**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

# "ESTUDO DA CABEÇA MEDIAL DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO EM RATOS EXERCITADOS SUBMETIDOS A SUPLEMENTAÇÃO DE MONOIDRATO DE CREATINA"

CAMILA NASCIMENTO DE SOUZA

**RIO CLARO – SP**

**2004**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
**INSTITUTODE BIOCIÊNCIAS**

# "ESTUDO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO EM RATOS EXERCITADOS SUBMETIDOS A SUPLEMENTAÇÃO DE MONOIDRATO DE CREATINA"

CAMILA NASCIMENTO DE SOUZA

**ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO ANARUMA**

Dissertação apresentada ao Instituo de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade – Área de Biodinâmica da Motricidade Humana.

RIO CLARO – SP
2004

*Dedicatória*

*"Este trabalho e dedicado aos meus pais. Mesmo estando "longe", vocês foram expressão de amor profundo. Por todas aquelas vezes em que me ouviram e me deram apoio, meu agradecimento. Nos méritos desta conquista, há muito da presença de D. Carmen e Sr. Teo."*

# *Agradecimentos*

*A Deus, obrigado! Que saibamos conciliar Fé e Razão, tanto em nossos estudos como em nossa vida profissional, visando testemunhar a tua presença em nossas idéias e atitudes.*

*A Capes, pela "ajuda financeira".*

*Ao meu orientador, prof. Dr. Carlos Alberto Anaruma, "aquele abraço"!!! Professor, Amigo, Companheiro, Paizão .. " Teacher" você é responsável por aquilo que cativas.*

*Aos professores: Zé Roberto, Lilian, Barela, Gnecco, Francisco, Angelina. Obrigado por todas as vezes que me ouviram e me deram apoio. Valeu!!!*

*Ao professor Peão, "pai" da estatística.*

*Aos técnicos do Laboratório: Beto, China e Clarice.*

*Ao Depto de Biologia – UNESP/Rio Claro.*

*As secretárias do Depto de Educação Física, a Cris (Motriz) e as bibliotecárias, especialmente a Regiane e a Gi.*

*Aos meus irmãos Thomas e Maristella: exemplos de determinação.*

*A Silma, Mazzeo e Erinardo: obrigado pelo trabalho em equipe com dedicação e paciência com os "ratinhos".*

*Aos amigos "irmãos" Mariangela, Marcia e Fabrizio. Valeu todos esses anos de companhia, alegria, palavras....*

*Aos amigos companheiros, obrigada pela convivência maravilhosa nesses anos "unespianos": Carol, Raquel, Aline Nicolino, Gi, Gerusa, Liz, Bruna, Mariana, Pris, Lala, Sandra, Marcele, Bola, Tuca, Conrado, Ipatinga, Caio, Suzi, Manoel, Hulk, Pano, Muringa. Fica pra trás um tempo pra lá de bão .....*

*"Você não sente nem vê*
*mas eu não posso te dizer amigo*
*que uma nova mudança em breve vai acontecer*
*o que algum tempo era novo e jovem*
*hoje é antigo*
*e precisamos todos rejuvenescer...."*
*Belchior*

# RESUMO

O monoidrato de creatina é um dos mais populares suplementos dietéticos naturais já comercializados para uma população saudável e fisicamente ativa. Apesar de ter sido demonstrado em diversos estudos que a suplementação de creatina pode aumentar a força e a resistência muscular (BRANNON et al., 1997; GREENHAFF, 1997a; VANDENBERGHE et al., 1997a; KREIDER et al., 1998; VOLEK et al.,1999), outros estudos, em torno de seus efeitos, ainda tornam o assunto muito contraditório (NEWBY-FRASER, 1998), não sabendo-se ao certo se há e quais são os possíveis efeitos colaterais, ou se causa ou não algum tipo de hipertrofia muscular. Também não se pode afirmar conclusivamente se é capaz de aumentar o rendimento esportivo e em que tipo de exercício pode promover um maior acúmulo de creatina no músculo. Tratando-se de um recurso ergogênico controverso, que pode "melhorar" a performance em competições deve ser melhor estudado. Nos músculos, a creatina é utilizada como substrato energético e sua presença pode compensar a utilização do glicogênio e com isto retardar a fadiga. O presente estudo teve como objetivo identificar e quantificar morfologicamente alterações no tamanho das diversas fibras que compõem o músculo gastrocnêmio sob os efeitos da suplementação alimentar com monoidrato de creatina. Para tal foram utilizados 20 ratos Wistar com idade de 80 dias e divididos em quatro grupos: sedentário (S), sedentário com creatina (SC), treinado (T) e treinado com creatina (TC). Os ratos foram submetidos ao treinamento de natação de quarenta e cinco minutos por dia, cinco vezes por semana, durante seis semanas. O treinamento consistiu em resistência aeróbia de longa duração combinada com episódios de alta intensidade da seguinte forma: quatro séries de dez minutos com 10 % do peso corporal de carga sendo que no final de cada série o exercício era feito por um minuto com carga de 20 % do peso corporal. Na primeira semana foi feita a adaptação dos animais ao meio líquido. Na segunda e terceira semanas, adaptação à carga extra de seu peso corporal. A partir da quarta semana, os animais passaram a treinar por mais três semanas suportando a carga estipulada. Foi feito o acompanhamento semanalmente dos pesos dos ratos. A suplementação foi aliada ao treinamento somente na segunda semana por cinco dias consecutivos e consistiu de uma solução de monoidrato de creatina mais um carboidrato, a maltodextrina, via sonda oro gástrica. A proporção foi de 1,428 g/Kg de peso do animal de creatina para 25,71 g/Kg de peso do animal de carboidrato. Após o período de treinamento os animais foram sacrificados por decapitação para que o músculo gastrocnêmio fosse colhido, criofixado em nitrogênio líquido e cortado em criostato para proceder à análise histomorfométrica das fibras musculares. Os cortes seriados foram corados inicialmente com H/E e posteriormente utilizou-se as técnicas de NADH-TR e ATPase miosínica pré-incubada em pH 9.4, 4.6 e 4.3. As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio *Zeiss* para identificação das fibras e medição da área de secção transversa, com o auxílio de um sistema formado por uma mesa digitalizadora acoplada a um PC e *software* específico do tipo CAD. Após a realização das etapas acima, promoveu-se a análise estatística pelo modelo *two-way* do tipo fatorial nos procedimentos *General Linear Models* do *The SAS System* para a variável área e teste de *Tukey* com nível de significância $p<0.05$. O resultado das medidas das fibras do músculo gastrocnêmio foram expressas através da média e desvio padrão (em $\mu m^2$): Fibras oxidativas: **S** – 1929 ± 310, **SC** – 1745 ± 275, **T** – 2338 ± 594, **TC** – 2203 ± 522; Fibras oxidativas-glicolíticas: **S** – 2922 ± 686, **SC** – 2696 ± 479, **T** – 3367 ± 876, **TC** – 3452 ± 692; Fibras glicolíticas: **S** – 3888 ± 866, **SC** – 3496 ± 536, **T** – 5003 ± 1509, **TC** – 4505 ± 1006. Concluímos que o treinamento aliado ao uso de creatina produziu adaptação hipertrófica nas fibras que compõem a cabeça medial do músculo gastrocnêmio. As fibras que mais reagiram foram as fibras de contração rápida, ou seja, as fibras Tipo II e Tipo IIb.

Palavras-chave: músculo gastrocnêmio, monoidrato de creatina, tipos de fibras.

# ABSTRACT

The creatine monohydrate is one of the most popular natural dietary supplements already marketed for a healthy population and physically active. In spite of it being demonstrated in several studies that the creatine supplementation it can increase the force and the muscular resistance (BRANNON et al., 1997; GREENHAFF, 1997a; VANDENBERGHE et al., 1997a; KREIDER et al., 1998; VOLEK et al., 1999), other studies, around your effects, still turn the very contradictory subject (NEWBY-FRASER, 1998), not being known for sure there is been and which are the possible collateral effects, or it is caused or not some type of muscular hypertrophy. One cannot also affirm conclusivamente if it is capable to increase the sporting revenue and in that exercise type can promote a larger creatina accumulation in the muscle. Being treated of a resource controversial ergogenic, which can improve " the performance in competitions it should be studied better. In the muscles, the creatine is used as energy substratum and your presence can compensate the use of the glycogen and with this to delay the fatigue. The present study had as objective identifies and to quantify morphological alterations in the size of the several fibres that they compose the muscle gastrocnemius under to the effects of the alimentary supplementation with creatine monohydrate. For such 20 rats were used Wistar with age of 80 days and divided in four groups: sedentary (S), sedentary with creatine (SC), trained (T) and trained with creatine (TC). The rats were submitted to the training of swimming of forty five minutes a day, five times a week, for six weeks. The training consisted of resistance aerobic of long combined duration with episodes of high intensity in the following way: four series of ten minutes with 10% of the corporal weight of load and in the end of each series the exercise was made by one minute with load of 20% of the corporal weight. In the first week it was made the adaptation of the animals to the liquid middle. In second and third weeks, adaptation to the extra load of your corporal weight. Starting from the fourth week, the animals started to workout for more three weeks supporting the stipulated load. It was weekly made the accompaniment of the weights of the mice. The supplementation was only formed an alliance with the training in the second week for five consecutive days and it consisted of a solution of creatine monohydrate one more carbohydrate, the maltodextrine, through probe pray gastric. The proportion was of 1.428 g/Kg of weight of the creatine animal for 25.71 g/Kg of weight of the animal of carbohydrate. After the training period the animals were sacrificed by decapitation so that the muscle gastrocnemius was removed, treated with liquid nitrogen and then cut into cryostat before the histomorfometric analysis of the muscle fibres. The series of cuts were initially reddened with H/E and then submitted to the techniques NADH-TR and myosin ATPase in pH 9.4, 4.6 and 4.3. The sheets were photographed under a *Zeiss* photomicroscope for identification of the fibres and measurement in the transverse section, with the aid of a system formed by a table digital coupled to a PC and specific software of the type CAD. After the accomplishment of the stages above, the statistical analysis was promoted by the model Two-way do tipo fatorial nos procedimentos *General Linear Models* of the *SAS System* to variavel area and test of *Tukey* com nivel de significância $P<0.05$. The result of the measures of the fibers of the muscle gastrocnemius was expressed through the average and standard deviation (in µm2) are: Oxidative fibres: S - 1929 ± 310, SC - 1745 ± 275, T - 2338 ± 594, TC - 2203 ± 522; Oxidative-glycolitics fibres: S - 2922 ± 686, SC - 2696 ± 479, T - 3367 ± 876, TC - 3452 ± 692; Glycolitics fibres: S - 3888 ± 866, SC - 3496 ± 536, T - 5003 ± 1509, TC - 4505 ± 1006.

Key Words: muscle gastrocnemius, creatine monohydrate, fibre types.

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O uso abusivo do monoidrato de creatina como suplemento alimentar, com finalidade ergogênica e estética, tanto por atletas de elite quanto por atletas recreacionais e de academias, sem orientação especializada, tem preocupado as autoridades da área médica. Não se sabe ao certo quais os efeitos desta suplementação sobre o aparelho excretor ou sobre os músculos. Orientados por médicos e nutricionista com formação em ciências do esporte os atletas acreditam que usar o suplemento em sua complementação nutricional não representa qualquer problema, para a saúde. A "prática" do uso do suplemento monoidrato de creatina para ganhar vantagem atlética é cercada de controvérsias. No que se refere ao desempenho físico do atleta além dos limites impostos pela constituição genética e pelo treinamento físico, nenhum outro fator isolado ocupa papel mais importante que a nutrição. A contribuição da nutrição na melhora da performance tem sido dada, sobretudo, pelos estudos sobre manutenção ou aumento dos estoques de substâncias energéticas armazenadas, pela perda de peso corporal, quando necessário, pela reposição de fluídos, pela diminuição da retenção hídrica, quando necessário, pela redução ou manutenção dos depósitos de gordura, ganho ou manutenção de massa corporal magra, e até no combate à fadiga.

Nos humanos a creatina é obtida naturalmente a partir da ingestão de carne e armazenada nos músculos. O fígado também sintetiza creatina a partir de outras fontes de proteína. Então, o homem possui sua própria fábrica de creatina, mas não é capaz de produzí-la nas quantidades necessárias para o acentuado efeito ergogênico. Teoricamente, ao ingerir creatina suplementar o atleta estará melhorando os níveis de energia e auxiliando na hipertrofia muscular. Esta creatina será utilizada na ressíntese de ATP durante os eventos da contração muscular. Desta maneira acredita-se ser um auxílio ergogênico efetivo para certos tipos de desempenho em determinados tipos de exercício, assim, o Comitê Olímpico Internacional (COI) e outras organizações atléticas têm discutido a sua proibição por melhorar artificialmente a performance física.

Os resultados de pesquisas sobre os efeitos dos ergogênicos somado a um exercício físico sobre as fibras musculares são na maior parte referentes aos efeitos bioquímicos e metabólicos da fibra muscular, porém existe uma carência de informação a respeito da melhora da performance atlética relacionada com o aumento da secção transversa dos músculos o que deixa dúvidas quanto aos seus efeitos no desenvolvimento da hipertrofia muscular.

Nos Estados Unidos, o *Dietary Health and Education Act* (DHEA) define um suplemento nutricional como um produto alimentar, adicionado à dieta total, que contém pelo menos um dos seguintes ingredientes: vitamina, mineral, erva ou botânico, aminoácido, metabólito, extrato ou combinação de qualquer um desses ingredientes. O suplemento nutricional não pode ser apresentado como alimento convencional, refeição ou dieta (WILLIAMS et al. 2000).

Hoje nenhum nutriente essencial é classificado como droga, sendo

considerados legais para o uso aliado ao treinamento físico. Mas vários suplementos nutricionais existentes no mercado, como os indicados para perda de peso, podem conter efedrina, estimulantes; outros suplementos podem conter dehidroepiandrosterona ou androstenediona, precursoras naturais da testosterona, etc. Estes suplementos são vendidos livremente como alimento nos Estados Unidos, porém são proibidos pelo Comitê Olímpico Internacional (COI), devido às substâncias componentes estarem relacionadas ao doping.

O Manual Prático de Controle Antidoping de 2002 do COI relata que é necessário basear todos os esforços em dois pontos fundamentais: técnica e nutrição. Muitos suplementos nutricionais específicos são capazes de alcançar os mesmos efeitos dos esteróides anabólicos, mas que não danificam sua saúde e sua moral.

O problema é que a excreção urinária da creatinina, um metabólito da creatina, é aumentada após a sua ingestão, e a variação diária nesta mensuração entre os indivíduos é muito grande, ficando esta dosagem apenas para indicar a ingestão com poucas chances de quantificação (GREENHAFF, 1997a). Para a creatina ser detectada com precisão, só através de uma série de biópsias musculares no decorrer de vários meses (GREENHAFF, 1997a)

Enquanto muito tem sido descoberto, muito ainda se tem por fazer no sentido de trazer conclusões mais concretas sobre os exatos efeitos da suplementação com creatina aliado ao exercício, nos diferentes esportes e principalmente num dos mais importantes órgãos do corpo relacionado com a performance física, o músculo estriado esquelético.

## 1.1. HISTÓRICO DA CREATINA

Segundo Williams et al.(2000), a creatina foi descoberta em 1832 por Michel Eugene Chevreul, um cientista francês que identificou uma nova substância orgânica encontrada na carne, a qual denominou CREATINA.

Em 1847, Liebig confirmou que a creatina era regularmente encontrada em extratos de carnes de animais mamíferos. Durante esse tempo Liebig observou que as carnes de raposas selvagens mortas em caçadas continham 10 vezes mais creatina que os mesmos animais mantidos em cativeiro, concluindo assim que o trabalho muscular estava intimamente envolvido com acúmulo de creatina no tecido muscular. Alguns anos depois, em 1885, Heins e Petenkofer descobriram uma substância na urina a qual Liebig mais tarde confirmou ser creatinina. Outros autores posteriormente especularam que ela era derivada da creatina e estaria relacionada com a massa muscular total.

Em 1927, Fiske e Subbrow reportaram a descoberta, em restos de músculos de gatos, de um "fósforo lábil" que eles deram o nome de "fosfo creatina". Também mostraram que durante uma estimulação elétrica no músculo, a fosfocreatina era diminuída, sendo recuperada somente após algum período, portanto, concluíram que a creatina fosfato (forma fosforilada da creatina) estava envolvida no gasto energético do exercício.

Em 1934, descobriu-se a creatinaquinase, enzima que catalisa a fosfosrização da creatina. Em 1968, cientistas suecos, através de aplicação da técnica de biópsia por agulha para extrair amostras de músculo humano, investigaram o papel da creatina fosfato (CP) durante o exercício e sua recuperação.

Atualmente, técnicas de ressonância nuclear magnética, não-invasivas, têm sido usadas para estudar a dinâmica da creatina fosfato durante o exercício.

Desde o trabalho desses autores e mais Ludsgaard, a creatina em sua forma livre (CL) e em sua forma fosforilada (CP) têm sido reconhecidas como chave intermediária do metabolismo energético da musculatura estriada esquelética (WILLIAMS et al., 2000).

A glicina é um dos três aminoácidos usados na formação da creatina, sendo a gelatina composta de mais ou menos 25% de glicina. Assim, após 1940 supôs-se que a suplementação com gelatina apresentava um potencial ergogênico, possivelmente por aumentar os níveis musculares de creatina fosfato. Vários pesquisadores investigaram o potencial ergogênico da suplementação de gelatina ou glicina no período de 1940 a 1964. Alguns estudos iniciais e mal controlados forneceram evidências de um efeito benéfico sobre o desempenho, mas pesquisas mais contemporâneas e melhor conduzidas não revelaram efeito ergogênico significativo destas substâncias (WILLIAMS, 1985).

Pesquisas realizadas nas décadas de 70 e 80 com suplementação de creatina ou creatina fosfato forneceram algumas evidências não comprovadas de que a creatina poderia ser um auxílio ergogênico efetivo. Como exemplo, Sipila et al. (1981), investigaram o efeito da suplementação prolongada de creatina na atrofia girada do coróide e da retina do olho, uma doença autossômica recessiva. Não comprovadamente, alguns pacientes relataram uma impressão subjetiva de força aumentada durante o tratamento, e dentre eles, um velho corredor ativo bateu seu recorde na corrida de 100m. Outros relatos, também não comprovados, vindos da Inglaterra, no início da década de 90, sugerem que a suplementação de creatina pode beneficiar o desempenho esportivo. Dois campeões da Olimpíada de 1992, Linford Christie (100m rasos) e Sally Gunnell (400m rasos com barreira) relataram o uso de suplemento de creatina. Manchetes de

jornal indicaram que a creatina é um suplemento nutricional popular entre atletas olímpicos e profissionais (DUARTE, 1998; STRAUSS e MIHOCES, 1998).

Pesquisa recentemente conduzida por Costley et al. (1998) com atletas da Divisão *IA da National Collegiate Athletic Association*, demonstraram que a creatina também parece ser um suplemento dietético popular entre atletas universitários, pois entre os suplementos consumidos, a creatina é a mais utilizada. O objetivo é melhorar o desempenho atlético, principalmente durante o treinamento de resistência.

Os suplementos à base de creatina também são utilizados por outros grupos envolvidos com o treinamento de força. Schneider et al. (1998) relataram que soldados da marinha do Estados Unidos da América (EUA) usam a creatina para aumentar a massa muscular, força e potência.

Dado de uma pesquisa feita com leitores da "*Muscle Media*", revista de grande circulação para levantadores de peso e fisioculturistas, indicaram que a maioria dos usuários de creatina são homens com idade entre 21 e 35 anos que freqüentam ou já concluíram a faculdade e apresentam uma renda financeira substancial (JOHNSON, 1998).

A *SKW Trostberg*, um grande fabricante de creatina, estima um consumo de 2,7 milhões de quilos por ano no mundo todo (SKW Trostberg, 1998).

Como os relatos não comprovados cientificamente, sugerem que a creatina pode fornecer um benefício ergogênico para alguns atletas, estes acreditam que, se um pouco é bom, muito é ainda melhor. Assim, atletas podem usá-la erroneamente e sofrer conseqüências adversas à saúde. Como exemplo, Derek Bell, jogador dos Houston Astros, acha que o mau uso de suplementos à base de creatina pode ter contribuído para os problemas renais que o hospitalizaram (DUARTE, 1998). Segundo

os jogadores do time dos Tampa Bay Buccaneers, da National Football League, a suplementação com creatina pode estar associada a problemas como, cãibras musculares e males associados ao calor.

Em maio de 1998 começaram a aparecer relatos sobre efeitos colaterais negativos que associou-se com o suplemento de monoidrato de creatina. Existe a possibilidade de a ingestão de creatina poder ter contribuído na morte de três lutadores de nível universitário. Newby-Fraser (1998), triatleta amaricana ganhadora de 8 edições do mundial de *triatlon Ironman*, levantou que pelo menos alguns destes atletas podem ter usado creatina durante a preparação física. A atleta declara que usa creatina e acha benéfica para o treinamento e acredita que diante de tanta controvérsia, toda a experiência adquirida deve ser comunicada aos atletas que se utilizam desta suplementação. Ela conclui que a creatina é usada como suplemento por atletas do football, corridas curtas e levantamento de peso. Até recentemente a creatina foi ignorada por grande parte dos competidores de esportes de resistência, pois nenhuma pesquisa mostrou aumento na capacidade aeróbia ou aumento de peso. Portanto, atletas americanos e europeus de *triathlon*, segundo Newby-Fraser, estão diminuindo a ingestão de alimentos ricos em creatina, como carne vermelha.

Williams e Branch (1998), dizem que para a suplementação de creatina ser efetiva para a melhoria da performance, a creatina total e/ou a concentração de creatina intramuscular deve ser incrementada.

Desde que os estudos sobre creatina foram iniciados há cerca de cem anos atrás, até 1995 não foram encontradas nenhuma evidência de que a suplementação crônica com altas dosagens de monoidrato de creatina (CrH2O) esteja associada a algum risco para a saúde (MAUGHAN, 1995).

Maughan (1995), disse que não há razão para acreditar que doenças, principalmente o câncer de cólon, que são mais comum em populações que têm um alto consumo de carne, tenham alguma relação com a suplementação diária com monoidrato de creatina.

Sendo a creatina conhecida há mais de 150 anos, várias revisões (BALSOM et al., 1994; GREENHAF, 1995; CLARK, 1997; VOLEK, 1997; JUHN e TARNOPOLSKY, 1998a; KRAEMER e VOLEK, 1998; WILLIAMS e BRANCH, 1998) foram feitas para avaliar os efeitos da suplementação sobre o exercício, sobre o desempenho esportivo, sobre a saúde e principalmente sobre o seu efeito ergogênico.

Segundo Fleck et al. (2000), os *sprints* na bicicleta e *sprints* repetidos na bicicleta são tipos de atividades físicas que podem ter a performance melhorada através da suplementação de creatina.

Através desta revisão notamos existir uma falha comum nos estudos sobre os efeitos da suplementação com creatina sobre o exercício intenso. É que os autores não se preocupam em coletar amostras de músculo para determinar o conteúdo de creatina muscular, uma informação indispensável para revelar e quantificar estocagem no tecido muscular.

### 1.1.1. A CREATINA

A creatina é uma substância ativa fisiologicamente indispensável para a contração do músculo. É um ácido acético metilguanidina (amina nitrogenada) encontrada naturalmente nos alimentos e envolvida inteiramente no metabolismo

humano.

No corpo ela é encontrada no músculo esquelético, coração, cérebro, retina e outros tecidos. A creatina é naturalmente encontrada em vertebrados participando em reações metabólicas dentro das células, é catabolizada para creatinina principalmente na musculatura e é excretada pelos rins. Não é encontrada em plantas e microorganismos (WALKER, 1979). Balsom et al. (1994), afirmaram que quantidades residuais podem ser encontradas em algumas plantas como *cranberries* (0,02 g/kg), mas a concentração é muito maior na carne (4,5g/Kg).

As principais fontes na dieta são os peixes (bacalhau - 3g/kg; atum - 4g/kg; salmão - 4,5g/kg; arenque - 6,5-10g/kg), e carnes vermelhas (vaca - 4,5g/kg e porco - 5g/kg).

O processo de cozimento pode degradar parte da creatina encontrada nos alimentos. Conseqüentemente, a quantidade de creatina disponível a partir das fontes de dieta, cuja ingestão protéica fica entre 1 e 2g/kg do peso corporal por dia, obtêm entre 0,25 e 1 g/dia de creatina a partir de sua dieta. Para vegetarianos radicais, a ingestão diária de creatina é zero e a síntese endógena é sua única fonte (GREENHAFF, 1997a). A dieta normal de pessoas que são vegetarianos contém menos de 1 grama de creatina, mas em populações com alto consumo de carne, o conteúdo de creatina é substancialmente elevado. A síntese endógena de creatina responde por cerca de 1g/dia da necessidade diária de creatina. A ingestão de creatina pela dieta responde por cerca de metade da necessidade corporal diária.

A creatina (CR) pode ser armazenada tanto na forma livre (CL) quanto na fosforilada (CP) e tem sido reconhecida como chave intermediária do metabolismo da musculatura esquelética. A soma das quantidades de CP e CL resulta na creatina

corporal total (CT). Em humanos, cerca de 95% da creatina corporal está localizada na musculatura esquelética (concentrações mais altas nas fibras de contração rápida) com aproximadamente 30% encontrada em sua forma livre e 60 – 70%, liga- se ao fosfato, apresentando-se na forma fosforilada (HUNTER, 1928). O restante do total da creatina total, 5%, é encontrada no coração, no cérebro, testículos e músculos lisos (MUJIKA e PADILLA, 1997).

Os níveis de CL e CP na musculatura esquelética são sujeitas às variações e são influenciadas por fatores como tipos de fibras musculares, idade e doenças, mas aparentemente, não pelo treinamento. Clark et al. (1996b), indicaram que no bíceps (músculo branco) contém 31% mais CP que o sóleo (músculo vermelho).

O *turnover* (ressíntese) de creatina em um homem de 70 kg tem sido estimado por volta 2g/dia e a creatina total é de aproximadamente 120g, sendo que 95% está situada no músculo (GREENHAFF, 1997a). A taxa de turnover diário da creatina em creatinina foi estimado como sendo em torno de 1,6% do pool total de creatina (BALSOM et al., 1996). Parte desse *turnover* pode ser feito através de fontes exógenas de creatina encontrado nos alimentos como carne e peixe. O restante é derivado pelas vias endógenas, via síntese dos seus aminoácidos precursores: arginina, glicina e metionina.

A síntese endógena da creatina acontece nos rins, pâncreas e principalmente no fígado feita por três aminoácidos: glicina, arginina e metionina. A molécula de glicina é totalmente incorporada na creatina, enquanto a arginina, por sua vez, fornece apenas seu grupo amino. Já a metionina, fornece seu grupo metil (WALKER, 1979). Isto só ocorre quando a disponibilidade de creatina na dieta é insuficiente para atender às necessidades diárias.

O processo começa com a transferência do grupo amina da arginina para a glicina, por um processo chamado transaminação, formando guanidilacetato e ornitina, uma reação reversível catalisada pela enzima S-adenosilmetionina, que requer a enzima metiltransferase para a reação irreversível conhecida como transmetilação (GREENHAFF,1997a).

Walker (1979), indicou que a biossíntese de creatina é regulada de modo a não interferir nas outras necessidades metabólicas de arginina, glicina e metionina. A arginina participa do ciclo da uréia; a glicina é um precursor da via das purinas nucleotídeos (ATP, DNA e RNA). A metionina contribui com o seu grupo metil na síntese de colina e metilação do DNA e RNA.

As enzimas estão localizadas no fígado, rins e pâncreas e a creatina é produzida fora dos músculos e depois é transportada para a musculatura esquelética via corrente sanguínea. A creatina consumida por via oral é absorvida intacta da luz intestinal através de sua parede e entra na circulação sanguínea. Apesar da presença de secreções gastrintestinais altamente ácidas durante o processo digestivo, isso é verdade (CLARK, 1996).

A concentração plasmática de creatina é de 50 a 100m mol/L (HARRIS et al., 1992). A creatina plasmática é entregue a vários tecidos corporais, incluindo o coração, a musculatura lisa, o cérebro e os testículos. Mas o estoque maior encontra-se no músculo esquelético. Greenhaff (1997b), afirma que dois mecanismos foram propostos para explicar a concentração bastante elevada de creatina na musculatura esquelética.

Em humanos, Green et al. (1996), relataram que a ingestão de grandes quantidades de carboidratos (95g) com creatina (5g) facilita a captação de creatina em

comparação à ingestão isolada desse nutriente. Tudo indica que a captação aumentada pode ter ocorrido em função da liberação de insulina estimulada pela ingestão de glicose.

A biossíntese nos seres humanos aumenta de acordo com o consumo de gelatina na dieta ou de arginina mais glicina. Porém, o jejum e a ingestão aumentada de creatina, particularmente a suplementação de creatina, irá abaixar o nível de amidinotransferase no fígado, suprimindo a síntese. Em jejum, os indivíduos não necessitam de creatina devido a diminuições na massa muscular, enquanto a ingestão de creatina pode suprimir a síntese pelo fato de ela simplesmente não ser necessária (WALKER, 1979).

### 1.1.2. CREATINA MUSCULAR

A creatina muscular é bem estável. O conteúdo muscular de creatina é normalmente expresso como milimoles por quilograma de peso seco (HARRIS et al., 1992) e corresponde a 30 mmol/kg no músculo úmido e aproximadamente 120-125 mmol/kg no músculo seco (ou massa magra) (CLARK, 1997).

Greenhaff (1997b), afirma que 2 mecanismos foram propostos para explicar a concentração bastante elevada de creatina na musculatura esquelética. O primeiro mecanismo proposto envolve o transporte da creatina para o músculo por um processo de entrada saturável sódio-dependente. O segundo mecanismo posiciona a captura de creatina dentro da célula.

Radda (1996), indicou que o conteúdo total de creatina das células

musculares é controlado pela captação ativa de creatina, na qual a estimulação de receptores beta-2 e a atividade do sódio-potássio adenosina trifosfatase (ATPase) apresentam um papel significativo.

Clark et al. (1996), indicaram que o transportador sódio-dependente (duas moléculas de sódio são transportadas para cada molécula de creatina), é altamente específico para a creatina.

A creatina extracelular é separada no citoplasma, onde ocorre a rápida fosforilação pela creatinaquinase (CLARK et al., 1996). Cerca de 60-70% do total de creatina muscular apresenta-se sob a forma de creatina fosfato que é incapaz de passar por membranas, mantendo assim a creatina na célula (GREENHAFF, 1997a). Contudo a creatina possivelmente consegue se ligar a componentes intracelulares, outro fator que pode facilitar sua retenção no músculo (WALKER, 1979).

A creatina é uma substância osmoticamente ativa; assim, um aumento na concentração intracelular de creatina total (CT) na forma de creatina livre (CL) e creatina fosfato (CP) podem induzir um influxo de água para dentro da célula, aumentar a água intracelular, e concomitantemente, a massa corporal (VOLEK et al., 1997a, 1997b; ZIEGENFUSS et al., 1998b). Teoricamente a suplementação de creatina pode influenciar a massa corporal e possivelmente a composição corporal, pelo aumento da água intracelular, estimulando a síntese protéica ou diminuindo a degradação protéica (VOLEK & KRAEMER, 1996; CLARK, 1997; VOLEK et al., 1997a, 1997b)

No metabolismo energético, importante para o exercício e desempenho no esporte, a creatina tem uma função básica. No músculo a creatina fosfato (CP) participa ativamente na síntese da adenosina trifosfato (ATP). Durante o exercício intenso a creatina é essencial para este processo, pelo fato de cerca de 2/3 desse

nutriente armazenado no músculo serem fosforilados pela enzima creatina quinase (CQ) para formar creatina fosfato (CP).

A creatina fosfato (CP) serve como um tampão temporário de energia durante os períodos de intensa contração muscular, quando o consumo de ATP excede sua síntese (VAN DEURSEN et al., 1993). A energia derivada da degradação da creatina fosfato (CP) permite ao *pool* de ATP ser reciclado mais de 12 vezes durante um esforço supramáximo. Sendo que tenha cerca de 3 a 4 vezes mais creatina fosfato (CP) que ATP no músculo, o CP também é limitado e precisa ser reposto para que se mantenha o exercício de intensidade muito alta.

O fosfato da creatina fosfato (CP) durante o exercício explosivo, é clivado para fornecer energia a ressíntese de ATP:

$$CP + ADP > ATP + CR$$

A regeneração do ATP é feita pela transferência do grupo fosfato de creatina fosfato (CP) para a adenosina difosfato (ADP), na reação catalisada pela enzima creatina quinase, resultando na restauração do ATP e liberação de CP.

Uma das principais causas da fadiga após o exercício intenso é atribuída ao decréscimo das concentrações de ATP. Sahlin et al. (1998), concluíram que a fadiga muscular pode ser causada pela falha do processo energético em gerar ATP numa taxa adequada. Segundo Newsholme et al. (1992), existem pelo menos cinco causas metabólicas para a fadiga: a diminuição das reservas de CP, o acúmulo de prótons no músculo (acidose), a depleção dos depósitos de glicogênio muscular, hipoglicemia e o aumento na proporção triptofano/aminoácido de cadeia ramificada.

Embora tenha sido afirmado por alguns pesquisadores que o conteúdo de ATP em algumas fibras individuais se reduzam quase a zero após um exercício

altamente intenso feito por cavalos (HUNTER, 1928), isso não é observado em humanos e o conteúdo total de ATP na musculatura esquelética em humanos raramente diminui abaixo de 25 a 30% no ponto de fadiga após o exercício intenso. Tem sido proposto que uma das principais funções do sistema dos fosfogênios é tamponar as elevações de ADP em vez de simplesmente ressintetizar ATP - um possível meio de evitar a fadiga prematura (NEWSHOLME e BEIS, 1996).

É sugerido por Walker (1979), que a CP pode ajudar a tamponar o $H^+$ e pode servir para atenuar o declínio nos níveis de pH durante o exercício intenso e atrasar a fadiga. O aumento do íons $H^+$ e diminuição dos níveis de pH durante o exercício intenso contribui para a fadiga.

Ma et al. (1996), apresentaram a hipótese de que a creatina pode funcionar como um sinal respiratório para a mitocôndria, possivelmente influenciando a cinética de $O_2$ durante o exercício. Acredita que a creatina forneça uma explicação viável para a relação entre a cinética da captação de $O_2$ e as alterações na taxa de creatina e CP. Sendo assim, o aumento do conteúdo de creatina e CP por meio da suplementação pode ter um efeito metabólico maior do que o que se acreditava originalmente. A creatina serve para: ajudar a regular o metabolismo oxidativo, tamponar a acidez, importante papel em muitas reações de creatina quinase e intimamente envolvida com a lançadeira de CP (WALKER, 1979).

A suplementação oral de creatina aumenta o desempenho do músculo esquelético durante a contração em exercícios com intensidade alternada, possivelmente pelo aumento da fosforilação aeróbia e pelo aumento do fluxo do sistema creatina fosfato (RICO-SANZ et al., 2000).

De acordo com Bemben et al. (2001), o efeito ergogênico da

suplementação oral de creatina é proveniente do aumento dos estoques de ATP-CP que permitem uma ressíntese rápida durante o trabalho muscular esquelético em exercícios de alta intensidade, além de aumentar a hidratação das células musculares, isso devido ao efeito oncótico da creatina, o que, estimula síntese protéica.

### 1.1.3. FORMAS DE CREATINA

Segundo levantamento feito nos "endereços eletrônicos" relacionados à venda de suplementos ou a informações farmacológicas, encontra-se a disposição no mercado de suplementos alimentares as seguintes formas de creatina com as seguintes indicações:

CREATINA PURA: substância que melhora os níveis de energia e auxilia na hipertrofia muscular. Indicado para atletas cujo esporte ou atividade física são de alta intensidade e curta duração, como corridas de 100m, natação 25m, levantamento de peso, e para atletas de musculação que querem otimizar sua hipertrofia. Pode ser tomada com água, suco, ou bebida energética, antes do exercício para melhorar a energia e após o exercício com uma bebida energética para auxiliar na hipertrofia muscular e repor glicogênio.

CREATINA POWER: é um suplemento composto por monoidrato de creatina e maltodextrina que, juntos na proporção adequada, assumem a propriedade de elevar os estoques de energia no organismo, proporcionando ao atleta um melhor rendimento em exercícios intensos de curta ou longa duração. Sabores de uva e frutas cítricas.

CREATINA MICRONIZADA: a micronização é um processo físico de redução da partícula da creatina à níveis muito pequenos, conferindo ao produto um aspecto de pó finíssimo. Isso determina uma melhor solubilidade à creatina micronizada, aumentando assim a sua absorção. Indicado para atletas cujo esporte ou atividade física são de alta intensidade e curta duração, como sprints de 100m, natação 25m, levantamento de peso, e para atletas de musculação que querem otimizar sua hipertrofia.

CREATINE LIQUID ENERGY: rápida absorção, 8 gramas de carboidrato, 6 gramas de monoidrato de creatina pura e glicerol para otimizar a hidratação celular.

MONOIDRATO DE CREATINA: é a forma mais comum de suplemento de creatina disponível e a principal forma utilizada na maioria das pesquisas.

CREATINA FOSFATO: é extremamente cara, o que restringe seu uso e distribuição. Podem aumentar a intensidade do treinamento, no desempenho do exercício e na saúde. Qualquer efeito da CP ingerida oralmente seria mediado pela creatina isoladamente, uma vez que enzimas fosfatases do intestino clivariam prontamente a porção fosfato da molécula, liberando creatina livre; adicionalmente, o soro possui elevada atividade fosfatase, levando à rápida quebra da CP administrada intravenosamente, resultando em creatina livre e fosfato.

CITRATO DE CREATINA: vendida como um suplemento; não têm muitos estudos publicados mostrando sua absorção, retenção muscular ou parâmetros funcionais tais

como mudanças no desempenho muscular ou na composição corporal.

Suplementos de creatina são comercializados sob diversas formas, como pó, tabletes, gel, líquido, goma de mascar e barras. Alguns produtos comerciais misturam o monoidrato de creatina com outras substâncias, como carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, aminoácidos e até mesmo extrato de ervas e produtos fitoquímicos.

### 1.1.4. SUPLEMENTAÇÃO E PROTOCOLOS

Na década de 90, Paul Greenhaff, Roger Rarris e Eric Hultman, iniciaram a pesquisa para investigar o potencial ergogênico da suplementação de creatina, usando uma técnica parecida com a supercompensação de carboidratos. Classificam a CP juntamente com os carboidratos, a gordura, as proteínas e outros compostos como componentes centrais do sistema metabólico envolvido no fornecimento de energia para o desempenho do trabalho e o exercício.

A suplementação de creatina pode modificar a utilização de substratos e possivelmente melhorar o desempenho durante exercícios prolongados (> 150 segundos), submáximos e em estado estável ou de segmentos intervalados de exercício incorporados em eventos aeróbios mais prolongados, tais como os múltiplos *sprints* de bicicleta durante um *triathlon* (ENGELHARDT et al., 1998).

A suplementação de creatina pode elevar o desempenho em tarefas de alta intensidade e duração mais prolongada que dependem essencialmente da glicólise anaeróbia para a produção de ATP e, por intermédio de mecanismos como

tamponamento da acidez e diminuição da formação de ácido láctico.

Na natação, 50m e 100m, em relação à potência anaeróbia, a suplementação de creatina é ineficaz em melhorar o tempo. Mujika et al. (1996) e Peyrebrune et al. (1998), reportaram tendências de piora no desempenho após a suplementação, uma observação possivelmente relacionada ao maior arrasto em conseqüência da massa corporal aumentada. Peyrebrune et al. (1998) e Leenders et al. (1999), reportaram tanto efeitos ergogênicos quanto efeitos negativos sobre o desempenho após a suplementação com creatina, aumento no tempo de nado, isto é diminuição do desempenho.

Sahlin et al. (1998), constatou que o conteúdo muscular de CP é cerca de 15% maior nas fibras de contração rápida em comparação às de contração lenta.

Hultman e Greenhaff (1991), indicaram que durante o exercício de alta intensidade e curta duração, 0 à 30 segundos, a utilização anaeróbia de CP e glicogênio musculares como substratos é o fator principal de fornecimento de energia para a contração muscular. A fadiga muscular nesse tipo de exercício está relacionada à incapacidade das fibras do tipo II em manterem as elevadas taxas de ressíntese de ATP exigidas, resultado da rápida depleção dos estoques de CP das fibras do tipo II e de uma taxa de glicogenólise insuficiente para compensar a queda na produção de ATP quando o estoque de CP está depletado.

Greenhaff et al. (1992), relataram uma depleção quase total da CP em fibras do tipo II durante um exercício de *sprint* máximo.

Hawley et al. (1997), perguntam se a suplementação de creatina poderia aumentar o desempenho no exercício de intensidade muito alta, como ocorre no exercício aeróbio prolongado em função da suplementação de carboidratos.

Harris et al. (1992) e Hultman et al. (1996), propuseram diversos mecanismos pelos quais a suplementação de creatina pode ser ergogênica para o desempenho no exercício de intensidade muito alta e curta duração dependente do sistema ATP-CP, podendo também beneficiar o desempenho em sessões de exercícios menos intensas e mais prolongadas e conseqüentemente ajudando a evitar a fadiga. Os mecanismos seriam: aumento nos níveis de CP disponível em repouso para servirem como um tampão imediato do uso de ATP durante o exercício; o aumento dos níveis de creatina livre (CL) em repouso para aumentar a taxa de ressíntese de CP durante e após o exercício, facilitando a transferência da energia da mitocôndria para os locais de utilização de ATP; e o tamponamento de íons hidrogênio ($H^+$) aumentado para reduzir o excesso de acidez na célula muscular, permitindo ao músculo acumular mais ácido láctico, antes de atingir um de pH muscular limitante, aumentando assim a duração do exercício de alta intensidade.

Teoricamente a suplementação de creatina poderia aumentar a concentração corporal total de creatina, possivelmente facilitando a geração intramuscular de CP e a subseqüente formação de ATP, em especial nas fibras musculares de contração rápida (WILLIAMS, 1999). Prolongaria a duração da atividade física de alta intensidade (BALSOM et al., 1994; CASEY et al., 1996).

Casey et al. (1996) e Greenhaff et al. (1994b), sugerem que a suplementação oral de creatina atenua a degradação de ATP durante a contração muscular intensa em até 30%, provavelmente pela manutenção melhorada da taxa de ressíntese de ATP a partir de ADP (adenosina difosfato)

Mujika e Padilla (1997), acreditam que um aumento na concentração muscular de CP obtido por meio da ingestão de creatina via suplementação

provavelmente deveria induzir um aumento na refosforilação de ADP durante o exercício muscular. Em conseqüência, haveria uma menor degradação de nucleotídeos de adenina ou preservação de ATP. Essa sugestão é apoiada por estudos que demonstram que o acúmulo de amônia e hipoxantina no plasma é reduzido durante o exercício máximo que se segue à ingestão de creatina (GREENHAFF, 1997b).

Clark (1996), alerta que o aparente aumento no metabolismo anaeróbio causado pela suplementação de creatina pode produzir mais lactato e, portanto, tornar o atleta mais propenso à acidose láctica.

Se uma maior quantidade de trabalho é realizada com a suplementação de creatina, a falta de diferenças significativas no lactato pode ser interpretada como uma menor dependência da glicólise anaeróbia. Mas, a suplementação de creatina pode ser um auxílio ergogênico durante exercícios anaeróbios mais longos, ainda que exista um forte componente anaeróbio em um exercício com três minutos de duração, há também um significativo componente aeróbio (BANGSBO et al., 1990).

Vários cientistas têm sugerido que a suplementação de creatina poderia beneficiar os atletas a longo prazo pela capacitação ao treino com cargas mais elevadas, pela melhoria da capacidade de repetir esforços rápidos intervalados, pela redução da fadiga associada ao treinamento e possivelmente pela aceleração da hipertrofia muscular (GREENHAFF, 1997a; VANDENBERGHE et al., 1997a; VOLEK et al., 1999).

A suplementação de creatina pode influenciar a massa e a composição corporal de várias formas no que diz respeito ao aumento da massa livre de gordura ou massa muscular. Volek et al. (1997b), perceberam que a creatina é uma substância osmoticamente ativa; assim, uma concentração intracelular aumentada de creatina pode, provavelmente, induzir um influxo de água para o interior da célula. Uma elevação do

conteúdo corporal de água aumentaria a massa corporal. Volek et al. (1997a), também indicaram que um aumento na água intracelular pode ser visto como um sinal anabólico proliferativo. Esses autores especularam que um aumento na hidratação celular induzida pela suplementação de creatina pode aumentar a síntese protéica, diminuir a proteólise e assim aumentar a massa magra; a suplementação aguda de creatina parece não influenciar alguns hormônios, tais como a testosterona e o cortisol, que podem influenciar a massa corporal.

Volek e Kraemer (1996), observaram que a creatina pode ser o sinal químico que acopla a atividade muscular aumentada ao desenvolvimento do processo de síntese protéica contrátil na hipertrofia.

Clark (1996) diz que a suplementação de creatina pode reduzir o desempenho do exercício e do esporte por aumentar a massa corporal; isso pode diminuir a eficiência metabólica em tarefas nas quais a massa corporal precisa ser movida de um ponto para outro. Por exemplo, um aumento na massa corporal poderia ser prejudicial para corredores de longa distância, uma vez que eles teriam de gastar mais energia oxidativa para mover a massa extra.

A suplementação de creatina se torna mais eficiente durante o período de treinamento, e não imediatamente antes. Segundo Williams (2001), ela não é uma substância a qual se ingere imediatamente antes da competição para se ter, imediatamente, os efeitos positivos, é algo que deve ser ingerido aliado ao treinamento físico, durante um certo período de tempo, como semanas ou meses.

A suplementação de creatina em curto prazo (cinco dias) pode contribuir para a massa corporal total aumentada, pelo menos em homens, ainda que muito desse aumento possa ser atribuído à retenção de água mais que à proteína contrátil aumentada.

Em geral, a maioria dos estudos (MAUGHAM et al., 1997; VOLEK et al., 1997a, 1997b) apóia a descoberta de que a suplementação de creatina em curto prazo (sobrecarga) aumenta a massa corporal em diversos grupos de indivíduos, incluindo sedentários, indivíduos fisicamente ativos, atletas recreacionais, atletas treinados e indivíduos treinados em força.

Earnest et al. (1997), para determinarem se a suplementação de creatina melhora na duração intermediária anaeróbia na corrida até exaustão, utilizaram 11 homens suplementados inicialmente com 20g por 4 dias e logo após, por mais 10g durante 6 dias. Afirmaram que a suplementação de creatina pode aumentar o trabalho anaeróbio por um período maior, especialmente durante tarefas repetitivas, facilitando a recuperação e promovendo uma maior base bioenergética.

Fleck et al. (2000), indicam que um regime típico de suplementação de aproximadamente, 20 gramas de creatina por dia, por cinco ou sete dias, não apresentou nenhum impacto na habilidade e no tempo de *sprints* do pedalar, em curta duração e alta intensidade, quando os *sprints* duraram entre cinco e trinta segundos. Enquanto o efeito da suplementação de creatina em protocolos, com períodos mais longos, comparados com suplementação única na habilidade do *sprints* no pedalar, em eventos de curta duração e alta intensidade, para ambos os protocolos ainda são equívocos. Embora a maioria dos estudos não seja conclusivos, são observados , aumento na habilidade de *sprint* em curta duração e alta intensidade, durante o regime de suplementação de creatina em protocolos mais longos que 28 dias de duração

Os estudos têm demonstrado que leva cerca de 4 a 5 semanas para que tais níveis musculares retornem aos valores normais após o término da suplementação de creatina de curto e longo prazo (HULTMAN et al., 1996; VANDENBERGHE et al.,

1997a).

Os protocolos de suplementação de creatina envolvem uma fase de sobrecarga e outra de manutenção. O protocolo de pesquisa mais comumente utilizado para promover a sobrecarga de creatina é a ingestão de 20-30 gramas de nutriente, normalmente monoidrato de creatina, em quatro doses iguais de 5-7 gramas dissolvidos em 250 ml de líquido, ao longo do dia (normalmente de manhã, ao meio-dia, à tarde e no início da noite) em um período de 5 a 7 dias. Quando baseada no peso corporal, a dose de creatina recomendada é 0,3 g/kg de massa corporal diariamente por um período de 5 a 6 dias; para um homem de 70 kg, essa recomendação corresponderia a 21 g/dia (HULTMAN et al., 1996). Um protocolo de sobrecarga mais prolongado, 3g/dia durante 28 dias, é tão efetivo quanto o protocolo de sobrecarga a curto prazo.

Após a fase de sobrecarga de creatina, a dose de manutenção recomendada é consideravelmente menor, aproximadamente 2 a 5 g de creatina por dia ou 0,03 g/kg de massa corporal por dia (HULTMAN et al., 1996).

Normalmente, quando se está fazendo uma sobrecarga de suplementação, nos primeiros 5 dias, pode-se ingerir 20 gramas de monoidrato de creatina, divididas em 4 doses ao dia. Quando se mantém o nível normal de manutenção deve-se ingerir 3 a 5g/dia. Isto pode ajudar a aumentar a intensidade do treinamento, pois a creatina estará mais disponível para os "*sprints*". A carga com 20 g por 5 dias versus 3 g por dia durante 28 dias mostrou ter o mesmo efeito sobre os estoques de creatina muscular.

Os atletas provavelmente não precisam repetir o ciclo (carga e manutenção). Eles chegam a um nível de armazenamento e o mantém, existindo um limite de quanto o músculo pode armazenar, sendo que este limite não poderá mudar. Portanto o excesso é expelido pelos rins. É provavelmente diferente do que ocorre com

o CHO (carboidrato). Se ingerir todo o carboidrato que o corpo pode carregar nos músculos como glicogênio, uma vez que a reserva esteja completa, o corpo pode utilizar este excedente em outra oportunidade, pois ficará depositado na forma de gordura. Com a creatina, uma vez que o músculo está carregado, a creatina não pode ir para mais nenhum lugar, portanto o corpo a excreta na urina. O indivíduo pode checar se conseguiu alcançar sua capacidade de acúmulo, provavelmente por meio da análise urinária, ou ainda através de uma biópsia de músculo ou ressonância magnética. Outra forma seria checar o ganho de peso durante a fase de sobrecarga (acúmulo). O peso deve aumentar de 1/2 a 2 kg em uma semana. Para algumas pessoas que não respondem ao tratamento, a ingestão concomitante de carboidrato pode ser melhor. Provavelmente a avaliação do peso é a maneira mais fácil de checar se o indivíduo está "carregado" ou não (WILLIAMS, 2001).

A suplementação de creatina é mais efetiva associada com um carboidrato, pois este provavelmente garantirá uma chance maior de se fazer uma carga adequada. Para Williams (2001), a recomendação é de 90 g de carboidrato para cada 5 g de creatina.

Segundo Williams (2001), alguns estudos sugerem que o carboidrato vai aumentar a insulinemia, a qual contribui para captação dos aminoácidos pelos músculos, portanto, parece que a combinação de CHO + PRO (carboidrato mais proteína) é tão boa, se não melhor, do que a ingestão de proteína somente. Por isso, do ponto de vista metabólico, seria aconselhável que se ingerisse uma combinação de carboidrato e proteína. Inclusive para a ressíntese de glicogênio a razão CHO:PRO deve ser de 3:1. Para o aumento da massa muscular, 50 a 100 g de carboidrato é o suficiente para estimular a resposta insulínica.

A hipertrofia muscular é resultado do aumento da síntese proteíca estimulada pelos exercícios de resistência muscular ou força. O transporte dos aminoácidos para dentro das células musculares é mediado pela liberação de insulina que induz a uma menor degradação e maior síntese proteíca no músculo (ROY et al., 2000).

Roy et al. (1997), demonstraram que 1 grama por Kg de peso corporal imediatamente e 1 hora após exercício a 85% da carga máxima leva a redução da excreção urinária de metilhistidina e uréia e maiores níveis de insulina plasmática, ocasionando aumento da síntese protéica e exercendo importante efeito anabólico após o exercício.

A importância do carboidrato se estende inclusive na suplementação de creatina. Alguns autores sugerem que a ingestão conjunta de creatina e carboidrato simples podem contribuir para o aumento da creatina no músculo. Isto, porque a ingestão de 90 a 100 g de carboidrato simples para cada 5 g de creatina, demonstrou um aumento de 17 vezes na concentração de insulina (20 min após a ingestão do carboidrato), o que leva a uma estimulação da atividade da bomba de sódio-potássio e conseqüentemente, o transporte de creatina para o interior do músculo (STEENGE et al., 1998).

Manetta J. et al. (2001, 2002), demonstraram uma capacidade maior da utilização de glicose e a preferência de um carboidrato durante o exercício de alta intensidade. O exercício de resistência resulta em um aumento na oxidação do carboidrato durante o exercício de alta intensidade em ciclistas treinados.

A suplementação de creatina é mais eficiente especialmente em exercícios de alta potência, que dependam de fosfocreatina. O exercício de força utiliza,

predominantemente, este sistema.

Se forem utilizados na forma de pó, alguns pesquisadores recomendam líquidos mornos ou quentes para uma melhor dissolução da creatina. Harris et al. (1992), usaram essa técnica e relataram que não houve formação detectável de creatinina na solução. Haughland e Chang (1975), relataram que a insulina pode estimular o transporte muscular de creatina. Os autores têm teorizado que o consumo concomitante de carboidrato simples, como a glicose, poderia ser um complemento eficaz para a suplementação de creatina.

Os primeiros estudos que investigaram sistematicamente os efeitos da suplementação com altas doses de creatina foram feitos por Harris em 1974. Foi demonstrado que a ingestão em pequenas doses de creatina monoidratada ($CrH_2O$), 1 grama ou menos, tiveram um efeito insignificante nos níveis de concentração circulante de creatina, enquanto que doses maiores, 5 gramas, resultaram em um aumento de aproximadamente 15 vezes em relação aos níveis iniciais. Repetidas administrações de 5 gramas a cada 2 horas mantiveram uma concentração plasmática em torno de 1 mmol/L por um período de 8 horas. Repetidas administrações de creatina monoidratada, 5g, quatro vezes ao dia, durante cinco dias resultaram em um grande aumento da creatina total nos músculos do quadríceps femoral. Este mesmo autor, reportou em 1992, através de experimentos com humanos, a uma dose de 5 gramas de creatina monoidratada produziu um “pico” de 795 mmol/L na concentração plasmática após uma hora, e retornou aos níveis normais entre 6 e 7 horas subseqüentes a ingestão.

Green et al. (1996), reportaram que 93 gramas de uma solução de carboidratos simples resultaram em um aumento de 60% na creatina total em humanos, concluindo que a ingestão de carboidrato aumenta a capacidade de acúmulo da creatina

pelo músculo parecendo assim, ser um processo mediado pela insulina. Concluíram que a suplementação de creatina por 5 dias aliado à um carboidrato, aumentou a concentração de CP no músculo.

Greenhaff et al. (1994a), reportaram que somente 5 dos 8 indivíduos incluídos na amostra aumentaram a concentração de creatina total seguido de suplementação. Os indivíduos tinham níveis anormais de creatina muscular antes da suplementação, ou seja, menos de 120 mmol/kg de tecido, com o mesmo perfil de indivíduos vegetarianos. Assim, concluiu que indivíduos que possuem níveis maiores que 120 mmol/kg de tecido de creatina muscular tem uma resposta menor à suplementação de creatina.

Balsom juntamente com Soderlund et al. (1994), fizeram estudos envolvendo suplementação com creatina monoidratada, 20 gr/dia durante 6 dias usando um protocolo de 5 séries de 6 segundos de pedaladas máximas em bicicleta ergométrica com 30 segundos de intervalo, seguido de 40 segundos de descanso após as séries e mais uma investida de 10 segundos. Os dois estudos reportaram uma alta concentração de CP e uma diminuição do lactato muscular.

Estudos feitos com corredores de cross-country (BALSOM et al., 1994) e atletas de endurance (GREEN et al., 1993) não observaram nenhum efeito ergogênico na suplementação com creatina monoidratada nestes atletas, ficando esclarecido que os exercícios físicos que não possuem características anaeróbias, ou seja, de curta duração e alta intensidade, não foram beneficiados com a suplementação de creatina.

Ficou bem esclarecido que a ingestão de altas doses de creatina monoidratada (20 a 30 gramas) por um período de 4 a 5 dias mostrou uma grande elevação nas quantidades de creatina livre (CL) e CP encontradas na musculatura

esquelética. Esses resultados mostraram uma capacidade de manutenção da força em exercícios de alta intensidade, especialmente quando estes eram repetidos com curtos períodos de recuperação.

Brannon et al. (1997), num estudo com 32 ratos com uma suplementação de 3.3 mg de creatina no início, por 10 dias, num período de treinamento que durou 5 semanas; o treinamento consistia de 5 séries de 2,5 minutos de corrida com velocidade de 53m/min-1 e 4,5 minutos de período de recuperação com velocidade de 13m/min-1. Foram aumentadas as velocidades gradualmente. Relatou aumento no desempenho anaeróbio e aeróbio que concorda com evidências apresentadas por Balsom et al. (1993), que a suplementação de creatina em humanos resulta em resistência à fadiga aumentada quando executado exercício intermitente de alta intensidade; e aumento da creatina intramuscular e níveis de CP que pode prover uma ajuda ergogênica para o exercício. Foi mostrado, com base nos estudos de Hultman et al. (1967), que o nível de CP deve ser um fator crítico na manutenção de produção de força durante atividade contrátil repetitiva.

Kreider et al. (1998), num estudo com 25 jogadores de *football* com uma suplementação de creatina pura monoidratada por 28 dias, 15 gramas diárias, com eletrólito de glucose e taurina, durante os treinos de resistência e agilidade de 8 horas/dia, relatou ganho em gordura, aumento no volume isotônico, aumento na performance de corrida, aumento nas adaptações fisiológicas para treinamento de resistência e agilidade. Permitiu ao atleta manter um maior volume e intensidade de treinamento, melhorando assim a qualidade do treinamento, afirmando que a suplementação de creatina pode dar benefício ergogênico.

Engelhardt et al. (1998), no estudo com 12 triatletas combinando

resistência e performance intervalada com 6 gramas de ingestão de creatina diariamente, dividida em 2 porções por 5 dias, houve efeito positivo no exercício de curta duração intervalada com exercício de resistência aeróbia. A queda de glicose no sangue durante o exercício foi reduzida após o consumo de creatina; registrou aumento da massa corporal, provavelmente da retenção de água e um possível aumento nos estoques de creatina nos músculos; a força muscular estava significantemente aumentada em 18%; a performance em corridas não foi influenciada. Essa dosagem tem efeito positivo em exercícios anaeróbios, concluíram os pesquisadores.

Preen et al. (2001), relataram que a ingestão de creatina, 20 g/dia por 5 dias aumentou a performance do exercício durante 80 minutos com episódios de alta intensidade (*sprints*). O que se deve possivelmente pelo aumento do estoque total de creatina e aumento da taxa de ressíntese de CP.

Romer et al. (2001), evidenciaram em nove jogadores de *squash* a eficácia da suplementação de creatina combinada com maltodextrina por 5 dias: melhorou a fase de alta intensidade, na performance do exercício intermitente e aumentou a concentração de CP pré-exercício particularmente nas fibras musculares Tipo II.

Moura et al. (2002), investigaram o efeito da suplementação com creatina proposta por BRANNON et al. (1997), na área seccional dos tipos de fibras musculares do músculo gastrocnêmio e sóleo de ratos wistar submetidos a 33 dias de treinamento de natação. Os autores encontraram hipertrofia nas fibras musculares tipo II, mas não nas fibras Tipo I.

## 1.2. MALTODEXTRINA

A maltodextrina é um carboidrato complexo de alto índice glicêmico. Composta de açúcares (dextroses, maltoses, trioses) obtidos da hidrólise enzimática do amido de milho, totalmente solúvel em água.

Tem absorção gradativa o que significa energia garantida durante todo o período da prática esportiva; evita a falta de glicogênio em atividades aeróbias intensas; aumenta a resistência corporal; evita o cansaço muscular (fadiga); controla o nível de glicose no sangue. Ela deve ser bebida 40 minutos antes e 40 minutos depois da prática da atividade física (CLARCK, 1998).

A elevada solubilidade da maltodextrina (cerca de 99,4 %) facilita enormemente sua mistura com qualquer tipo de sucos, leite ou qualquer outra bebida que contenha água.

## 1.3. MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

O tecido muscular esquelético é composto por células alongadas de contornos poligonais, multinucleadas e dispostas em feixes longitudinais denominados fascículos. Os fascículos contêm um número variável de fibras, estando delimitadas por um tecido conjuntivo denso denominado perimísio.

Cada fibra muscular está constituída por uma lâmina basal e pelo plasmalema que circunda uma massa citoplasmática denominada sarcoplasma. Além das organelas específicas, o sarcoplasma contém numerosas miofibrilas com diâmetro

de 1 a 2 μm. Estas se estendem, em sua maioria, de uma extremidade a outra da fibra. Em sua estrutura as miofibrilas são formadas por miofilamentos organizados de tal modo a constituir as unidades contráteis: os sarcômeros, conforme descrito em Junqueira e Carneiro (1995).

A formação dos sarcômeros ocorre na periferia em direção ao centro do miotubo em formação, e uma vez completado o processo, os núcleos migram do centro para a periferia. Paralelamente, ocorre o desenvolvimento do sistema de membranas das outras organelas, que também está envolvido no mecanismo da contração muscular (FRANZINI e ARMSTRONG, 1986).

Uma estrutura importante para manutenção da fibra muscular é a lâmina basal localizada externamente à membrana plasmática. Em posição externa a esta estrutura inserem-se numerosas fibras reticulares do endomísio. Denomina-se sarcolema ao conjunto formado pela lâmina basal e as fibras reticulares.

Entre o sarcolema e o plasmalema em depressões rasas, observa-se um espaço de 20nm onde estão localizadas as células miosatélites. Estas células indiferenciadas são pequenas, possuem um único núcleo e atuam como células regenerativas. A cromatina do núcleo da célula satélite é mais densa e mais grosseira do que a da fibra muscular.

Tem sido demonstrado que a integridade do sarcolema é indispensável à regeneração das fibras musculares a qual se processa mediante a diferenciação destas células satélites em mioblastos, os quais por sua vez se fundem formando miotubos, que, por sua vez, diferenciam-se em fibras musculares jovens e posteriormente adultas (DUBOWITZ e BROOKE, 1985).

Cada músculo é inervado por um ou mais nervos contendo fibras motoras

e sensitivas. O ponto de entrada do nervo no músculo é denominado “ponto motor”. Além disso, cada fibra nervosa inerva determinado número de fibras musculares. Denomina-se unidade motora o conjunto das fibras musculares inervadas por um neurônio motor.

O número de fibras musculares inervadas por uma única fibra nervosa motora varia desde apenas cinco, como em alguns músculos do olho que tem um controle fino, até 1000 ou mais em um músculo grande tal como o gastrocnêmio que não requer um alto grau de controle (LEHMKUHL e SMITH, 1989).

As fibras musculares pertencentes a uma unidade motora são idênticas, tanto em suas propriedades fisiológicas, como em suas reservas enzimáticas (BURKE et al. ,1971).

Assim, todas as fibras dependentes de uma mesma unidade motora possuem as mesmas características morfológicas, metabólicas e contráteis (DUBOWITZ e BROOKE, 1985).

As células musculares são capazes de responder a estímulos elétricos e se contrair. Em seu sarcoplasma são observadas miofibrilas voltadas à produção de trabalho mecânico, às custas de energia química. Esta é obtida a partir de depósitos de substâncias energéticas representadas pelo ATP, fosfocreatina, glicogênio e lipídeos (McARDLE, 1985).

### 1.3.1. TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Nos mamíferos os diferentes músculos estão constituídos por uma

população heterogênea de fibras, com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas próprias (OGATA, 1958).

Na literatura encontram-se descritos, com base em vários critérios uma grande variedade de fibras, porém na prática clínica são reconhecidas três tipos básicos de fibras musculares, com diferentes nomenclaturas.

Ogata (1958), descreveu que de acordo com sua reação para Succinato Desidrogenase (SDH), estas podem ser vermelhas, intermediárias e brancas. De acordo com Barnard et al. (1971), baseado em reações de SDH e ATPasica, diz que estas podem ser "fast twitch white", "slow twitch intermediate" e "fast twitch red". Para Peter et al. (1972), Dubowitz (1985), com base na atividade NADH e ATPase definem as fibras como: "fast twitch glycolytic (FG); "fast twitch oxidative glycolitic" (FOG); slow twitch oxidative"(SO). Ainda, segundo Dubowitz e Pearse (1960), as fibras musculares podem ser classificadas em tipo I, IIa, IIb e IIc .

Com base em critérios fisiológicos, bioquímicos e morfológicos, a literatura descreve basicamente três sub-populações de fibras estriadas esqueléticas:

**Fibras Slow Oxidative (SO) ou Tipo I**: possuem pequeno diâmetro, intenso metabolismo oxidativo e habilidade contrátil lenta, também chamadas de fibras tônicas ou vermelhas por sua alta concentração de mioglobina, são altamente resistentes à fadiga.

**Fibras Fast Glycolitic (FG) ou Tipo IIb**: possuem maior diâmetro, reduzido teor de enzimas da via oxidativa, elevado metabolismo glicolítico, intensa atividade ATPase com habilidade contrátil rápida, pouco resistentes à fadiga, também chamadas de fibras fásicas ou brancas devido à menor quantidade de mioglobina, desenvolvem maior força de contração em um curto período de tempo, conduzindo a

fibra muscular à hipertrofia;

**Fibras Fast Oxidative Glycolitic (FOG) ou Tipo IIa:** possuem diâmetro intermediário entre os tipos acima citados, metabolismo oxidativo e glicolítico, habilidade contrátil rápida, chamada também de fibras vermelhas de contração rápida, possuem alta concentração de mioglobina, média densidade de mitocôndrias, rápido tempo de contração, média capacidade de tensão e moderada atividade ATPase miofibrilar.

Além desses três tipos, tem sido descrito também um quarto tipo de fibra muscular denominado IIc . Este tipo possui características embrionárias, sendo encontrado em maior ou menor número durante o processo de regeneração muscular (FERNANDES, 1981; DUBOWITZ e BROOKE, 1985; WEINECK, 1991; GOULD, 1993).

### 1.3.2. ATIVAÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES

Os exercícios resistidos (são os mais eficientes para aumentar a capacidade contrátil e o volume do músculo esquelético) solicitam os dois tipos básicos de fibras musculares que formam os músculos esqueléticos: fibras brancas e fibras vermelhas (MALHEIRO, 2003).

As fibras vermelhas também são identificadas em outras classificações como: lentas, oxidativas ou do Tipo I.

As fibras brancas são conhecidas como rápidas, glicolíticas ou Tipo II.

Alguns grupos musculares humanos possuem predominância de fibras

brancas, enquanto que outros apresentam maior quantidade de fibras vermelhas. Alguns indivíduos possuem predomínio de um tipo sobre o outro, o que as torna mais apta para as atividades que dependem do tipo de fibra predominante.

As fibras Tipo I são solicitadas isoladamente das brancas em atividades de baixa intensidade, quando a tensão muscular durante a contração é pequena, e o metabolismo é predominante aeróbio.

A Tipo II, metabolismo anaeróbio, são ativadas nas atividades de velocidade pura.

Nas tarefas de força e potência, normalmente utilizam-se as fibras vermelhas e brancas simultaneamente. No treinamento com pesos, fibras I (cargas pequenas) e cargas maiores entre 70% e 90%, tanto fibras Tipo II quanto fibras Tipo I.

### 1.3.3. HIPERTROFIA MUSCULAR

O tamanho do músculo para um ser humano é determinado principalmente pela hereditariedade, e pelo nível de secreção de testosterona. Entretanto, com o treinamento os músculos podem ser hipertrofiados, talvez em mais trinta a sessenta por cento (GUYTON, 1989).

O crescimento muscular em resposta ao treinamento com sobrecarga chama-se hipertrofia, e se dá em cad fibra muscular. Este processo está relacionado diretamente a síntese de material celular, em particular com os filamentos protéicos que constituem os elementos contráteis. Dentro da célula as miofibrilas sofrem espessamento e aumento em número, à medida que a síntese proteíca se acelera e o

fracionamento protéico diminui proporcionalmente. Para que a exigência primária para desencadear a hipertrofia muscular é o aumento na tensão ou força que o músculo precisa gerar (MCARDLE, 1992). As alterações que ocorrem dentro das fibras musculares hipertrofiadas segundo Guyton (1989), são as seguintes:

- número maior de miofibrilas em proporção ao grau de hipertrofia;
- aumento no número e tamanho de mitocôndrias;
- aumento em até vinte e cinco a quarenta por cento nos componentes do sistema metabólico do fosfagênio, incluindo ATP e PC;
- aumento em até cem por cento no glicogênio acumulado e aumento de até setenta e cinco a cem por cento, nos triglicerídeos acumulados.

O aumento na área de secção transversa está associado ao aumento no conteúdo miofibrilar. Processo pelo qual uma miofibrila se divide longitudinalmente em duas ou mais miofibrilas irmãs. A divisão longitudinal da miofibrila aparentemente ocorre porque há uma desunião entre os filamentos de actina e miosina, onde os filamentos de actina são deslocados do disco Z para a banda A. Esse deslocamento causa um estresse mecânico que ocorre no centro de cada disco Z (rupturas do tecido conectivo transmitidas ao longo das miofibrilas) (GOLDISPINK, 1971).

Durante as contrações musculares também ocorre aumento de atividades dos processos de produção de energia, caracterizando uma sobrecarga metabólica do tipo energética. Essa sobrecarga metabólica também contribui para o aumento de volume muscular, basicamente por dois mecanismos. Um deles é o aumento de hidratação celular conseqüente ao aumento das reservas de glicogênio, uma resposta adaptativa ao consumo aumentado dessa substância, altamente hidratada.

O outro mecanismo é extracelular, e consiste no aumento de

vascularização do tecido muscular. A maior hidratação do músculo leva ao aumento da consistência do músculo, fenômeno popularmente conhecido como "tonificação", mas que na verdade não se acompanha de aumento do grau de contração do músculo em repouso.

Para que ocorra o aumento de volume dos músculos esqueléticos, não basta proporcionar os estímulos adequados. Também é necessário que o organismo esteja em balanço nitrogenado positivo, ou seja, a situação metabólica em que predominam as reações de síntese sobre as reações de degradação de tecidos.

Quando em balanço nitrogenado positivo, ou seja, a situação metabólica em que predominam as reações de síntese sobre as reações de degradação de tecidos. Quando em balanço nitrogenado positivo, o organismo consegue converter proteínas alimentares em proteínas próprias, aumentando assim a quantidade de nitrogênio do corpo. Para que ocorra o balanço energético positivo, as reações anabólicas devem predominar sobre as reações catabólicas.

### 1.3.4. HIPERPLASIA MUSCULAR

O aumento da musculatura devido ao aumento no número de células por mitose é chamado de hiperplasia, embora seja observado somente na fase embrionária do músculo esquelético e cardíaco, é comum no músculo liso, pois suas células não perderam a capacidade de divisão mitótica (MOORE, 1991 citado por FURUMURA, 1994).

Aproximadamente na quarta semana de gestação, os grupos de

mioblastos, se alinham para começar junto a formar os miotubos multinucleados que eventualmente virão maturar-se nas fibras musculares. O processo continua até o nascimento e talvez por umas poucas semanas depois. Após a instalação periférica do núcleo, os miotubos são incapazes de manter a divisão mitótica neste estágio, sendo conhecido que no nascimento, o número total de fibras já era estabelecido (MALINA, 1986).

Para explicar este fenômeno que corresponde ao surgimento de novas fibras musculares, pesquisadores relataram que algumas fibras musculares de animais treinados podem sofrer um processo de divisão longitudinal ou estas fibras se formam a partir da fusão das células satélites. Principalmente na década de setenta uma série de estudos apareceram sugerindo que o crescimento compensatório e induzido pelo, treinamento no músculo de ratos e gatos, pode ser o resultado de ambos fenômenos, aumento de tamanho das fibras existentes ou pela adição de novas fibras (MCARDLE, 1992).

O problema é extrapolar a pesquisa animal para os seres humanos, uma vez que vários animais não sofrem hipertrofia maciça, observada nos seres humanos, com treinamento de resistência. Assim a hiperplasia poderia ser um ajuste compensador importante para a sobrecarga.

Em geral, os experimentos usando tipos normais de exercício não têm demonstrado nenhuma alteração no número de fibras. No entanto, é possível que a fibra se divida, caracterizando a hiperplasia, sob condições de repetidos aumentos incrementais de exercício. Isto pode ser observado como um provável fenômeno adaptativo do que como uma alteração patológica, a divisão teria que ser completa e resultando em fibras inervadas (GOLDISPINK, 1992).

Em pesquisa realizada em fisiculturistas não conseguiram evidenciar se estes atletas possuíam uma hipertrofia significativa das fibras musculares individuais. Isso deixa em aberto a possibilidade da hiperplasia ocorrer em seres humanos com um treinamento de resistência, sugerindo diferença hereditária no número de fibras ou adaptações das fibras de maneira diferente ao treinamento de alto volume e alta intensidade (MCARDLE, 1992).

As evidências da literatura não mostram nenhuma consistência a respeito deste fenômeno, tanto em humanos, quanto em animais. Além disso, a observação do fenômeno chamado *spliting* pode promover uma interpretação errônea quanto à real divisão celular de uma fibra, originando outra nova. Este fenômeno caracteriza-se pela divisão longitudinal, porém incompleta da fibra (GOLDISPINK, 1992).

Por outro lado, também, o uso de treinamentos intensos e que poderiam provavelmente promover a hiperplasia são controversos, pois a intensidade de aplicação destes protocolos em animais são questionáveis em relação ao treinamento em humanos, podendo ficar aquém dos níveis necessários que também não se encontram pré-estabelecidos.

Então, como podemos observar, somos de certa forma, levados a acreditar que a hiperplasia talvez não ocorra no músculo humano adulto, como também em animais, e que se ocorrer, seja em graus pequenos e insignificantes perante a massa total de um músculo.

### 1.3.5. MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Segundo, Lehmkuhl e Smith (1989), o gastrocnêmio, compõe a

principal porção dos músculos da perna.

Para Rasch e Burke (1977), a cabeça medial do músculo gastrocnêmio de humanos possui 1.120.000 fibras musculares, 965 fibras nervosas grandes; tem um número calculado de unidades motoras de 579; o número de fibras por unidade motora é de 1.934, e o diâmetro médio das fibras musculares (mícron) é de 54,1 ± 2 μm.

O músculo gastrocnêmio nos humanos, assim como nos ratos, origina-se através de duas cabeças tendinosas, a medial e a lateral, acima dos côndilos femorais; estas inserções são parcialmente aderidas à cápsula da articulação do joelho. Suas origens transpõem a articulação do joelho sobre a face flexora, a cabeça medial é a maior das duas, e sua porção muscular desce mais distalmente que a da cabeça lateral. As fibras musculares das duas cabeças convergem para ter inserção sobre um espesso tendão aponeurótico, que começa no septo entre as duas cabeças e que se fundem com a aponeurose que recobre o músculo sóleo. Distalmente este tendão - aponeurose - estreita-se para formar o tendocalcâneo (tendão de Aquiles), que se insere no calcâneo. É inervado pelos ramos da porção tibial do nervo ciático. O músculo gastrocnêmio é mais importante como flexor plantar do tornozelo do que como flexor do joelho. Ao correr, nadar e saltar, a ação do gastrocnêmio é indispensável, pois suas fibras possuem a qualidade de produzir um aumento rápido de tensão.

O músculo gastrocnêmio conhecido como flexor plantar é capaz de realizar dois movimentos ao mesmo tempo, a flexão do joelho combinada com flexão plantar do tornozelo. A articulação do tornozelo (tíbio-társica) é chamada de articulação talocrural, entre o talo e o crus (*Lat.* Perna), é uma articulação troclear (monoaxial). Os movimentos da articulação superior do tornozelo são: dorsiflexão, em direção à face dorsal do pé, e a flexão plantar, em direção à face plantar. Funcionalmente, a flexão

plantar do tornozelo pode ser chamada de extensão, pois é parte de um movimento geral de extensão do quadril, joelho e tornozelo. Do ponto de vista anatômico, a dorsiflexão pode ser chamada também de extensão, pois o movimento ocorre em direção à face extensora do membro.

A diferenciação entre o gastrocnêmio e o sóleo na flexão plantar se dá pelo fato de que as duas cabeças do gastrocnêmio inserem-se acima do eixo do joelho, este músculo é mais eficiente como flexor plantar quando o joelho está em extensão. Quando o tornozelo está em flexão plantar juntamente com flexão do joelho, é mais provável que o sóleo esteja mais ativo que o gastrocnêmio.

As funções dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram investigadas em seis indivíduos normais. Os sujeitos foram testados em posição prono com os joelhos estendido e a tensão e a atividade eletromiográfica foram registradas com relação ao comprimento do músculo e ao grau de velocidade de desenvolvimento de tensão numa contração isométrica graduada voluntariamente. Observou-se que a atividade do gastrocnêmio era maior quando o tornozelo era fletido em direção plantar, quando as contrações eram máximas e quando a tensão se desenvolvia rapidamente. O sóleo estava mais ativo nas porções de dorsiflexão e quando as contrações eram mínimas (LEHMKUHL e SMITH, 1989).

## 1.4. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PRECONIZADAS PARA O ESTUDO DAS FIBRAS MUSCULARES

### 1.4.1. Coloração Histológica por Tingimento

A literatura descreve que a maioria dos corantes utilizados em Histologia comporta-se como ácido ou base e tendem a formar ligações salinas com radicais ionizáveis presentes nos tecidos. Os componentes dos tecidos que têm afinidade com corantes básicos são chamados de basófilos, sendo chamados de acidófilos os que se ligam a corantes ácidos.

A Hematoxilina é um corante básico, ligando-se a estruturas ácidas dos tecidos, corando principalmente os núcleos celulares, ricos em DNA (Ácido Desoxirribonucléico) RNA (Ácido Ribonucléico) e proteínas associadas que são fortemente basófilos.

O núcleo celular é basófilo e o citoplasma quase sempre acidófilo.

Os corantes ácidos como, por exemplo, a eosina, coram principalmente as proteínas básicas, coram citoplasma e o colágeno em vários tons de vermelho. A coloração dupla pela Hematoxilina/Eosina (HE) é a mais utilizada em Histologia.

### 1.4.2. Coloração histológica por reação Histoquímica

Métodos histoquímicos e citoquímicos são utilizados para localização de diferentes substâncias, baseados em reações químicas específicas, ou interação macromolecular. O resultado final é a produção de compostos insolúveis, corados ou elétron-densos, que possibilitam a localização de substâncias específicas nos cortes dos tecidos através de microscópios como descrito em (JUNQUEIRA E CARNEIRO,

1995).

Numa célula, a manutenção da vida depende da ocorrência de reações bioquímicas. Há uma montagem constante de novas moléculas, como por exemplo, as de glicose, que são oxidadas liberando energia; moléculas grandes podem ser desmontadas. Essas reações químicas dependem da presença de enzimas para facilitar seus processos.

As enzimas são componentes vitais dos sistemas biológicos, desenvolvem ação catalítica da maior parte das reações biológicas, são essenciais aos processos metabólicos que ocorrem no interior das células. As enzimas são moléculas protéicas de elevado PM. Aparecem livres e solúveis no citoplasma ou fluidos corporais, ou ligadas a componentes específicos. Para que uma reação enzimática ocorra é requerida presença de co-fatores, que são com freqüência íons metálicos, geralmente $Mg^{++}$ e $Mn^{++}$ (ativadores) e compostos tais como os nucleotídeos NAD e NADP, os quais são co-enzimas.

Vários fatores afetam a demonstração das enzimas. Devido a sua característica hábil, são necessários procedimentos específicos para a preservação das mesmas nos tecidos e células. As enzimas respondem de diferentes modos às influências externas. Com ausência de oxigênio, as enzimas oxidativas mitocondriais sofrem lesões rápidas, ao mesmo tempo em que as membranas das fibras são lesadas, seguindo-se a perda da atividade enzimática. Os lisossomos, que contém um elevado teor de enzimas hidrolíticas, são lesados pelos processos de congelação e descongelação dos blocos e cortes, seguindo-se a difusão das enzimas. A fixação branda minimiza a difusão destas enzimas. As enzimas mitocondriais são menos sensíveis aos efeitos da congelação e descongelação. Muitas enzimas oxidativas são desnaturadas se o tecido for

fixado antes da demonstração da enzima. Para minimizar esse efeito, os cortes devem ser fixados após o processo de incubação. As enzimas hidrolíticas são capazes de resistir à fixação branda, fato este que possibilita sua localização, embora ocorra alguma perda. No entanto, a demonstração de enzimas oxidativas é feita em cortes não fixados, enquanto que para as enzimas hidrolíticas, os cortes são usualmente fixados antes da incubação.

Em cortes mantidos à temperatura ambiente ou mais elevada, a perda da atividade enzimática é muito rápida. Para a demonstração de enzimas oxidativas, os tecidos devem ser congelados imediatamente.

A fixação para demonstração das enzimas hidrolíticas é efetuada a 4°C. Para isso deve-se resfriar o fixador antes de usá-lo. Os fixadores devem ser utilizados em pH próximo do fisiológico (7.4). Para a demonstração das enzimas o pH 7.0 costuma ser ótimo, mas há exceções como a fosfatase ácida (pH – 5) e a fosfatase alcalina (pH 9.2).

As substâncias químicas inibidoras que podem destruir as atividades enzimáticas, podem ser: Específicos: competem por sítios específicos da molécula da enzima; Não Específicos: impedem a reação pela sua ação de desnaturação da enzima; Competitivos: competem pelo sítio ativo na molécula, mesmo sítio do substrato; Não Competitivos: ligam-se a outros sítios que não os do substrato.

Os co-fatores em geral são necessários para que a reação se processe. São íons metálicos, exemplo: $Mg^{++}$ são utilizados na técnica de precipitação de Gomory para a fosfatase alcalina. Nesta ação são denominados ativadores.

As desidrogenases são enzimas que oxidam seus substratos removendo H e passando-os a um aceptor. As co-enzimas NAD e NADP quando presentes no meio de

incubação agem como aceptores.

As enzimas oxidativas têm a capacidade de oxidar os substratos. O modo como o fazem origina subgrupos, tal como as desidrogenases.

A oxidação é usualmente realizada pela remoção de um hidrogênio. Cada reação é acompanhada de uma redução. O processo é expresso com a transferência de elétrons.

Junqueira e Carneiro (1995), descreveram a demonstração histoquímica da NADH TR que é feita em cortes de tecido não fixado, em solução contendo o substrato adequado e tetrazol, composto aceitador de $H^+$ e fracamente corado. Sob a ação da enzima o substrato cede hidrogênio que é e fracamente corado. Sob a ação da enzima o substrato cede hidrogênio que é transferido para o tetrazol, reduzindo-o a um composto fortemente corado e insolúvel chamado formazam, que se precipita no local da atividade enzimática. É possível visualizar nas mitocôndrias a atividade da succinodesidrogenase, enzima muito ativa no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebbs).

Várias colorações e reações histoquímicas são utilizadas para caracterizarem os aspectos morfológicos, metabólicos, funcionais e também a identificação dos diferentes tipos de fibras musculares. Entre as reações destacam-se a NADH TR (Nicotinamida Adenina Dinucleotideo-tetrazolium Redutase) e a mATPase (ATPase miofibrilar) (DUBOWITZ e BROOKE, 1973).

Para uma atividade enzimática ser demonstrada, torna-se necessário colocar à disposição da enzima um substrato específico. Se, como conseqüência da ação catalítica da enzima ocorrer a formação de um produto colorido e insolúvel, então a demonstração no tecido foi alcançada (DAL PAI, 1995).

Peter et al. (1972), ressaltam que para a demonstração das características

metabólicas dos diferentes tipos de fibras, utiliza-se a reação NADH-TR. As fibras de metabolismo oxidativo, do tipo I, reagem fortemente para esta reação. Também consideradas oxidativas, as fibras Tipo IIa, reagem com intensidade moderada; já para as fibras Tipo IIb, a intensidade da reação é fraca, pois seu metabolismo é glicolítico.

O diâmetro da fibra muscular e seu grau de vascularização também revelam o tipo de metabolismo que possuem. Geralmente as fibras do Tipo I apresentam pequeno diâmetro e um número maior de capilares quando comparadas às fibras do Tipo IIa e IIb. Como conseqüência disso, as fibras do Tipo I recebem maior teor de oxigênio e metabólitos, e com isso uma rápida remoção dos catabólitos do metabolismo e uma elevada atividade fosforilação oxidativa. As fibras Tipo IIb apresentam área transversal maior, menor número de capilares por fibra, reduzido aporte de oxigênio e metabólitos, e seu metabolismo é glicolítico. As fibras Tipo IIa revelam características intermediárias entre as Tipo I e Tipo IIb (GUTH e SAMAH, 1970).

ATPase miofibrilar (mATPase) é uma reação histoquímica que possibilita avaliar as características contráteis das fibras musculares. Esta reação é utilizada com meio de incubação em pH 9.4, precedido de pré-incubação em meio ácido pH (4.3 – 4.6) e alcalino pH (10.4 – 10.6).

Para Dubowitz (1985), dependendo do tipo de músculo, freqüentemente, a reação m ATPase apenas evidencia as fibras Tipo I e II.

Para Brooke e Kaiser (1970a, 1970b); Peter et al. (1972); Dubowitz (1985); Betto et al. (1986), em pré-incubação ácida , as fibras Tipo I, de contração lenta, reagem fortemente; já as fibras de contração rápida Tipo IIb, reagem fortemente em de pré-incubação alcalina. As fibras do Tipo IIa geralmente possuem uma reação moderada após pré-incubação em pH alcalino, e fraca após pré-incubação em pH ácido; essas

fibras respondem de maneira variada à reação pela ATPase miofibrilar.

A distribuição dos tipos de fibras é variável não somente entre os diferentes músculos e espécies animais, como também dentro de um mesmo músculo (DAL PAI, 1997).

Weineck (1991) e Gould (1993), relatam que os seres humanos apresentam aproximadamente a mesma porcentagem de fibras de contração rápida e lenta distribuída em seus músculos. Também cita exceções, onde pode haver predominância de apenas um tipo. Atletas velocistas podem apresentar geneticamente uma porcentagem maior de fibras de contração rápida, enquanto que atletas maratonistas poderão apresentar alta concentração de fibras de contração lenta.

De acordo com Armstrong e Phelps (1984), nos mamíferos, a maioria dos músculos é formada por uma população heterogênea de fibras, distribuídas de maneira a formar um mosaico. Em geral, músculos dos membros anteriores dos mamíferos contêm uma maior porcentagem de fibras de contração lenta (Slow Oxidative SO ou fibras Tipo I), enquanto que nos músculos dos membros posteriores predominam fibras de contração rápida (Fast Glycolitic FG ou Tipo II). Segundo Armstrong et al. (1982) este fato se dá pela função locomotora e postural desses músculos anteriores e à função propulsora dos músculos posteriores.

# 2. OBJETIVO

Diante do exposto, nossos objetivos foram:

1. Avaliar a condição geral de saúde dos animais através do controle semanal do peso corporal;

2. Estudar, comparar e quantificar morfometricamente, no músculo gastrocnêmio de ratos treinados o que ocorre na área da secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares, quando submetidas a um protocolo de treinamento aeróbio de alta intensidade, como a natação com carga, aliado ao uso de um suplemento alimentar como o monoidrato de creatina.

# 3. MATERIAL E MÉTODO

## 3.1. Animais experimentais

Para este experimento foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos, provenientes do biotério da UNESP Campus de Botucatu-SP, com 80 dias de idade e massa corporal média de 350 ± 30 gramas, no início do experimento. Os mesmos foram divididos aleatoriamente em 8 gaiolas plásticas, contendo cinco animais por gaiola.

Estes animais foram alimentados com ração balanceada padrão Labina e água "ad libitum", temperatura controlada a 25 °C e mantidos em um ciclo de claro e escuro de doze em doze horas.

## 3.2. Planejamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com cada grupo contendo inicialmente cinco animais, a saber:

- Sedentário sem creatina (S);
- Sedentário com creatina (SC);
- Treinado sem creatina (T);
- Treinado com creatina (TC).

### 3.3. Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento proposto procura avaliar as fibras musculares, do ponto de vista morfológico, quando submetidas a um tipo de treinamento proposto por GODLY e YATES (1997), os quais concluíram que a suplementação de creatina (20 g/dia por 5 dias) não tem efeito na atividade de resistência aeróbia combinada com episódios de alta intensidade e curta duração em indivíduos bem treinados. Estes resultados contrastam com os de ENGELHARDT et al. (1998), que em treinamento semelhante reportaram melhoras no desempenho do exercício intervalado intenso incorporado ao exercício aeróbio. Esta controvérsia, aliada à falta de dados sobre a morfologia das fibras musculares justifica a utilização do protocolo de treinamento proposto: resistência aeróbia de longa duração combinada com episódios de alta intensidade mais a suplementação com monoidrato de creatina.

Na primeira semana, os grupos treinados foram submetidos à adaptação ao meio líquido. Na segunda e terceira semanas, ocorreu a adaptação à carga extra de seu peso corporal. A partir daí (quarta semana), os animais exercitados passaram a treinar por mais três semanas suportando carga de 10% e 20% do peso corporal em 4 séries consecutivas de 10 e 1 minuto respectivamente. A suplementação de creatina foi

administrada por 5 dias consecutivos durante a segunda semana.

Os exercícios foram realizados em tanques de 100x70x60 cm com água à temperatura de 30 ±2 ° C, por ser considerada termicamente neutra e procurando assim, evitar-se um estresse maior dos animais (MAGEL, 1969)

### 3.4.Grupos Sedentários

Os animais foram classificados como "sedentários" por não realizarem qualquer atividade física, permanecendo durante o período do experimento, confinados em suas respectivas gaiolas (5 animais por gaiola), período este correspondente ao tempo de treinamento dos animais dos grupos exercitados (seis semanas).

- Grupo sedentário sem suplementação de creatina (S): animais mantidos em gaiolas, sem nenhum tipo de atividade física.
- Grupo sedentário com suplementação de creatina (SC): animais sedentários que foram submetidos à administração do suplemento alimentar, via sonda oro-gástrica, uma vez por dia, por 5 dias.

### 3.5. Grupos Treinados

Os animais incluídos neste grupo foram submetidos ao programa específico de natação de resistência aeróbia de longa duração combinada com episódios

de alta intensidade, pelo período de seis semanas, com freqüência de cinco dias semanais.

- Grupo treinado sem suplementação de creatina (T): animais submetidos a 45 minutos de natação, 5 vezes por semana. O treinamento consistia de: 4 séries de 10 minutos com carga equivalente a 10% da massa corporal do animal sendo que no final de cada série era combinada com um minuto com carga equivalente a 20% da massa corporal do animal.
- Grupo treinado com suplementação de creatina (TC): animais submetidos a 45 minutos de natação, 5 vezes por semana. O treinamento consistia de: 4 séries de 10 minutos com carga equivalente a 10% da massa corporal do animal sendo que no final de cada série era combinada com um minuto com carga equivalente a 20% da massa corporal do animal perfazendo um total de 45 minutos de exercício efetivo. A suplementação foi administrada na segunda semana, via sonda oro-gástrica, uma vez por dia, por 5 dias.

### 3.6. Administração do suplemento alimentar

A suplementação de monoidrato de creatina tomou como base o que se preconiza a um ser humano de 70 Kg, como descrito por Green e seus colaboradores (199 a, 1996b): uma solução com 5 g de monoidrato de creatina diluído em 90 g de um carboidrato, a maltodextrina, consumidos 4 vezes por dia durante 5 dias. Guardando as devidas proporções, para nossos animais a dosagem diária foi de 0,285g/Kg de monoidrato de creatina para 5,14g/Kg de carboidrato durante 5 dias na segunda semana

de experimento. Segundo trabalhos de Altman e Dittmer (1974), estabelece a velocidade do metabolismo do rato ser 5 vezes maior que a do ser humano, multiplicamos estes valores por 5, resultando nas seguintes dosagens: 1,428 g/kg de peso do animal de creatina em 25,71 g/kg de peso do animal de maltodextrina.

A creatina e a maltodextrina foram diluídas em 2 ml de água potável e administrada em doses individuais intragástricas.

A forma de administração via oro-gástrica foi feita através de uma seringa com uma cânula plástica acoplada (sonda). Esta administração acorreu na segunda semana de treinamento, pelo menos 3 horas antes do exercício. A dose foi calculada proporcionalmente ao peso do animal.

### 3.7. Avaliação da massa corporal dos animais

Os animais foram pesados para avaliação da massa corporal durante as seis semanas de realização do protocolo experimental em balança semi-analítica. Este procedimento foi realizado sempre no primeiro dia de cada semana.

### 3.8. Carga

Para obtenção das sobrecargas de treinamento, foram utilizados pesos de chumbo equivalentes a 10% e 20% da massa corporal colocados nos animais imediatamente antes do exercício com uma cinta elástica amarradas ao tórax. Estes pesos foram aferidos e corrigidos semanalmente.

### 3.9. Coleta do músculo

Ao término do período de treinamento (6 semanas), os animais foram sacrificados por decapitação. Com um corte circular próximo à região do tendão de Aquiles, descolava-se e levantava-se toda a pele desse membro até a altura do joelho, expondo assim o grupo muscular onde se situa o músculo gastrocnêmio (fig. 1 a e b) . Este, foi retirado cuidadosamente para ter colhido uma amostra do terço médio da cabeça medial. Estas amostras foram posteriormente coladas em um suporte de cortiça com auxílio de um meio de inclusão para congelamento tipo "*Tissue Tec*", e a seguir envolvidos em talco para serem mergulhadas em Nitrogênio líquido. As amostras eram assim, criofixadas em uma posição em que o músculo proporcionasse cortes transversais de suas fibras. Após a congelação, o material foi estocado em freezer a -70$^{o}$C e posteriormente transferido para um micrótomo criostato (criótomo) onde, após uma hora de adaptação à temperatura do aparelho (-20°C), eram obtidos os cortes histológicos.

**A)** **B)**

Figura 1. Exposição e retirada do músculo gastrocnêmio.

### 3.10. Procedimentos histológicos para obtenção das lâminas

Foram obtidos no criótomo, cortes tranversais de 7 µm de espessura, corados inicialmente pela reação de H/E (hematoxilina-eosina), onde após uma análise prévia para a observação da disposição das fibras, obteve-se o restante dos cortes seriados para serem corados pela reação histoquímica NADH-tetrazolium redutase e ATPase miofibrilar pré-incubada em pH 4.3, 4.6 e 9.4.

#### 3.10.1. Princípios das reações histoquímicas

**a - Tetrazolium Redutases**

As tetrazolium redutases são uma parte importante das enzimas histoquímicas. Elas estão presentes na mitocôndria e no retículo endoplasmático, sendo firmemente ligadas (DUBOWITZ, 1985).

O NADH-tetrazolium redutase, demonstra a quantidade de NAD ou NADP-desidrogenase dependente, onde na oxidação do lactato para piruvato pela desidrogenase láctica, a reação é úmida para a redução de NAD para NADH. Em troca é oxidado pela NADH-tetrazolium redutase no tecido e úmido (acoplado) com a redução de NBT. O mais elementar das reações da enzima oxidativa é a reação NADH-tetrazolium redutase. Nesta reação o NADH é usado como substrato e um dos componentes do tetrazolium (NBT) é o aceptor de elétrons (DUBOWITZ, 1973).

O princípio desta técnica histoquímica é aplicar uma descolorização,

solúvel, sal de tetrazolium que intercepta os elétrons em alguns pontos ao longo da cadeia respiratória e é reduzido para um colorido azul intenso, formazam insolúvel, produto que é depositado no lugar da atividade enzimática.

**b - <u>Hidrolases: adenosina trifosfatase</u>**

Segundo DUBOWITZ (1985) a enzima adenosina trifosfatase catalisa a reação ATP $+H_2O \leftrightarrow$ ADP + P.A ATPpase miosínica, a qual esta presente no músculo, tem um ph ótimo de nove e é ativado pelos íons $Ca^{++}$. Essa ATPase é responsável pela degradação fisiológica do ATP e pela hidrólise das ligações fosfato de alta energia, com liberação de energia. Assim, a ATPase miosínica tem um papel importante na contração muscular.

A reação histoquímica para a ATPase depende de uma serie de reações complexas para atingir um produto final. O tecido incubado em uma solução contendo ATP e cálcio. Este é retirado em um ph 9,4. A enzima ATPase divide o fosfato terminal do ATP e por causa da presença do cálcio na solução este fosfato imediatamente combina-se para formar fosfato de cálcio. Em um ph alcalino, o fosfato de cálcio é insolúvel e é depositado no lugar da atividade enzimática. Quando o tecido é removido da solução e colocado em cloreto de cobalto, ocorre a troca do cálcio pelo cobalto, resultando em fosfato de cobalto no lugar onde anteriormente havia fosfato de cálcio. Depois o tecido é colocado em sulfeto de amônia, resultando na formação de sulfeto de cobalto insolúvel de coloração escura. Assim, o lugar original da atividade enzimática é revelado. A ATPase presente em vários tipos de fibras musculares são dependentes da influencia do ph, podendo ser usada para demonstrar os diferentes tipos de fibras em

pré-incubação nos vários valores de ph (DUBOWITZ, 1985).

Sabe-se que as fibras musculares esqueléticas de adultos possuem diversas isoformas de cadeia pesada da miosina. Através da utilização da técnica histoquímica de BROOKE & KAISER (1970), para definir os três tipos de fibras do musculo normal com base na reação ATPase, variando o ph de incubação (9.4, 4.6 e 4.3), fomos capazes de identificar as fibras I, IIa e IIb (sub-tipos da fibra tipo II). Assim, tipo I fraca em ATPase no ph 9.4 e forte em ATPase nos pHs 4.6 e 4.3; tipo IIa fraca na reação de pH 4.6 e 4.3 e forte no pH 9.4; tipo IIb forte na reação de pH 9.4 e 4.6, mais fraca no ph 4.3.

Além desta identificação realizada na década de 1970, em 1986 foi identificada por SCHIAFFINO et al. (1986), mais uma isomorfa de cadeia pesada da miosina, através da utilização de sete tipos de anticorpos monoclônicos anti-MHC (miosina de cadeia pesada), recebendo a denominação de IIx. Posteriormente, em 1988, foi chamada também de IId, por estar presente em grande quantidade no músculo diafragma do rato (BÄR & PETTE, 1988), além de ser encontrada no músculo diafragma de ratos normais e com hipertireodismo e no músculo sóleo, após este sofrer estimulação crônica de alta freqüência (SCHIAFFINO et al. 1989). Porém, o nome definitivo, se IIx ou IId.

Desta forma, a musculatura do rato adulto apresenta quatro diferentes tipos de isomorfas, ou seja, isomorfa dos tipos I, IIa, IIb e IIx/IId. Segundo SCHIAFFINO et al. (1989), a fibra IIx/ IId é histoquimicamente caracterizada por uma capacidade oxidativa intermediária entre os tipos IIa e IIb.

As isomorfas citadas aqui e chamadas de “pura” estão presentes no músculo esquelético normal, apresentando também uma pequena porcentagem de fibras

híbridas indiferenciadas (< 5%). Ou seja, fibras que apresentam mais de uma isomorfa da MHC. Portanto, fibras Ic e IIc contem MHC dos tipos Ia e IIa. Fibras do tipo IIa/IId contem MHC dos tipos IIa e IId e as híbridas IIb/ IId contem MHC dos tipos IIb e IIx. Estas fibras híbridas forma observadas em grandes quantidades quando o músculo de contração rápida foi submetido a estimulação elétrica crônica de baixa freqüência (STARON et al. 1987; PETTE & STARON, 1990), mostrando existir uma transição de um fibra para a outra.

No presente estudo não foi feito uma identificação dos diversos sub-tipos de fibras do tipo II, sendo utilizados apenas os tipos I , IIa e IIb e determinado a atividade oxidativa, oxidativo-glicolítica (intermediária) e glicólicas das fibras.

**Tabela 1.** Representação da coloração das reações de NADH-TR e ATPase

| **Tipo de fibra muscular** | I | IIa | IIb | IIx/IId |
|---|---|---|---|---|
| Rotina ATPase (pH 9.4) | × | ● | ● | ● |
| ATPase pré-incubada pH 4.6 | ● | ○ | ● | ● |
| ATPase pré-incubada pH 4.3 | ● | ○ | ○ | ○ |
| NADH - TR | ● | × | ○ | ● |

○ = +, × = ++, ● = +++

### 3.11. Análise histomorfométrica - Identificação e medida das fibras

A identificação das fibras com base na reação histoquímica para NADH-TR permite diferenciar s fibras brancas (FG), coradas fracamente, das fibras vermelhas (SO), coradas intensamente pela reação. Já as fibras mistas ou intermediárias (FOG) apresentam-se coradas de maneira intermediária quando comparada às outras fibras. Estas diferenças histoquímicas são baseadas na atividade de enzimas oxidativas, por exemplo, fibras vermelhas, resistentes à fadiga, possuem maior quantidade destas enzimas em seu protoplasma reagindo, portanto, fortemente com o substrato contido nos reagentes.

Já para a identificação com base na reação histoquímica ATPase, permitiu-se diferenciar também, os três tipos de fibras (I, IIa e IIb) através das reações nos pHs 9.4, 4.6 e 4.3., que revelam as diferentes fibras segundo a velocidade de contração das isoformas da miosina

Após a obtenção dos cortes histológicos e coloração, as lâminas obtidas foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio ZEISS com objetiva de 16X e optovar de 1,25, de maneira que se obtivesse amostras da região superficial, média e profunda do músculo gastrocnêmio. O resultado final das fotos após a ampliação em papel fotográfico permitiu um aumento final de quatrocentos vezes.

De posse das fotos, as mesmas foram fixadas a uma mesa digitalizadora acoplada a um microcomputador que possui um softwear do tipo CAD específico, onde foram digitalizadas todas as fibras inteiras e identificadas segundo suas características metabólicas, sendo medidas para a determinação da área individual das fibras do

músculo gastrocnêmio do rato, perfazendo um total de cerca de cem fibras por músculo/animal.

### 3.12. Análise dos dados

Os resultados expressos através da média e desvio padrão serão analisados e comparados estatisticamente empregando-se análise estatística modelo *Two-Way* do tipo fatorial nos procedimentos General Linear (GLM) do SAS para variável área e teste de *Tukey,* com nível de significância de $p < 0,05$.

# 4. RESULTADOS

## 4.1. Avaliação do peso corporal dos grupos

As médias do peso corporal dos animais foram acompanhadas semanalmente até o final do protocolo experimental compreendido por 6 semanas. Assim acompanhamos a evolução e o crescimento normal dos animais, bem como o estado geral da saúde dos mesmos, além de obter os dados necessários para o ajuste semanal da carga utilizada para o exercício de natação.

A Tabela 2 contém a média e desvio padrão deste parâmetro medido semanalmente, do início ao final do experimento, o mesmo ocorrendo com a Figura 2, onde na representação gráfica do comportamento do peso corporal, a seta marca o início do treinamento específico dos animais e da suplementação de creatina. (2° semana)

**Tabela 2.** Peso corporal inicial (PI), peso corporal final (PF) e ganho de peso dos animais (GP = PF-PI).

| GRUPOS | PI (g) | PF (g) | GP (g) | GP (%) |
|---|---|---|---|---|
| **S (n=5)** | 318 ± 26 | 408 ± 27 | 90 ± 1 | 22,05% |
| **SC (n=5)** | 355 ± 37 | 429 ± 42 | 74 ± 5 | 17,24% |
| **T (n=5)** | 342 ± 20 | 411 ± 34 | 69 ± 14 | 16,78% |
| **TC (n=5)** | 388 ± 12 | 447 ± 24 | 59 ± 12 | 13,19% |

Resultados são Média ± Desvio padrão

O peso corporal dos animais apresentou uma elevação natural e gradativa sem diferenças significativas no início do experimento, não diferindo também durante o período experimental, visto que não foram detectadas diferenças significativas através das análises estatísticas de variância (ANOVA) e test-t de Student no peso inicial e

final.

O ganho de peso (GP), demonstrado na Tabela 2, mostra-se equiparado entre os grupos, com valores próximos.

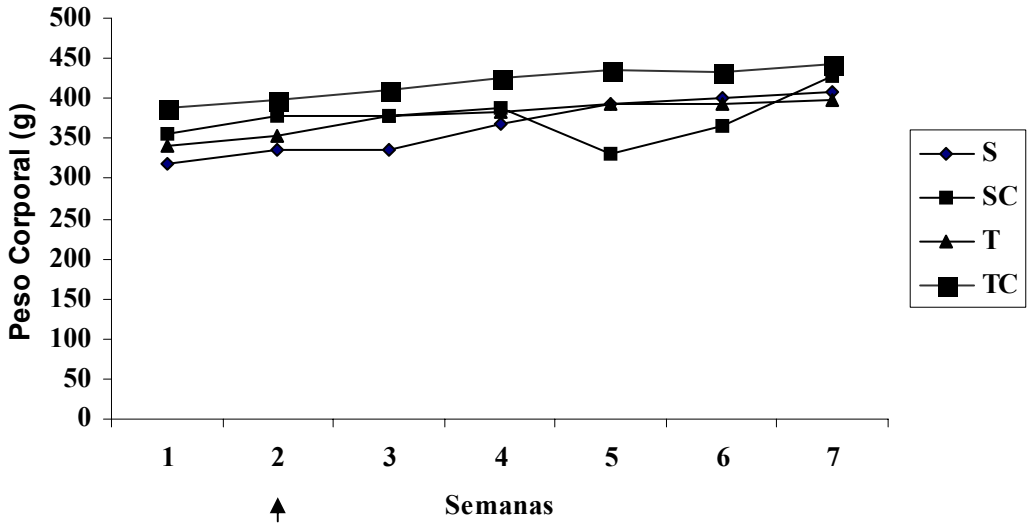


**Figura 2.** Média semanal da massa corpórea dos animais (em g).

## 4.2. Análise Qualitativa

Os resultados obtidos da observação morfológica mostraram que as fibras do músculo gastrocnêmio dos animais dos quatro grupos estudados não apresentaram alterações morfológicas significativas quando comparamos entre os grupos. Ou seja, as fibras musculares tinham aparência normal com tamanho e contornos poligonais bem definidos, sarcoplasma e rede intermiofibrilar homogêneos, quando observados nos cortes corados pela técnica H/E e NADH-TR (Fig. 3 e 4).

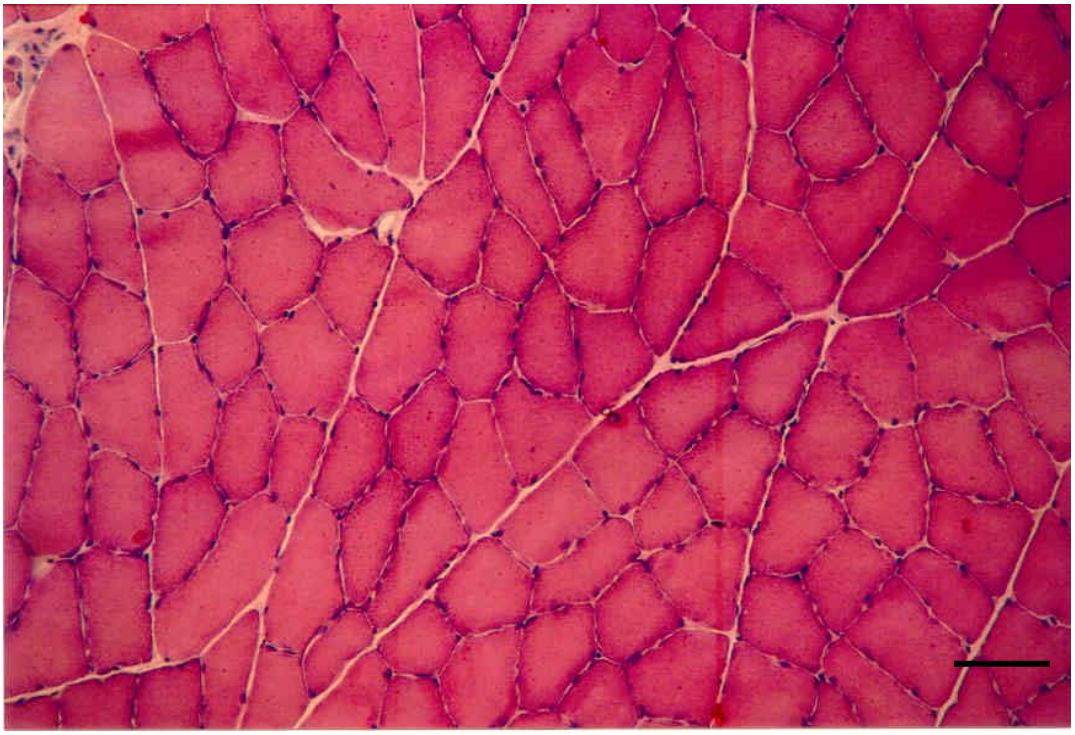

**Figura. 3**. Fotomicrografia de um corte transversal do terço médio do ventre medial do músculo gastrocnêmio de rato do grupo TC mostrando aspectos morfológicos normais das fibras musculares e do conjuntivo que envolve cada fibra e os fascículos. H/E. Barra = 50 μm

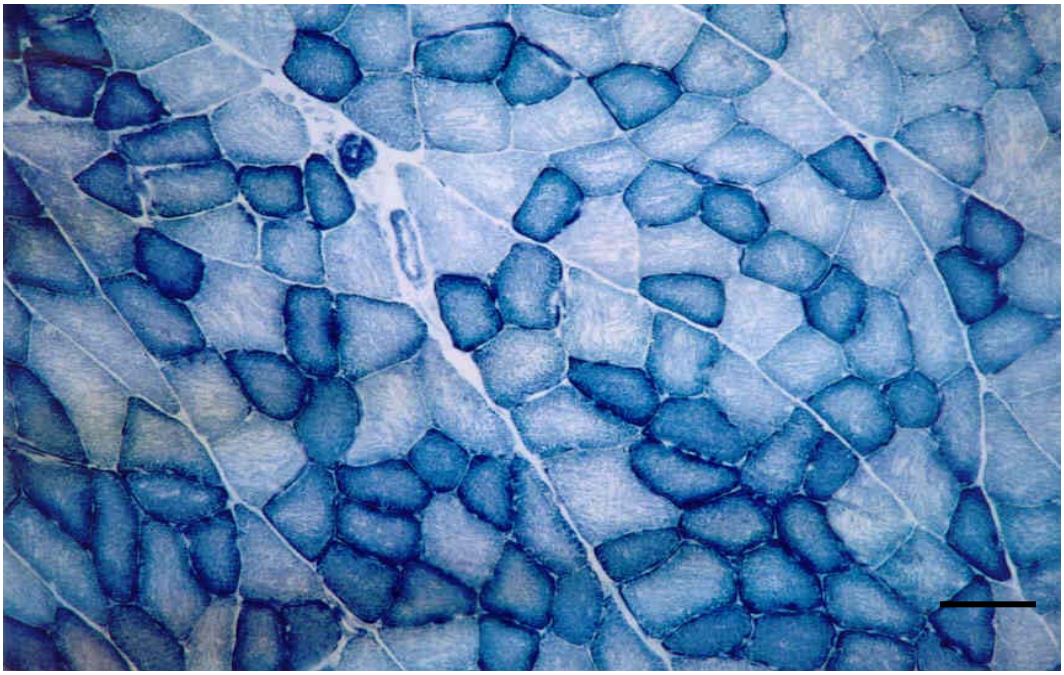

**Figura 4.** Fotomicrografia de um corte transversal do músculo gastrocnêmio de rato do grupo T onde observa-se o contorno poligonal e a distribuição homogenia das diferentes fibras que o compõe. NADH-TR. Barra = 50 μm

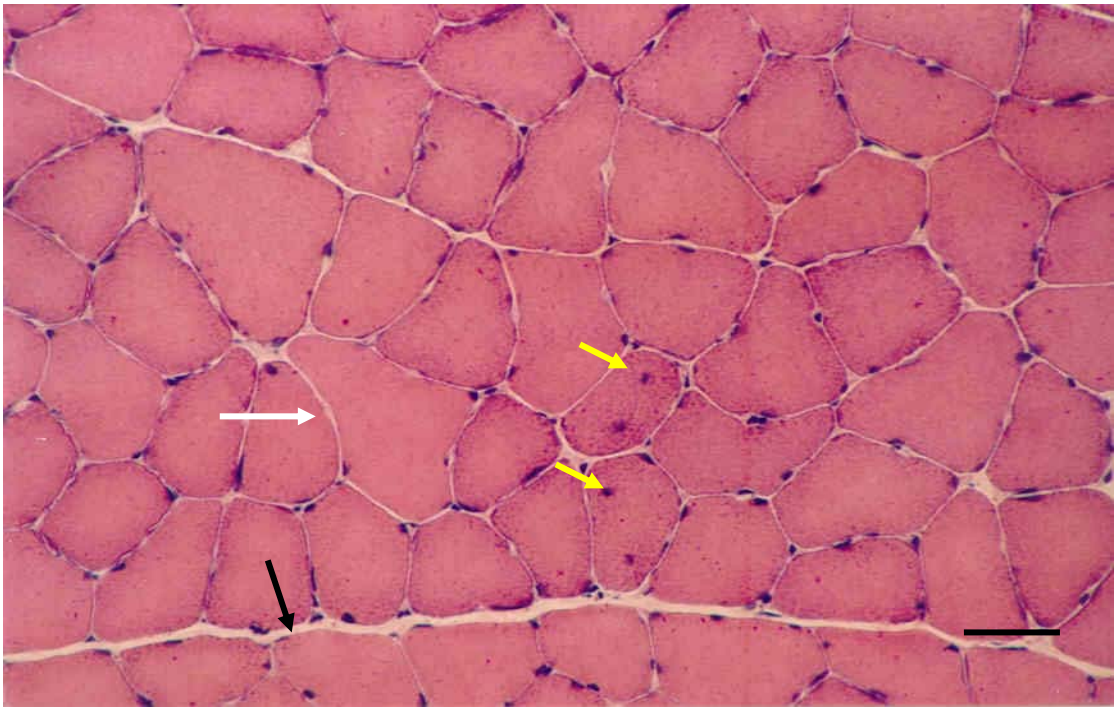

**Figura 5**. Fotomicrografia do corte transversal do músculo gastrocnêmio de rato do grupo sedentário onde observa-se aspectos morfológicos normais, tanto das fibras musculares quando do conjuntivo associado (endomísio – seta branca, perimísio – seta preta). Algumas fibras apresentam núcleo centralizado (seta amarela) H/E. Barra = 50 µm.

Nas amostras do músculo gastrocnêmio analisadas, os núcleos apresentavam-se localizados predominantemente na periferia, apresentaram-se nítidos e evidentes, apesar de poder ser observado pequeno número de fibras musculares com seus núcleos deslocados para o interior das fibras (Fig.5). Também podem ser observadas, em meio a fibras morfologicamente normais, algumas fibras onde o espaço intermiofibrilar apresentava pontos acidófilos quando notadas nas lâminas coradas por H/E (Fig. 6 e 7). Aparentemente estes mesmos achados puderam ser observados nas lâminas submetidas à reação do NADH-TR que cora histoquimicamente uma enzima localizada no interior das mitocôndrias. Esta reação pareceu em alguns pontos do interior da fibra, excessivamente oxidativa e deu um aspecto de agregação mitocondrial no interstício miofibrilar (Fig. 8 e 9).

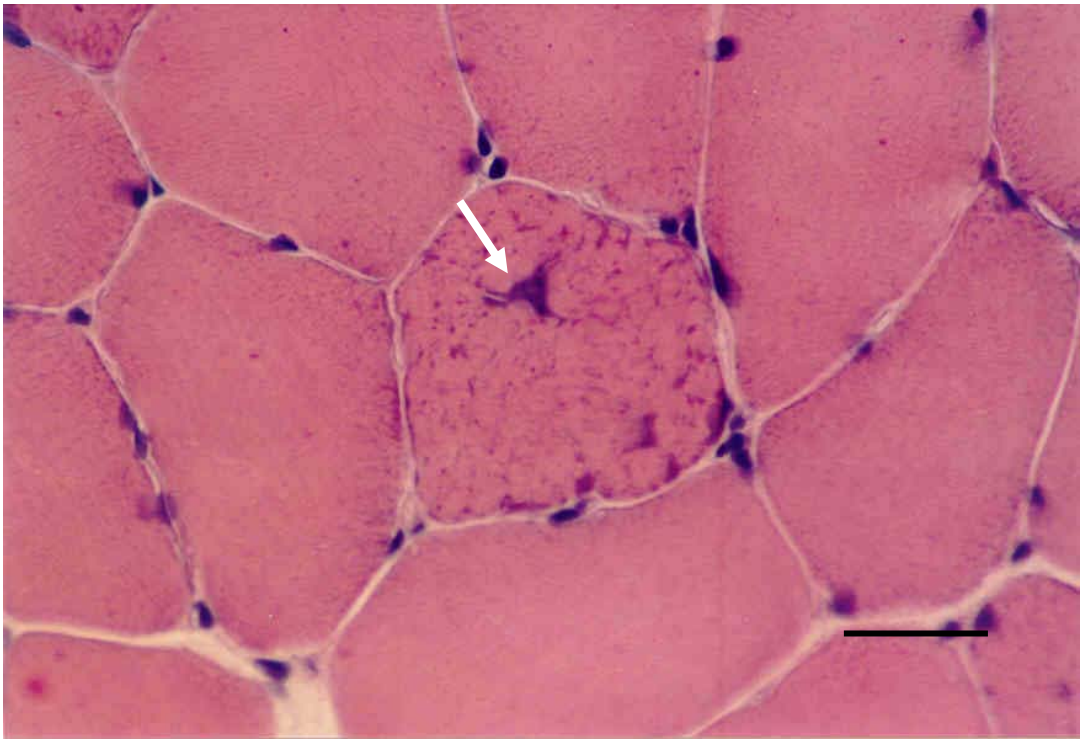

**Figura 6.** Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de rato do grupo SC onde observa-se no espaço intermiofibrilar alguns pontos acidófilos (seta branca) em algumas fibras musculares . H/E. Barra = 10 µm.

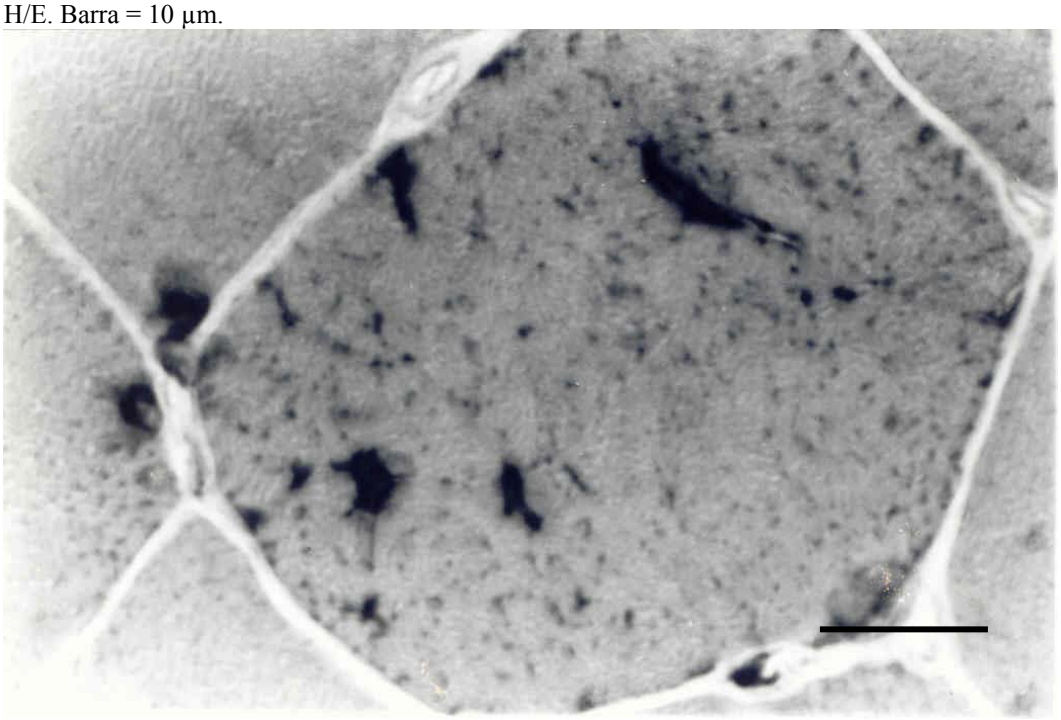

**Figura 7.** Fotomicrografia de um corte transversal de uma fibra do músculo gastrocnêmio de rato do grupo SC que mostra com mais detalhe os pontos acidófilos encontrados em algumas fibras. H/E. Barra = 5 µm.

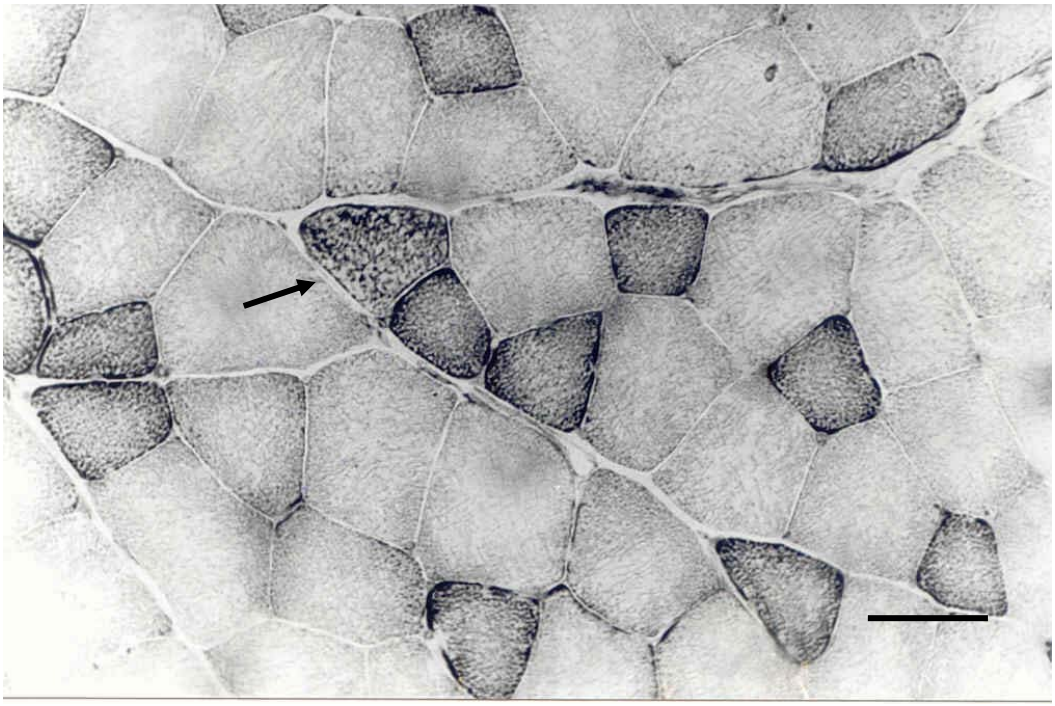

**Figura 8.** Fotomicrografia de um corte transversal de uma fibra do músculo gastrocnêmio de rato do grupo SC que mostra algumas fibras com aspecto de agregação mitocondrial (setas) em meio às fibras com aspecto morfológico normal. NADH-TR. Barra = 50 µm.

**Figura 9.** Fotomicrografia de um corte transversal do músculo gastrocnêmio de rato do grupo SC onde observam-se fibras com aspecto de agregação mitocondrial em seu sarcoplasma (seta branca). Nota-se ainda uma fibra em processo de divisão longitudinal (seta amarela). NADH-

TR. Barra = 10µm

Em alguns animais do grupo treinado pode ser observado em alguns fascículos um endomísio ligeiramente espessado sugestivo de edema intersticial do tipo transudato, ou seja, com pequena ou nenhuma celularidade (Fig. 10). Em alguns animais sedentários tratados com creatina, também pode ser observado, fibras de pequeno diâmetro entre as fibras de diâmetro normal. Estes achados sugerem a existência de hiperplasia do tipo "*spliting*", ou seja, hiperplasia a partir da divisão longitudinal de uma fibra vizinha (Fig. 9 e 11).

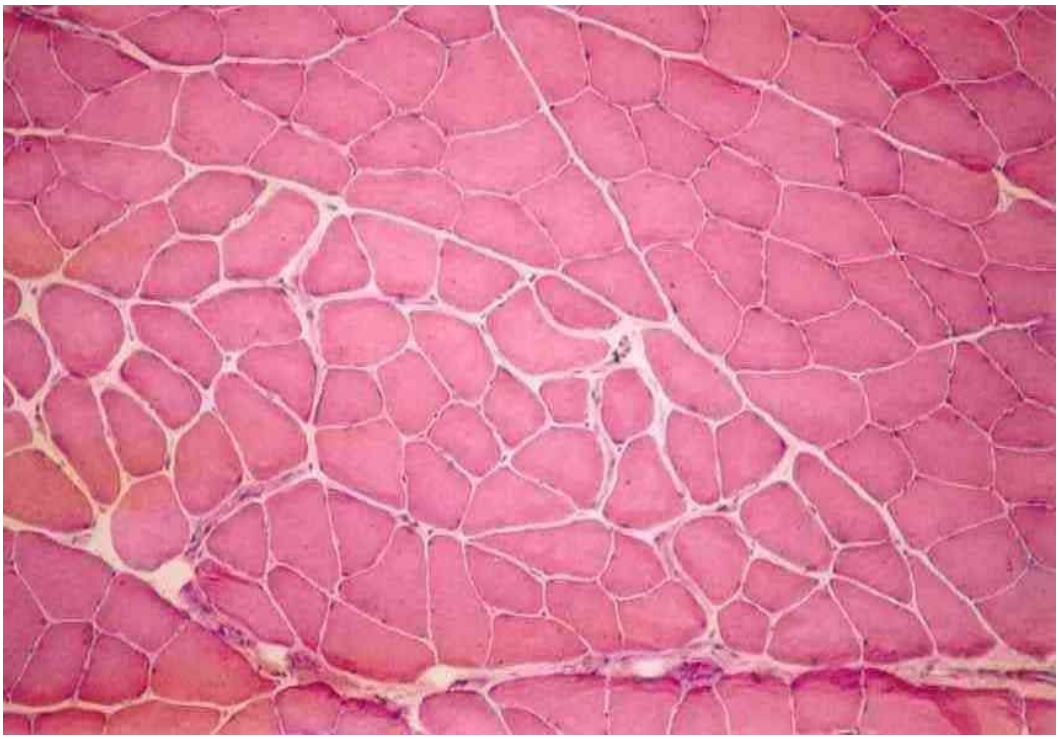

**Figura 10.** Fotomicrografia do corte transversal do músculo gastrocnêmio de rato do grupo T onde observa-se endomísio espessado, sugestivo de edema. H/E. Barra = 50 µm

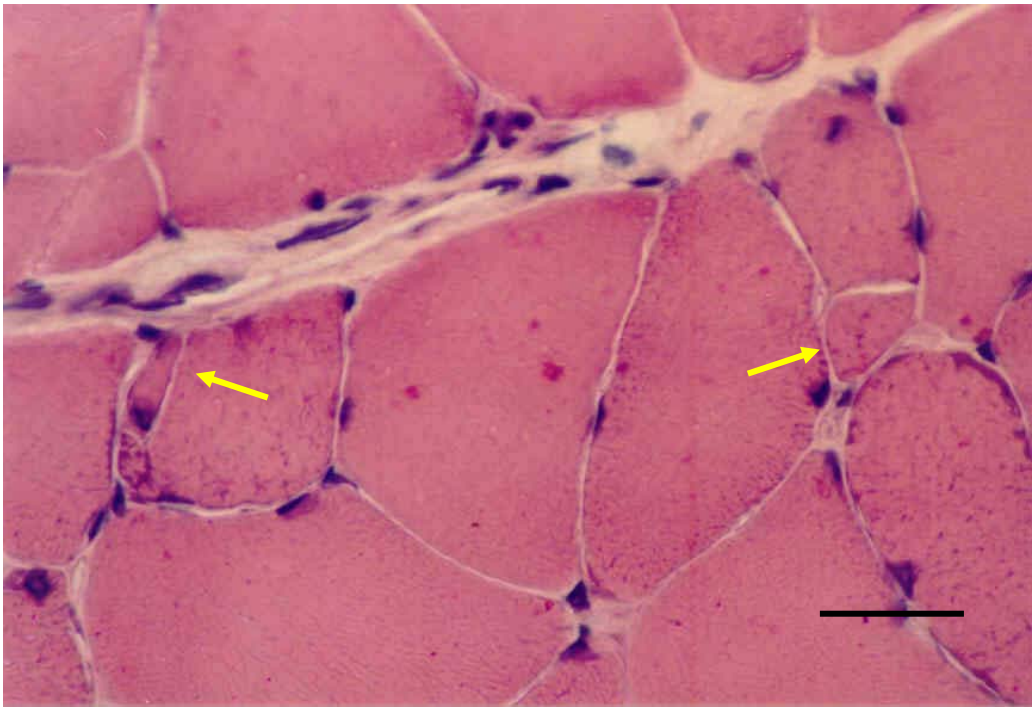

**Figura 11.** Fotomicrografia de um corte transversal do músculo gastrocnêmio de rato do grupo SC onde observa-se fibras de pequeno diâmetro próximo às fibras de diâmetro normal. Este aspecto é sugestivo de divisão muscular longitudinal por "*spliting*" (seta amarela). H/E. Barra = 25 µm.

Outro achado menos importante, por causa de sua baixa freqüência, foi a visualização de fibras musculares sendo invadidas por macrófagos (Fig 12). Normalmente isto ocorre em fibras desnervadas, em fibras lesadas e em fibras necróticas.

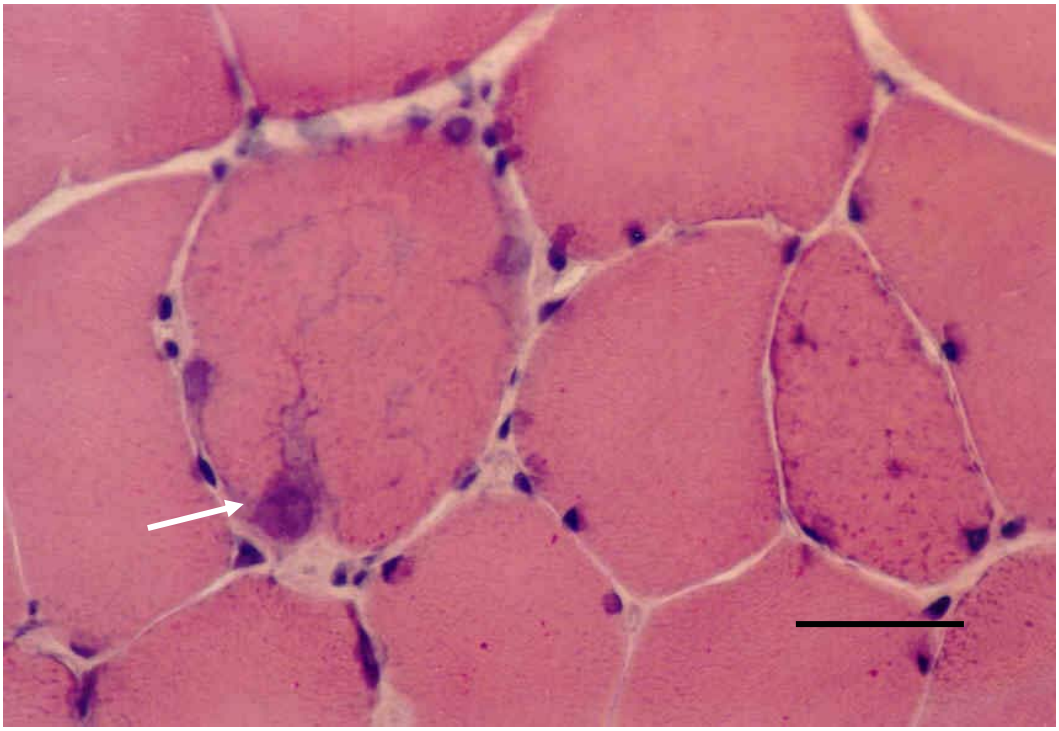

**Figura 12**. Fotomicrografia do corte transversal das fibras do músculo gastrocnêmio de rato do grupo SC onde observa-se macrófago invadindo o interior de uma fibra muscular (Seta branca). H/E. Barra = 25 µm

Nos cortes submetidos à reação histoquímica para NADH-TR, observamos fibras que mostraram reação forte, revelando sua alta capacidade oxidativa e diâmetros aparentemente menores; fibras que demonstraram reação fraca com baixa capacidade oxidativa, porém de diâmetro aparentemente maiores e fibras com reação e diâmetro intermediário, ou seja, fibras que demonstraram uma reação oxidativa e tamanho intermediários (Fig. 4).

Nas lâminas submetidas à reação pela ATPase miofibrilar pré incubada em pH 9.4 (Fig. 13 e 14), pudemos reconhecer e diferenciar as fibras Tipo I, de contração lentas (SO), das fibras Tipo IIa e IIb de contração rápidas (FOG e FG respectivamente).

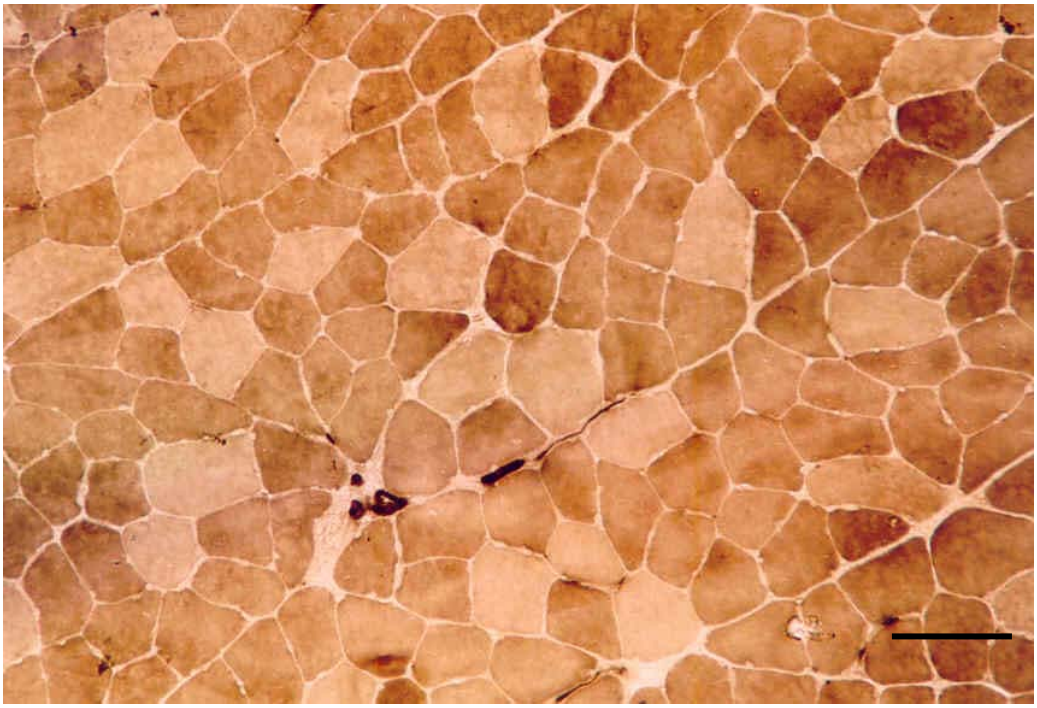

**Figura 13.** Fotomicrografia de corte transversal de fibras do músculo gastrocnêmio de rato do grupo S onde observa-se fibras claras, consideradas de contração lenta, e fibras escuras, classificadas como de contração rápida. ATPase pré-incubada em pH 9.4. Barra = 50 µm

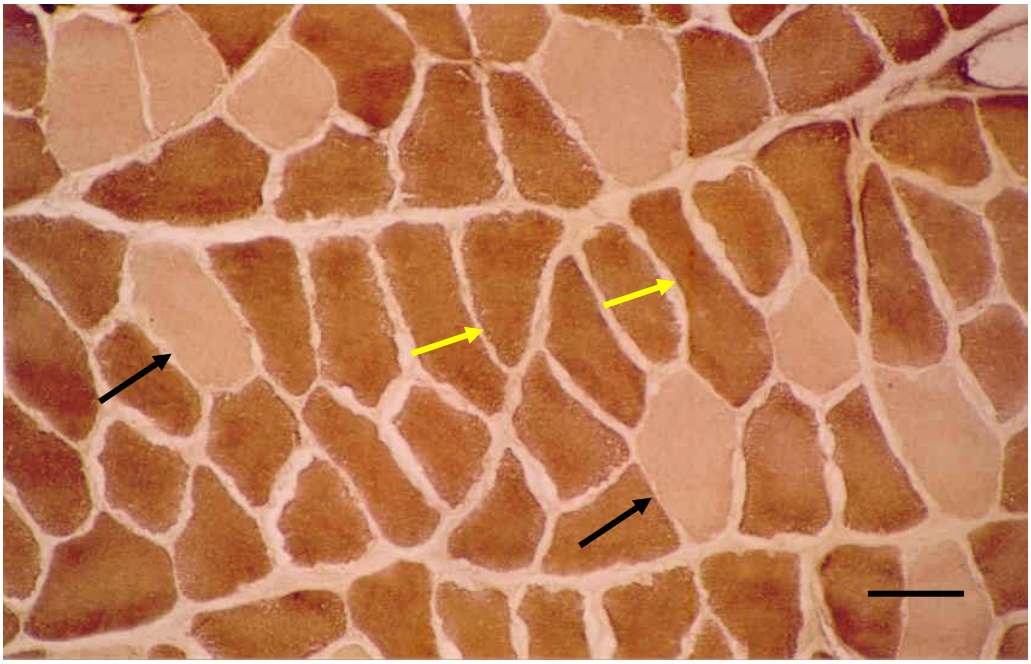

**Figura 14.** Fotomicrografia de corte transversal de fibras do músculo gastrocnêmio de rato do grupo T onde observa-se fibras lentas (seta preta), e fibras rápidas (seta amarela). ATPase pré-incubada em pH 9.4. Barra = 25 µm.

## 4.3. Análise Quantitativa

De um modo geral, para a parte do músculo gastrocnêmio estudada, em um campo microscópico de 0,191mm$^2$ foram contadas aproximadamente 40 fibras inteiras de várias dimensões. Para tal, utilizou-se as fotomicrografias obtidas das lâminas submetidas à reação histoquímica para NADH-TR que representavam um retângulo com 0,530 mm de comprimento e 0,360 mm de largura. Uma vez identificados os três tipos de fibras, quanto às suas características oxidativas, oxidativas-glicolíticas e glicolíticas, observou-se que as mesmas apresentavam populações de células com diversas medidas da área de secção transversa que eram distintas entre si pelo menor, médio e maior diâmetro respectivamente. Estas fibras estavam distribuídas de maneira homogênea nos cortes analisados, sem que houvesse predomínio de um tipo sobre o outro. Em números absolutos (tab. 3 e fig. 15) a maioria das fibras eram glicolíticas (17 fibras), seguido das fibras tipo I e tipo IIa (12 e 11 fibras respectivamente).

**Tabela 3.** Média e desvio padrão do número de fibras por unidade de área (0,191mm$^2$) do músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais.

| Grupos | Oxidativas | Oxidativas/Glicolíticas | Glicolíticas | Total |
|---|---|---|---|---|
| **S** | 11,00 ± 2,00 | 15,00 ± 4,00 | 14,33 ± 4,16 | 40,33 ± 2,50 |
| **SC** | 15,33 ± 3,21 | 10,00 ± 2,00 | 20,33 ± 2,08 | 45,67 ± 7,24 |
| **T** | 9,67 ± 1,15 | 12,67 ± 2,08 | 15,33 ± 2,52 | 37,67 ± 3,83 |
| **TC** | 14,67±1,53 | 10,00 ± 1,00 | 19,67 ± 5,69 | 44,33 ± 4,83 |

Resultados são Média ± Desvio padrão.
($p>0.05$)

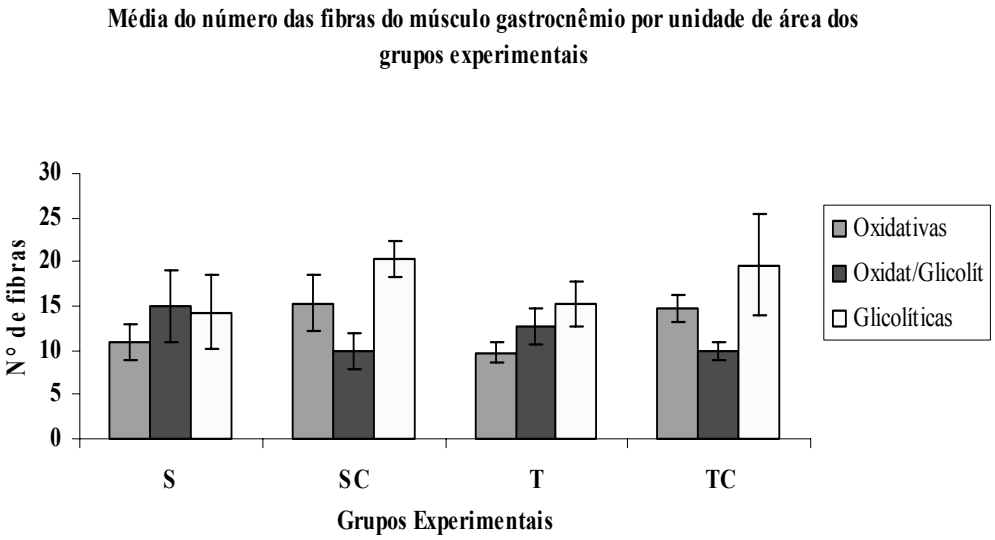


**Figura 15.** Número médio das fibras do músculo gastrocnêmio por unidade de área (0,191mm$^2$).

Em porcentagem de fibras presentes em uma unidade de área, ou seja, o número relativo das diferentes fibras que compõem o ventre medial do músculo gastrocnêmio, podemos notar que no grupo controle, praticamente, não existe predomínio de nenhum tipo de fibras. Já nos grupos que foram manipulados houve, se comparado ao controle, interconversão de fibras que atingiu, nos grupos que ingeriram creatina, uma mudança das fibras tipo IIa que, teoricamente, se transformaram em fibras tipo IIb (Tab. 4 e fig 16).

**Tabela 4.** Número relativo das fibras musculares estudadas que compõe o músculo gastrocnêmio. Dados expressos em porcentagem.

| Grupos | Oxidativas | Oxidativa/Glicolítica | Glicolíticas |
|---|---|---|---|
| **S** | 27,27 | 37,19 | 35,53 |
| **SC** | 33,58 | 21,90 | 44,52 |
| **T** | 21,50 | 35,52 | 42,98 |
| **TC** | 33,08 | 22,55 | 44,36 |

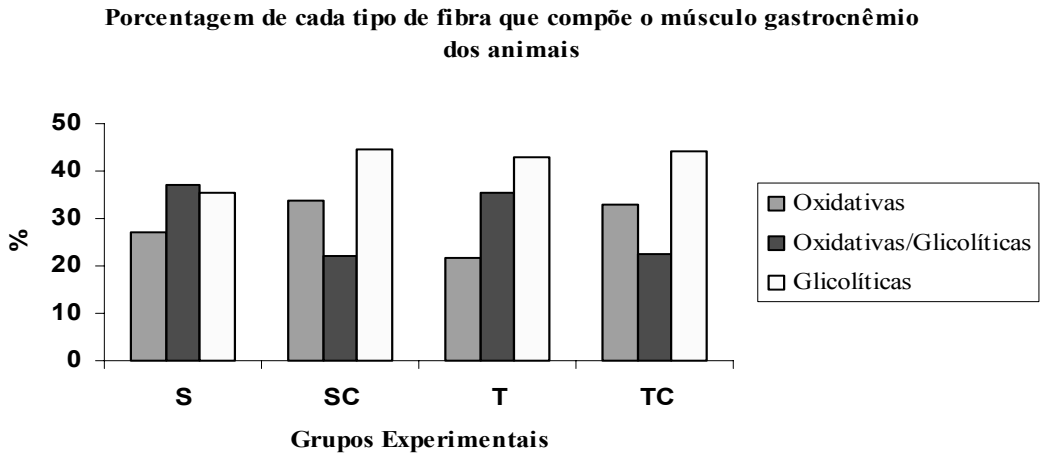


**Figura 16.** Número relativo dos tipos de fibras estudadas do músculo gastrocnêmio dos grupos estudados. Dados expressos em porcentagem.

## 4.4. Morfometria das Fibras Musculares

Os dados relativos à medida da área da secção transversa dos diferentes tipos de fibras que compões a porção do músculo estudado estão indicados na tabela 5 e figura 17 e são dados como média a desvio padrão.

### Fibras Oxidativas

As fibras oxidativas foram aquelas que apresentaram reação azul escura

intensa e formaram uma população de fibras que tiveram as menores áreas de secção transversa, variando de 995 $\mu m^2$ a 3800 $\mu m^2$ entre todos os grupos para o músculo gastrocnêmio. Nos animais do grupo SC, estas fibras sofreram uma diminuição no tamanho quando comparadas as do grupo S ($p<0,05$). No grupo T as fibras aumentaram de tamanho quando comparadas ao grupo S e ao grupo TC ($p<0,05$). Estas fibras do grupo TC também sofreram um aumento na secção transversa se comparadas às fibras do grupo SC ($p<0,05$).

**Fibras Oxidativas-Glicolíticas**

As fibras oxidativas-glicolíticas foram aquelas que apresentaram reação e valores das áreas de secção transversa intermediários, variando de 1784 $\mu m^2$ a 5847 $\mu m^2$ entre todos os grupos. Nos animais do grupo SC, estas fibras sofreram uma ligeira diminuição no tamanho quando comparadas as do grupo S ($p<0,05$). No grupo T as fibras aumentaram de tamanho quando comparadas ao grupo S e ao grupo TC ($p<0,05$). No grupo TC estas fibras também sofreram um aumento na secção transversa se comparadas às fibras do grupo SC ($p<0,05$).

**Fibras Glicolíticas**

As fibras glicolíticas foram aquelas que apresentaram reação azul clara e tiveram as áreas de secção transversa com os maiores valores, variando de 1536 $\mu m^2$ a 9019 $\mu m^2$ entre todos os grupos. Assim como ocorreu nos outros dois tipos de fibras, nos animais do grupo SC, estas fibras sofreram uma diminuição no tamanho quando comparadas as do grupo S ($p<0,05$). No grupo T as fibras aumentaram de tamanho quando comparadas ao grupo S e ao grupo TC ($p<0,05$). Estas fibras do grupo TC

também sofreram um aumento na secção transversa quando comparadas às fibras do grupo SC ($p<0,05$).

**Tabela 5.** Área dos diferentes tipos de fibras musculares do músculo gastrocnêmio (em $\mu m^2$).

| GRUPOS | I | IIa | IIb |
|---|---|---|---|
| **S** | 1929 ± 310 | 2922 ± 686 | 3888 ± 866 |
| **SC** | 1745 ± 275*$^{\beta\theta}$ | 2696 ± 479* $^{\beta\theta}$ | 3496 ± 536* $^{\beta\theta}$ |
| **T** | 2338 ± 594*$^{\alpha\theta}$ | 3367 ± 876* $^{\alpha\theta}$ | 5003 ± 1509* $^{\alpha\theta}$ |
| **TC** | 2203 ± 522*$^{\alpha\beta}$ | 3452 ± 692* $^{\alpha\beta}$ | 4505 ± 1006* $^{\alpha\beta}$ |

Resultados são Média ± desvio padrão
* $p < 0,05$ quando comparado ao controle S
$\alpha$ $p < 0,05$ quando comparado ao SC
$\beta$ $p < 0,05$ quando comparado ao T
$\theta$ $p < 0,05$ quando comparado ao TC
(n= 5)

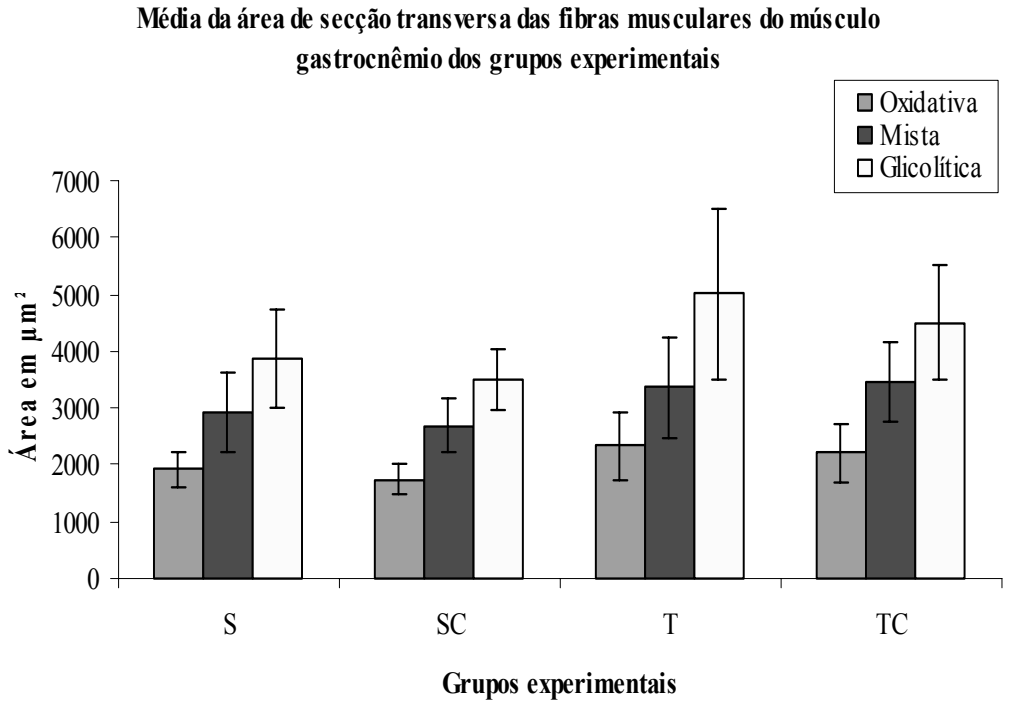


**Figura 17.** Área dos diferentes tipos de fibras musculares obtidas no músculo gastrocnêmio de

ratos. Sedentário (S), Sedentário Creatina (SC), Treinado (T), Treinado Creatina (TC).

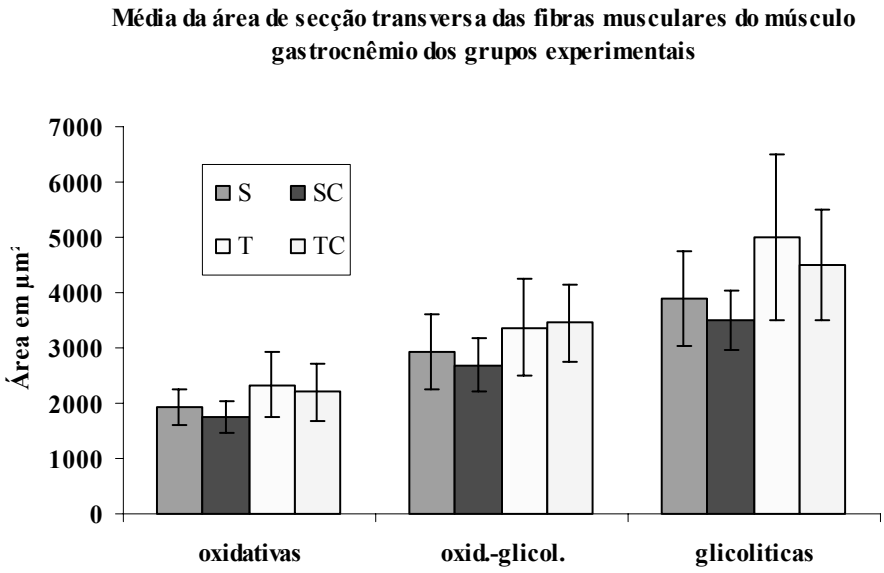


**Figura 18.** Área dos diferentes tipos de fibras musculares obtidas do músculo gastrocnêmio, agrupadas quanto à atividade metabólica. (Média ± Desvio padrão).

## 5. DISCUSSÃO

Os estudos dos efeitos da administração de creatina avaliados em nossa revisão de literatura descrevem seus efeitos fisiológicos e bioquímicos (SODERLUND et. al. 1994; GREENHAFF, 1997b; BALSON et. al., 1994) e como estes efeitos podem alterar ou não a performance atlética.

Em nossa avaliação notamos que fica negligenciada a abordagem morfológica para se explicar o ganho de força descrito por atletas usuários da creatina. Também notamos que os textos

publicados em revistas e "endereços eletrônicos" da Internet, aos quais o público leigo tem acesso, tratam do assunto de forma superficial e empírica.

Como é difícil saber qual é a dose recomendada, pois o seu efeito parece ser de caráter individual (GREENHAFF, 1997a), muitos acreditam que a ingestão de creatina não tem efeitos colaterais, o que faz com que tomem em excesso, não levando em consideração, por exemplo, a sobrecarga a que fica submetido o rim para a sua excreção.

Em nosso estudo procuramos reproduzir um protocolo de treinamento e de ingestão da creatina que mais se assemelhasse com a realidade dos usuários. Estes, muitas vezes, recebem orientação de "colegas" de treinamento, de treinadores e médicos fisiologistas que nem sempre têm um conhecimento profundo do assunto.

Utilizamos, assim como preconizam Williams (2000) e Green et al. (1996a, 1996b), para melhorar a captação de creatina pelas paredes do tubo digestivo, um carboidrato, a maltodextrina obtida a partir da hidrólise enzimática do amido de milho (dextrose, maltose, triose). Esta foi utilizada na proporção de 18 partes de maltodextrina para 1 de creatina, pois acreditamos que a liberação da insulina provocada pela absorção dos açucares para a circulação sanguínea pode ser um coadjuvante que auxilia a penetração da creatina pelas membranas sarcoplasmáticas das fibras musculares.

Outra discussão pertinente é, sobre o período e a dosagem em que a creatina deve ser ingerida, se muito antes do treinamento, se durante o treinamento, ou se após o treinamento e qual a quantidade mais adequada. Assim procuramos testar uma destas sugestões (ROMER, et al., 2001), ou seja, a ingestão de dosagem que produziria a sobrecarga das reservas de creatina pelo músculo, já nos primeiros dias do treinamento. Segundo Balsom et. al. (1994) e Sonderlund et al. (1994). Estas altas dosagens iniciais produzem grande elevação nas concentrações de CL e CP das fibras musculares.

Sobre o acompanhamento da massa corporal dos animais que constituíram os grupos experimentais podemos afirmar que em nosso experimento os grupos não tiveram diferenças durante o ganho de peso monitorado neste experimento, com exceção dos animais do grupo sedentário com creatina, os quais apresentaram discreto ganho de peso, se comparado ao seu controle. No geral, pudemos comprovar as boas condições de saúde dos animais que tiveram um ganho de peso progressivo e constante durante todo o experimento. Este ganho de peso observado nos animais sedentário com suplementação, segundo Kraemer e Volek (1999), se deve a retenção hídrica provocada pela creatina no

interior das células, pois a creatina é uma substância osmoticamente ativa e este aumento de concentração da creatina total pode induzir ao influxo de água para o interior das células.

Segundo Poortmans e Francaux (2000) e Volek et al. (1997a), se deve ao ganho de massa muscular, ou seja, massa magra e não gordura. Segundo estes autores o aumento na hidratação celular induzida pela suplementação de creatina pode aumentar a síntese protéica, diminuir a proteólise e assim desenvolver a massa muscular livre de gordura.

Nossos animais do grupo sedentário com creatina apresentaram este ganho de massa, mas acreditamos estar ligada a condição de sedentarismo à que foram submetidos, pois os animais do grupo treinado com creatina não apresentaram este aumento que poderia assim, estar relacionado com a ingestão de creatina.

Um dos motivos pelos quais os atletas utilizam a cretina é para melhorar a performance e o tempo de recuperação entre uma seção de treinamento e outra. Segundo Clark (1996), um ganho de massa conseguido com a ingestão de creatina pode limitar a performance, pois o ganho de massa pode ser prejudicial em certas modalidades esportivas.

Sendo este aumento de massa, relacionada com a retenção hídrica, provocada pela maior concentração de creatina total no interior das fibras musculares, o aumento da massa muscular nestas condições pode, no atleta, aumentar o arrasto relacionado à massa muscular aumentada, sem que haja um conseqüente aumento das proteínas estruturais relacionadas com a manutenção da contração muscular.

A abordagem morfológica e estrutural do músculo esquelético se faz necessário, pois este aumento de performance nos esportes em se requer força e explosão só é possível quando se tem um concomitante aumento das porções de actina e miosina que formam os sarcômeros e as miofibrilas (GOLDSPINK, 1992). Esta força produzida em uma fibra muscular está relacionada à quantidade de reação entre a actina e a miosina que pode ocorrer no seu interior e que é transferida aos tendões, e em última análise, para as alavancas produzidas entre os ossos que se articulam.

Qualitativamente, as fibras musculares apresentaram-se em perfeitas condições morfológicas, ou seja, com contornos poligonais bem definidos, núcleos localizados perifericamente, sarcoplasma homogênio, etc.

O conjuntivo observado pela coloração com H/E, também apresentou estrutura e

morfologia normais, onde puderam ser observados vasos capilares e algumas células próprias do tecido conjuntivo, como fibroblastos e leucócitos. Com exceção de alguns animais do grupo sedentário com creatina que apresentaram um certo espessamento no endomísio e que corrobora com nossa justificativa para o aumento da massa corporal destes animais quando comparados ao dos outros grupos experimentais.

Este aumento, acreditamos, estar relacionado com a retenção hídrica no meio extra-celular, causando um pequeno edema no endomísio devido talvez, ao sedentarismo.

Outro aspecto notado e registrado como uma alteração na morfologia em algumas fibras, foi observado nas lâminas analisadas a partir dos animais do grupo sedentário com creatina.

Estas alterações encontradas no interior, ou na rede intermiofibrilar, pode estar relacionado à retenção hídrica provocada pelo aumento nas concentrações de creatina total ou a um mau tamponamento do seu citoplasma devido ao acúmulo de ácido lático (HARRIS et al 1992; HULTMAN et. al. 1996).

Nas lâminas coradas pela reação histoquímica para NADH-TR pode ser observado algumas células, nos animais do grupo treinado com creatina, uma alteração na distribuição das mitocôndrias, que sugere ter havido agregação das mitocôndrias, tanto sub-sarcolemais, como das mitocôndrias intermiofibrilares.

Este achado sugere, que os animais treinados e submetidos à suplementação com creatina, podem ter o metabolismo mitocondrial comprometido. Acreditamos que este comprometimento pode ser devido a um maior acúmulo de substrato energético derivado da CP que deve interferir na captação deste combustível pela própria mitocôndria no momento da transferência do fosfato, quando a CP sofre a ação da enzima creatinaquinase (CK).

O treinamento proposto neste trabalho, aeróbio com episódios de alta intensidade, é uma atividade teoricamente hipertrofiante. Quando este tratamento é aliado a um agente ergogênico, como vem sendo considerada a creatina, podemos esperar uma melhora neste fator hipertrofiante. Para este tipo de treinamento, esperamos uma reação adaptativa, principalmente nas fibras de contração rápida, pois são estas fibras utilizadas para gerar força para os músculos estriados durante os momentos de explosão ou *sprint*. Apesar das controvérsias e segundo Romer, et. al. (2001) e Moura, et. al. (2002) o acúmulo de CP acontece principalmente no interior destas fibras (SAHLIN et al., 1998).

O aumento na área da secção transversa das fibras que compõe a cabeça medial do músculo gastrocnêmio ocorreu mais marcadamente nas fibras de contração rápida do que nas fibras de contração lenta. Este aumento era esperado por nós, pois de acordo com as características do treinamento proposto, e com o envolvimento metabólico da CP neste tipo de fibras, estas seriam as mais recrutadas.

Uma curiosa observação mostrou que a creatina causou um leve, porém considerável aumento na porcentagem de fibras musculares tipo IIB. Teoricamente, se aumentar a porcentagem de fibras tipo IIB, você terá mais fibras que produzem o rendimento necessário para esforços físicos muito altos.

Maiores rendimentos em esforços físicos de alta intensidade podem significar um treinamento mais intenso, que pode aumentar seu potencial para o crescimento do tamanho das fibras. VOLEK & KRAEMER, 1996, CLARK, 1997, VOLEK et al., 1997a, 1997b, apontam que o fato da retenção de água poderá não ser o único responsável por este aumento, mas também o fato de que é possível que a creatina afeta a síntese protéica de uma forma positiva. O que significa músculos maiores e mais fortes. Anatomicamente, o músculo gastrocnêmio dos ratos treinados suplementados eram maiores e mais fortes do que os ratos não suplementados.

## 6. CONCLUSÕES

1. De acordo com o acompanhamento da massa corporal dos animais, podemos concluir que eram animais saudáveis, o que valida a qualidade de nossos dados.
2. O protocolo de treinamento instituído neste trabalho foi capaz de produzir adaptações hipertróficas em todas os tipos de fibras musculares.
3. As fibras que reagiram ao protocolo e a suplementação com maior amplitude foram as fibras de contração rápida, ou seja, as fibras Tipo IIa e Tipo IIb.
4. Mais experimentos com abordagem morfológica, tanto com microscopia de luz, como com microscopia ultra-estrutural são necessários para melhor descrever as adaptações por que passam as fibras musculares, já que são raros os trabalhos relacionando a morfologia com o uso de suplementos alimentares.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, P. L.; DITTMER, D. S. Biology Data Book. **Federation of American societies for Experimental Biology,** v. 3, p. 1613-1615, 1974.

ARMSTRONG, R. B.; SSAUBERT, C. W.; SEGHERMAN, H. J.; TAYLOR, C. R. Distribution of fiber types in locomotory muscle of dogs. Am. J. Anat., v. 163, p. 87 - 98, 1982.

ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R. O. Muscle fiber type composition on the rat hind limb. Am. J. Anat., v. 171, p. 259 - 72, 1984.

BÄR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. FEBS Letters, v. 235, p. 153 -155, 1988.

BARNARD, J.; EDGERTON, V. R.; FURUKAWA, T.; PETER, J. B. Histochemical, biochemical and contractile properties of red withe and intermediate fibers. Am. J. Physiol., n. 220, p. 410 – 4, 1971.

BETTO, D. D.; ZERBATO, E.; BETTO, R. Type 1, 2A; and 2B myosin heavy chain Eletrophoretic analysis of rat muscle fibers. Biochem. Biophys. Res. Commum., v. 138, p. 981 - 7, 1986

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind. Arch Neurol., v. 23, p. 369 - 79, 1970a.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Three "myosin adenosinetriphosphatase" sistems: the natureof their pH hability and sulphydryl dependence. J. Histochem. Cytochem., v. 18, p. 670-2, 1970b.

BURKE, R. E.; LEVINE, D. N.; ZAJAC, F. E.; TSAIRIS, P.; ENGEL, W. K. Mammalian motor units: Physiological -- histochemical correlation in 3 types in cat gastrocnemius. Science, v. 174, p. 709, 1971.

BALSOM, P.; SODERLUND, K.; EKBOLM, B. Creatine in humans with special reference to creatine suplementation. Sports Medicine, v. 18, p. 268- 280, 1994.

BALSOM, P.; EKBLOM, B.; SODERLUND, K.; SJODIN, B.; HULTMAN, E.

Creatine supplementation and dynamic high-intensity intermittent exercise. Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, v. 3, p.143-149, 1993.

BANGSBO, J.; GOLLNICK, P. D.; GRAHAM, T. E.; JUEL, C.; KIENS, B.; MIZUNO, M.; SALTIN, B. Anaerobic energy production and $O_2$ deficit-debt relationship during exhaustive exercise in humans. Journal of Physiology, v. 422, p. 539-559, 1990.

BEMBEN, M. G.; BEMBEN, D. A.; LOFTISS, D. D.; KNEHANS, A . W. Creatine supplementation during resistance training in college football athletes. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 33, n.10, p. 1667-1673, 2001.

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

CASEY, A.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; HOWELL, S.; HULTMAN, E.; GREENHAFF, P. L. Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. American Journal of Physiology, v. 271, p. E31-E37, 1996.

CLARK, J. F.; CONWAY, M. A.; CLARCK, J. F. (Ed). Uses of creatine phosphate and creatine supplementation for the athlete. In: Creatine and creatine phosphate: scientific and clinical perspectives. San Diego: Academic Press, 1996. p. 217-226.

CLARK, J. F. Creatine and phosphocreatine: A review of their use in exercise and sport. Journal of Athletic Training, v. 32, p. 45-50, 1997.

CLARK, J. F.; CONWAY, M. A.; CLARCK, J. F.; FIELD, M. L.; VENTURA-CLAPIER, R. (Ed.). An introduction to the cellular creatine kinase system in contractile tissue. In: Creatine and creatine phosphate*:* scientific and clinical perspectives. San Diego: Academic Press, 1996. p. 51-64.

CLARK, J. F.; ODOOM, J.; TRACEY, I.; DUNN, J.; BOEHM, E. A.; PATERNOSTRO, G.; RADDA, G. K.; CONWAY, M. A.; CLARCK, J. F. (Ed.). Experimental observations of creatine and creatine phosphate metabolism. In: Creatine and creatine phosphate: scientific and clinical perspectives. San Diego: Academic Press, 1996b. p. 33-50.

CLARCK, N. Guia de nutrição desportiva: uma alimentação para uma vida ativa. Tradução de Álvaro Reischak de Oliveira. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 376p.

COSTLEY, C. D.; MANDEL, C. H.; SCHWENCK, T. L. Nutritional supplement use in collegiate athletes. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 30, p. S40, 1998. Abstract

DUARTE, J. For athletes, potion has powerful lure. Houston Chronicle, v. 13 march, p. 1A-14A, 1998.

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A.G. E. A comparative histochemical study of oxidative enzymes and phosphorilase activity in skeletal muscle. Histochemical., v. 2, p. 105 - 17, 1960.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H. Histological and histochemical stains avd reactions. In: _____. Muscle biopsy: A modern approach. London: W. B. Saunders, 1973. Cap. 2. p. 20-73.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H. Muscle biopsy: A modern approach. London: W. B. Saunders, 1985.

DUBOWITZ, V. Normal muscle. In: _____. Muscle Biopsy: A practical approach. 2 nd ed. London: Bailliere Tindall, 1985. Cap. 03, p. 41 - 81.

DAL PAI, V. Histoenzimologia: teoria e prática. Botucatu: IB/UNESP, 1995.

DAL PAI, S. MAELI, Aspectos morfológicos do músculo masseter do coelho (Orictolagus curriculus), após simpatectomia cervical. 1997. Tese (Doutorado). UNESP – Botucatu.

EARNEST, C. P.; ALMADA, A. L.; MITCHELL, T. L. Effects of creatine monohydrate ingestion on intermediate duration anaerobic treadmill running to exhaustion. Journal of Strength and Conditioning Research, v. 11, n. 4, p. 234-238, 1997.

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

FERNANDES, J. L. O treinamento desportivo. 2. ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária , 1981. 148 p.

FLECK, S. J.; VOLEK, J. S.; KRAEMER, W. J. Efeito da suplementação de creatina em sprints no pedalar e na performance de sprints repetitivos no pedalar. Rev. Bras. Ciên. E Mov., v. 8, n. 3, p. 25-32, 2000.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. The sarcoplasm, reticulum and transverse tubules. In: ENGEL, A.; BANKER, B. Myology. New York: McGraw-Hill, 1986. p. 125 - 53.

FURUMURA, M. T. Quantificação de hipertrofia muscular em fibras tipo I e tipo II do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a um exercício de natação e a um esteróide anabólico. 1994. Monografia – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

GOLDISPINK, G.; WATERSON, S. E. The effect of growth and inanition on the amount of Nitroblue tetrazolium deposited in individual muscle fibers of fast and slow. **Acta Histochemica,** v. 40, p. 16-22, 1971.

GOLDISPINK, G; KOMI, P. V. (Ed). Cellular and molecular aspects of adaptation in skeletal muscle. In: **Stregth and Power in Sport.** Oxford (USA). Blackwell Scientific Publications, 1 ed., p. 230-238, 1992.

GOULD, J. A. Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte. 2. ed. São Paulo: Manole, 1993. 691 p.

GREEN, A. L.; GREENHAFF, P. L.; MACDONALD, I. A.; BELL, D.; HOLLIMAN, D.; STROUD, M. A. The influence of oral creatine supplementation on metabolism during sub-maximal incremental treadmill exercise. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.53, p. 84A, 1993.

GREEN, A. L.; HULTMAN, E.; MACDONALD, L. A.; SEWELL, D. A.; GREENHAFF, P. L. Carbohydrate feeding augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. Am. Journal of Physiology, v. 271, p. E821-E826, 1996.

GREENHAFF, P. L. Creatine and its application as an ergogenic aid. International Journal of Sports Nutrition, v. 5, p. S100-S110, 1995.

GREENHAFF, P. L.; JEUKENDRUP, A.; BROUNS, M.; BROUNS, F. (Ed.). Creatine suplementation and implications for exercise performance and guidelines for creatine suplementation. In: Advances in training and nutrition for endurance sports. Maastricht: Novartis Nutrition Research Unit, 1997a. v. 30, p. 8-11.

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

GREENHAFF, P. L.; BODIN, K.; SODERLUND, K.; HULTMAN, E. Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. American Journal of Physiology, v. 266, p. E725-E730, 1994. Abstract.

GREENHAFF, P. L.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; CASEY, A.; HULTMAN, E. The effect of oral creatine suplementation on skeletal muscle ATP degradation during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. Journal of Physiology, v. 476, p. 84, 1994b. Abstract.

GREENHAFF, P. L.; NEVILL, M. E.; SODERLUND, K.; BOOBIS, L.; WILLIAMS, C.; HULTMAN, E. Energy metabolism in single muscle fibers during maximal sprint exercise in man. Journal of Physiology, v. 446, p. 528, 1992. Abstract.

GUTH, L.; SAMAHA, F.J. Procedure for the histochemical demonstration of acto myosin ATPase. Exp. Neuro., v. 28, p. 365 - 7, 1970.

GUYTON, A . C. Anatomia Funcional e Controle do Músculo. In: **Tratado de Fisiologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1989. Cap. 11, p. 98-110.

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

HAUGLHAND, R. B.; CHANG, D. T. Insulin effects on creatine transport in skeletal muscle. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine, v. 148, p. 1-4, 1975. Abstract.

HAWLEY, J. A.; SCHABORT, E. B.; NOAKES, T. D.; DENNIS, J. C. Carbohydrate loading and exercise performance. Sports Medicine, v. 24, p. 73-81, 1997.

HULTMAN, E. Studies on muscle metabolism of glycogen and active phosphate in man with reference to exercise and diet. Acta Med. Scand., v. 182, p. 109-117, 1967. Disponível em: <http://www.wilkins.com/MSSE> Acesso em: 21 de março de 1999.

HULTMAN, E.; GREENHAFF, P. L. Skeletal muscle energy metabolism and fatigue during intense exercise in man. Science Progress, v. 75, n. 298, part 3-4, p. 361-370, 1991.

HULTMAN, E.; SODERLUND, K.; TIMMONS, J. A.; CEDERLBLAD, G.; GREENHAFF, P. L. Muscle creatine loading in men. Journal of Applied Physiology, v. 8, p. 1232-1237, 1996. Disponível em: <http://www.ovidweb.com> Acesso em: 15 de junho de 1999.

HUNTER, A. Monographs on biochemistry: creatine and creatinine. London: Longmans, Green, 1928. Abstract.

JOHNSON, R. Demographics of creatine monohydrate users: Memorandum to Brett Hall. Experimental and Applied Sciences, 1998. Abstract.

JUHN, M. S.; TARNOPOLSKY, M. Oral creatine supplementation and athletic performance: A critical review. Clinical Journal of Sport Medicine, v. 8, p. 286-297, 1998a.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KRAEMER, V. J.; VOLEK, J. S. Creatine supplementation: current comment from the American College of Sports Medicine. Indianapolis: American College of Sports Medicine, 1998. Abstract

KREIDER, R. B.; FEREIRA, M.; WILSON, M.; GRINDSTAFF, P.; PLISK, S.; REINARDY, J.; CANTLER, E.; ALMADA, A. L. Effects of creatine supplementation on body composition, strength, and sprint performance. Med. Sci. Sports Exerc., v. 30, n. 1, p. 73-82, 1998.

LEENDERS, N.; SHERMAN, W. M.; LAMB, D. R.; NELSON, T. E. Creatine supplementation and swimming performance. International Journal of Sports Nutrition,

v. 9, 1999. In Press.

LEHMKUHL, L. DON.; SMITH, L. K. Brunnstrom: Cinesiologia Clínica. 4. ed., São Paulo: Manole, 1989.

MA, T. M.; FRIEDMAN, D. L.; ROBERTS, R. CONWAY, M. A.; CLARK, J. F. (Ed.) Creatine phosphate shuttle pathway in tissues with dynamic energy demand. In: Creatine and creatine phosphate: Scientific and clinical perspectives. San Diego: Academic Press, 1996. p. 17-32.

MAGEL, J. R.; McARDLE, W. D.; GLASER, R. M. Telemetered heart rate response to select competitive swimming events. Journal Applied Physiology, v. 26, n. 6, p. 764 – 769, 1969.

MALHEIRO, O. C. M. Avaliação morfológica e histoquímica da lesão muscular por estiramento produzida em ratos. 2003. Dissertação (Mestrado em Motricidade Humana) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MALINA, R. M.; FALKER, F.; TANNER, J. M. (Ed.). Growth of tissue and muscle mass. In: **Human Growth. A Comprehensive Treatise.** New York: Plenum Press, v. 2, p. 77-99, 1986.

MANETTA, J.; BRUN, J. F.; MERCIER, J.; PRÉFAUT, C. Carbohydrate dependence during hard-intensity exercise in trained cyclists in the competitive season: importance of training status. Int. Sports Med., v. 23, p. 516 –523, 2002.

MANETTA, J.; BRUN, J. F.; PÉREZ-MARTIN, A.; CALLIS, A.; PREFAUT, P.; MERCIER, J. Fuel oxidation during exercise in middle-aged men: effect of training and glucose disposal. Med. Sci. Sports Exerc., v. 34, p. 423 – 429, 2002.

MANUAL Prático de Controle Antidoping e Alternativas Naturais. 2. ed., 2002.

MAUGHAN, R. J. Creatine supplementation and exercise performance. International Journal of Sports Nutrition, v. 5, p. 94-101, 1995. Disponível em: < http://www.ovidweb.com>. Acesso em: 23 de agosto de 1999.

MAUGHAN, R. J.; GREENHAFF, P. L.; LEIPER, J. B.; BALL, D.; LAMBERT, C. P.; GLEESON, M. Diet composition and the performance of high-intensity exercise. J. Sports Sci., v. 15, p. 265-275, 1997.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. Guanabara Koogan, 1985.
MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Músculo Esquelético: Estrutura e Função. In: **Fisiologia do Exercício.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 226-237.

MOURA, I. M. W.; SANTOS, F. F.; MOURA, J. A. A.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional area in skeletal muscle

fibers of wistar rats after swimming training. Journal of Sports Sciences and Medicine, v. 3, p. 87 – 95, 2002.

MUJIKA, I.; CHATARD, J. C.; LACOSTE, L.; BARALE, F.; GEYSSANT, A. Creatine supplementation does not improve sprint performance in competitive swimmers. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 28, p. 1435-1441, 1996.

MUJIKA, I.; PADILLA, S. Creatine supplementation as an ergogenic aid for sports performance in highly trained athletes: a critical review. International Journal of Sports Medicine, v. 18, p. 491-496, 1997.

NEWBY-FRASER, P. The creatine controversy. Body Talk Triatlhete n. 169, p. 64, 1998. Disponível em:< www.TriathleteMag.com.> Acesso em: 23 de janeiro de 1999.

NEWSHOLME, E. A.; BEIS, I.; CONWAY, M. A.; CLARK, J. F. (Ed.). Old and new ideas on the roles of phosphagens and their kinases. In: Creatine and creatine phosphate: Scientific and clinical perspectives. San Diego: Academic Press, 1996. p. 3-15.

OGATA, T. A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide daphorasse and triphosphopiridinenucleotide diaphorase in muscle fibers. Acta. Med. Okayama., v. 12, p. 233-40, 1958.

PETER, J. B.; BARNARD, V. R.; EDGERTON, V. R.; GILLESPIE, C. A.; STEMPEL, K. E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscles in guineas pigs and rabbits. Biochemistry, v. 11, p. 2627 – 33, 1972.

PETTE, D.; STARON, R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Review Physiology Biochemistry Pharmacology, v. 116, p. 1 – 76, 1990.

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

PREEN, D.; DAWSON, B.; GOODMAN, C.; LAWRENCE, S.; BEILBY, J.; CHING, S. Effect of creatine loading on long-term sprint exercise performance and metabolism. Med. Sci. Sports Exerc., v. 33, n. 5, p. 814 – 821, 2001.

RADDA, G. K. Control of energy metabolism during muscle metabolism. Diabetes, v. 45, p. S88-S92, 1996.

RASCH, J. P.; BURKE, K. R.; Cinesiologia e anatomia aplicada a ciência do movimento humano. 5. ed. Guanabara Koogan, 1977.

RICO-SANZ, J.; MARCO, M. T. M. Creatine enhances oxygen uptake and performance during alternating intensity exercise. Med. Sci. Sports Exerc., v. 32, p. 379-385, 2000.

ROMER, M. L.; BARRINGTON, J. P.; JEUKENDRUP, A. E. Effects of oral creatine

supplementation on high intensity, intermittent exercise performance in competitive squash players. Int. J. Sports Med., v. 22, p. 546-552, 2001.

ROY, B. D.; TARNOPOLSKY, M. A.; MACDOUGALL, J. D.; FOWLES, J.; YARASHESKI, K. E. Effect of glucose supplement timing on protein metabolism after resistance training. J. Appl. Physiol., v. 82, n. 6, p. 1882 – 8, 1997.

SAHLIN, K.; HARRIES, M.; WILLIAMS, C.; STANISH, W. D.; MICHELI, L. J. (Ed.). Anaerobic metabolism, acid-base balance, and muscle fatigue during high intensity exercise. In: Oxford textbook of sports medicine. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 69-76.

SCHIAFFINO, S.; GORZA, L.; SARTORE, S. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. Journal of Muscle Research and Cell Motility, v.10, p.197 – 205, 1989.

SCHNEIDER, K.; HERVIG, L.; ENSIGN, W.Y.; PRUSACZYK, W. K.; GOFORTH, H.W. Use of supplements by U.S. Navy Seals. Med. And Science in Sports and Exercise, v. 30, p. S60, 1998. Abstract.

SIPILA, I.; RAPOLA, J.; SIMELL, O.; VANNAS, A. Supplementary creatine as a treatment for gyrate atrophy of the choroid and retina. New England Journal of Medicine, v. 304, p. 867-870, 1981.

SODERLUND, K.; BALSOM, P. D.; EKBLOM, B. Creatine supplementation and high intensity exercise: Influence on performance and muscle metabolism. Clinical Science (suppl.): p. 120-121.

SOUZA, C. N.; GONÇALVES, S. R.; MAZZEO, R.; ARAUJO, E.; AFONSO, M.; ANARUMA, C. A. Resposta do lactato sanguíneo m ratos wistar submetidos ao treinamento de alta intensidade e a suplementação de monoidrato de creatina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CIËNCIAS DO ESPORTE, 26., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Celafiscs, 2003. p. 268

STARON, R. S.; GOHLSCH, B.; PETTE, D. Myosin polymorphism in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. Pfugers Archieve, v. 408, n. 5, p. 444 - 450, 1987.

STEENGE, G. R.; LAMBOURNE, J.; CASEY, A.; McDONALD, I. A.; GREENHAFF, P. L. Stimulatory of effect of insulin on creatine accumulation in human skeletal muscle. Am. J. Physiol Endocrinol Metabol., United Kingdon: v. 275, n. 6, p. E974 - 979, 1998.

STRAUSS, G.; MIHOCES, G. Jury still out on creatine use. *USA Today,* 4 june*,* 1998. p. C1-C2.

VANDENBERGHE, K.; GORIS, M.; Van HECKE, P.; Van LEEMPUTTE, M.; Van GERVEN, L.; HESPEL, P. Long-term creatine intake is beneficial to muscle

performance during resistance training. Journal of Applied Physiology, v. 83, p. 2055-2063, 1997a.

VAN DEURSEN, J.; HEERSCHAP, A.; OERLEMANS, F.; RUITENBEEK, W.; JAP, P.; TER LAAK, H.; WIERINGA, B. Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. Cell, v. 74, p. 621-631, 1993. Abstract.

VOLEK, J. S. Creatine supplementation and its possible role in improving physical performance. ACSM Health Fitness Journal, v.1, n. 4, p. 23-29, 1997.

VOLEK, J.S.; BOETES, M.; BUSH, J. A.; PUTUKIAN, M.; SEBASTIANELLI, W. J.; KRAEMER, W. J. Response of testosterone and cortisol concentrations to high-intensity resistance exercise following creatine supplementation. Journal of Strength and Conditioning Research, v. 11, p. 182-187, 1997a.

VOLEK, J.S.; DUNCAN, N. D.; MAZZETTI, S. A.; STARON, R. S.; PUTUKIAN, M.; GÓMEZ, A.L.; PEARSON, D. R.; FINK, W. J.; KRAEMER, W. J. Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 31, p. 1147-1156, 1999.

VOLEK, J. S.; KRAEMER, W. J. Creatine supplementation: its effect on human muscular performance and body composition. Journal of strength and conditioning Research, v. 10, p. 200-210, 1996.

VOLEK, J. S.; KRAEMER, W. J.; BUSH, J. A.; BOETES, M.; INCLEDON, T.; CLARK, K. L.; LYNCH, J. M. Creatine supplementation enhances muscular performance during high-intensity resistance exercise. Journal of the American Dietetic Association, v. 97, p. 765-770, 1997b. Disponível em: <http://www.wwilkins.com/MSSE> Acesso em: 12 de junho de 2000.

WALKER, J.B. Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. Advances in Enzymology, v. 50, p. 177-242, 1979. Abstract.

WEINECK, J. **Biologia do esporte**. São Paulo: 1991. 599 p.

WILLIAMS, M.H. Nutritional aspects of human physical and athletic performance. Sprinfield, IL: Charles C Thomas, 1985. Disponível em: <http;//www.ovidweb.com>. Acesso em: 25 de março de 2002.

WILLIAMS, M.H. **Nutrition for health, fitness and sport**. Dubuque: 1999.

WILLIAMS, M. H.; BRANCH, J. D. Creatine suplementation and exercise performance: An update. Journal of the American College of Nutrition, v. 17, p. 216-234, 1998.

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

WILLIAMS, M. H.; WILKINS. Physiological and Health effects of oral creatine supplementation. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 32, n. 3, p. 706-717, 2000. Disponível em: <http://www.ovidweb.com> Acesso em: 9 de novembro de 2001.

WILLIAMS, M. H. Nutrição Saúde e Performance, ano 3, ed. n. 10, p. 10-11, abril/maio, 2001.

ZIEGENFUSS, T. N.; LOWERY, L. M.; LEMON, P. W. R. Acute fluid volume changes in men during three days of creatine supplementation. Journal of Exercise Physiology, v. 1, n. 3, p. 1-9, 1998b. Disponível em: <http://www.css.edu/users/tboone2/asep>. Acesso em: 13 de janeiro de 1999.

# 8. ANEXO

http://www.probiotica.com.br/pesquisas.htm

http://www.probiotica.com.br/produtos.htm

http://www.probiotica.com.br/creatina_pura.htm

http://www.creatine.com/creamicroniz.htm

http://www.creatine.com/fitness_mag2.htm

http://www.creatine.com/creatine_banners.swf

http://www.creatine.com/nutritional_needs_of_female

http://www.creatine.com/medicine_creatine-studies_as_distrophy_drug.htm

http://www.creatine.com/powers_endurance_athetes.htm

www.optimumbrasil.com.br

www.phorte.com

www.artnutri.com.br

www.musclemedia.com

**Camila Nascimento de Souza**
Mestranda

**Prof. Dr. Carlos Alberto Anaruma**
Orientador