

Influência da suplementação de creatina sobre a massa muscular de ratos

Influence of creatine supplementation on muscle mass of rats

Renato Aparecido de Souza¹; Humberto Miranda²; Rodrigo Alexis Lazo Osório³; Belmiro Salles⁴; Roberto Simão⁵; Wellington Ribeiro⁶

¹ Doutorando em Engenharia Biomédica – Univap; Professor de Ortopedia e Traumatologia – UFVJM.

² Doutor em Engenharia Biomédica – Univap.

³ Doutor em Ciências – Unifesp; Professor – Univap.

⁴ Doutorando em Fisiopatologia Clínica e Experimental – UERJ.

⁵ Doutor em Educação Física – UGF; Professor de Pós-Graduação – UFRJ.

⁶ Doutor em Farmacologia – USP; Professor – Univap.

Endereço para correspondência

Renato Aparecido de Souza
Rua João Nunes de Oliveira Jr., 140. FOCH
37550-000 Pouso Alegre – Minas Gerais [Brasil]
tatosouza2004@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação aguda (5g . kg⁻¹ durante uma semana) e crônica (1g . kg⁻¹ durante 8 semanas) de creatina sobre a adaptação ponderal dos músculos tibial anterior e sóleo de ratos sedentários e exercitados (natação a 80% da carga máxima tolerada). 72 ratos Wistar machos (250 ± 11g) foram divididos em 4 grupos: ratos sedentários não suplementados (CON; n = 18); ratos exercitados não suplementados (NAT; n = 18); ratos sedentários e suplementados (CRE; n = 18), e ratos exercitados e suplementados (CRE+NAT; n = 18). Ao final da primeira, quarta e oitava semanas, seis animais de cada grupo foram sacrificados para análise. Obtiveram-se os seguintes resultados (p<0.05): maior média de massa absoluta do músculo tibial anterior no CRE e CRE+NAT; maior média de massa absoluta e relativa do músculo sóleo no CRE+NAT em relação aos demais grupos, após 4 e 8 semanas. Esses achados sugerem que a suplementação de creatina ocasiona adaptações ponderais positivas no tecido muscular esquelético de ratos, independentemente da realização do exercício físico.

Descritores: Músculo esquelético; Ratos; Suplementação de creatina.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of the short-term (5g . kg⁻¹ for 1 week) and long-term (1g . kg⁻¹ for 8 weeks) creatine supplementation on ponderal adaptation of anterior tibial and soleus muscles of sedentary and exercised (swimming to 80% of the tolerated maximum load) rats. 72 Wistar males rats (240 ± 10g) were divided in 4 groups: sedentary rats without supplementation (CON; n = 18); exercised rats without supplementation (NAT; n = 18); sedentary rats with supplementation (CRE; n = 18); exercised rats with supplementation (CRE+NAT; n = 18). At the end of the first, fourth and eighth weeks six animals of each group were sacrificed. There were obtained the following results (p<0.05): superior average of anterior tibial muscle absolute mass in CRE and CRE+NAT; superior average of absolute and relative soleus muscle mass in the CRE+NAT in relation to other groups after four and eight experimental weeks. These findings suggest that the creatine supplementation causes positive ponderal adaptations in skeletal muscle tissue independly of physical exercise realization.

Key words: Creatine supplementation; Rats; Skeletal muscle.

Introdução

O aumento das reservas intramusculares de creatina (Cr) pode resultar em um desempenho muscular melhorado nos seres humanos¹, durante a prática de determinados tipos de exercício. A creatina tem o potencial de aumentar a hidratação celular e fatores de transcrição miogênica, facilitando a super-regulação de genes musculares específicos, tais como da cabeça pesada da miosina, e possivelmente conduzindo à hipertrofia muscular².

Os efeitos benéficos da suplementação de Cr, associada aos exercícios resistidos sobre os ganhos em força e massa muscular em humanos²⁻⁴ e em modelos experimentais⁵, são relativamente bem documentados. Entretanto, ainda são pouco conhecidos os efeitos crônicos desse tipo de suplementação sobre as adaptações em fibras musculares de características metabólicas aeróbias (fibras tipo I), e de sua associação com atividade física que apresente essas mesmas características, principalmente em modelos experimentais⁶.

Esse aspecto poderia ser mais bem elucidado se a atividade osmótica da Cr e o ganho de peso associado à sua suplementação⁷ fossem considerados por meio da análise da massa de músculos com predomínio de fibras funcionalmente diferentes. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a adaptação ponderal de músculos funcionalmente distintos (tibial anterior e sóleo) de ratos sedentários e exercitados aerobiamente, submetidos à suplementação aguda e crônica de Cr.

Materiais e Métodos

Modelo Experimental

Foram utilizados 72 ratos (250 ± 10 g) machos Wistar (*Rattus Norvegicus*), adultos jovens (10-12 semanas de idade), obtidos da fazenda Bem-te-vi (Paulínia/SP). Os animais foram mantidos, individualmente, em caixas de polietileno, no biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do

Paraíba, com temperatura (22-25°C), umidade relativa (40-60%) e fotoperíodo (ciclo de 12 horas claro-escuro) controlados. Além disso, todos os animais tiveram acesso à ração peletizada e água *ad libitum*. O estudo teve duração de oito semanas, sendo os animais divididos igualmente em 4 grupos experimentais: ratos sedentários não suplementados (CON; n = 18); ratos exercitados não suplementados (NAT; n = 18); ratos sedentários e suplementados (CRE; n = 18); ratos exercitados e suplementados (CRE+NAT; n = 18). Todos os procedimentos adotados neste estudo estavam de acordo com os princípios de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Univap (Protocolo nº L022-2005-CEP).

Atividade Física

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação à natação (30 minutos diários sem carga, durante cinco dias consecutivos) para reduzir fatores ligados ao estresse promovido pela atividade do nado⁸. Durante esse período, a creatina não foi administrada. Após a adaptação, os animais foram individualmente submetidos ao teste de carga máxima (TCM)^{9,10}. Foram colocadas células de carga, correspondendo a 0%, 1%, 2%, 3% etc. da massa corporal total do animal, até sua exaustão, atingindo a carga máxima tolerada. A exaustão foi determinada pela incapacidade de o animal manter-se abaixo da superfície da água por aproximadamente oito segundos^{9,10}. Esse teste permitiu o ajuste da carga de trabalho para o treinamento físico a 80% da carga máxima.

Esse treinamento foi realizado em grupos de seis animais em decorrência da promoção de exercício mais vigoroso quando comparado ao nado individual⁸. Ocorreu cinco vezes por semana, com sessões diárias de treinamento de 30 minutos, somente nos grupos experimentais NAT e CRE+NAT. Foram utilizados coletes, que continham pesos de chumbo, e posicionados

junto ao tórax de cada animal, de modo confortável⁸⁻¹⁰. Ao final de cada semana experimental, novo TCM foi realizado para possíveis reajustes da carga de treinamento. O protocolo de natação foi feito em um tanque de amianto com capacidade para 250 litros de água, mantidos à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ¹⁰.

Suplementação de Creatina

A suplementação foi realizada por meio de uma sonda oroesofágica (1mm de diâmetro; 3cm de comprimento) adaptada a uma seringa de 3 ml, tendo a água como veículo de infusão. Esse procedimento ocorreu diariamente após o período de adaptação ao nado, duas horas antes do treinamento físico. Foi instituída durante a primeira semana do experimento (*loading phase*) a dose de 5g de Cr/kg de massa corporal do animal e, após a primeira semana (fase de manutenção), a dose de 1g de Cr/kg de massa corporal do animal para todos os animais suplementados (CRE e CRE+NAT)^{11,12}. Para facilitar a absorção do suplemento e minimizar qualquer risco de contaminação do produto, foi utilizada creatina micronizada com grau padrão cromatográfico.

Sacrifício dos Animais

Cada um dos quatro grupos experimentais (CON, NAT, CRE e CRE+NAT) foi constituído inicialmente de 18 animais; no entanto, o modelo experimental exigiu a subdivisão dos grupos experimentais em 3 subgrupos (cada um com 6 animais), e de acordo com o período do estudo analisado (após 1, 4 e 8 semanas). Depois do período de estudo, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. O sacrifício foi realizado após dois dias da última sessão de treinamento, para atenuar os efeitos agudos do exercício¹³. Adotou-se como anestésico o etoxietano, pois promove ação depressora no Sistema Nervoso Central sem provocar qualquer disfunção tecidual. Os animais foram sacrificados por meio de administração de Cloreto de Potássio (KCl) 20% intracardíaco, ainda sob efeito anestésico, e após

a realização dos procedimentos experimentais listados a seguir.

Coleta Tecidual e Análise Ponderal

Ainda sob efeito anestésico, os músculos tibial anterior e sóleo foram removidos cirurgicamente da pata direita de cada animal, limpos em salina 0,9% e secos em temperatura ambiente. Logo em seguida, foram colocados individualmente em balança digital de alta precisão (Bel[®]) para aferição de suas respectivas massas. Foi observada a massa muscular (Massa Absoluta, expressa em gramas) e sua relação com a massa corporal do respectivo animal (Massa Relativa, expressa em porcentagem).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Foi utilizada análise de variância (ANOVA one way) entre os grupos experimentais nos diferentes períodos experimentais. O teste *post hoc* de Tukey, para comparações múltiplas, foi empregado para a identificação das diferenças específicas nas variáveis em que os valores de F encontrados foram superiores ao critério de significância estatística estabelecido ($p < 0,05$).

Resultados

Na Tabela 1, estão representadas as médias da massa corporal total (g). Ao analisarmos tal massa, observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) dessa variável nos grupos suplementados (CRE e CRE+NAT) *versus* os grupos não suplementados do mesmo período experimental (CON e NAT) durante todo o estudo. Na Tabela 2, estão apresentados os valores médios da massa absoluta (g) e relativa (%) dos músculos tibial anterior e sóleo, ao final da primeira, quarta e oitava semanas experimentais. Foram observados valores superiores de massa absoluta do músculo tibial anterior ($p < 0,05$) nos grupos suplementados em relação aos não suple-

mentados, ao final de todos os períodos experimentais. Por meio da análise da massa do músculo sóleo, observamos que diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais foram encontradas somente quando comparamos o valor médio dessa variável nos grupos (CRE+NAT-4 e CRE+NAT-8) *versus* os demais, no mesmo período experimental (CON-4, NAT-4, CRE-4 e CON-8, NAT-8, CRE-8, respectivamente). Essa última diferença foi observada tanto pela análise da massa absoluta quanto pela relativa.

Discussão

Nossos principais resultados sugerem que a suplementação de Cr, independentemente da

associação com o treinamento físico, promoveu aumento da massa corporal total e de músculos com características predominantemente anaeróbias (tibial anterior). Além disso, a suplementação de Cr influenciou a massa de músculos com características predominantemente aeróbias (sóleo), somente quando foi associada ao treinamento regular aeróbio.

Inúmeros estudos descrevem os possíveis efeitos ergogênicos de sua suplementação durante exercícios de curta duração e alta intensidade¹⁴⁻¹⁶, em decorrência da relação direta da Cr com reações celulares de características anaeróbicas. McBride e Gregory⁵ observaram, durante quatro semanas, os efeitos de um protocolo de exercício excêntrico em 30 ratos, 15 com suplementação de creatina (divididos em dois grupos: treinado e controle) e

Tabela 1: Massa corporal em gramas (g)

Grupos Experimentais	Antes da Adaptação! (n = 18)	Após a Adaptação! (n = 18)	Após 1 semana (Loading Phase) (n = 6)	Após 4 Semanas (n = 6)	Após 8 Semanas (n = 6)
CON (n = 18)	252 ± 11	261 ± 13	271 ± 08	325 ± 13	404 ± 09
NAT (n = 18)	250 ± 10	260 ± 11	273 ± 12	335 ± 11	411 ± 12
CRE (n = 18)	251 ± 12	259 ± 12	301 ± 15 *	359 ± 10 *	437 ± 14 *
CRE+NAT (n = 18)	249 ± 11	260 ± 09	299 ± 13 *	362 ± 15 *	443 ± 11 *

Durante o período de adaptação ao nado, a Cr não foi suplementada. CON: grupos controle, NAT: grupos natação, CRE: grupos creatina, CRE+NAT: grupos creatina natação. Valores expressos como média ± desvio padrão (DP). * Diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2: Massa absoluta e relativa dos músculos tibial anterior e sóleo em gramas (g)

Grupos Experimentais	Após 1 semana (Loading Phase) (n = 6)		Após 4 Semanas (n = 6)		Após 8 Semanas (n = 6)	
	Tibial Anterior (g)	Sóleo (g)	Tibial Anterior (g)	Sóleo (g)	Tibial Anterior (g)	Sóleo (g)
CON (n = 18)						
Massa Absoluta (g)	0,56 ± 0,13	0,10 ± 0,05	0,65 ± 0,07	0,13 ± 0,05	0,76 ± 0,11	0,16 ± 0,06
Massa Relativa (%)	0,21 ± 0,05	0,04 ± 0,02	0,20 ± 0,07	0,04 ± 0,02	0,19 ± 0,09	0,04 ± 0,01
NAT (n = 18)						
Massa Absoluta (g)	0,57 ± 0,08	0,10 ± 0,06	0,73 ± 0,06	0,16 ± 0,03	0,82 ± 0,10	0,20 ± 0,07
Massa Relativa (%)	0,21 ± 0,08	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,05 ± 0,01
CRE (n = 18)						
Massa Absoluta (g)	0,81 ± 0,12 *	0,11 ± 0,05	0,89 ± 0,09 *	0,14 ± 0,05	1,09 ± 0,09 *	0,21 ± 0,06
Massa Relativa (%)	0,27 ± 0,07	0,04 ± 0,02	0,25 ± 0,08	0,04 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,05 ± 0,01
CRE+NAT (n = 18)						
Massa Absoluta (g)	0,77 ± 0,10 *	0,14 ± 0,05	0,86 ± 0,08 *	0,28 ± 0,07 *	1,10 ± 0,13 *	0,39 ± 0,06 *
Massa Relativa (%)	0,26 ± 0,09	0,05 ± 0,01	0,24 ± 0,07	0,08 ± 0,01 *	0,25 ± 0,08	0,09 ± 0,02 *

CON: grupos controle, NAT: grupos natação, CRE: grupos creatina, CRE+NAT: grupos creatina natação. Valores expressos como média ± desvio-padrão (DP). * Diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

15 ratos sem suplementação (também divididos em dois grupos: treinado e controle). Assim como em nossos resultados, os autores verificaram um aumento do peso corporal em ambos os grupos suplementados com creatina, quando comparados aos seus pares não suplementados, porém sugeriram que os efeitos da associação entre a suplementação de creatina e o treinamento resistido estão intimamente relacionados à intensidade de carga e ao volume de treinamento.

Ainda são conflituosas e escassas as pesquisas acerca dos efeitos da suplementação de Cr associada ao treinamento aeróbio. Entretanto, a premissa de que os efeitos desse tipo de associação sejam dependentes da intensidade e do volume de treinamento também parece verdadeira em relação aos exercícios aeróbios. Achados de um estudo preliminar realizado em nosso laboratório corroboram esses aspectos, demonstrando a possibilidade de a Cr ser ergogênica também em atividades aeróbias¹⁷. Por meio da avaliação da carga máxima tolerada, foi observado que houve incremento significativo nesse parâmetro, a partir da primeira semana, no grupo com suplementação de Cr associada ao treinamento aeróbio. O treinamento isolado sem a suplementação de Cr promoveu aumento da carga máxima tolerada somente a partir da sexta semana experimental.

Gallo e colaboradores⁶ encontraram resultados diferentes dos nossos quando associaram a suplementação de Cr a um protocolo de corrida durante 12 semanas. Nesse estudo, 40 ratos foram divididos em 4 grupos (treinados – suplementados; treinados – não suplementados; controles – suplementados; controles – não suplementados). Os grupos treinados tiveram redução do peso corporal, mas a suplementação de Cr não apresentou efeitos sobre o peso ou ganho de massa muscular entre os grupos estudados. Entretanto, Gallo e colaboradores utilizaram protocolo de corrida voluntária na roda, cuja intensidade, conseqüentemente, não apresentava uma relação direta com a capacidade máxima individual, e muito menos os volumes totais de treinamento poderiam ser equacionados⁶. Neste estudo, a intensidade do treinamento foi estimada por meio

de um teste de carga máxima, tendo sido todos os ratos dos grupos treinados submetidos a um treinamento com 80% da carga máxima, com duração e frequência similar. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que a intensidade e o volume de treinamento podem ser fatores determinantes em relação aos efeitos da suplementação de Cr também em exercícios aeróbios.

O ganho ponderal observado nos ratos não exercitados, que foram suplementados, pode ser associado à dose de Cr utilizada e ao fator osmótico dessa substância⁷. De acordo com estudos realizados em humanos, comumente a suplementação de Cr é dividida em duas fases: suplementação inicial de doses elevadas (20 a 30g de Cr/dia) durante uma semana (*Loading Phase*), substituída, logo em seguida, pela fase de manutenção, com doses reduzidas (até 1/5 da dose inicial), durante várias semanas (1). Contudo, em face da adoção do modelo animal neste estudo, as doses de Cr foram aumentadas para a real atividade e necessidade metabólica da população estudada, de acordo com o descrito em estudos prévios^{11,12}.

Neste estudo, as respostas obtidas em relação ao ganho ponderal do músculo tibial anterior (de características anaeróbias) foram observadas a partir da primeira semana experimental e independentemente da associação com o treinamento aeróbio. Esse aumento ocorreu somente na análise da massa absoluta, que pode ser justificada pela própria retenção hídrica promovida pela suplementação, especialmente em músculos que apresentam maior população de receptores CT-1 (músculos predominantemente anaeróbios)¹⁸. O músculo sóleo (predominantemente aeróbio), de fato, não apresentou aumento de massa com a suplementação isolada, o que corrobora a descrição anterior de que músculos com características aeróbias não são capazes de captar a Cr suplementada eficazmente^{18,19}. No entanto, a massa absoluta e a relativa do músculo sóleo apresentaram aumentos após 4 semanas de treinamento no grupo suplementado. Tal fato poderia ser justificado pela progressão do treinamento aeróbio que aumentaria a expressão do receptor CT-1 (*up regulation*) no músculo funcionalmente solicitado (sóleo)²⁰.

Conclusão

De acordo com as condições experimentais adotadas neste estudo, concluímos que a suplementação de Cr, mesmo não associada ao exercício físico, promoveu alterações ponderais corporais e em músculos com características predominantemente anaeróbicas (tibial anterior), mas foi necessário associá-la ao treinamento regular de longa duração e intensidade para promover adaptações em músculos funcionalmente aeróbicos (sóleo).

Referências

- Murphy RM, Stephenson DG, Lamb GD. Effect of creatine on contractile force and sensitivity in mechanically skinned single fibers from rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(6):C1589-95.
- Candow DG, Chilibeck PD. Effect of creatine supplementation during resistance training on muscle accretion in the elderly. *J Nutr Health Aging.* 2007;11(2):185-8.
- Candow DG, Little JP, Chilibeck PD, Abeyssekara S, Zello GA, Kazachkov M et al. Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40(9):1645-52.
- Cribb PJ, Williams AD, Hayes A. A creatine-protein-carbohydrate supplement enhances responses to resistance training. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(11):1960-8.
- McBride TA, Gregory MA. Effect of creatine supplementation during high resistance training on mass, strength, and fatigue resistance in rat skeletal muscle. *J Strength Cond Res.* 2002;16(3):335-42.
- Gallo M, Gordon T, Syrotuik D, Shu Y, Tyreman N, MacLean I et al. Effects of long-term creatine feeding and running on isometric functional measures and myosin heavy chain content of rat skeletal muscles. *Pflugers Arch.* 2006;452(6):744-55.
- Volek JS, Ratamess NA, Rubin MR, Gomez AL, French DN, McGuigan MM et al. The effects of creatine supplementation on muscular performance and body composition responses to short-term resistance training overreaching. *Eur J Appl Physiol.* 2004;91:628-637.
- Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med and Biol Res.* 2002;35:1389-94.
- Osorio RA, Christofani JS, D'almeida V, Russo AK, Picarro IC. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003;135:89-95.
- Osorio RA, Silveira VL, Maldjian S, Morales A, Christofani JS, Russo AK. Swimming of pregnant rats at different water temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003;135:605-11.
- Brannon TA, Adams GR, Gonniff CL, Baldwin KM. Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29:489-95.
- Tarnopolsky MA, Bourgeois JM, Snow R, Keys S, Roy BD, Kwieceien JM et al. Histological assessment of intermediate and long-term creatine monohydrate supplementation in mice and rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:762-9.
- Nakao C, Ookawara T, Kizaki T, Oh-Ishi S, Miyazaki H, Haga S et al. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissue. *J Appl Physiol.* 2000;88:649-654.
- Bemben MG, Lamont HS. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Med.* 2005;35:107-125.
- Greenhaff PL. The nutritional biochemistry of creatine. *J Nutr Biochem.* 1997;11:610-618.
- Kreider RB. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Mol Cell Biochem.* 2003;244:89-94.
- Souza RA, Santos RM, Osório RAL, Cogo JC, Júnior ACGP, Martins RABL et al. Influência da suplementação aguda e crônica de creatina sobre as concentrações sanguíneas de glicose e lactato de ratos Wistar. *Rev Bras Med Esporte.* 2006;12:361-5.
- Brault JJ, Terjung RL. Creatine uptake and creatine transporter expression among rat skeletal muscle fiber types. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284: 1481-1489.
- Brault JJ, Abraham KA, Terjung RL. Muscle creatine uptake and creatine transporter expression in response to creatine supplementation and depletion. *J Appl Physiol.* 2003; 94: 2173-2180.
- Guerrero-Ontiveros ML, Wallimann T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 1998;184(1-2):427-37.