

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**O IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA E CARBOIDRATO NA  
EXPRESSÃO PROTEICA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO  
SEMELHANTE À INSULINA 1 (IGF-1R) EM RATOS WISTAR MACHOS NO  
EXERCÍCIO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE**

Carlos Eduardo Haar Flores

**Orientador: Prof. Dr. Edison Capp**

Porto Alegre, maio de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**O IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA E CARBOIDRATO NA EXPRESSÃO PROTEICA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA 1 (IGF-1R) EM RATOS WISTAR MACHOS NO EXERCÍCIO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE**

Carlos Eduardo Haar Flores

**Orientador: Prof. Dr. Edison Capp**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, maio de 2013

*“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’. Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”.*

**George Bernard Shaw**

*Dedico este trabalho a todos que eu amo e estão sempre do meu lado, torcendo por mim e me dando força para seguir em frente sempre.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Capp, pela confiança depositada em mim, para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ilma Simoni Brum, pela acolhida no laboratório, pelos ensinamentos e carinho.

À Profa. Dra. Helena von Eye Corleta, pelas relevantes contribuições em nossos encontros científicos.

À Dra. Vivian Giesel, pela oportunidade dada, por toda ajuda e por todo aprendizado.

À Profa. Dra. Maria Flávia Ribeiro, pelos valorosos ensinamentos como professora.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, por terem me proporcionado uma excelente formação.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre: principalmente à equipe da Unidade de Experimentação Animal, pelo auxílio, acolhida e carinho.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia, pelas conversas pelos corredores, pelas dicas e auxílios.

A todos meus colegas de laboratório: Carol Hillebrand, Patrícia, Diego, Amanda, Gabriela, Gisele, Fernanda, Joelson, Anita, Carol Luft, Juliana, Tadeu,

Alice, Laura por tornarem o ambiente de trabalho muito agradável, por sempre estarem disponíveis a ajudar, incentivando.

Aos grandes colegas, Dr. Vanderlei Biolchi e Dra. Ana Santin, as valiosíssimas dicas e pelo auxílio em várias etapas deste projeto.

Um agradecimento especial às alunas de iniciação científica Débora e Jéssica, por estarem incondicionalmente junto comigo nos momentos mais trabalhosos deste estudo.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, possibilitando que eu trilhasse meu caminho com muita segurança e apoio. Ao amor incondicional, pelos ótimos bons exemplos e por sempre estarem antes, durante e depois das minhas escolhas.

Ao meu irmão Marcelo, que me apóia nas minhas decisões e que sei que sempre poderei contar com ele.

A toda minha família, que me incentiva a querer sempre mais da vida.

E, por fim, a minha namorada Josi, por me acompanhar durante toda essa trajetória com muito amor e paciência. Por ter abdicado de muitos momentos para estar ao meu lado, em vários finais de semana de estudo e trabalho, sempre com muita dedicação e companheirismo. E por, às vezes, vibrar até mesmo mais do que eu com as minhas conquistas.

Carlos Eduardo Haar Flores

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
INTRODUÇÃO .....	17
Exercício intervalado .....	18
Creatina.....	20
Carboidrato .....	24
IGF-1 .....	25
IGF-1R .....	27
HIPÓTESES .....	30
OBJETIVOS.....	31
Geral .....	31
Específicos.....	31
MATERIAS E MÉTODOS .....	32
Delineamento .....	32
População e Amostra.....	32
Suplementação com Creatina .....	35
Protocolo de treinamento .....	36
Determinação da glicose e do lactato séricos .....	36
Extração de proteínas .....	37
Análise de Concentração de Proteínas .....	37
Análise de proteínas.....	37
Revelação das Autorradiografias .....	39
Análise Estatística.....	39

Aspectos éticos e de biossegurança .....	40
Locais de realização do projeto.....	41
Fontes de Financiamento .....	42
RESULTADOS .....	43
Massa Corporal.....	43
Performance Pareada .....	43
Performance pós-treinamento.....	44
Glicemia .....	45
Lactato .....	46
IGF-1R .....	47
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO .....	59
PERSPECTIVAS .....	60
REFERÊNCIAS .....	60

## RESUMO

A redução nos níveis de atividade física nos últimos tempos, devido ao aumento do uso de novas tecnologias e a vida sedentária, agregada ao consumo excessivo de alimentos, tem promovido uma epidemia de obesidade e doenças metabólicas. No contraponto deste caminho, está a realização de exercícios físicos. O exercício intervalado surge como uma boa opção para a obtenção de bons resultados físicos, principalmente, quando as pessoas possuem um tempo reduzido para a realização do seu treinamento. Muitos esportes como futebol, vôlei, tênis e atletismo, assim como o exercício intervalado, necessitam de indivíduos que possam competir, ou simplesmente praticar, várias vezes dentro de um intervalo de poucos dias. Atletas profissionais ou amadores treinam quase todos os dias e necessitam de uma intervenção dietética para manter o seu nível de energia estável para a realização de treinos e partidas, fazendo uso frequente de suplementos alimentares. Dentro desta gama de suplementos alimentares a Creatina é um dos mais utilizados coadjuvantes na melhoria do desempenho atlético, demonstrando potencial aumento de força, bem como aumento de massa magra, o que pode estar relacionado com o sistema do fator de Crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) ou o seu receptor celular o IGF-1R. O objetivo deste trabalho foi analisar o impacto da suplementação de Creatina juntamente com o treinamento intervalado de alta intensidade na expressão proteica de IGF-1R no tecido muscular, além de analisar as concentrações sanguíneas de lactato e glicemia, avaliar o desempenho ou a performance, dos ratos antes e após o treinamento intervalado e verificar o ganho de peso dos animais nos diferentes grupos. Trinta e sete (37) ratos Wistar machos com 75 dias no começo do experimento foram randomizados e separados em três



grupos: A (Treinado sem suplementação, 13 animais), B (Treinado suplementado com Creatina e Carboidrato, 12 animais) e C (Treinado suplementado com Creatina, 12 animais). O protocolo de treinamento consistiu em 1 minuto de exercício a 110% da velocidade de fadiga do teste máximo em esteira, seguidos por 30 segundos a 40% desta, totalizando 30 min, cinco vezes por semana durante trinta e dois dias corridos. A suplementação de Creatina ocorreu durante todo o período de treinamento, duas horas antes do exercício. A água foi utilizada como veículo de infusão nos grupos A e C e uma solução de glicose a 10% no grupo B. Como resultado foi verificada uma melhoria no desempenho físico dos ratos em todos os grupos. Bem como uma maior expressão proteica do IGF-1R nos grupos treinados suplementados (B e C) quando comparados ao grupo treinado sem suplementação (A). Já os dados de glicemia, lactato e ganho de massa não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Conclui-se que o treinamento intervalado de alta intensidade se apresenta como uma boa opção para melhorias na performance física, e que a suplementação de Creatina está envolvida no aumento da expressão proteica do IGF-1R. Contudo o protocolo de treinamento e suplementação utilizados no estudo não se refletiram em diferenças nas análises glicemia, lactato e massa dos animais.

**Palavras-chave:** treinamento intervalado, Creatina, IGF-1R, IGF-1.



## ABSTRACT

The reduction in levels of physical activity in recent times, due to the increased use of new technologies and sedentary life, added to the excessive consumption of food, has promoted an epidemic of obesity and metabolic diseases. In contrast this way, is physical exercises. The interval exercise appears as a good option for getting good physical results, mainly, when people don't have enough time to do their training. Many sports such as football, volleyball, tennis and athletics, as well as the interval exercise, require athletes to compete, or simply practicing several times within a few days. These professional or amateur athletes train almost every day and need a dietary intervention to keep your energy level stable for training and matches appropriately, making use often, dietary supplements. Within this range of dietary supplements, Creatine is one of the most used resource for improving athletic performance, demonstrating increased strength and power, as well as increased lean mass, which may be related to the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) system or its cellular receptor IGF-1R.

The aim of this study was to analyze the impact of creatine supplementation along with high intensity interval training on protein expression of IGF-1R in muscle tissue, and analyzing blood concentrations of lactate and glucose, evaluate the performance of rats before and after interval training, examine the weight gain of the animals in different groups. Thirty-seven (37) male Wistar rats at 75 days at the beginning of the experiment were randomly divided into three groups: A (Trained without supplementation, 13 animals), B (Trained supplemented with creatine and Carbohydrate, 12 animals) and C (Trained supplemented with creatine, 12 animals). The training protocol consisted of a 1 minute to 110% of the test speed of fatigue,

followed by 30 seconds at 40% of this, totaling 30 minutes, five times a week for consecutive thirty-two days. The creatine supplementation occurred throughout the training period, two hours before the exercise, with water as a vehicle for infusion in groups A and C, and 10% glucose solution in group B. As a result we had improvement in physical performance of rats in all groups. As well as increased protein expression of IGF-1R in groups trained supplemented (B and C) when compared to the trained group without supplementation (A). Meanwhile, data from the glucose, lactate and mass gain did not differ significantly between groups. It is concluded that high-intensity interval training is presented as a good option to improve physical performance, and that creatine supplementation is involved in the increased protein expression of IGF-1R. The training and supplementation protocol used in the study were not reflected in differences in the analysis of IGF-1R, glucose, lactate and gain mass in the animals.

**Keywords:** interval training, creatine, IGF-1R, IGF-1.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

IGF-1	Fator de Crescimento semelhante à insulina - 1
IGF-1R	Receptor do fator de Crescimento semelhante à insulina - 1
IR	Receptor de insulina
TIAI	Treinamento intervalado de alta intensidade
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
Crea	Creatina
PCrea	FosfoCreatina
GLUT4	Transportador de glicose – 4
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do Crescimento
GH	Hormônio do Crescimento
PI3K	Fosfatidil inositol-3-quinase
JAK	Janus quinase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA
AKT	Serina-Treonina Kinase B/Proteína Kinase B
RNA	Ácido ribonucléico

mRNA      RNA mensageiro

UFRGS      Universidade Federal do Rio Grande do Sul

HCPA      Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ativação e rotas de sinalização do receptor do fator de Crescimento semelhante a insulina (IGF-1R) no músculo esquelético. Adaptado de Philippou, Halapas et al. 2007. ....29
- Figura 2. Esquema do experimento. ....35
- Figura 3. Peso corporal pré e pós protocolo de treinamento em ratos Wistar machos adultos. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p>0,05$ )..43
- Figura 4. Resultados obtidos no teste máximo em esteira rolante na análise de pré e pós treinamento de ratos Wistar machos adultos. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p<0,05$ ).....44
- Figura 5. Comparação da velocidade de teste na análise pós treinamento em ratos Wistar machos adultos. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p>0,05$ ).....45
- Figura 6. Dosagem de glicemia em ratos Wistar machos adultos antes e após teste máximo em esteira rolante. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p>0,05$ ).....46
- Figura 7. Dosagem de lactato sanguíneo em ratos Wistar machos adultos após teste máximo em esteira rolante. Os valores são apresentados como mediana (percentil 25 – 75) de unidades arbitrárias ( $p>0,05$ ).....47
- Figura 8: Expressão protéica do Receptor do IGF-1 (IGF-1R) em ratos Wistar machos após análise de Western blot. Os valores são apresentados como

média e desvio padrão de unidades arbitrárias (A vs B  $p=0,047$ ; A vs C  
 $p=0,043$ ).....48



## INTRODUÇÃO

A redução nos níveis de atividade física nos últimos tempos, devido ao aumento do uso de novas tecnologias e vida sedentária, agregado ao consumo excessivo de alimentos, tem promovido uma epidemia de obesidade e doenças metabólicas como a diabetes mellitus tipo 2 (O'Neill 2013). No contraponto deste caminho, está a realização de exercícios físicos. A prática de exercícios físicos está muito difundida atualmente para qualquer tipo de público e, do mesmo modo, amplamente exposta na mídia de uma maneira geral. Hoje em dia há revistas, programas de televisão e rádio, canais de televisão e sites na internet especializados no tema. Eventos de grande porte, como a copa do mundo de futebol e os jogos olímpicos, chamam a atenção de milhões de espectadores e movimentam quantias elevadas de dinheiro em patrocínios e cotas de imprensa. A prática de exercícios físicos é incentivada pelos governos em suas várias esferas, principalmente nos programas de atenção e promoção da saúde, baseados nas práticas corporais e de lazer e estilo de vida saudáveis (Saúde 2011). O exercício intervalado surge como uma boa opção para a obtenção de bons resultados físicos, principalmente, quando as pessoas possuem um tempo reduzido para a realização do seu treinamento.

Esta modalidade de exercício físico ocorre ao ar livre, em residências, ONGs, clubes, academias, praticada por atletas profissionais ou amadores. Estes treinam quase todos os dias e necessitam de uma intervenção dietética para manter estável a concentração de glicogênio intramuscular, permitindo a efetiva participação nos treinos e partidas. Para tal, fazem uso de suplementos alimentares como forma de manutenção dos níveis de energia estáveis (Yen, Tsao et al. 2013). Suplementos

dietéticos estão diariamente disponíveis, para atletas profissionais e amadores, e são comercializados com a premissa de melhorar o rendimento físico e o desempenho do atleta (Coletta, Thompson et al. 2013).

Dentro desta gama de suplementos alimentares a Creatina é um dos mais utilizados recursos para a melhoria do desempenho atlético (Taes, Delanghe et al. 2003; Bargieri, Vancini et al. 2005), demonstrando aumento de força e potência, bem como aumento de massa magra (Hespel, Op't Eijnde et al. 2001; Gualano, Artioli et al. 2008).

Porém, a origem do aumento de massa magra através da suplementação da Creatina ainda não está bem esclarecida, e pode ter relação com a situação anabólica da célula envolvendo o fator de Crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e os efeitos desencadeados por sua ligação no receptor específico (IGF-1R), promovendo os efeitos celulares (Deldicque, Louis et al. 2005).

Estes dados sugerem, portanto, uma necessidade em se investigar se os efeitos mostrados na literatura pela suplementação de Creatina, juntamente com o exercício físico, podem realmente ter conexão com a expressão do receptor de IGF-1 (IGF-1R).

### **Exercício intervalado**

O exercício intervalado é aquele que se caracteriza por promover períodos de intensidade alta ou máxima seguidos de períodos de baixa intensidade para recuperação (Vogiatzis, Nanas et al. 2002). Os picos de alta intensidade têm como

característica a predominância de rotas metabólicas anaeróbias (Dorado, Sanchis-Moysi et al. 2004) e a recuperação é baseada nas fontes aeróbias.

Neste tipo de exercício, é possível obter benefícios similares aos oferecidos pelo treinamento de intensidade moderada (Talanian, Galloway et al. 2007). Porém, em indivíduos saudáveis, é possível impor carga máxima nos músculos e no transporte de oxigênio (Vogiatzis, Terzis et al. 2005). Este tipo de exercício oferece uma melhor relação tempo-eficiência, sendo uma ótima opção para pessoas que precisam otimizar o seu dia pois não tem muito tempo sobrando e querem resultados eficazes (Gillen, Little et al. 2012).

O treinamento intervalado de alta intensidade (TIAI), que nada mais é do que o exercício intervalado realizado de maneira Crônica e com planejamento, induz profundas mudanças no músculo esquelético (Burgomaster, Hughes et al. 2005) assim como também muitas adaptações fisiológicas no músculo (Little, Safdar et al. 2010). Ele pode aumentar o conteúdo de proteínas transportadoras de ácidos graxos tanto no sarcolema quanto na mitocôndria, permitindo uma maior oxidação de ácidos graxos (Talanian, Holloway et al. 2010), pois também aumenta a quantidade de enzimas oxidativas no músculo, permitindo uma máxima capacidade oxidativa mitocondrial (McKay, Paterson et al. 2009).

O desempenho físico, também chamado de performance, no exercício é melhorado com o treinamento intervalado de alta intensidade (McKay, Paterson et al. 2009; Little, Safdar et al. 2010), verificando-se um aumento no consumo máximo de oxigênio e melhora no condicionamento aeróbio ( $VO_{2máx}$ ) (Weber and Schneider 2002; Haram, Kemi et al. 2009).

O exercício intervalado de alta intensidade, assim como vários outros exercícios, também é investigado no sentido de verificar os seus efeitos em variáveis clínicas, mostrando-se um importante aliado para o tratamento de algumas doenças apresentando melhora na função muscular, diminuição da hipertensão e melhora da função endotelial (Haram, Kemi et al. 2009). Esta modalidade de exercício mostra-se também um importante mecanismo de controle dos efeitos deletérios da síndrome metabólica (Haram, Kemi et al. 2009; Drago and Junior 2010).

### **Creatina**

A Creatina (Crea) é um aminoácido não proteogênico que é encontrado principalmente em carnes e peixes. Uma dieta normal fornece cerca de 1g de Creatina diária, sendo que também é sintetizado aproximadamente 1g por dia pelo fígado, rins e pâncreas, através dos aminoácidos glicina, arginina e metionina (Bemben and Lamont 2005; Vieira, Duarte et al. 2007; Little, Safdar et al. 2010). A Creatina é encontrada principalmente no músculo esquelético (~95%), sendo aproximadamente 40% da Creatina encontrada na forma livre e 60% na forma de fosfocreatina (PCrea) (Franco 2007).

A fosfocreatina celular, juntamente com seu ATP é conhecida como sistema energético do fosfagênio. Em conjunto, podem proporcionar uma potência muscular máxima por um período de 8 a 10 segundos, quase o suficiente para uma corrida de 100 metros. Assim, a energia proveniente do sistema do fosfagênio é utilizada para os curtos picos máximos de potência muscular (Graham and Hatton 1999).

Uma vez dentro da célula, a Creatina é fosforilada a fosfocreatina, durante o repouso, pela enzima Creatina quinase. Esta enzima possui cerca de 400 aminoácidos com massa molecular de 75 a 91 kDa e 306 a 380 kDa, conforme a isoforma (Gasper and Gilchrist 2005). A Creatina quinase é encontrada na maioria dos tecidos que utilizam energia para o desempenho de suas funções fisiológicas como o músculo esquelético, o músculo cardíaco e o cérebro (Wallimann 1994).

A Creatina quinase catalisa a transferência reversível do fosfato rico em energia da fosfocreatina (PCrea) para o adenosina difosfato (ADP) originando adenosina trifosfato (ATP) e Creatina (Crea), sendo uma enzima dependente do Magnésio. Trata-se de um processo reversível que garante a manutenção contínua do ATP nos tecidos ou células (Gasper and Gilchrist 2005). A suplementação de Creatina é capaz de reservar o glicogênio muscular armazenado após exercício intermitente de alta intensidade e também pode reduzir a concentração de lactato sanguíneo após o mesmo tipo de exercício (Roschel, Gualano et al. 2010). A energia produzida no interior da mitocôndria é transferida para o citosol pela PCrea, que atua como um carreador energético que liga o local de produção de energia e o local de sua utilização por meio de compartimentos celulares que contém a Creatinaquinase. O aumento da demanda energética, produzida pelo exercício intervalado, requer um controle eficaz da sua produção e/ou transferência (Pilla 2003).

Pelo seu importante papel nos exercícios intensos e máximos a Creatina poderia oferecer benefícios aos praticantes de atividades físicas e esportes que utilizam sessões curtas de alta intensidade como: corridas curtas (ex. 100m rasos), natação e ciclismo. Também em esportes onde ocorrem vários momentos de alta intensidade como: o futebol, o rúgbi e o hóquei (Casey and Greenhaff 2000). O

treinamento de potência juntamente com a suplementação de Creatina durante cinco dias aumenta também a massa magra e fortalece o tecido ósseo, reduzindo o percentual de gordura, sem alteração no percentual de água (Izquierdo, Ibanez et al. 2002). Além disso, a suplementação desta (cinco dias/ semana, 20g/dia) aumenta a concentração de Creatina total e fosfocreatina, reduzindo as taxas de oxidação de leucina, o que sugere que a suplementação de Creatina pode promover uma ação anticatabólica em alguns tecidos (Parise, Mihic et al. 2001).

A suplementação com Creatina tem recebido importante atenção dos médicos e fisiologistas, pois alguns benefícios são relatados quando se faz uso desta. Por exemplo, em pacientes com doenças neurodegenerativas há uma melhoraria na função cerebral (Taes, Delanghe et al. 2003). A melhora da função cerebral e os níveis de Creatina maiores no cérebro correspondem a um melhor reconhecimento da memória e a redução da suplementação gera fadiga mental (Rae, Digney et al. 2003).

A suplementação de Creatina também é capaz de atenuar o efeito deletério muscular causado pelo uso de corticosteroides em ratos (Menezes, Sobreira et al. 2007). Períodos maiores de suplementação com Creatina propiciam um aumento na força e velocidade de contração e menor fadiga em exercícios intermitentes de alta intensidade. Estes resultados também são acompanhados pelo aumento no consumo de oxigênio e um maior fluxo sanguíneo (Jager, Metzger et al. 2008). Assim, pacientes com artrite reumatoide também podem ser seguramente tratados com suplementação de Creatina, gerando bons ganhos de força muscular (Willer, Stucki et al. 2000).

Estudos também mostram a importância da suplementação de Creatina na diminuição dos danos musculares causados pelo aumento da idade, principalmente quando estão associados aos exercícios resistidos. Além de ser uma forma segura e barata de intervenção nutricional também em idosos (Dalbo, Roberts et al. 2009).

A recuperação muscular após exercícios isocinéticos é significativamente melhor com a suplementação de Creatina e carboidratos do que somente com carboidratos (Cooke, Rybalka et al. 2009) e a suplementação de Creatina aumenta a recuperação da massa muscular também após um período de imobilização (Hespel, Op't Eijnde et al. 2001).

Em cultura de células L6 (mioblastos) de ratos verificou-se, após 48h de tratamento com Creatina, um aumento na oxidação da glicose e diminuição da produção de lactato. Também foi possível observar um aumento na atividade do AMPK e do GLUT4 e no conteúdo de glicogênio (Ceddia and Sweeney 2004). Também a suplementação de Creatina durante três semanas é capaz de promover um aumento na expressão gênica do GLUT4 além de apresentar aumento na fosforilação de AMPK em músculos esqueléticos de ratos (Ju, Smith et al. 2005).

A suplementação de Creatina é capaz de aumentar a expressão de diversos genes em células musculares (Deldicque, Atherton et al. 2008), suprarregulando o teor de mRNA de genes e o conteúdo de proteínas cinases envolvidos na transdução de sinal, remodelamento do citoesqueleto, regulação da síntese de glicogênio e proteínas, proliferação e diferenciação de células satélites, reparação e replicação de DNA, controle da transcrição de RNA, e sobrevivência celular (Safdar, Yardley et al. 2008).

## **Carboidrato**

A ingestão de alimentos ou suplementos ricos em carboidratos já é bem difundida por aumentar os estoques de glicogênio corporais e por ter como característica o aumento do tempo total de exercício até a fadiga (Costill and Hargreaves 1992). Já a depleção destes estoques pode ser um fator limitante na duração do exercício (Hill, Stathis et al. 2013).

Devido à bem conhecida relação entre a depleção dos estoques de glicogênio e diversas alterações corporais negativas, a utilização de carboidratos possivelmente seja a mais antiga forma de suplementação conhecida (Kerksick, Harvey et al. 2008).

A suplementação de carboidratos juntamente com o exercício intervalado mostra uma eficiência na manutenção da glicemia durante a realização do exercício, e a glicose suplementada parece ter um efeito poupador dos estoques de glicogênio muscular (Giesel, Reche et al. 2009). E alguns estudos mostram um efeito ergogênico da suplementação de carboidratos em exercícios de alta intensidade (Jeukendrup 2004).

O exercício físico, assim como a insulina, aumenta a taxa de captação de glicose pelo músculo esquelético através da translocação do GLUT4 para a membrana celular, realizando um efeito controlador da glicemia. Além disso, o exercício físico aumenta a síntese de glicogênio muscular através da contração muscular, o que sustenta melhor ainda a ideia da suplementação de carboidratos (O'Neill 2013). A suplementação de carboidratos juntamente com a Creatina se deve ao fato de trabalhos mostrarem que desta forma obtém-se um aumento na captação da Creatina pela célula muscular, possibilitando maior estoque intramuscular de



Creatina. Isto ocorre devido ao aumento na secreção de insulina após a ingestão de carboidratos. A insulina parece estar envolvida diretamente nos processos de captação de Creatina pela proteína transportadora de Creatina na membrana plasmática, estimulando a sua captação (Snow and Murphy 2003).

Outro fator importante que tem sido relacionado à ingestão de carboidratos, através de alimentos ou suplementos esportivos é que este método tem demonstrado significativas alterações na resposta imunológica ao exercício intenso ou de longa duração (Carlson, Kenefick et al. 2013).

## **IGF-1**

O fator de Crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) é uma cadeia simples polipeptídica formada por 70 aminoácidos estruturalmente similar à insulina. Este hormônio age tanto de maneira endócrina quanto autócrina e parácrina (Hwang, Yoo et al. 2004; Nindl 2009). O gene do fator de Crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) originalmente chamado de somatomedina C, abrange uma região com cerca de 90 kb do DNA genômico, localizado no braço longo do Cromossomo 12 e contém seis éxons (Kim, Lajara et al. 1991).

O IGF-1 medeia suas ações através do seu receptor IGF-1R1a (Perrini, Laviola et al. 2010), tendo diversas ações celulares, dependendo das reações que acontecerem na sua cascata de sinalização, podendo agir na proliferação, síntese proteica (hipertrofia), sobrevivência (inibição de apoptose) e diferenciação (Philippou, Halapas et al. 2007). Além disso, o IGF-1 está envolvido na alteração do tipo de fibra muscular (Yang, Alnaqeeb et al. 1997), Crescimento e sobrevivência em

cardiomiócitos (Davis 2005), neurogênese e efeito neuroprotetivo (Sharma, Prasanthi et al. 2008), e regeneração periférica nervosa (Hwang, Yoo et al. 2004).

A regulação central do IGF-1 reside no hipotálamo, que produz o hormônio liberador do hormônio do Crescimento (GHRH) em resposta a diversos estímulos, como o sono, exercício e jejum, ou somatostatina, além do ritmo de secreção de 24h (Paula and Czepielewski 2008). A liberação do GHRH estimula a secreção do hormônio do Crescimento (GH) pela hipófise anterior (Arnaldez and Helman 2012). A concentração de IGF-1 sérico é dependente da produção do IGF-1 pelo fígado, sendo esta mediada pela ação do hormônio do Crescimento (GH), o qual também exerce efeitos no Crescimento, diferenciação e metabolismo intermediário (Sun, Al-Regaiey et al. 2005), e estimula a produção de IGF-1 pelo fígado após a ligação do GH com seu receptor específico neste órgão (Rakpongsiri and Sawangkoon 2009; Perrini, Laviola et al. 2010). Porém, a produção de IGF-1 também pode ocorrer localmente em alguns tecidos, como o músculo esquelético, em resposta à estimulação mecânica muscular, sendo conhecido como *mechano growth factor* (MGF) (Machida and Booth 2004; Goldspink 2005). Esta é uma forma derivada do gene do IGF-1 por um *splicing* alternativo, e não é dependente do GH e IGF-1 circulantes (Barton 2006). As isoformas do IGF-1 também são representadas como IGF-1Ea (IGF-1 sérico produzido no fígado) e IGF-1Ec (ou MGF, produzido no músculo).

A produção de diferentes isoformas através de um *splicing*, provavelmente indica seus diferentes papéis biológicos, principalmente no tecido muscular, seguindo diferentes estímulos ou diferentes condições impostas (Philippou, Maridaki et al. 2007). A interação do MGF e fatores moleculares da resposta imunológica, por

exemplo, são importantes para determinar o curso de uma lesão muscular, reparo e remodelamento (Pelosi, Giacinti et al. 2007).

A insulina também pode aumentar indiretamente a produção de IGF-1 pelo fígado, pois estimula uma *upregulation* do receptor de GH no fígado (Gallagher and LeRoith 2011). Além disso, uma situação de hiperinsulinemia pode aumentar a quantidade de IGF-1 biodisponível (livre), pois pode diminuir os níveis de proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) 1 e 3 (Frystyk, Vestbo et al. 1995; Grinspoon, Clemmons et al. 1995).

## **IGF-1R**

O receptor de IGF-1 (IGF-1R) é o responsável por mediar as ações do IGF-1. Este receptor é um receptor tirosina quinase transmembrana (RTK). O gene do IGF-1R é localizado no Cromossomo 15q26 e codifica um simples polipeptídeo de 1367 aminoácidos, os quais são constitutivamente expressos na grande maioria das células. O IGF-1R e o receptor de insulina (IR) compartilham aproximadamente 70% de homologia dos aminoácidos (Riedemann and Macaulay 2006).

Tanto o IGF-1R, quanto o IR, são compostos por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ) extracelulares que são ligadas cada uma a uma subunidade beta ( $\beta$ ) e uma a outra por ligações dissulfeto. A subunidade  $\beta$  contém porções extracelular, transmembrana e citoplasmática, sendo que a subunidade  $\alpha$  contém o sítio de ligação do IGF-1, e a atividade tirosina quinase se encontra na subunidade  $\beta$ . O IGF-1R forma um tetrâmero ( $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ ) (Riedemann and Macaulay 2006; Clemmons 2009; Arnaldez and Helman 2012; Xue, Cao et al. 2012). Também existem receptores

híbridos que são compostos pela metade do IR e metade do IGF-1R, IR $\alpha\beta$  ligado à IGF-1R $\alpha\beta$  (Arnaldez and Helman 2012). O IGF-1 liga ao IGF-1R com grande afinidade, todavia tanto o IGF-2 quanto a insulina podem se ligar ao IGF-1R, porém com menor afinidade (Philippou, Halapas et al. 2007).

A ligação do IGF-1 à subunidade  $\alpha$  do IGF-1R desencadeia uma mudança conformacional que causa ativação do domínio catalítico da porção citoplasmática da subunidade  $\beta$ , causando autofosforilação e transfosforilação nos resíduos de tirosina (1131, 1135 e 1136), que aumentam a atividade tirosina quinase do receptor, seguidos por fosforilação de tirosinas justamembranas e serinas carboxi-terminal (Favelyukis, Till et al. 2001; Riedemann and Macaulay 2006). Estes eventos levam ao recrutamento de proteínas adaptadoras como IRS, CREAK e SHC. A cascata de sinalização é realizada principalmente por três caminhos diferentes: o caminho da MAPK/Ras-Raf-Erk, o caminho da PI3K/AKT/mTOR, e o caminho da Jak/STAT (Arnaldez and Helman 2012). Dependendo do caminho seguido pela cascata de sinalização, a ativação do IGF-1R age, em suma, nos fatores de proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (Philippou, Halapas et al. 2007). O caminho da MAPK aumenta a proliferação celular, entretanto for ativado o caminho do fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K) ocorre inibição de apoptose e síntese proteica, e se o caminho ativado for o da janus quinase (Jak) ocorre a ativação da transcrição de genes e pode ser responsável pela transformação da atividade do IGF-1R (Figura 1) (Philippou, Halapas et al. 2007; Gallagher and LeRoith 2011).

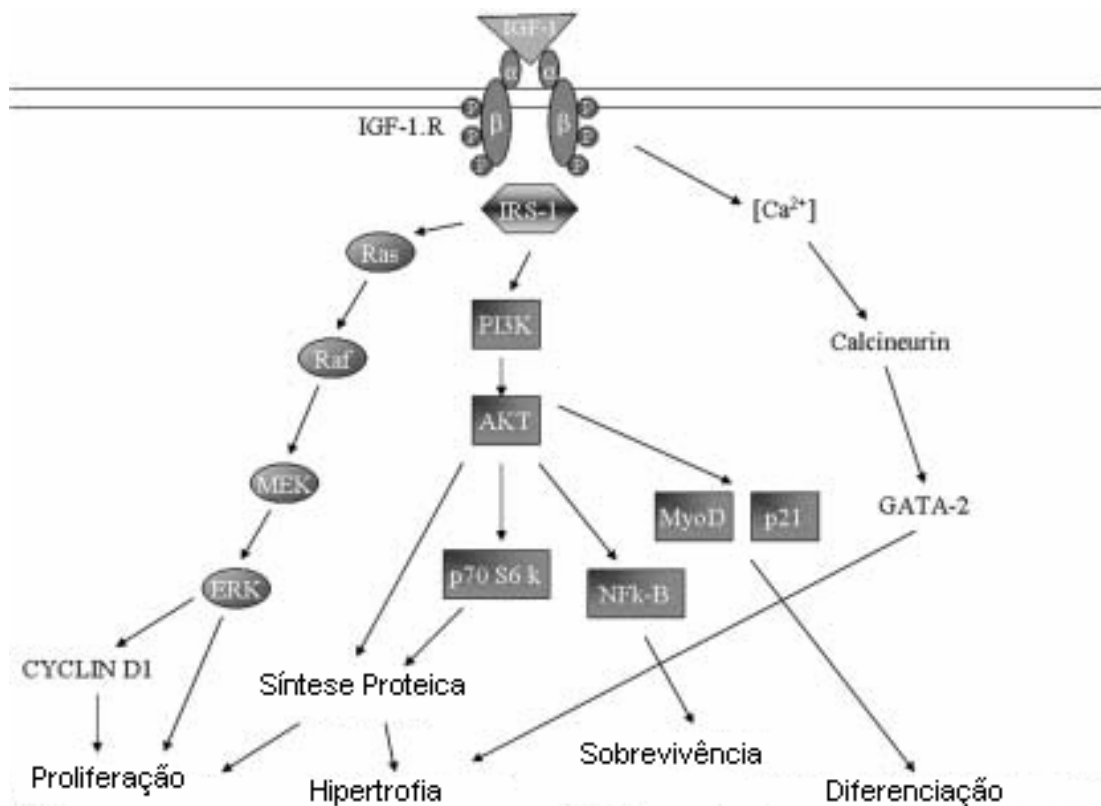


Figura 1. Ativação e rotas de sinalização do receptor do fator de Crescimento semelhante a insulina (IGF-1R) no músculo esquelético. Adaptado de Philippou, Halapas et al. 2007.

Já é bem esclarecido que vários tipos de exercício induzem ao aumento do IGF-1, IGF-1R e da cascata de sinalização de ativação do IGF-1 no músculo esquelético (Willis, Chadan et al. 1997; Adamo and Farrar 2006). Aumentos no mRNA do IGF-1R e na sua expressão proteica têm sido encontrados em resposta a sessões agudas de exercícios aeróbios (Willis, Chadan et al. 1997) e crônicas de exercícios resistidos (Owino, Yang et al. 2001), e treinamento de resistência (Willis, Chadan et al. 1998).

## HIPÓTESES

- A expressão de IGF-1R muscular será maior nos ratos suplementados;
- Os grupos suplementados terão valores menores de lactacidemia e glicemia;
- O desempenho no teste máximo em esteira rolante após o treinamento intervalado será melhor e terá aumentos mais significativos nas velocidades nos ratos dos grupos suplementados.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Verificar o impacto da suplementação de Creatina e carboidrato juntamente com o treinamento intervalado de alta intensidade na expressão proteica de IGF-1R no tecido muscular.

### **Específicos**

- Analisar a concentração de lactato no sangue após teste máximo;
- Analisar a concentração de glicose no sangue, antes e após teste máximo;
- Avaliar a performance dos ratos antes e após o treinamento intervalado;
- Avaliar o ganho de massa dos animais nos diferentes grupos;

## MATERIAS E MÉTODOS

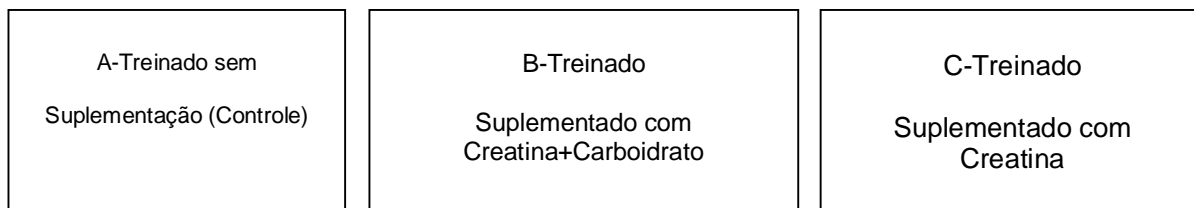
### Delineamento

Trata-se de um estudo experimental randomizado.

### População e Amostra

Trinta e sete (37) ratos Wistar machos foram usados nos experimentos. Os animais tinham 75 dias no começo do experimento.

Os ratos foram aclimatados, desde o nascimento, a uma temperatura ambiente de 22°C ( $\pm 2^\circ$ ). O ciclo de luz invertido 12 h/12 h, foi iniciado 20 dias antes do início do experimento. Os animais foram mantidos com ração e água à vontade, e permaneceram em cinco animais por caixa. Os mesmos foram randomizados para a divisão em três grupos treinados. Os três grupos ficaram divididos da seguinte maneira: grupo “A” treinado sem suplementação ou controle (13 animais), o grupo “B” treinado suplementado com Creatina e carboidrato (12 animais), e o grupo “C” treinado suplementado com Creatina (12 animais). Assim ficando constituídos os grupos:





No primeiro dia (01) do experimento todos os ratos, ainda sem treinamento e suplementação, foram submetidos à pesagem e a uma coleta de sangue do plexo reto-orbital de 1,5 mL, os animais foram anestesiados com isoflurano. Após estes procedimentos, os ratos foram randomizados para a distribuição nos grupos através do site [www.random.org](http://www.random.org).

Os animais passaram por uma habituação em esteira. O protocolo de habituação consistiu de quatro (4) dias consecutivos com 10, 20, 25 e 30 min/dia de treinamento em esteira, respectivamente. O treinamento ocorreu durante trinta dias consecutivos (sempre no escuro), cinco vezes por semana, durante trinta (30) minutos por dia, para todos os ratos.

Após esta etapa de adaptação, no dia 06, todos os animais foram submetidos ao teste máximo em esteira para determinação da velocidade máxima até a fadiga (VF), seguindo o protocolo no qual a velocidade é incrementada em 0,3 km/h a cada três minutos (Brooks and White 1978), este protocolo possui correlação significativa com o consumo de oxigênio  $VO_2$ , o que nos dá uma validade e fidedignidade maior para a prescrição do treinamento aos animais (Rodrigues, Figueroa et al. 2007). Após a realização do teste, os percentuais de intensidade foram calculados e, no dia 07, os ratos foram mantidos nas gaiolas para recuperação. No dia 08 foi iniciado o treinamento concomitante com a suplementação dos animais que pertenciam aos grupos suplementados. A administração oral de água 2mL (grupo sem suplementação, A), solução de glicose 10% 2mL + Creatina (grupo suplementado com Creatina e carboidrato, B) ou água 2mL + Creatina (grupo suplementado com Creatina, C) foi realizada por gavagem utilizando uma seringa, duas (2) horas antes do exercício. O protocolo de exercício nos trinta e dois dias de treinamento consistiu

de 1 min de corrida a 110% da velocidade de fadiga (VF) obtida no teste, seguidos de 30 s de recuperação a 40% da VF, de forma intervalada, num total de 30 min, para todos os ratos.

No dia 40 do experimento, o qual finalizou os trinta e dois dias de treinamento, realizou-se um re-teste máximo na esteira, a fim de medir o desempenho dos animais após o treinamento intervalado, neste dia também foram feitas as medidas de glicemia antes e após o teste na esteira, e o lactato sérico somente após o teste. A importância da medição de glicemia e do lactato sérico se dá principalmente pelo fato de evidências recentes mostrarem que a suplementação de Creatina pode promover uma diminuição nos níveis de glicemia, sugerindo uma maior síntese de glicogênio muscular e sua maior utilização, promovendo uma oxidação mais eficiente da glicose e diminuição da produção de lactato, com consequente melhora no rendimento físico (Souza 2006).

No último dia do experimento (dia 41), os animais foram mortos por decapitação em guilhotina, para coleta de sangue e tecido muscular. As coletas ocorreram entre 9h e 12h. O sangue foi coletado em tubos de ensaio pelo corte da decapitação, em seguida, realizou-se a cirurgia para retirada de uma amostra do músculo gastrocnêmio. Para as análises referentes à musculatura, utilizamos a porção branca do músculo gastrocnêmio, pois é um músculo que tem predominância de fibras do tipo 2 e apresenta um bom aumento na quantidade de Creatina total e fosfoCreatina, após suplementação com Creatina (McMillen, Donovan et al. 2001).

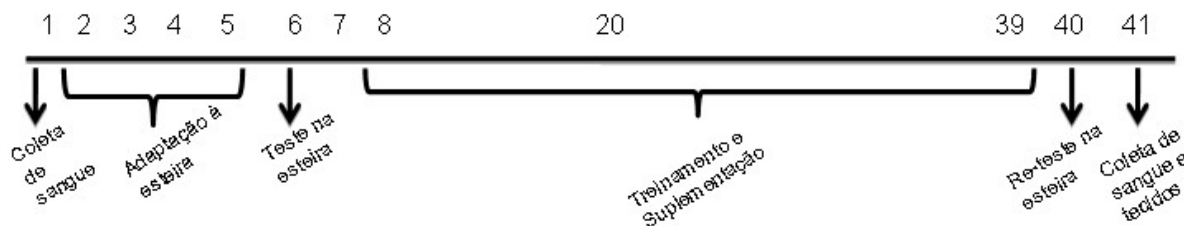


Figura 2. Esquema do experimento.

A amostra de músculo foi congelada em nitrogênio líquido e, após, estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O sangue foi mantido sob refrigeração durante a noite e no dia seguinte foi centrifugado e o plasma estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O tecido muscular armazenado foi submetido posteriormente ao protocolo de Western blotting para a determinação de expressão proteica de IGF-1R local. Este protocolo foi realizado no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular (LaGOM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### Suplementação com Creatina

A suplementação foi realizada por meio de uma sonda oro-esofágica (1 mm de diâmetro; 3 cm de comprimento) adaptada a uma seringa de 5 mL, tendo a água como veículo de infusão no volume de 2 mL para o grupo treinado sem suplementação (A), uma solução de glicose a 10% no volume de 2 mL para o grupo treinado suplementado com Creatina e carboidrato (B), e água como veículo de infusão no volume de 2 mL para o grupo treinado suplementado com Creatina (C). Este procedimento (gavagem) ocorreu diariamente duas horas antes do treinamento

físico (Souza 2006). Foi instituída, durante a primeira semana do experimento, chamada de fase de carga, a dose de 0,430 g de Crea/kg de massa corporal do animal e, nos dias restantes do experimento a dose foi de 0,073 g de Crea/kg de massa corporal do animal para todos os animais suplementados, chamada de fase de manutenção (Brannon, Adams et al. 1997; Op 't Eijnde, Urso et al. 2001; Tarnopolsky, Bourgeois et al. 2003). As dosagens pesquisadas nas referências variam bastante, desde doses menores 0,43 g até 5 g/kg de peso corporal (Souza 2006; Franco 2007).

Para facilitar a absorção do suplemento e minimizar qualquer risco de contaminação do produto foi utilizada a Creatina micronizada (Universal Nutrition CreaPure).

### **Protocolo de treinamento**

Os treinamentos tiveram como característica 1 min de exercício a 110% da velocidade do teste, seguidos por 30 segundos de recuperação a 40% da velocidade do teste (Giesel, Reche et al. 2009), totalizando 30 min. Caracterizando assim o exercício intervalado de alta intensidade, tendo sido realizado a partir das 11 h da manhã. O treinamento ocorreu cinco vezes por semana durante trinta e dois dias.

### **Determinação da glicose e do lactato séricos**

Os níveis de glicose foram determinados através do medidor de glicose e tiras Accutrend Plus. O lactato também foi determinado com o auxílio do aparelho

Accutrend Plus. Este aparelho é propriedade da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Extração de proteínas**

Foi adicionado a cada 0,06 g de tecido muscular, 300µL de RIPA (uma solução tampão de lise contendo 50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e 2 mM de  $\text{NaVO}_4$ , 0,1% Triton X-100 e leupeptina. As amostras foram trituradas com o homogeneizador OMNI por 15 a 30 s no gelo para lise celular. A seguir, foram centrifugadas a 8000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi estocado a -20°C.

### **Análise de Concentração de Proteínas**

A análise da concentração de proteínas das amostras foi realizada pelo método modificado de Bradford (Burgomaster, Hughes et al. 2005), padronizado com albumina.

### **Análise de proteínas**

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE com uma concentração de poliacrilamida de 8% (Vogiatzis, Terzis et al. 2005). Foi utilizado 40 µg de proteína extraída das amostras, as quais foram incubadas com solução de Laemmli (30% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris, 750 mg DTT e 0,001% azul de bromofenol) a

95°C por 2 min (Laemmli 1970), e colocadas em cada poço. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo 192 mM glicina; 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por 2 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência (Semidry Biorad®) em contato com a membrana de nitrocelulose, coberto com tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 10% metanol, pH 8,3). A transferência foi efetuada por 1 h, com uma diferença de potencial elétrico de aproximadamente 25 V. As membranas de nitrocelulose foram então incubadas durante 2 h em solução bloqueadora (TTBS), contendo 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,4, acrescido de 5% de leite em pó (Molico, Nestlé) para saturar sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose foram incubadas por, no mínimo, 16 h a 4°C sob agitação constante, com o anticorpo específico para cada proteína diluídos em TTBS e 2,5% de albumina. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS (3 lavagens de 10 min cada) e então incubadas com o segundo anticorpo específico por 2 h. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05%, pH 7,4) (3 lavagens de 10 min cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimioluminescência (*ECL Western Blotting Substrate - Promega*) por 1 min.

## **Revelação das Autorradiografias**

Após a incubação com solução para quimioluminescência, as membranas de nitrocelulose foram colocadas em contato com o filme fotográfico (*High Performance Chemiluminescence Film – Amersham*) durante 1-5 min. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 min; lavado com água e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. Após a revelação, foram realizadas as análises dos resultados. A densidade óptica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem (fotodocumentador Image Station IS 4000MM Pro®). A densitometria obtida para cada banda foi avaliada, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias.

Os anticorpos secundários utilizados foram: rabbit anti-mouse (Invitrogen; e goat anti-rabbit (Millipore).

## **Análise Estatística**

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a distribuição das variáveis analisadas. Os dados que apresentaram distribuição normal (paramétricos) foram representados por média  $\pm$  desvio padrão (massa, performance, glicemia e IGF-1R). Já os dados que não apresentaram uma distribuição normal (não paramétricos) foram representados por mediana e intervalo interquartis (lactato).

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar as médias entre os grupos, sendo realizado um teste Post Hoc de Tukey HSD. Já o teste *t* pareado foi utilizado para a análise das médias em dois tempos diferentes dentro de cada grupo.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a análise das medianas entre os grupos.

Para todos os testes, as diferenças encontradas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram feitas através do processador de dados SPSS 18.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Para um desvio padrão de 0,40 do grupo treinado suplementado com Creatina e carboidrato, e de 0,25 no grupo treinado sem suplementação, encontrando uma diferença de 0,38 em um tamanho amostral de 12 animais por grupo, o poder foi de 78%.

### **Aspectos éticos e de biossegurança**

Este trabalho foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado de acordo com o protocolo de número 110345 de 2011, e foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e do COBEA (Código Brasileiro de Experimentação Animal) - 1988, concordando com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH). O laboratório onde foram realizados os experimentos é credenciado no CNEN (AP-0875), e cumpre a legislação recomendada (Lei nº 11.794/08).



A higienização dos insumos utilizados com os animais foi sempre realizada com detergente clorado e água quente (aproximadamente 70°C para as caixas dos animais). Os bebedouros e grades foram submetidos a processo de esterilização por calor seco e a maravalha foi esterilizada em autoclave a vapor.

Quanto ao uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) foram utilizados os propés e gorro para acessar a Unidade de Experimentação Animal. O uso de avental exclusivo e luvas foram exigidos quando havia manipulação de animais. Máscaras e óculos foram utilizados quando havia risco de contaminação por sangue e secreções.

As carcaças dos animais foram congeladas em sacos plásticos, identificados com os procedimentos a que foram submetidas, e armazenadas a -20°C. Diariamente, os animais de descarte e produtos oriundos das pesquisas assim como os dejetos dos animais foram recolhidos por empresa terceirizada (Aborgama), que atende o HCPA, obedecendo às normas vigentes para descarte de material biológico.

### **Locais de realização do projeto**

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS e no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, instalado no Centro de Pesquisa do HCPA, que dispõem da infra-estrutura para a execução dos procedimentos para a análise proteica.

## **Fontes de Financiamento**

Este projeto contou com financiamento parcial do FINE-HCPA e CNPq.

## RESULTADOS

### Massa Corporal

Todos os animais ganharam massa corporal durante o período de realização do experimento. Porém, tanto nas análises dentro de cada grupo, quanto na comparação entre os diferentes grupos, não houve diferença significativa.

Os valores apresentados na figura abaixo, como média  $\pm$  desvio padrão, referem-se ao primeiro e último dia de experimento.

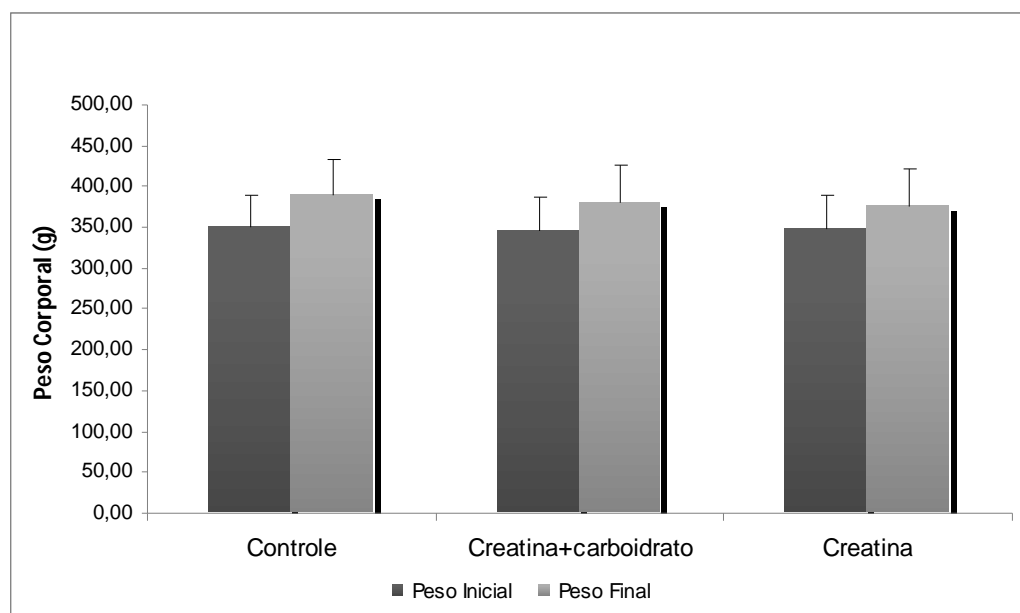


Figura 3. Massa corporal pré e pós protocolo de treinamento em ratos Wistar machos adultos. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p > 0,05$ ).

### Performance Pareada

A figura abaixo apresenta o resultado da análise pareada de cada grupo em dois tempos diferentes, antes do protocolo de treinamento e depois do protocolo de

treinamento. Mostrando uma diferença na performance pré e pós treinamento intervalado de alta intensidade, na comparação das médias de cada grupo antes e depois.

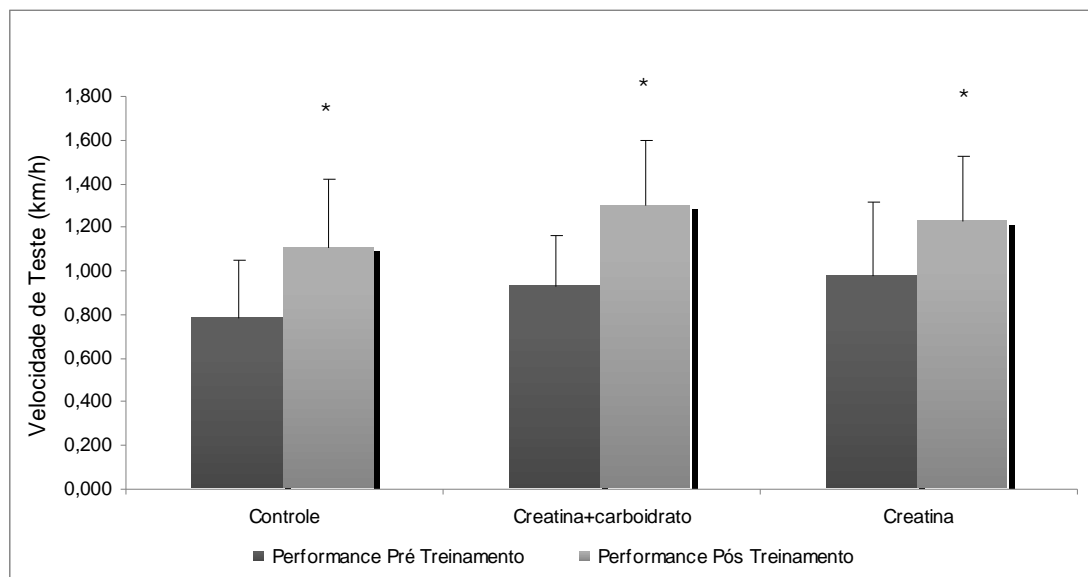


Figura 4. Resultados obtidos no teste máximo em esteira rolante na análise de pré e pós treinamento de ratos Wistar machos adultos. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p < 0,05$ ).

### Performance pós-treinamento

Na análise da comparação das velocidades atingidas por cada grupo após o protocolo de treinamento, não houve diferença entre os grupos. Os dados são apresentados na figura abaixo.

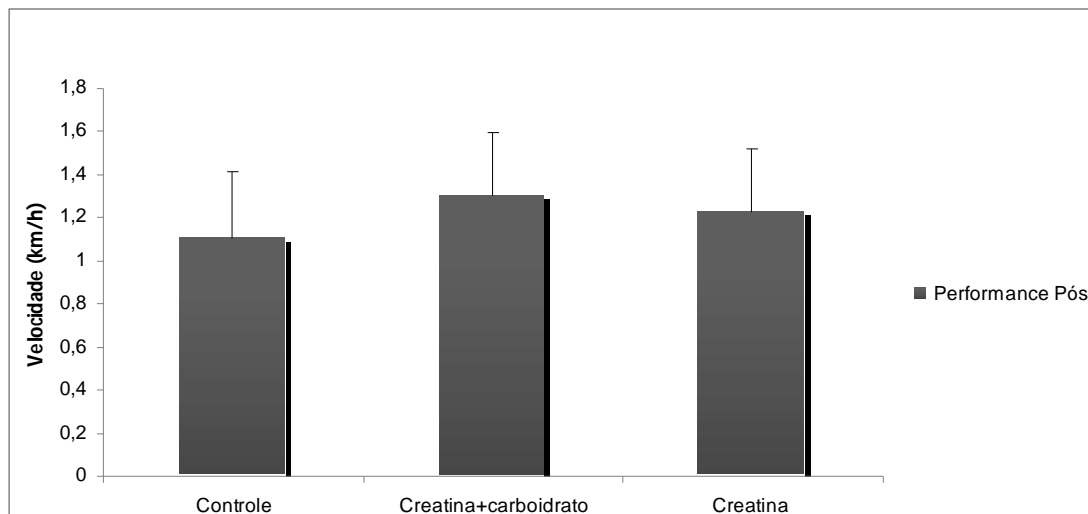


Figura 5. Comparação da velocidade de teste na análise pós treinamento em ratos Wistar machos adultos. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p > 0,05$ ).

## Glicemia

A análise de glicemia nos grupos não apresentou diferença, tanto na análise pareada, quanto na análise entre os grupos. Os valores apresentados referem-se aos dados coletados antes e imediatamente depois da realização do último teste máximo em esteira rolante.

Os dados estão apresentados na figura abaixo.

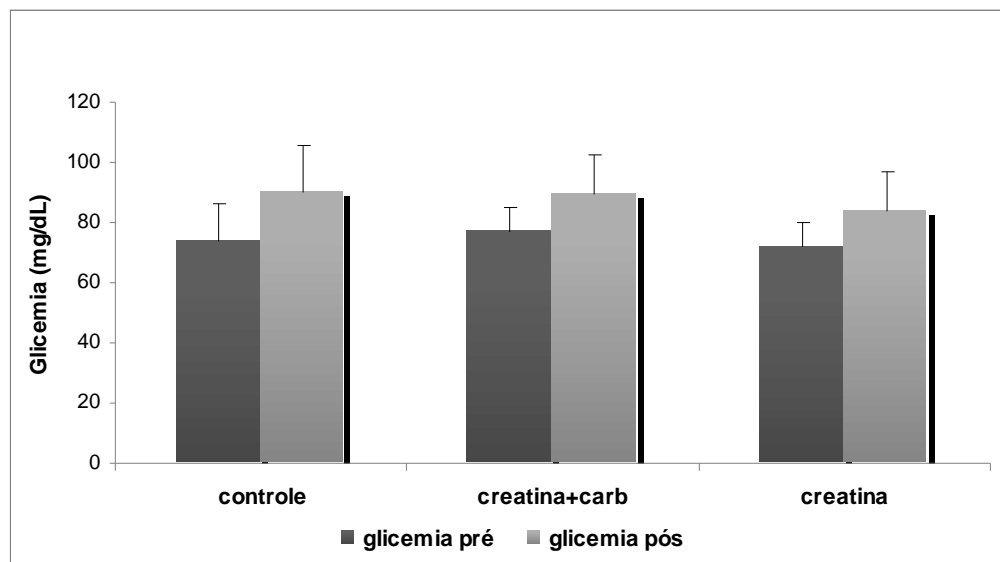


Figura 6. Dosagem de glicemia em ratos Wistar machos adultos antes e após teste máximo em esteira rolante. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p > 0,05$ ).

## Lactato

Os valores das medianas das concentrações sanguíneas de lactato estão apresentados na figura abaixo. Os dados referem-se à coleta realizada imediatamente após o término do último teste máximo realizado em esteira rolante.

Não houve diferença nos valores na comparação entre os grupos.

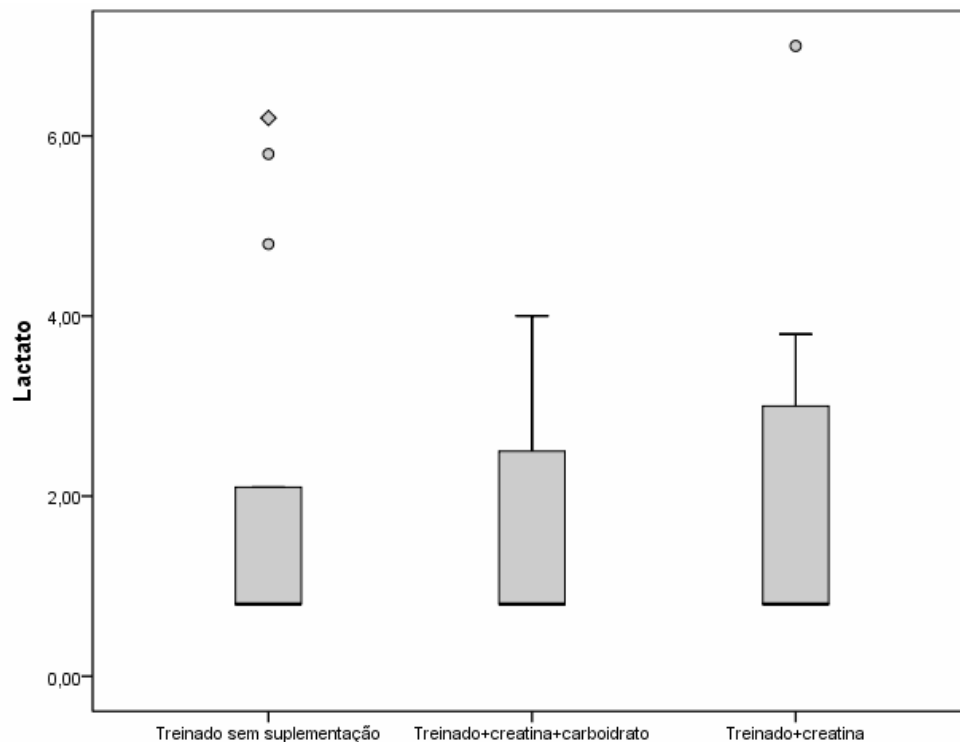


Figura 7. Dosagem de lactato sanguíneo em ratos Wistar machos adultos após teste máximo em esteira rolante. Os valores são apresentados como mediana (percentil 25 – 75) de unidades arbitrárias ( $p > 0,05$ ).

## IGF-1R

Os valores das médias da expressão protéica do receptor do IGF-1 (IGF-1R) estão apresentados na figura 8. Os dados referem-se à análise de Western blot realizada no músculo gastrocnêmio (porção branca). A  $\beta$ -tubulina foi utilizada como normalizador da amostra. Os dados são representados pela expressão do IGF-1R divididos pela expressão da  $\beta$ -tubulina. Houve diferença significativa entre os grupos treinados suplementados (B e C) e o grupo treinado sem suplementação (A). O grupo treinado suplementado com Creatina e carboidrato (B) e o grupo treinado suplementado com Creatina (C) não apresentaram diferenças significativas entre si.

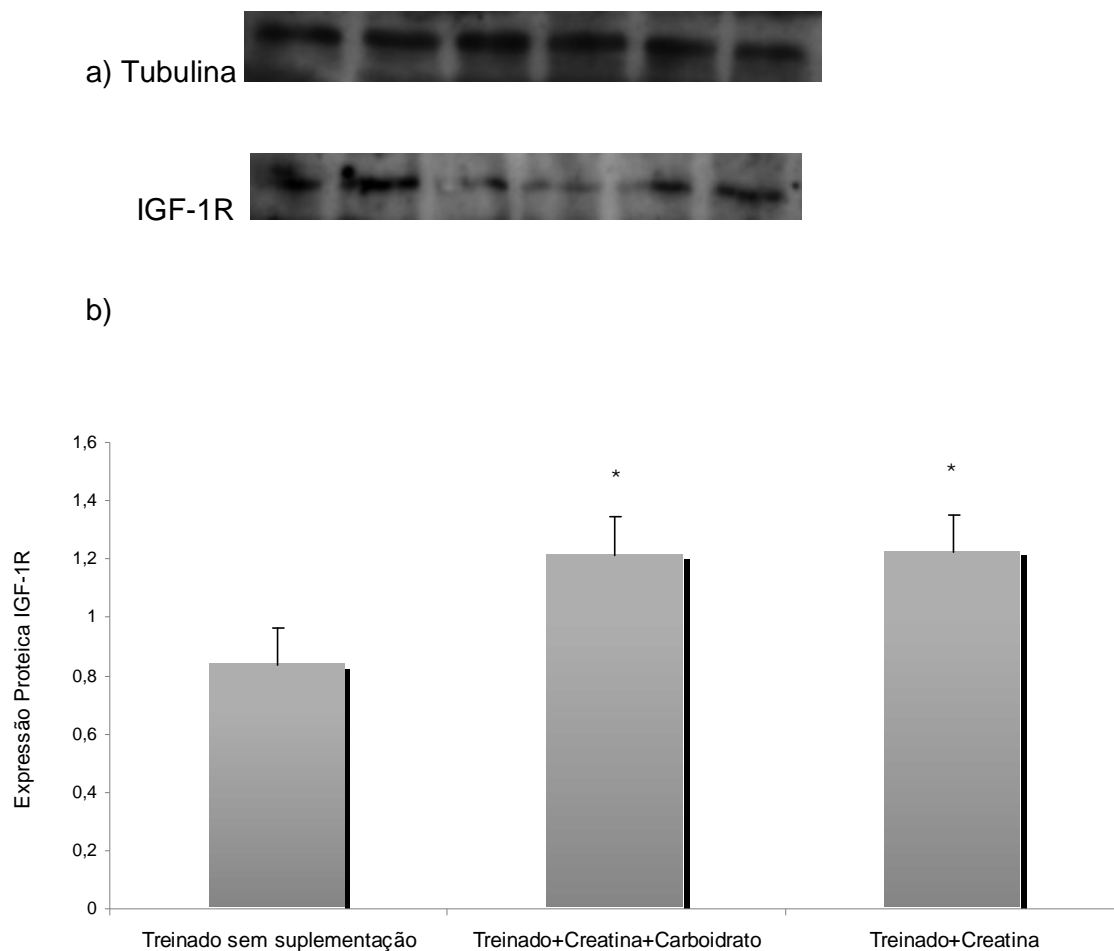


Figura 8: a) Autoradiografia da expressão proteica de Tubulina e IGF-1R, com disposição de amostras na sequência da esquerda para a direita de acordo com o Grupo pertencente A, B, C, A, B, C. b) Expressão protéica do Receptor do IGF-1 (IGF-1R) em ratos Wistar machos após análise de Western blot. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de unidades arbitrárias (A vs B  $p=0,047$ ; A vs C  $p=0,043$ ).



## DISCUSSÃO

Os avanços nos estudos relacionados ao exercício físico, nas últimas décadas, contribuíram para o esclarecimento de muitos mecanismos envolvidos no rendimento. Também, diversas observações ajudaram a tornar cada vez mais claros os efeitos bioquímicos e celulares desta intervenção. O estudo de diversos métodos de treinamento possibilita o desenvolvimento de diferentes abordagens relativas ao sistema de treinamento a ser aplicado. A aquisição de maior rendimento em determinados pontos do treinamento, a obtenção mais rápida e segura de resultados em performance, fatores estéticos e até terapêuticos estão envolvidos nesta diversidade de modelos de aplicação do exercício físico. As pesquisas relacionadas a suplementos alimentares, bem como os próprios suplementos, e estratégias dietéticas também evoluíram muito e nos permitem traçar melhores caminhos a serem seguidos para alcançar determinados objetivos. A inserção destas variáveis no meio científico também ajudam a desmistificar aspectos fisiológicos que são erroneamente atribuídos a alguns alimentos e suplementos alimentares.

O presente estudo demonstrou que o exercício físico intervalado é uma boa estratégia para a melhora da performance em ratos. Aplicado como forma de treinamento, com planejamento, objetivo e sequência, o exercício evidenciou a melhoria do condicionamento físico dos ratos visto que as velocidades do re-teste máximo em esteira foram consideravelmente superiores às velocidades que haviam sido alcançadas no teste inicial. É interessante ressaltar uma importante característica do presente estudo que é a utilização do ciclo claro/escuro invertido. Os ratos têm um ciclo biológico diferente dos humanos, o qual caracteriza-se pelo metabolismo mais intenso à noite (escuro). Portanto, não seria interessante realizar

o treinamento físico durante o dia (claro), pois os animais possivelmente apresentariam perda de desempenho e alterações hormonais condizentes com o momento do sono, o que poderia propiciar um viés no experimento. Realizar o treinamento em ambiente escuro é de fundamental importância para que possamos analisar os efeitos do treinamento físico em ratos, já que os mesmos estão física e metabolicamente mais ativos neste ambiente. Outra constatação importante é que o presente estudo foi conduzido em roedores, pois apresenta características muito invasivas, tornando-se de difícil aplicação em seres humanos.

No que diz respeito ao ganho de massa corporal dos ratos, esperávamos verificar uma diferença entre os grupos que receberam a suplementação e o grupo sem suplementação, já que grande parte dos estudos mostra que a suplementação com Creatina gera ganhos na massa muscular. Porém, os grupos A, B e C não apresentaram diferença no ganho de massa corporal. Concordando com os dados encontrados no presente estudo, alguns trabalhos também não verificaram diferença entre o ganho de massa corporal entre grupos suplementados e grupos controle (McMillen, Donovan et al. 2001; Parise, Mihic et al. 2001; Menezes, Sobreira et al. 2007). Entretanto, diferentemente do nosso estudo, alguns trabalhos mostraram diferença no ganho de massa corporal entre grupos suplementados com Creatina e grupos controle (Snow, McKenna et al. 1998; Huso, Hampl et al. 2002; Roschel, Gualano et al. 2010). Quando a suplementação de Creatina é acompanhada a um regime de exercícios resistidos, ou de força, o aumento da massa muscular também apresenta ganho significativo (Bargieri, Vancini et al. 2005), verificado também em idosos, promovendo melhora na autonomia e na qualidade de vida destas pessoas (Dalbo, Roberts et al. 2009). Os dados referentes ao ganho de massa muscular são

controversos no sentido de divergirem na causa do aumento da massa corporal, pois mostram um aumento devido ao acúmulo de água dentro da célula muscular, e outros mostram aumento de massa livre de água. Neste sentido, a suplementação de Creatina juntamente com o treinamento de força, pode aumentar a expressão de fatores de transcrição miogênicos como o MRF4 e miogenina (Hespel, Op't Eijnde et al. 2001). Podemos perceber que a Creatina se apresenta como um potencializador do ganho de massa quando conjugada ao treinamento de força, porém, quando utilizada juntamente com outros tipos de exercício, ela não demonstra ganhos significativos de massa magra (Hespel, Op't Eijnde et al. 2001; Bargieri, Vancini et al. 2005; Menezes, Sobreira et al. 2007; Dalbo, Roberts et al. 2009).

Sobre os dados referentes à performance dos ratos, nos grupos A, B e C houve diferença entre a análise pré-treinamento e pós-treinamento, mostrando uma melhora no condicionamento físico dos animais. O protocolo de treinamento utilizado no presente estudo mostrou-se efetivo para o aumento das velocidades no teste máximo em esteira rolante após a realização do treinamento no período de 33 dias. Estes dados reiteram que o exercício intervalado de alta intensidade é uma importante estratégia para a melhoria do condicionamento físico (Giesel, Reche et al. 2009), independente de intervenção dietética ou suplementação, visto que todos os grupos apresentaram este aumento. Resultados como este, embora já esperados, são de suma importância pois a melhoria do condicionamento físico através do exercício intervalado já é bastante conhecida (Vogiatzis, Nanas et al. 2002; Vogiatzis, Terzis et al. 2005) porém, pouco divulgada. Muito relevante também é que o exercício intervalado de alta intensidade, além de proporcionar resultados semelhantes ao exercício contínuo de carga constante, apresenta uma importante

relação entre tempo gasto na execução da atividade e os efeitos obtidos, pois ótimos resultados são alcançados com menor tempo gasto. Outro ponto é que o exercício intervalado tende a apresentar menos efeitos colaterais como dispnéia e desconforto muscular quando comparado ao exercício contínuo de carga constante (Vogiatzis, Terzis et al. 2005).

Quando os dados de performance final do presente estudo são comparados entre os grupos, não apresentam diferença, mostrando que a suplementação de Creatina ou Creatina e carboidrato não apresentou interferência nos resultados. O exercício intervalado baseia seus períodos de alta intensidade em fontes anaeróbias para o fornecimento de energia. Exercícios que demandam tarefas de alta intensidade, como o utilizado no protocolo do presente estudo, podem ser mais dependentes dos níveis endógenos de adenosina trifosfato (ATP) e fosfocreatina (PCrea) para a realização destes. Particularmente, da PCrea, pois esta funciona como um meio rápido de regenerar o limitado suprimento de ATP intramuscular, o qual é fundamental para o desenvolvimento da capacidade anaeróbia. A elevação da Creatina livre devido à suplementação exógena é um importante recurso ergogênico para o reabastecimento da PCrea, a qual pode rapidamente fornecer um meio de síntese de ATP durante o exercício intervalado de alta intensidade (Williams and Branch 1998). A suplementação de Creatina pode aumentar a taxa de ressíntese de PCrea entre os períodos de alta intensidade do exercício intervalado e aumentar a translocação de ATP mitocondrial para o citoplasma, proporcionando adaptações fisiológicas significativas (Graef, Smith et al. 2009). Assim, esperávamos encontrar diferença entre os grupos suplementados e o grupo não suplementado, visto que a Creatina está envolvida principalmente no rápido fornecimento de

energia para atividades de alta intensidade, porém, não encontramos. A fosfoCreatina que se mostra aumentada após a suplementação de Creatina poderia manter o fornecimento de energia em níveis mais adequados e evitar uma fadiga precoce no exercício intervalado de alta intensidade, diferenciando os grupos suplementados e não suplementado, como encontrado em outros estudos (Murphy, Stephenson et al. 2004; Jager, Metzger et al. 2008; Roschel, Gualano et al. 2010). A combinação da suplementação de Creatina com treinamento intervalado de alta intensidade, já se mostrou um interessante meio de se levar ao aumento do  $VO_{2pico}$ , quando comparado à suplementação de Creatina ou ao exercício intervalado sozinhos (Graef, Smith et al. 2009). Um outro estudo também utilizou a suplementação de Creatina e carboidrato e mostrou ganhos significativos no desempenho físico dos participantes em exercícios de alta ou máxima intensidade (Casey and Greenhaff 2000). Sugere-se que o aumento na performance dos participantes tenha causa direta do efeito da PCrea disponível e consequente aumento na ressíntese de ATP muscular, evidenciando que a Creatina pode prover um meio de aumentar a performance de alta ou máxima intensidade, como futebol, rugby e hóquei, exatamente como demonstrado neste protocolo para roedores.

Outros estudos, porém, vão de encontro aos nossos achados e não verificam diferenças no desempenho físico entre grupos suplementados e não suplementados. Porém, utilizam o exercício intervalado de alta intensidade na forma de tiros máximos de 20 segundos de duração em cicloergômetros (Snow, McKenna et al. 1998). A performance de ratos em exercícios de potência, como saltos verticais, também não apresentou diferença devido à suplementação de Creatina (Franco 2007).

Os resultados de glicemia verificados nos ratos antes e após o teste máximo em esteira rolante não apresentaram diferença, tanto na análise pareada quanto na análise entre os grupos A, B e C, mostrando que a suplementação não produziu diferenças na glicemia nos ratos. A suplementação de carboidrato, em repouso, pode resultar em hiperglicemia e hiperinsulinemia, que é frequentemente seguido de uma queda nos níveis de glicose sanguínea. A queda da glicemia se dá principalmente pela aumentada captação de glicose pelo tecido muscular, como também uma diminuição da produção de glicose pelo fígado (Jeukendrup 2011). Estes dados nos levaram a supor que as concentrações de glicose no sangue seriam menores no grupo suplementado com Creatina e carboidrato. Em um trabalho pesquisado, com exercícios submáximos e suplementação de Creatina e carboidratos, foram achados aumentos nos estoques de glicogênio nos músculos exercitados, porém os níveis de glicose sanguínea também não foram diferentes nos grupos com a suplementação e sem a suplementação, corroborando com os nossos resultados (Robinson, Sewell et al. 1999).

No presente estudo, o lactato não apresentou diferença na comparação entre os grupos A, B e C. A coleta de sangue para a realização do teste ocorreu imediatamente após o término do teste máximo em esteira rolante para cada animal, quando o mesmo chegava na fadiga e não prosseguia mais no teste. Simulando o mesmo protocolo de teste realizado em atletas e praticantes de exercícios físicos quando são submetidos à coleta de sangue para a determinação de lactato sanguíneo, afim de uma extrapolação mais fidedigna dos resultados. Durante a realização de exercícios físicos intensos ocorre a produção e acumulação de lactato e  $H^+$ . Este lactato acumulado pode ser removido pela oxidação ou gliconeogênese

no músculo, ou é transportado para o sangue e removido por outras células. A produção de lactato no exercício físico é diretamente proporcional á intensidade deste exercício (Juel, Klarskov et al. 2004; Morris, Nevill et al. 2005), e pode ser medido no sangue após sua remoção da célula. Exercícios físicos intensos, como o realizado no presente estudo, supostamente produziram quantidades elevadas de lactato, porém a mediana dos valores da concentração de lactato sanguíneo, nos diferentes grupos, não se mostrou muito elevada, mesmo logo após a realização do teste máximo. Os nossos achados corroboram com um trabalho realizado também com exercício intervalado de alta intensidade em cicloergômetro, o qual mostrou da mesma forma, que o treinamento é capaz de diminuir a produção de lactato e a concentração de lactato sanguíneo (Green, Tupling et al. 2000). Assim como no presente estudo, outro trabalho também não mostrou diferenças na concentração de lactato sanguíneo entre grupos que receberam suplementação de Creatina e grupos controle, em exercícios máximos em cicloergômetro (Snow, McKenna et al. 1998). É possível que o aumento dos estoques de PCrea possam reduzir a dependência da glicólise anaeróbia como uma fonte de reposição de ATP, e possivelmente minimizar a formação de lactato e sua acumulação, podendo melhorar o desempenho em exercícios físicos de alta intensidade (Williams and Branch 1998), como no protocolo de treinamento do presente estudo. Por isso, esperávamos observar menores valores de lactato nos grupos suplementados. Nesse foco, alguns trabalhos apresentam resultados diferentes do nosso estudo, um deles, conjugando a suplementação de Creatina e o exercício intervalado de alta intensidade, encontrou valores mais baixos na concentração de lactato sanguíneo no grupo suplementado em comparação com o grupo placebo, em ratos (Roschel, Gualano et al. 2010). Já em um outro trabalho, verificou-se concentrações em torno de 42% mais baixas, na

produção de lactato basal (Ceddia and Sweeney 2004) em cultura de células musculares L6 de ratos.

O músculo esquelético compõe aproximadamente 45% da massa corporal magra em seres humanos, e é um tecido metabolicamente muito ativo, sendo o maior responsável pelo consumo energético corporal e pela captação de glicose após uma refeição (O'Neill 2013). Esta captação de glicose em repouso é feita mediante a ligação da insulina com o seu receptor na membrana da célula muscular. Tanto a insulina quanto o exercício físico promovem a translocação do GLUT4 de um compartimento intracelular para a membrana plasmática, permitindo a difusão da glicose para dentro da célula (Adams 2013). Durante exercícios de alta intensidade como o executado no presente estudo, a glicose é o principal combustível muscular (Marliss and Vranic 2002). Portanto, o controle da captação da glicose é de vital importância para a manutenção do exercício. Neste sentido, o IGF-1 aparece como um importante regulador do metabolismo da glicose, pois o mesmo possui certa afinidade ao receptor de insulina (IR), podendo auxiliar na captação de glicose durante o exercício, já que neste período a secreção de insulina está inibida. Portanto, o exercício por si só já evidencia o sistema do IGF-1, e poderíamos ter dados sobre o IGF-1R diferentes entre grupos treinados e não treinados, porém, todos os grupos do nosso trabalho são treinados, e a diferença entre eles consiste somente na suplementação proporcionada. Neste sentido, as diferenças encontradas entre o grupo A e os grupos B e C demonstram que a Creatina parece estar envolvida no sistema do IGF-1/IGF-1R. Alguns trabalhos mostram o efeito da suplementação de Creatina na expressão de genes em células musculares (Deldicque, Atherton et al. 2008; Safdar, Yardley et al. 2008), envolvidos na



transdução de sinal, remodelamento do citoesqueleto, regulação da síntese de glicogênio e proteínas, proliferação e diferenciação de células satélites, reparação e replicação de DNA, controle da transcrição de RNA, e sobrevivência celular, o que poderia afetar o conteúdo de receptores celulares como o IGF-1R. Outros trabalhos também mostram a influência da suplementação de Creatina no aumento do mRNA de IGF-1 (Deldicque, Louis et al. 2005), assim como aumento do IGF-1 muscular (Burke, Candow et al. 2008), podendo este último também estar agindo de maneira autócrina/parácrina atuando na regulação do seu receptor celular o IGF-1R e alterando a sua expressão proteica.

Os dados referentes à expressão protéica do IGF-1R mostram diferenças significativas na expressão protéica do IGF-1R entre o grupo treinado não suplementado (A) e os grupos treinados suplementados (B e C). Na análise que compara a expressão protéica do IGF-1R entre os grupos A, B e C, os grupos suplementados (B e C) apresentaram valores de média maiores do que o grupo não suplementado (A). Aumentos na expressão de IGF-1R tem sido mostrados em resposta à diferentes tipos de exercício físico como exercícios aeróbios (Willis, Chadan et al. 1997), exercícios de força ou resistidos (Owino, Yang et al. 2001), e exercícios de resistência (Willis, Chadan et al. 1998). O treinamento intervalado de alta intensidade, como o protocolo utilizado no presente estudo, induz a alterações celulares muito semelhantes ao treinamento de resistência também chamado de treinamento de *endurance* (Gibala 2009). Por este motivo, já esperávamos ter valores mais altos de IGF-1R para todos os grupos, visto que todos são treinados. Porém, como comentado acima, esperávamos encontrar valores mais altos justamente nos grupos suplementados, pois a suplementação de Creatina parece

agir no sentido de contribuir para o Crescimento muscular, e esta resposta ao Crescimento parece estar relacionada aos efeitos anabólicos do sistema do IGF-1 (Louis, Van Beneden et al. 2004; Deldicque, Louis et al. 2005). Estes trabalhos mostram a relação entre a suplementação de Creatina e o aumento do IGF-1 mRNA. Porém não encontramos na literatura trabalhos que relacionem a suplementação de Creatina e a expressão gênica ou protéica de IGF-1R, sendo o presente estudo o primeiro a correlacionar todos estes assuntos. A confirmação da nossa hipótese de que a suplementação de Creatina é capaz de aumentar a expressão proteica de IGF-1R sugere que os efeitos miogênicos da suplementação de Creatina podem estar relacionados justamente ao aumento da expressão dos receptores de IGF-1.

Uma super expressão do IGF-1R tem sido demonstrada em diferentes tipos de câncer como de cólon, de mama, de próstata e de pulmão (Pollak, Schernhammer et al. 2004). A ativação ou super expressão do IGF-1R também está relacionada ao aumento na propensão a ocorrência metástases (Riedemann and Macaulay 2006; Gallagher and LeRoith 2011) além de estar envolvida em diversos processos de transformação oncogênica (Furstenberger and Senn 2002). Todavia, uma diminuição na expressão do IGF-1R leva também a uma diminuição do Crescimento do tumor, na maioria dos tumores (Jones, Campbell et al. 2009). Porém, a suplementação com Creatina parece ir na contramão dessas evidências e provocar benefícios no combate à diversos tipos de doenças, inclusive o câncer (Gualano, Roschel et al. 2012), pois verifica-se uma relação na diminuição de Creatina quinase e Creatina total e o aparecimento de câncer (Patra, Ghosh et al. 2012).

## CONCLUSÃO

O protocolo treinamento intervalado de alta intensidade utilizado no presente estudo, sendo realizado cinco vezes por semana durante 30 minutos, mostrou-se capaz de aumentar significativamente o desempenho físico dos animais, independente de suplementação, visto que houve um aumento na velocidade até o aparecimento da fadiga após a realização do treinamento. O mesmo protocolo de treinamento intervalado juntamente com a suplementação de Creatina se mostrou também capaz de aumentar significativamente a expressão protéica de receptor de IGF-1 (IGF-1R) no tecido muscular de ratos.

A concentração de lactato no sangue não apresentou diferença entre os grupos estudados, quando comparados os valores pré e pós teste máximo.

Os valores de glicemia, quando comparados antes e depois do teste máximo, não apresentaram diferenças entre os grupos.

A massa dos animais não apresentou diferença entre os grupos estudados.

## **PERSPECTIVAS**

Como perspectivas para continuidade deste estudo pretendemos analisar a concentração de IGF-1 sérico e intramuscular. Pretende-se também realizar as análises de glicogênio muscular e hepático.

## REFERÊNCIAS

- Adamo, M. L. and R. P. Farrar (2006). "Resistance training, and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process." Ageing Res Rev **5**(3): 310-331.
- Adams, O. P. (2013). "The impact of brief high-intensity exercise on blood glucose levels." Diabetes Metab Syndr Obes **6**: 113-122.
- Arnaldez, F. I. and L. J. Helman (2012). "Targeting the insulin growth factor receptor 1." Hematol Oncol Clin North Am **26**(3): 527-542, vii-viii.
- Bargieri, J. V., R. L. Vancini, et al. (2005). Suplementação de Creatina e Exercício. Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício, Universidade Federal de São Paulo.
- Barton, E. R. (2006). "The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair." Appl Physiol Nutr Metab **31**(6): 791-797.
- Bemben, M. G. and H. S. Lamont (2005). "Creatine supplementation and exercise performance: recent findings." Sports Med **35**(2): 107-125.
- Brannon, T. A., G. R. Adams, et al. (1997). "Effects of Creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle." Med Sci Sports Exerc **29**(4): 489-495.
- Brooks, G. A. and T. P. White (1978). "Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise." J Appl Physiol **45**(6): 1009-1015.
- Burgomaster, K. A., S. C. Hughes, et al. (2005). "Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans." J Appl Physiol **98**(6): 1985-1990.
- Burke, D. G., D. G. Candow, et al. (2008). "Effect of Creatine supplementation and resistance-exercise training on muscle insulin-like growth factor in young adults." Int J Sport Nutr Exerc Metab **18**(4): 389-398.
- Carlson, L. A., R. W. Kenefick, et al. (2013). "Influence of carbohydrate ingestion on salivary immunoglobulin A following resistance exercise." J Int Soc Sports Nutr **10**(1): 14.
- Casey, A. and P. L. Greenhaff (2000). "Does dietary Creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance?" Am J Clin Nutr **72** (suppl): 607S-617S.
- Casey, A. and P. L. Greenhaff (2000). "Does dietary Creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance?" Am J Clin Nutr **72**(2 Suppl): 607S-617S.
- Ceddia, R. B. and G. Sweeney (2004). "Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells." J Physiol **555**(Pt 2): 409-421.
- Clemmons, D. R. (2009). "Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance." Trends Endocrinol Metab **20**(7): 349-356.

- Coletta, A., D. L. Thompson, et al. (2013). "The influence of commercially-available carbohydrate and carbohydrate-protein supplements on endurance running performance in recreational athletes during a field trial." J Int Soc Sports Nutr **10**(1): 17.
- Cooke, M. B., E. Rybalka, et al. (2009). "Creatine supplementation enhances muscle force recovery after eccentrically-induced muscle damage in healthy individuals." J Int Soc Sports Nutr **6**: 13.
- Costill, D. L. and M. Hargreaves (1992). "Carbohydrate nutrition and fatigue." Sports Med **13**(2): 86-92.
- Dalbo, V. J., M. D. Roberts, et al. (2009). "The effects of age on skeletal muscle and the phosphocreatine energy system: can creatine supplementation help older adults." Dyn Med **8**: 6.
- Davis, M. E. et al. (2005). "Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(21): 8155-8160.
- Deldicque, L., P. Atherton, et al. (2008). "Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle." J Appl Physiol **104**(2): 371-378.
- Deldicque, L., M. Louis, et al. (2005). "Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation." Med Sci Sports Exerc **37**(5): 731-736.
- Dorado, C., J. Sanchis-Moysi, et al. (2004). "Effects of recovery mode on performance, O<sub>2</sub> uptake, and O<sub>2</sub> deficit during high-intensity intermittent exercise." Can J Appl Physiol **29**(3): 227-244.
- Drago, M. and L. C. C. Junior (2010). Comparação entre as diferentes intensidades de treinamento no controle dos fatores de risco associados à síndrome metabólica. São Paulo, Anhanguera Educacional Ltda.
- Favelyukis, S., J. H. Till, et al. (2001). "Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase." Nat Struct Biol **8**(12): 1058-1063.
- Franco, F. S. C. et al. (2007). "Efeitos da suplementação de Creatina e do treinamento de potência sobre a performance e a massa corporal magra de ratos."
- Frystyk, J., E. Vestbo, et al. (1995). "Free insulin-like growth factors in human obesity." Metabolism **44**(10 Suppl 4): 37-44.
- Furstenberger, G. and H. J. Senn (2002). "Insulin-like growth factors and cancer." Lancet Oncol **3**(5): 298-302.
- Gallagher, E. J. and D. LeRoith (2011). "Minireview: IGF, Insulin, and Cancer." Endocrinology **152**(7): 2546-2551.
- Gasper, M. C. and J. M. Gilchrist (2005). "Creatine kinase: a review of its use in the diagnosis of muscle disease." Med Health R I **88**(11): 398, 400-394.
- Gibala, M. (2009). "Molecular responses to high-intensity interval exercise." Appl Physiol Nutr Metab **34**(3): 428-432.

- Giesel, V. T., M. Reche, et al. (2009). "Effects of intermittent high-intensity exercise and carbohydrate supplementation on IGF-1 and glycogen of Wistar rats." Growth Horm IGF Res **19**(2): 156-161.
- Gillen, J. B., J. P. Little, et al. (2012). "Acute high-intensity interval exercise reduces the postprandial glucose response and prevalence of hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **14**(6): 575-577.
- Goldspink, G. (2005). "Research on mechano growth factor: its potential for optimising physical training as well as misuse in doping." Br J Sports Med **39**(11): 787-788; discussion 787-788.
- Graef, J. L., A. E. Smith, et al. (2009). "The effects of four weeks of Creatine supplementation and high-intensity interval training on cardiorespiratory fitness: a randomized controlled trial." J Int Soc Sports Nutr **6**: 18.
- Graham, A. S. and R. C. Hatton (1999). "Creatine: a review of efficacy and safety." J Am Pharm Assoc (Wash) **39**(6): 803-810; quiz 875-807.
- Green, H., R. Tupling, et al. (2000). "Adaptations in skeletal muscle exercise metabolism to a sustained session of heavy intermittent exercise." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(1): E118-126.
- Grinspoon, S., D. Clemmons, et al. (1995). "Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 levels in the diagnosis of acromegaly." J Clin Endocrinol Metab **80**(3): 927-932.
- Gualano, B., G. G. Artioli, et al. (2008). "Efeitos da suplementação de Creatina no metabolismo glicolipídico: possíveis aplicações terapêuticas." Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte **7**(1): 149-159.
- Gualano, B., H. Roschel, et al. (2012). "In sickness and in health: the widespread application of Creatine supplementation." Amino Acids **43**(2): 519-529.
- Haram, P. M., O. J. Kemi, et al. (2009). "Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity." Cardiovasc Res **81**(4): 723-732.
- Hespeel, P., B. Op't Eijnde, et al. (2001). "Oral Creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans." J Physiol **536**(Pt 2): 625-633.
- Hill, K. M., C. G. Stathis, et al. (2013). "Co-ingestion of carbohydrate and whey protein isolates enhance PGC-1 $\alpha$  mRNA expression: a randomised, single blind, Creatine over study." J Int Soc Sports Nutr **10**(1): 8.
- Huso, M. E., J. S. Hampl, et al. (2002). "Creatine supplementation influences substrate utilization at rest." J Appl Physiol **93**(6): 2018-2022.
- Hwang, I. K., K. Y. Yoo, et al. (2004). "Expression and changes of endogenous insulin-like growth factor-1 in neurons and glia in the gerbil hippocampus and dentate gyrus after ischemic insult." Neurochem Int **45**(1): 149-156.
- Izquierdo, M., J. Ibanez, et al. (2002). "Effects of Creatine supplementation on muscle power, endurance, and sprint performance." Med Sci Sports Exerc **34**(2): 332-343.

- Jager, R., J. Metzger, et al. (2008). "The effects of Creatine pyruvate and Creatine citrate on performance during high intensity exercise." J Int Soc Sports Nutr **5**: 4.
- Jeukendrup, A. E. (2004). "Carbohydrate intake during exercise and performance." Nutrition **20**(7-8): 669-677.
- Jeukendrup, A. E. (2011). "Nutrition for endurance sports: marathon, triathlon, and road cycling." J Sports Sci **29 Suppl 1**: S91-99.
- Jones, R. A., C. I. Campbell, et al. (2009). "Reversibility and recurrence of IGF-IR-induced mammary tumors." Oncogene **28**(21): 2152-2162.
- Ju, J. S., J. L. Smith, et al. (2005). "Creatine feeding increases GLUT4 expression in rat skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(2): E347-352.
- Juel, C., C. Klarskov, et al. (2004). "Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H<sup>+</sup> release from human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(2): E245-251.
- Kerksick, C., T. Harvey, et al. (2008). "International Society of Sports Nutrition position stand: nutrient timing." J Int Soc Sports Nutr **5**: 17.
- Kim, S. W., R. Lajara, et al. (1991). "Structure and function of a human insulin-like growth factor-I gene promoter." Mol Endocrinol **5**(12): 1964-1972.
- Little, J. P., A. Safdar, et al. (2010). "A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms." J Physiol **588**(Pt 6): 1011-1022.
- Louis, M., R. Van Beneden, et al. (2004). "Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory factor mRNA in C2C12 cells." FEBS Lett **557**(1-3): 243-247.
- Machida, S. and F. W. Booth (2004). "Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation." Proc Nutr Soc **63**(2): 337-340.
- Marliss, E. B. and M. Vranic (2002). "Intense exercise has unique effects on both insulin release and its roles in glucoregulation: implications for diabetes." Diabetes **51 Suppl 1**: S271-283.
- McKay, B. R., D. H. Paterson, et al. (2009). "Effect of short-term high-intensity interval training vs. continuous training on O<sub>2</sub> uptake kinetics, muscle deoxygenation, and exercise performance." J Appl Physiol **107**(1): 128-138.
- McMillen, J., C. M. Donovan, et al. (2001). "Energetic driving forces are maintained in resting rat skeletal muscle after dietary Creatine supplementation." J Appl Physiol **90**(1): 62-66.
- Menezes, L. G., C. Sobreira, et al. (2007). "Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats." J Appl Physiol **102**(2): 698-703.
- Morris, J. G., M. E. Nevill, et al. (2005). "Muscle metabolism, temperature, and function during prolonged, intermittent, high-intensity running in air temperatures of 33 degrees and 17 degrees C." Int J Sports Med **26**(10): 805-814.



- Murphy, R. M., D. G. Stephenson, et al. (2004). "Effect of Creatine on contractile force and sensitivity in mechanically skinned single fibers from rat skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(6): C1589-1595.
- Nindl, B. C. (2009). "Insulin-Like Growth Factor-I, Physical Activity and Control of Cellular Anabolism." The American College of Sports and Medicine.
- O'Neill, H. M. (2013). "AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity." Diabetes Metab J **37**(1): 1-21.
- Op 't Eijnde, B., B. Urso, et al. (2001). "Effect of oral Creatine supplementation on human muscle GLUT4 protein content after immobilization." Diabetes **50**(1): 18-23.
- Owino, V., S. Y. Yang, et al. (2001). "Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autoCreatine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload." FEBS Lett **505**(2): 259-263.
- Parise, G., S. Mihic, et al. (2001). "Effects of acute Creatine monohydrate supplementation on leucine kinetics and mixed-muscle protein synthesis." J Appl Physiol **91**(3): 1041-1047.
- Patra, S., A. Ghosh, et al. (2012). "A short review on Creatine-Creatine kinase system in relation to cancer and some experimental results on Creatine as adjuvant in cancer therapy." Amino Acids **42**(6): 2319-2330.
- Paula, L. P. and M. A. Czepielewski (2008). "Evaluating diagnosis methods on childhood GH (DGH) deficiency: IGFs, IGFs, releasing tests, GH rhythm and image exams]." Arq Bras Endocrinol Metabol **52**(5): 734-744.
- Pelosi, L., C. Giacinti, et al. (2007). "Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines." FASEB J **21**(7): 1393-1402.
- Perrini, S., L. Laviola, et al. (2010). "The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis." J Endocrinol **205**(3): 201-210.
- Philippou, A., A. Halapas, et al. (2007). "Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy." J Musculoskelet Neuronal Interact **7**(3): 208-218.
- Philippou, A., M. Maridaki, et al. (2007). "The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology." In Vivo **21**(1): 45-54.
- Pilla, C. (2003). Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada e seus cetoácidos sobre a atividade da Creatinaquinase de cérebros de ratos jovens. Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Doutorado**: 111.
- Pollak, M. N., E. S. Schernhammer, et al. (2004). "Insulin-like growth factors and neoplasia." Nat Rev Cancer **4**(7): 505-518.
- Rae, C., A. L. Digney, et al. (2003). "Oral Creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, Cross-over trial." Proc Biol Sci **270**(1529): 2147-2150.

- Rakpongsiri, K. and S. Sawangkoon (2009). "Increased serum IGF-I level by Creatine supplementation and estrogen replacement in exercise-trained ovariectomized hamsters." Thammasat Medical Journal **9**(4).
- Riedemann, J. and V. M. Macaulay (2006). "IGF1R signalling and its inhibition." EndoCreat Relat Cancer **13 Suppl 1**: S33-43.
- Robinson, T. M., D. A. Sewell, et al. (1999). "Role of submaximal exercise in promoting Creatine and glycogen accumulation in human skeletal muscle." J Appl Physiol **87**(2): 598-604.
- Rodrigues, B., D. M. Figueroa, et al. (2007). "Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats." Cardiovasc Diabetol **6**: 38.
- Roschel, H., B. Gualano, et al. (2010). "Creatine supplementation spares muscle glycogen during high intensity intermittent exercise in rats." J Int Soc Sports Nutr **7**(1): 6.
- Safdar, A., N. J. Yardley, et al. (2008). "Global and targeted gene expression and protein content in skeletal muscle of young men following short-term Creatine monohydrate supplementation." Physiol Genomics **32**(2): 219-228.
- Saúde, M. d. (2011). "Academia da Saúde." Retrieved 22/01/2013, 2013, from [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=37078](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=37078).
- Sharma, S., R. P. J. Prasanthi, et al. (2008). "Hypercholesterolemia-induced Abeta accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling." Neurobiol Dis **32**(3): 426-432.
- Snow, R. J., M. J. McKenna, et al. (1998). "Effect of Creatine supplementation on sprint exercise performance and muscle metabolism." J Appl Physiol **84**(5): 1667-1673.
- Snow, R. J. and R. M. Murphy (2003). "Factors influencing Creatine loading into human skeletal muscle." Exerc Sport Sci Rev **31**(3): 154-158.
- Souza, R. A. e. a. (2006). "Influence of the sport and long term supplementation of Creatine on the plasmatic concentrations of glucose and lactate in Wistar rats." Rev Bras Med Esporte **12**(6): 361-365.
- Sun, L. Y., K. Al-Regaiey, et al. (2005). "Local expression of GH and IGF-1 in the hippocampus of GH-deficient long-lived mice." Neurobiology of Aging **26**: 929-937.
- Taes, Y. E., J. R. Delanghe, et al. (2003). "Creatine supplementation does not affect kidney function in an animal model with pre-existing renal failure." Nephrol Dial Transplant **18**(2): 258-264.
- Talanian, J. L., S. D. Galloway, et al. (2007). "Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women." J Appl Physiol **102**(4): 1439-1447.
- Talanian, J. L., G. P. Holloway, et al. (2010). "Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(2): E180-188.

- Tarnopolsky, M. A., J. M. Bourgeois, et al. (2003). "Histological assessment of intermediate- and long-term Creatine monohydrate supplementation in mice and rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(4): R762-769.
- Vieira, R. P., A. C. Duarte, et al. (2007). "Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **37**(6): 660-667.
- Vogiatis, I., S. Nanas, et al. (2002). "Interval training as an alternative modality to continuous exercise in patients with COPD." Eur Respir J **20**(1): 12-19.
- Vogiatis, I., G. Terzis, et al. (2005). "Skeletal muscle adaptations to interval training in patients with advanced COPD." Chest **128**(6): 3838-3845.
- Wallimann, T. (1994). "Bioenergetics. Dissecting the role of Creatine kinase." Curr Biol **4**(1): 42-46.
- Weber, C. L. and D. A. Schneider (2002). "InCreatases in maximal accumulated oxygen deficit after high-intensity interval training are not gender dependent." J Appl Physiol **92**(5): 1795-1801.
- Willer, B., G. Stucki, et al. (2000). "Effects of Creatine supplementation on muscle weakness in patients with rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **39**(3): 293-298.
- Williams, M. H. and J. D. Branch (1998). "Creatine supplementation and exercise performance: an update." J Am Coll Nutr **17**(3): 216-234.
- Willis, P. E., S. Chadan, et al. (1997). "Acute exercise attenuates age-associated resistance to insulin-like growth factor I." Am J Physiol **272**(3 Pt 1): E397-404.
- Willis, P. E., S. G. Chadan, et al. (1998). "Restoration of insulin-like growth factor I action in skeletal muscle of old mice." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): E525-530.
- Xue, M., X. Cao, et al. (2012). "Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) kinase inhibitors in cancer therapy: advances and perspectives." Curr Pharm Des **18**(20): 2901-2913.
- Yang, H., M. Alnaqeeb, et al. (1997). "Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch." J Anat **190 (Pt 4)**: 613-622.
- Yen, C. H., T. H. Tsao, et al. (2013). "Effects of sweet cassava polysaccharide extracts on endurance exercise in rats." J Int Soc Sports Nutr **10**(1): 18.