RT group ($n = 2$).

3.5. Adverse effects

There were no self-reported side effects throughout the study. Clinical examinations did not reveal adverse events potentially associated with creatine supplementation or resistance training. Moreover, blood

Table 1
Demographic characteristics, comorbidities, drug regimen, and supplement intake data.

	PL (n = 15)	CR (n = 15)	PL + RT (n = 15)	CR + RT (n = 15)	p
Age (years)	66.3 $\pm$ 6.0	66.1 $\pm$ 4.8	63.6 $\pm$ 3.6	67.1 $\pm$ 5.6	0.31
Height (m)	1.55 $\pm$ 0.07	1.54 $\pm$ 0.05	1.54 $\pm$ 0.04	1.54 $\pm$ 0.07	0.97
Body mass (kg)	63.4 $\pm$ 8.8	64.4 $\pm$ 10.2	66.8 $\pm$ 9.0	66.6 $\pm$ 7.1	0.66
BMI (kg·m ⁻²)	26.8 $\pm$ 5.5	27.1 $\pm$ 3.5	28.2 $\pm$ 3.6	28.0 $\pm$ 2.1	0.70
Fat mass (%)	36.4 $\pm$ 5.5	36.7 $\pm$ 4.2	39.8 $\pm$ 3.7	37.1 $\pm$ 3.5	0.14
Lean mass (kg)	38.9 $\pm$ 4.5	39.5 $\pm$ 5.5	38.2 $\pm$ 3.6	39.8 $\pm$ 3.0	0.78
BMD (T-Score)	-1.9 $\pm$ 0.9	-1.7 $\pm$ 1.1	-1.7 $\pm$ 0.6	-1.9 $\pm$ 0.6	0.82
Comorbidities (n, %)					
Hypertension	8 (53.3)	9 (60.0)	3 (20.0)	4 (26.7)	0.13
Diabetes mellitus	1 (6.7)	2 (13.3)	2 (13.3)	1 (6.7)	1.00
Dyslipidemia	3 (20.0)	4 (26.7)	0 (0)	1 (6.7)	0.15
Drug/supplement (n, %)					
Anti-hypertensives	7 (46.7)	8 (53.3)	3 (20.0)	4 (26.7)	0.22
Oral hypoglycemics	1 (6.7)	2 (13.3)	2 (13.3)	1 (6.7)	1.00
Hypolipidemics	3 (20.0)	5 (33.3)	1 (6.7)	1 (6.7)	0.21
Antidepressants	2 (13.3)	3 (20.0)	2 (13.3)	0 (0)	0.49
Vitamin B12	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.7)	0.36
Calcium and/or Vitamin D	2 (13.3)	1 (6.7)	1 (6.7)	4 (26.7)	0.49

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation or n (% of the total sample). No significant between-group differences were observed. PL = placebo; CR = creatine; PL + RT = placebo + resistance training; CR + RT = creatine + resistance training; BMI = body mass index; and BMD = bone mineral density.

Table 2
Daily food intake at baseline (Pre) and after 24 weeks of intervention (Post).

	CR (n = 15)			PL + RT (n = 15)			CR + RT (n = 15)			p
	Pre	Post	Δ (95% CI)	Pre	Post	Δ (95% CI)	Pre	Post	Δ (95% CI)	
Energy (kcal)	1461 ± 202	1548 ± 315	87 (−225 to 210)	1257 ± 318	1307 ± 367	50 (−176 to 88)	1438 ± 343	1342 ± 469	−96 (−370 to 178)	0.56
Carbohydrate (g)	197 ± 37	214 ± 52	17 (−7 to 41)	162 ± 50	161 ± 43	−1 (−18 to 16)	190 ± 57	172 ± 57	−18 (−56 to 20)	0.30
Carbohydrate (%)	54 ± 8	56 ± 10	1 (−5 to 7)	52 ± 10	50 ± 6	−2 (−7 to 3)	54 ± 10	52 ± 4	−3 (−9 to 3)	0.71
Protein (g)	61 ± 17	68 ± 19	6 (−10 to 22)	54 ± 17	62 ± 21	9 (0 to 18)	58 ± 18	54 ± 15	−4 (−13 to 5)	0.46
Protein (%)	17 ± 4	18 ± 5	1 (−3 to 5)	17 ± 3	19 ± 3	2 (0 to 4)	17 ± 3	17 ± 5	0 (−4 to 4)	0.78
Fat (g)	48 ± 14	47 ± 18	−1 (−15 to 13)	44 ± 15	46 ± 15	2 (−6 to 10)	48 ± 15	49 ± 23	1 (−14 to 16)	0.96
Fat (%)	29 ± 7	27 ± 8	−3 (−10 to 4)	32 ± 9	32 ± 6	0 (−4 to 4)	29 ± 9	32 ± 7	3 (−4 to 10)	0.45
Calcium (mg)	502 ± 210	561 ± 241	59 (−50 to 165)	578 ± 343	537 ± 262	−42 (−240 to 155)	529 ± 203	542 ± 424	12 (−280 to 300)	0.76

No between-group differences were observed. PL = placebo; CR = creatine; CR + RT = creatine + resistance training; and CL = confidence level.

parameters (i.e., urea, creatinine, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and creatine kinase) remained within normal range and did not change across time (data not shown).

4. Discussion

The main novelties of the this study include: i) the assessment of the long-term effects (i.e., 24 weeks) of creatine supplementation in older subjects; and ii) the evaluation of the effects of creatine supplementation in vulnerable sedentary elderly subjects with low bone mass and other chronic diseases. The main findings of this clinical trial indicated that creatine supplementation, particularly when combined with resistance training, was capable of increasing lower- and upper-body muscle strength as well as appendicular lean mass in our elderly cohort. Interestingly, the number of subjects considered sarcopenic at baseline decreased in the creatine-supplemented groups (i.e., CR and CR + RT, $n = -3$) in comparison with the placebo groups (PL and PL + RT, $n = +2$). Altogether, these data support the speculation that the combination of creatine supplementation and resistance training can be of therapeutic relevance in the management of vulnerable older individuals by counteracting aging-induced muscle weakness and muscle mass loss, which are independent factors strongly associated with risk of falls (Tinetti et al., 1988) and, consequently, mortality (Ruiz et al., 2008).

There has been a growing number of studies demonstrating that both acute (≤ 7 days) and chronic creatine supplementation (up to 14 weeks) can improve muscle function and fatigue resistance in healthy older adults (for a comprehensive review, see Rawson and Venezia (2011)). Moreover, a few studies have suggested that this dietary supplement along with a resistance training program could enhance gains in lean mass in older people. Nonetheless, these studies had some limitations, including: a low sample size (i.e., normally, $n \leq 25$), a short-term follow-up period (i.e., ≤ 14 weeks), the combination of creatine with other dietary supplements (i.e., protein and conjugated linoleic acid), samples excessively heterogeneous (i.e., age between 56 to 71 years; no distinction between men and women), and an incomplete phenotypical characterization of samples (i.e., no clear description on physical activity level, associated chronic diseases, and use of medications) (Rawson and Venezia, 2011). In this regard, the current study extends the knowledge on the application of creatine in senescence by providing evidence of the beneficial effect of this nutrient associated with resistance training in a well-characterized cohort of vulnerable elderly women. These findings also support a previous study from our group in which creatine supplementation added to a lower-body resistance training program resulted in better physical function (as assessed by timed-stands test) and clinical improvements in older patients with knee osteoarthritis (Neves et al., 2011).

Another interesting finding of this study refers to the gain in lean mass promoted by creatine supplementation combined with resistance training, which corroborates some (Aguar et al., 2013; Brose et al., 2003; Candow et al., 2008; Chrusch et al., 2001; Tarnopolsky et al., 2007), but not all (Eijnde et al., 2003), previous investigations involving elderly populations. In support to the current results, Aguiar et al. (2013) recently reported improvements in fat-free mass ($+3.2\%$) in healthy older women who were supplemented with creatine concomitantly to a resistance training program for 12 weeks. However, the differences pertaining to the selected samples (i.e., vulnerable subjects in the current study vs. healthy subjects in the Aguiar et al.'s (2013) study preclude any further comparisons between the studies.

It has been showed that dietary creatine can modulate the transcription of myogenic regulatory factors (e.g., IGF-1, Myo-D, myogenin, MRF-4, Myf5) (Deldicque et al., 2005), increase the efficiency of protein translation (Deldicque et al., 2007), and enhance the activation, proliferation and differentiation of satellite cells (Olsen et al., 2006), which, ultimately, would contribute to a more positive protein balance. Notwithstanding these molecular observations, two

Fig. 2. Effects of creatine supplementation combined or not resistance training on muscle strength and physical function in vulnerable elderly subjects. Panel A: 1-RM leg press. Panel B: 1-RM bench press. Panel C: Timed-stands test. Panel D: Timed-up-and-go test. PL = placebo; CR = creatine; PL + RT = placebo plus resistance training; CR + RT = creatine plus resistance training. * means CR + RT > all the other groups; # means CR + RT > PL and CR; \$ means CR + RT > PL ($p \leq 0.05$). Data are expressed as mean for delta scores $\pm$ 95% confidence level.

elegant studies using isotopic technique did not show any influence of short-term creatine supplementation, combined or not with a resistance training session, on protein balance in healthy young individuals (Louis et al., 2003b,c), suggesting that acute creatine intake is unable to modulate myofibrillar protein synthesis and/or catabolism. Nonetheless, it has been speculated that chronic creatine supplementation could effectively support muscle anabolism by enhancing resistance training volume in both healthy and disabled individuals (Gualano et al., 2012; Rawson and Venezia, 2011). Further studies should examine the underlying mechanism(s) of creatine-induced lean mass accretion in older individuals.

Further to the purpose of investigating the role of creatine supplementation on lean mass and muscle strength and function, we also aimed to gather knowledge on the possible therapeutic effect of this nutrient in bone mass loss. There is evidence that the creatine/ATP/creatine kinase system plays a pivotal bioenergetic role in the differentiation and activation of osteoblast-like cells (Gerber et al., 2005). Furthermore, experimental studies have revealed that creatine supplementation can improve bone biomechanical parameters (e.g., femur fracture load) and bone mineral density in healthy rats (Antolic et al., 2007) as well as increase bone mineral density content in ovariectomized rats (de Souza et al., 2011). The scarce clinical studies available have also supported the role of creatine in positively affecting bone remodeling. For instance, Louis et al. (2003a) and Tarnopolsky et al. (2004) reported reductions in bone resorption in patients with dystrophy supplemented with creatine. Moreover, Chilibeck et al. (2005) verified increased bone mineral content after creatine supplementation in resistance trained subjects. Collectively, these data led to the speculation that long-term creatine supplementation, particularly in association with exercise, could attenuate bone loss in older women with osteopenia or osteoporosis. However, the current findings did not reveal any effect of creatine or

resistance training on bone mass or serum bone markers. There are some explanations for the lack of the efficacy of the interventions in this study. First, it has been shown that exercise training can increase bone mineral density in both adolescents and young adults, but not in post-menopausal women, suggesting that exercise is less effective in conditions characterized by low bone mass (Nikander et al., 2010). One may speculate that this also holds true for creatine supplementation. Additional trials with subjects suffering from less severe bone mass deterioration must be conducted in order to test this hypothesis. Second, it has been postulated that the creatine-induced bone mass increase may be secondary to an enhanced muscle mass, which would potentially foster greater tension on bone at sites of muscle attachment (Chilibeck et al., 2005). In this respect, it is plausible to assume that our training protocol was not sufficiently intensive to promote beneficial adaptation in bone tissue, with creatine supplementation being unable to maximize muscle mass at a given extent which would lead to the bone mass gain. Finally, and perhaps most importantly, one may assume that our sample size was underestimated and our follow-up period was too short in order to detect significant changes in bone mass. We have currently conducted a 2-year randomized controlled trial primarily aimed to investigate the role of creatine supplementation on bone mass in a large cohort of post-menopausal women (registered at clinical trial.gov as NCT01472393), which may provide more definitive conclusions on this topic.

This trial has some limitations. First, we were not able to measure muscle creatine or phosphorylcreatine content. Even though the literature has demonstrated that older individuals show an effective response to creatine supplementation in terms of intramuscular creatine/phosphorylcreatine accumulation (Brose et al., 2003; Rawson et al., 2002), it remains controversial whether older and younger subjects equally respond to this supplement (Rawson and Venezia, 2011). Further studies involving elderly participants must re-assess the effects of

Table 3
Bone mass at baseline (Pre) and after 24 weeks of intervention (Post).

	PL (n = 15)			CR (n = 15)			PL + RT (n = 15)			CR + RT (n = 15)			p
	Pre	Post	Δ (95% CI)	Pre	Post	Δ (95% CI)	Pre	Post	Δ (95% CI)	Pre	Post	Δ (95% CI)	
Whole body													
BMC (kg)	1.65 ± 0.20	1.65 ± 0.19	0.00 (−0.02 to 0.02)	1.67 ± 0.25	1.65 ± 0.25	−0.02 (−0.04 to 0.00)	1.70 ± 0.16	1.69 ± 0.17	−0.01 (−0.03 to 0.01)	1.64 ± 0.18	1.62 ± 0.18	−0.02 (−0.04 to 0.00)	0.35
BMD (g/cm ³)	0.93 ± 0.08	0.93 ± 0.08	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.95 ± 0.10	0.95 ± 0.10	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.95 ± 0.06	0.95 ± 0.05	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.94 ± 0.05	0.93 ± 0.05	−0.01 (−0.02 to 0.00)	0.26
T-Score	−1.9 ± 0.9	−1.9 ± 0.9	0.0 (−0.1 to 0.1)	−1.7 ± 1.1	−1.8 ± 1.1	−0.1 (−0.2 to 0.0)	−1.7 ± 0.6	−1.7 ± 0.6	0.0 (−0.1 to 0.1)	−1.9 ± 0.6	−2.0 ± 0.5	−0.1 (−0.2 to 0.0)	0.24
Z-Score	−0.4 ± 0.8	−0.4 ± 0.8	0.0 (−0.1 to 0.1)	−0.3 ± 1.3	−0.3 ± 1.3	0.0 (−0.1 to 0.1)	−0.4 ± 0.7	−0.3 ± 0.7	0.1 (0.0 to 0.2)	−0.4 ± 0.7	−0.5 ± 0.7	−0.1 (−0.3 to 0.1)	0.26
L1–L4													
BMD (g/cm ³)	0.82 ± 0.07	0.82 ± 0.07	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.82 ± 0.13	0.82 ± 0.14	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.84 ± 0.09	0.83 ± 0.08	−0.01 (−0.02 to 0.00)	0.80 ± 0.08	0.81 ± 0.09	0.01 (0.00 to 0.02)	0.30
T-Score	−2.2 ± 0.9	−2.2 ± 0.9	0.0 (−0.2 to 0.2)	−2.0 ± 1.2	−2.0 ± 1.2	0.0 (−0.1 to 0.1)	−2.0 ± 0.9	−2.0 ± 0.8	0.0 (−0.1 to 0.1)	−2.5 ± 0.9	−2.4 ± 1.0	0.1 (0.0 to 0.2)	0.44
Z-Score	−0.3 ± 1.0	−0.3 ± 1.0	0.0 (−0.1 to 0.1)	−0.2 ± 1.3	−0.1 ± 1.4	0.1 (0.0 to 0.2)	−0.2 ± 0.8	−0.2 ± 0.8	0.0 (−0.1 to 0.1)	−0.4 ± 1.0	−0.3 ± 1.0	0.1 (0.0 to 0.2)	0.40
Total femur													
BMD (g/cm ³)	0.82 ± 0.09	0.82 ± 0.07	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.79 ± 0.10	0.78 ± 0.10	−0.01 (−0.02 to 0.00)	0.80 ± 0.09	0.80 ± 0.09	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.79 ± 0.10	0.79 ± 0.09	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.86
T-Score	−1.0 ± 0.7	−1.0 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	−1.3 ± 0.8	−1.3 ± 0.8	0.0 (−0.1 to 0.1)	−1.2 ± 0.8	−1.2 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	−1.3 ± 0.7	−1.3 ± 0.6	0.0 (−0.1 to 0.1)	0.75
Z-Score	0.2 ± 0.7	0.2 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	0.0 ± 0.9	0.0 ± 0.9	0.0 (−0.1 to 0.1)	0.0 ± 0.8	0.0 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	0.0 ± 0.8	0.0 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	0.71
Femoral neck													
BMD (g/cm ³)	0.68 ± 0.08	0.68 ± 0.07	0.00 (−0.01 to 0.01)	0.66 ± 0.06	0.65 ± 0.07	−0.01 (−0.02 to 0.00)	0.70 ± 0.06	0.69 ± 0.05	−0.01 (−0.02 to 0.00)	0.66 ± 0.08	0.65 ± 0.07	−0.01 (−0.02 to 0.01)	0.47
T-Score	−1.6 ± 0.7	−1.6 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	−1.7 ± 0.6	−1.8 ± 0.6	−0.1 (−0.2 to 0.0)	−1.3 ± 0.6	−1.4 ± 0.5	−0.1 (−0.2 to 0.0)	−1.8 ± 0.6	−1.9 ± 0.5	−0.1 (−0.2 to 0.0)	0.40
Z-Score	−0.1 ± 0.7	−0.1 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	−0.1 ± 0.6	−0.1 ± 0.7	0.0 (−0.1 to 0.1)	0.2 ± 0.5	0.1 ± 0.5	−0.1 (−0.2 to 0.2)	−0.3 ± 0.7	−0.3 ± 0.6	0.0 (−0.1 to 0.1)	0.90
No significant differences were observed between groups. PL = placebo; CR = creatine; PL + RT = placebo + resistance training; CR + RT = creatine + resistance training; CR +													

No significant differences were observed between groups. PL = placebo; CR = creatine; PL + RT = placebo + resistance training; CR + RT = creatine + resistance training; CI = confidence interval; BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; and L = lumbar vertebrae.

Fig. 3. Effects of creatine supplementation combined or not resistance training on body composition and serum bone markers in vulnerable elderly subjects. Panel A: Appendicular lean mass. Panel B = Percent fat mass. Panel C: CTX. Panel D: P1NP. PL = placebo; CR = creatine; PL + RT = placebo plus resistance training; CR + RT = creatine plus resistance training. CTX = Type I collagen C-telopeptide; P1NP = Procollagen type I N-propeptide. * means CR + RT > all the other groups; # means PL < all the other groups ($p \leq 0.05$). Data are expressed as mean for delta scores $\pm$ 95% confidence level.

creatine supplementation on muscle function and mass concomitantly to muscle creatine/phosphorylcreatine evaluations. Second, given the sample's characteristics, the current findings cannot be extrapolated to severely frail older individuals who are completely dependent on others for the activities of daily living, or terminally ill. The potentially beneficial effect of creatine supplementation on this population remains to be investigated. Third, while the gains in muscle function and appendicular lean mass seen in this study might be of clear clinical relevance to older individuals on a long-term basis, possibly reducing the risk of falls, fractures, hospital admissions, and, eventually, mortality, the current study did not address none of these outcomes. Thus, future larger clinical trials involving older cohorts should investigate the effects of creatine supplementation along with resistance training upon more robust outcomes, including health-related quality of life and survival.

In conclusion, long-term creatine supplementation combined with resistance training was able to improve appendicular lean mass and muscle function, but not bone mass, in vulnerable older women. Creatine supplementation per se led to improvements in appendicular lean mass, but not muscle function, when compared to placebo. These findings points out the therapeutic potential of creatine supplementation, especially in association with resistance training, in offsetting the decline of muscle mass and muscle function in aging.

Financial support

RMRP was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Federico Foundation, whereas FBB and CRRA were supported by Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Conflict of interest

The authors declare that they do not have conflict of interests.

Authorship

Significant manuscript writer — Bruno Gualano, Hamilton Roschel, and Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Significant manuscript reviewer/reviser — Christiano Robles Rodrigues Alves, André Macedo, Fabiana Braga Benatti, Ana Lucia de Sá-Pinto, Liliam Takayama, and Fernanda Rodrigues Lima.

Concept and design — Bruno Gualano, and Rosa Maria Pereira.

Data acquisition — André Macedo, Christiano Robles Rodrigues Alves, Fabiana Braga Benatti, Ana Lucia de Sá Pinto, Liliam Takayama, and Fernanda Rodrigues Lima.

Data analysis and interpretation — Bruno Gualano, Hamilton Roschel, and Rosa Maria Pereira.

Statistical expertise — Hamilton Roschel, Bruno Gualano, Christiano Robles Rodrigues Alves, and Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Acknowledgments

We would like to thank Probiotica for providing the creatine supplements.

References

- Aguiar, A.F., Januario, R.S., Junior, R.P., et al., 2013. Long-term creatine supplementation improves muscular performance during resistance training in older women. *Eur. J. Appl. Physiol.* 4, 987–996.
- Antolic, A., Roy, B.D., Tarnopolsky, M.A., et al., 2007. Creatine monohydrate increases bone mineral density in young Sprague-Dawley rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 5, 816–820.

- Bixby, W.R., Spalding, T.W., Hafler, A.J., et al., 2007. The unique relation of physical activity to executive function in older men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1408–1416.
- Brose, A., Parise, G., Tarnopolsky, M.A., 2003. Creatine supplementation enhances isometric strength and body composition improvements following strength exercise training in older adults. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1, 11–19.
- Candow, D.G., Little, J.P., Chilibeck, P.D., et al., 2008. Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. *Med. Sci. Sports Exerc.* 9, 1645–1652.
- Chilibeck, P.D., Chrusch, M.J., Chad, K.E., et al., 2005. Creatine monohydrate and resistance training increase bone mineral content and density in older men. *J. Nutr. Health Aging* 5, 352–353.
- Chrusch, M.J., Chilibeck, P.D., Chad, K.E., et al., 2001. Creatine supplementation combined with resistance training in older men. *Med. Sci. Sports Exerc.* 12, 2111–2117.
- de Souza, R.A., Xavier, M., da Silva, F.F., et al., 2011. Influence of creatine supplementation on bone quality in the ovariectomized rat model: an FT-Raman spectroscopy study. *Lasers Med. Sci.* 2, 487–495.
- Deldique, L., Louis, M., Theisen, D., et al., 2005. Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 5, 731–736.
- Deldique, L., Theisen, D., Bertrand, L., et al., 2007. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 4, C1263–C1271.
- Domiciano, D.S., Figueiredo, C.P., Lopes, J.B., et al., 2013. Discriminating sarcopenia in community-dwelling older women with high frequency of overweight/obesity: the Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAHS). *Osteoporos. Int.* 2, 595–603.
- Eijnde, B.O., Van Leemputte, M., Goris, M., et al., 2003. Effects of creatine supplementation and exercise training on fitness in men 55–75 yr old. *J. Appl. Physiol.* 2, 818–828.
- Ferri, A., Scaglioni, G., Pousson, M., et al., 2003. Strength and power changes of the human plantar flexors and knee extensors in response to resistance training in old age. *Acta Physiol. Scand.* 1, 69–78.
- Funanage, V.L., Carango, P., Shapiro, I.M., et al., 1992. Creatine kinase activity is required for mineral deposition and matrix synthesis in endochondral growth cartilage. *Bone Miner.* 2, 228–236.
- Gerber, L., ap Gwynn, I., Alini, M., et al., 2005. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *Eur. Cell Mater.* 8–22.
- Gotshalk, L.A., Kraemer, W.J., Mendonca, M.A., et al., 2008. Creatine supplementation improves muscular performance in older women. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2, 223–231.
- Gualano, B., Roschel, H., Lancha-Jr, A.H., et al., 2012. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids* 2, 519–529.
- Harris, R.C., Soderlund, K., Hultman, E., 1992. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin. Sci. (Lond.)* 3, 367–374.
- Lopes, J.B., Danilevicius, C.F., Takayama, L., et al., 2011. Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly. *Osteoporos. Int.* 2, 711–719.
- Louis, M., Lebacqz, J., Poortmans, J.R., et al., 2003a. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve* 5, 604–610.
- Louis, M., Poortmans, J.R., Francaux, M., et al., 2003b. No effect of creatine supplementation on human myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis after resistance exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 5, E1089–E1094.
- Louis, M., Poortmans, J.R., Francaux, M., et al., 2003c. Creatine supplementation has no effect on human muscle protein turnover at rest in the postabsorptive or fed states. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 4, E764–E770.
- Neves Jr, M., Gualano, B., Roschel, H., et al., 2011. Beneficial effect of creatine supplementation in knee osteoarthritis. *Med. Sci. Sports Exerc.* 8, 1538–1543.
- Newcomer, K.L., Krug, H.E., Mahowald, M.L., 1993. Validity and reliability of the timed-stands test for patients with rheumatoid arthritis and other chronic diseases. *J. Rheumatol.* 1, 21–27.
- Newman, A.B., Kupelian, V., Visser, M., et al., 2003. Sarcopenia: alternative definitions and associations with lower extremity function. *J. Am. Geriatr. Soc.* 11, 1602–1609.
- Nikander, R., Sievanen, H., Heinonen, A., et al., 2010. Targeted exercise against osteoporosis: a systematic review and meta-analysis for optimising bone strength throughout life. *BMC Med.* 47.
- Olsen, S., Aagaard, P., Kadi, F., et al., 2006. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *J. Physiol. Pt 2*, 525–534.
- Podsiadlo, D., Richardson, S., 1991. The timed “Up & Go”: a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2, 142–148.
- Rawson, E.S., Clarkson, P.M., 2000. Acute creatine supplementation in older men. *Int. J. Sports Med.* 1, 71–75.
- Rawson, E.S., Venezia, A.C., 2011. Use of creatine in the elderly and evidence for effects on cognitive function in young and old. *Amino Acids* 5, 1349–1362.
- Rawson, E.S., Wehnert, M.L., Clarkson, P.M., 1999. Effects of 30 days of creatine ingestion in older men. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 2, 139–144.
- Rawson, E.S., Clarkson, P.M., Price, T.B., et al., 2002. Differential response of muscle phosphocreatine to creatine supplementation in young and old subjects. *Acta Physiol. Scand.* 1, 57–65.
- Rawson, E.S., Lieberman, H.R., Walsh, T.M., et al., 2008. Creatine supplementation does not improve cognitive function in young adults. *Physiol. Behav.* 1–2, 130–134.
- Rockwood, K., Song, X., MacKnight, C., et al., 2005. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ* 5, 489–495.
- Ruiz, J.R., Sui, X., Lobelo, F., et al., 2008. Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. *BMJ* a439.
- Shepherd, J.A., Lu, Y., Wilson, K., et al., 2006. Cross-calibration and minimum precision standards for dual-energy X-ray absorptiometry: the 2005 ISCD Official Positions. *J. Clin. Densitom.* 1, 31–36.
- Stout, J.R., Sue Graves, B., Cramer, J.T., et al., 2007. Effects of creatine supplementation on the onset of neuromuscular fatigue threshold and muscle strength in elderly men and women (64–86 years). *J. Nutr. Health Aging* 6, 459–464.
- Tarnopolsky, M.A., Mahoney, D.J., Vajsar, J., et al., 2004. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 10, 1771–1777.
- Tarnopolsky, M., Zimmer, A., Paikin, J., et al., 2007. Creatine monohydrate and conjugated linoleic acid improve strength and body composition following resistance exercise in older adults. *PLoS One* 10, e991.
- Tinetti, M.E., Speechley, M., Ginter, S.F., 1988. Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *N. Engl. J. Med.* 26, 1701–1707.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., et al., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 21–40.