

FREDERICO SOUZALIMA CALDONCELLI FRANCO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA ASSOCIADA OU NÃO
À CAFEÍNA EM RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO ANAERÓBICO
INTERMITENTE.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

DEDICATÓRIA

Para

Meus Pais

Por Serem Impar;
Oferecendo-me o que há de mais preciso:
Amor e Educação;
Caráter e Dignidade;
Fibra e Vontade de Viver.

Minha Esposa

Pelo Amor, Atenção e Confiança;
Compreensão pela ausência;
E por me dar duas filhas maravilhosas.

Minhas Filhas

Que o exemplo a ser seguido seja mais valioso,
Que a minha ausência;
Pois todo este esforço tem um único sentido,
O “futuro de vocês”.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela excelência em ensino e pesquisa;

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, por ter possibilitado estes anos de afastamento objetivando meu aperfeiçoamento;

À CAPES, pela bolsa, que representa grande suporte aos estudantes de pós-graduação;

À Bioclin[®], por ter cedido com presteza os kits para análises bioquímicas;

Ao prof. Ph.D. Antônio José Natali, por ter sido mais que orientador, através de sua serenidade, paciência e competência, ter me reencaminhado à busca do saber científico;

À profa. Ph.D. Neuza Maria Brunoro Costa, conselheira que estendeu a mão em todos os momentos desta caminhada;

Ao prof. D.S. João Carlos Bouzas Marins, conselheiro sempre atencioso nas correrias das avaliações do exercício.

À profa. Dra. Jaqueline Isaura Alvarez Leite, pelo grande conhecimento passado durante o curso *latu-sensu* em Lavras e a enorme admiração;

À profa. D.S. Tânia Toledo de Oliveira, pelo apoio incansável nas análises realizadas no Biofármaco e a palavra motivadora a todo instante, meu profundo agradecimento.

À profa. D.S. Sylvia do Carmo Castro Franceschini, pelo sorriso sincero de todos os dias e ao estímulo “robusto” do conhecimento estatístico.

À profa. D.S. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelo apoio nos estudos realizados no Biotério Central da UFV.

Ao prof. Ph.D Lúcio Alberto de Miranda Gomide, que gentilmente possibilitou as análises de resistência óssea no Departamento de Tecnologia de Alimentos;

Aos animais de experimentação que possibilitam a eterna busca do conhecimento científico;

Ao grande amigo Adão Custódio (Biotério), pela amizade e presteza de todo momento;

Aos companheiros de laboratórios, Ricardo, Cassiano, Paulo Rogério, Nádia, Lucia e José Geraldo (Biofármaco), companheiros de batalha;

Aos colegas de experimento Wellington, Miguel, Gilton, Susana, Andressa, Levy e Stéfano, pelo esforço nos momentos árdios e a alegria dos churrascos nos finais de experimentos.

BIOGRAFIA

FREDERICO SOUZALIMA CALDONCELLI FRANCO, filho de Luiz Carlos de Lima Franco e Maria Aparecida Caldoncelli Franco, nasceu em 22 de maio de 1967, na cidade de Rio Pomba – MG.

Em janeiro de 1985, iniciou o Curso de Educação Física na Universidade Federal de Viçosa – MG, concluindo-o em janeiro de 1989.

De março de 1989 a março de 1995 atuou como professor de ensino do 1º e 2º graus do Colégio Regina Coeli de Rio Pomba – MG.

De agosto de 1989 a agosto de 1995 atuou como professor de ensino do 1º e 2º graus da “Escola Estadual Prof. José Borges de Moraes” de Rio Pomba – MG.

De abril de 1989 a janeiro de 1993 atuou como técnico das equipes de voleibol da Prefeitura Municipal de Rio Pomba – MG.

Em julho de 1990, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciências do Voleibol, nível de especialização, na Universidade Gama Filho - RJ, concluindo-o em maio de 1991.

Em setembro de 1995, passou no concurso público da Escola Agrotécnica Federal de Machado – MG, sendo transferido para a Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba – MG em abril de 1996.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição Humana e Saúde, nível de especialização, na Universidade Federal de Lavras – MG, concluindo-o em maio de 2003.

Em março de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

Em dezembro de 2004, foi selecionado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

FRANCO, Frederico Souzalima Caldoncelli, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2004. **Efeito da suplementação de creatina associada ou não à cafeína em ratos submetidos a exercício anaeróbico intermitente.** Orientador: Antônio José Natali. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa e João Carlos Bouzas Marins.

Os objetivos deste estudo foram: 1) verificar se a suplementação de creatina associada ou não à cafeína afetaria o peso e a composição corporal de ratos exercitados com saltos verticais intermitentes; 2) verificar se os protocolos de suplementação aguda ou crônica influenciariam a excreção de creatinina urinária dos animais exercitados e sedentários; 3) verificar se os protocolos de suplementação afetariam a performance do exercício e a resistência óssea; e 4) verificar se os protocolos de suplementação aguda ou crônica influenciariam a excreção de cálcio urinário dos ratos exercitados e sedentários. Os resultados foram apresentados em dois capítulos. Os resultados apresentados no capítulo 1 mostraram que o ganho de peso corporal apresentou-se reduzido ($p < 0,05$) nos animais exercitados, independentes da suplementação. Os protocolos de suplementação não interferiram nos percentuais de água, gordura e proteína das vísceras e carcaça vazia, contudo, o programa de exercício reduziu a porcentagem de gordura da carcaça vazia. A excreção de creatinina urinária absoluta elevou-se após a ingestão aguda e crônica de creatina, independente do exercício, no entanto, a suplementação de creatina-cafeína não causou tal efeito ($p > 0,05$). Ao contrário do esperado, o programa de exercício reduziu a excreção de creatinina absoluta na sexta semana. Ao normalizar os conteúdos de creatinina pelo peso corporal, observou-se aumento após a suplementação aguda nos grupos sedentário creatina (SC) e exercício sem suplemento (ESS), comparados ao grupo sedentário sem suplemento (SSS). Entretanto, após suplementação crônica, na sexta semana, a creatinina urinária relativa do grupo SSS foi maior que a do grupo ESS. Ao comparar os resultados após suplementação crônica com os após suplementação aguda observou-se que o conteúdo de creatinina urinária relativa do grupo SSS foi maior na sexta semana e o do grupo ESS foi maior na segunda semana. Os resultados apresentados no capítulo 2 mostraram que o tempo de execução das séries de exercício não foi afetado pelos diferentes protocolos de suplementação, no entanto, a ingestão de creatina-cafeína elevou a

concentração de lactato sanguíneo após a quarta série de saltos em relação ao grupo sem suplemento. Contrariando a expectativa, os diferentes tipos de suplementação não afetaram os parâmetros ósseos analisados, todavia, o programa de exercício aumentou o comprimento, a espessura, o peso e a força de resistência à fratura óssea. A excreção de cálcio urinário aumentou ($p < 0,05$) somente após a ingestão crônica de creatina-caféina em relação aos grupos sem suplementos e creatina, independente do exercício. Concluiu-se que a suplementação de creatina, assim como a sua combinação com a caféina, não interferiram no ganho de peso corporal e na composição de água, proteína e gordura da carcaça e vísceras dos animais, independentes do exercício. O programa de exercício, por sua vez, independente da suplementação, reduziu o ganho de peso corporal e o percentual de gordura na carcaça, mas não alterou o conteúdo de proteína e a retenção de água. As ingestões aguda e crônica de creatina elevaram os conteúdos de creatinina urinária absoluta, independentes do exercício; enquanto que o programa de exercício, independente da suplementação, reduziu a creatinina urinária absoluta na sexta semana. A suplementação de creatina não interferiu no conteúdo de creatinina urinária relativa na segunda e sexta semanas, independente do exercício; ao passo que o programa de exercício elevou a creatinina relativa na segunda semana e reduziu na sexta semana, independente da suplementação. A administração de creatina adicionada à caféina não alterou a excreção de creatinina absoluta e relativa, independente do exercício. Animais suplementados com creatina-caféina apresentaram maior concentração de lactato sanguíneo ao final da execução do esforço físico, em comparação à dos animais sem suplemento, apesar da performance não ter sido afetada pela suplementação. A suplementação crônica, mas não a aguda, de creatina-caféina, independente do exercício, elevou a excreção de cálcio urinário. Nenhum protocolo de suplementação, independente do exercício, interferiu nos parâmetros ósseos analisados. No entanto, o programa de exercício empregado aumentou a força relativa de resistência à fratura óssea, assim como o comprimento, espessura e peso relativos do fêmur. A força de resistência à fratura óssea parece estar associada às alterações no comprimento, espessura e peso ósseo.

ABSTRACT

FRANCO, Frederico Souzalima Caldoncelli, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2004. **Effects of creatine supplementation associated or not with caffeine in rats submitted to intermittent anaerobic exercise.** Advisor: Antônio José Natali. Committee Members: Neuza Maria Brunoro Costa e João Carlos Bouzas Marins.

The aims of this study were: 1) to verify whether creatine supplementation associated or not with caffeine would affect the body weight and body composition of rats exercised with intermittent vertical jumps; 2) to verify whether the acute and chronic supplementation protocols would influence the urinary creatinine excretion of exercised and sedentary animals; 3) to verify whether the supplementation protocols would affect exercise performance and bone resistance; and 4) to verify whether the acute and chronic supplementation protocols would influence the urinary calcium excretion of exercised and sedentary animals. The results were presented in two chapters. The results exhibited in chapter 1 showed that body weight gain was reduced ($p < 0,05$) in exercised animals, independent of supplementation. The supplementation protocols did not affect the composition of viscera and carcass, however, the exercise program reduced the percentage of fat in the carcass. The absolute creatinine excretion increased after acute and chronic ingestion of creatine, independent of exercise, however, creatine and caffeine supplementation did not cause such effect ($p > 0,05$). The exercise program reduced absolute creatinine excretion at week six. When the content of urinary creatinine was normalized by body weight it was observed an increase after acute supplementation, week two, in animals from sedentary creatine (SC) and exercise without supplement (ESS) groups compared with that of sedentary without supplement (SSS). Nevertheless, after chronic supplementation, week two, the relative urinary creatinine from SSS was greater than that of ESS group. When the results of chronic supplementation were compared with those of acute supplementation, it was observed that the content of relative urinary creatinine of the SSS group was greater at week six and that of ESS group was greater at week two. The results presented in chapter 2 showed that the excretion of urinary calcium increased ($p < 0,05$) just

after the chronic ingestion of creatine-caffeine as compared to that of the groups without supplementation and creatine, independent of exercise. The time to perform the sets of jumps was not affected by the different supplementation protocols, however, creatine-caffeine ingestion elevated the concentration of blood lactate after the fourth set as compared to that of the groups without supplementation. The supplementation protocols did not affect bone parameters, nevertheless, the exercise program increased femur length, thickness, weight and resistance force to fracture. It was concluded that creatine supplementation as well as its association with caffeine did not affect body weight and the percentage of water, protein and fat in the carcass and viscera, independent of exercise. The exercise program, however, decreased body weight and the percentage of fat in the carcass, but no effect was observed in the percentage of protein and water. Acute and chronic creatine supplementation increased the absolute urinary creatinine content, independent of exercise and the exercise program decreased absolute urinary creatinine at week six, independent of supplementation. Creatine supplementation did not affect the content of relative urinary creatinine at weeks two and six, independent of exercise, however, the exercise regime increased relative urinary creatinine at week two and decreased at week six, independent of supplementation. Creatine supplementation associated with caffeine did not alter absolute and relative creatinine excretion, independent of exercise. Animals supplemented with creatine and caffeine exhibited a greater blood lactate concentration at the end of exercise performance compared with that of animals without supplement, although the performance was not affected by supplementation. The chronic creatine and caffeine supplementation enhanced the urinary calcium excretion, independent of exercise. None of the supplementation protocols affected the analyzed bone parameters, independent of exercise. However, the exercise regime increased the relative bone resistance to fracture as well as femur relative length, thickness and weight. The bone resistance to fracture appears to be associated with alterations in bone length, thickness and weight.

ÍNDICE

Capítulo 1: Efeitos da Suplementação de Creatina associada ou não à Cafeína sobre a Composição Corporal em Ratos Wistar submetidos a Exercício Anaeróbico Intermitente.

Introdução	1
Materiais e Métodos	5
Animais de Experimentação e Tratamento	5
Suplementação de Creatina e Cafeína	6
Programa de Exercício	6
Delineamento Experimental	9
Determinação da Concentração de Lactato Sangüíneo	10
Determinação da Composição Corporal	10
Determinação da Creatinina Urinária	11
Análise Estatística	11
Resultados	12
Caracterização do Programa de Exercício	12
Ganho de Peso Corporal	12
Composição Corporal da Carça e das Vísceras	14
Creatinina Urinária	16
Discussão	20
Conclusão	27
Referências Bibliográficas	28

Capítulo 2: Efeitos da Suplementação de Creatina associada ou não à Cafeína sobre a Performance e a Resistência Óssea em Ratos Wistar submetidos a Exercício de Saltos Intermitente.

Introdução	39
Materiais e Métodos	44

Animais de Experimentação e Tratamento	44
Suplementação de Creatina e Cafeína	44
Programa de Exercício	45
Avaliação da Performance	46
Determinação do Tempo de Exercício	46
Determinação da Concentração de Lactato Sangüíneo	46
Determinação do Cálcio Urinário	47
Avaliação da Resistência à Fratura Óssea	47
Análise Estatística	48
Resultados	49
Performance	49
Cálcio Urinário	50
Resistência à Fratura Óssea	51
Discussão	54
Conclusão	60
Referências Bibliográficas	61
Considerações Finais	69

CAPÍTULO 1:

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA ASSOCIADA OU NÃO À CAFEÍNA SOBRE A COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A EXERCÍCIO ANAERÓBICO INTERMITENTE

INTRODUÇÃO

O consumo de suplementos nutricionais tais como creatina e cafeína vêm aumentando entre atletas e praticantes de atividade física objetivando o incremento da performance e da massa muscular. O uso da creatina por atletas como um aditivo ergogênico não é considerado doping (Williams et al., 1998) e o uso da cafeína foi retirada da lista de doping do COI em janeiro de 2004 (WADA).

A creatina é um composto nitrogenado cuja taxa de turnover diária em um ser humano com peso médio de 70 kg é de 2g/dia, proveniente da ingestão exógena ou síntese endógena (Demant e Rhodes, 1999). A creatina é absorvida no trato gastrointestinal de forma similar à dos aminoácidos e peptídeos, sendo digerida a aminoácido por meio de hidrólise enzimática para adentrar à corrente sangüínea e subseqüentemente às células (Speer et al., 2004; Persky et al., 2003). A creatina é sintetizada a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina nos rins, fígado e pâncreas (Persky et al., 2003; Mendes et al., 2002; Demant e Rhodes, 1999), e é estocada predominantemente no músculo esquelético (aproximadamente 95%) sob as formas de creatina livre (aproximadamente 40%) e fosfocreatina (PCr; aproximadamente 60%) (Williams, 2004; Mendes et al., 2002), entretanto, sua farmacocinética pode sofrer influência de compostos dietéticos como cafeína, bicarbonato, carboidratos e outros (Rawson e Clarkson, 2004; van Loon et al., 2004).

A suplementação crônica de creatina combinada ao exercício de força poderia incrementar diretamente o metabolismo da proteína muscular, através da redução da degradação protéica ou aumento da síntese, e/ou indiretamente como resultado da maior carga de treinamento realizada em função de seu efeito ergogênico (Volek et al., 2004; Louis et al., 2003). Também podem ser relacionados mecanismos como o aumento no mRNA da miosina de cadeia pesada e expressão protéica (Volek et al., 2004), alteração na

expressão do fator de transcrição miogênico (Hespel et al. 2001), aumento líquido na retenção de nitrogênio (Jówko et al., 2001) e efeito anti-catabólico em alguns tecidos (Parise et al., 2001). Contudo, pouco se conhece sobre a interação do aumento da massa corporal com a incorporação de proteína muscular em função da elevação da síntese protéica em resposta à ingestão de creatina e treinamento físico.

O aumento da massa corporal induzida pela suplementação de creatina (Brilla et al., 2003; Lehmkuhl et al., 2003) tem sido relacionada à retenção de água pelo efeito osmótico decorrente da elevação da creatina intramuscular (Murphy et al., 2004; Powers et al., 2003; Mendes et al., 2002), porém, outros autores mencionam não encontrar tal mecanismo (Eckerson et al., 2004; Mendes et al., 2004; Louis et al., 2003). Assim, a determinação da retenção hídrica na carcaça vazia (músculo esquelético e ossos) e nas demais partes (pele e vísceras) pode esclarecer esta questão.

A degradação da PCr por meio de uma reação irreversível poderia gerar como produto final a creatinina (Greenhaff, 2001), que tem sido mostrada ser excretada totalmente na urina (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Havenetidis e Bourdas (2003) e Smith-Palmer (2002) sugerem que a creatinina urinária poderia aumentar devido à elevação da creatina corporal em função de sua suplementação. O exercício também poderia incrementar a excreção de creatinina urinária por aumentar o catabolismo da PCr (Mendes et al., 2004; Gill et al., 2004; Turgut et al., 2003). Portanto, a determinação da creatinina urinária poderá elucidar se a PCr seria o principal substrato energético consumido durante a performance do exercício anaeróbico intermitente associada à suplementação de creatina, e se, estes elevariam a excreção de creatinina.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância psicoativa presente em plantas e seus derivados como chá, café, guaraná, chocolate e em refrigerante sabor cola (Deslandes et al., 2004; Tieges et al., 2004). A cafeína, uma substância lipossolúvel, alcançaria seus níveis de pico no plasma entre 30 e 120 minutos, e aproximadamente 100% de sua ingestão oral poderiam ser rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal (Braga et al., 2000). Em doses baixas (3mg/kg p.c./dia) a cafeína poderia melhorar a performance em exercício de longa duração (Birnbaum et al., 2004; Bell et al., 2002; Nishijima, 2002), pois sua ingestão estimula a liberação de catecolaminas (Tinley et al., 2004; Altimari et al., 2001) e reduz a taxa de glicogenólise muscular durante o exercício aeróbico, cabendo à cafeína, o efeito de

poupar glicogênio devido ao aumento da mobilização e oxidação da gordura intra e extramuscular (McLellan et al., 2004; Hespel et al., 2001).

Apesar de alguns autores sugerirem que a cafeína não exerceria nenhum efeito sobre a performance em exercício de curta duração (James et al., 2004; Warskulat et al., 2004; Vandenberghe et al., 1996), vários estudos mostraram a melhora na produção de potência anaeróbica (Acheson et al., 2004; McLellan et al., 2004; Bell et al., 2002), na capacidade anaeróbica (Doherty et al., 2004; Bell et al., 2002) e em outras medidas de performance anaeróbica (Doherty et al., 2002). O principal efeito da cafeína no exercício intenso é sua ação direta no músculo esquelético, elevando a transmissão de estímulos na interação neuro-muscular (Kalmar et al., 2004; Altimari et al., 2001), como a capacidade de antagonismo aos receptores de adenosina (Halldner et al., 2004). Tem sido sugerido que a cafeína aumenta o tempo até a fadiga durante o exercício de força máxima (Kalmar et al., 2004) em função da liberação dos íons de cálcio (Ca^{2+}) do retículo sarcoplasmático (RS) (Germinario et al., 2004; James et al., 2004), e que a ingestão de cafeína potencializaria a produção de força muscular (James et al., 2004; Paluska, 2003; Graham, 2001).

A cafeína poderia alterar a composição corporal por reduzir o peso e a gordura corporais (Birnbaum et al., 2004; Zheng et al., 2004; Bell et al., 2002) em função de elevar a taxa metabólica basal, mobilização e oxidação de ácidos graxos (Zheng et al., 2004; Hespel et al., 2001; Chesley et al., 1998). Todavia, estes efeitos não foram identificados por alguns autores (Acheson et al., 2004; Dulloo et al., 1999). A possível ação da cafeína em prolongar o exercício de força muscular até a fadiga (Kalmar et al., 2004) poderia promover maior performance do exercício anaeróbico intermitente e indiretamente promover a síntese protéica, contudo, faltam evidências que suportem esta suposição.

O sinergismo dos potenciais efeitos da suplementação de creatina e da ingestão de cafeína têm sido estudado e acredita-se que a cafeína facilita a elevação da creatina exógena no tecido muscular, melhorando a produção de força dinâmica e a concentração de PCr muscular. Porém, seu potencial ergogênico poderia ser completamente eliminado quando a cafeína fosse ingerida junto a creatina (Hespel et al., 2002; Vandenberghe et al., 1996). Em contrapartida, Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) afirmaram que a cafeína não estimularia o acúmulo de creatina muscular em resposta à sua suplementação. Doherty et al. (2002) mostraram que a cafeína poderia ser ergogênica se administrada após a suplementação de

creatina. Portanto, em função destas contradições, mais estudos sobre as interferências e conseqüências da cafeína sobre a cinética da creatina são necessários.

A dose de 5mg de cafeína/kg p.c./dia poderia aumentar o desempenho durante o exercício intenso (Doherty et al., 2002), mas, como conseqüência, a elevação da concentração de lactato sangüíneo (Jackman et al., 1996) poderia, ao contrário, reduzir a performance durante o exercício (Warskulat et al., 2004). Da mesma forma, considerando que a cafeína aumentaria o tempo até a fadiga em exercício de força máxima (Kalmar et al., 2004) e que a suplementação de creatina reduziria o tempo de recuperação pós-fadiga (McBride et al., 2002), a interação destes efeitos, por um longo período de ingestão, associada ao treinamento com exercício anaeróbico intermitente poderiam ser potencializados, no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos desta interação sobre a composição corporal.

Portanto, os objetivos deste estudo foram: 1) verificar se a suplementação de creatina associada ou não à ingestão de cafeína afetaria o peso e a composição corporal de animais sedentários e exercitados; e 2) verificar se os protocolos de suplementação interfeririam na excreção urinária de creatinina de animais sedentários e exercitados.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de Experimentação e Tratamento

Foram utilizados inicialmente 60 animais (*Rattus norvegicus* – Wistar) adulto-jovens machos com 45 dias de idade e peso inicial médio de $142,7 \pm 7,41$ g, obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa - MG. Estes foram alocados aleatoriamente em um dos 6 grupos (10 por grupo): SSS – sedentários sem suplementos (n=10); SC – sedentário com creatina (n=10); SCC – sedentário com creatina e cafeína (n=09); ESS – exercitado sem suplementos (n=07); EC – exercitado com creatina (n=07); e ECC – exercitado com creatina e cafeína (n=06). As perdas de animais ocorreram por causas independentes à da execução do programa de exercício.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas, por um período de 6 semanas, mantidos em ambiente com temperatura média de 24°C, fotoperíodo de 12 horas. Todos os animais receberam de 15 a 20g de dieta semipurificada AIN-93M (Reeves et al., 1993; Tabela 1.1) e água destilada *ad libitum*.

Tabela 1.1. Composição da dieta AIN-93M.

Ingredientes	%
Caseína (>85% de proteína)	14,00
Amido Dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos)	15,50
Sacarose	10,00
Óleo de Soja	4,00
Fibra (Celulose microfina)	5,00
Mistura de Minerais	3,50
Mistura de Vitaminas	1,00
L-Cistina	0,8
Bitartarato de Colina	0,25
Amido de Milho	46,57
Total	100,00

O peso corporal foi aferido no primeiro dia de cada semana e no dia do sacrifício, utilizando-se uma balança eletrônica digital (Marte - Brasil) com capacidade máxima de 500 gramas e precisão de 5 miligramas, sendo o peso dos animais sempre aferidos no mesmo horário do dia.

Suplementação de Creatina e Cafeína

Os animais dos grupos SC e EC receberam suplementação diária de creatina; os animais dos grupos SCC e ECC receberam suplementação diária de creatina mais cafeína, adotando-se o procedimento para suplementação de creatina de duas fases: carga e manutenção.

A fase de carga teve a duração de sete dias e foi iniciada na primeira semana de experimento. Os animais dos grupos com creatina receberam uma dose de 0,430g de creatina (Power Nutrition[®])/kg de peso corporal/dia adicionada a 15g de dieta semipurificada (AIN-93 M), em função da melhor absorção da creatina quando administrada juntamente com carboidrato (van Loon et al., 2004).

A fase de manutenção teve duração de cinco semanas e foi iniciada na segunda semana. Nesta fase, os animais dos grupos com creatina receberam uma dose de 0,143g/kg de peso corporal/dia adicionada a 15 a 20g de dieta semipurificada (AIN-93 M). Os animais dos grupos com creatina e cafeína receberam uma dose de 15mg de cafeína/kg de peso corporal/dia, que foi adicionada à dieta semipurificada dos animais.

Os animais dos grupos SSS e ESS receberam os mesmos procedimentos dos demais grupos, contendo apenas a dieta semipurificada (AIN-93 M).

As doses da suplementação de creatina foram determinadas com base numa dose de 30g na fase de carga e 10g na fase de manutenção para um homem de 70 kg, doses estas de creatina expressas por diversos autores como as maiores administradas em estudos com humanos e animais (Lehmkuhl et al., 2003; Persky et al., 2003; van Loon et al., 2003), bem como as doses de cafeína (Doherty et al., 2004; Hartley et al., 2004; O'Connor et al., 2004).

Programa de Exercício

Para a adaptação dos animais dos grupos ESS, EC e ECC ao meio líquido, na primeira semana de experimento os mesmos foram colocados num tanque de alvenaria azulejado (largura: 60 cm, comprimento: 75 cm, altura: 80 cm) com água na profundidade de 15 cm e temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$, por 30 minutos diários.

Para a realização do programa de exercício foram colocados dois tubos de PVC (diâmetro, 15 cm; e altura, 60 cm) fechado em sua extremidade inferior com tela de nylon

vazada. A sobrecarga do exercício, percentagem do peso corporal, foi adicionada ao animal utilizando-se esferas de chumbo inseridas em um colete (lycra) especialmente confeccionado para os animais (Figura 1.1). A profundidade da água foi determinada por um percentual da média do comprimento dos animais, maior distância entre as extremidades dos membros posteriores e as narinas estando o animal com o corpo e membros inferiores estendidos.



Figura 1.1. Animal vestido com o colete de lycra.

Após uma semana de adaptação à água, o protocolo de exercício foi iniciado. O exercício consistiu de saltos de impulsão vertical desde o fundo do tanque (apoio dos pés) até a superfície da água (narinas fora d'água, Figura 1.2). Os animais realizavam quatro séries de dez saltos (40 saltos) com intervalo de descanso de um minuto entre as séries. Este protocolo foi realizado cinco dias por semana, durante cinco semanas. A sobrecarga do exercício foi empregada da seguinte forma: na primeira semana, os ratos realizaram as quatro séries de dez saltos estando a água do tanque a uma profundidade de 120% do comprimento dos animais (média), além da adição de 20% do peso corporal do animal, nos dois primeiros dias, e 25% nos três dias seguintes. Durante a segunda semana, os animais exercitaram estando a água com profundidade de 130% do comprimento dos animais e com sobrecarga de 30% de peso corporal nos dois primeiros dias e 35% nos três dias seguintes. Durante a terceira semana, os animais realizaram os saltos estando a água com profundidade de 140% do comprimento dos animais e sobrecarga de 40% do peso corporal durante toda a semana. Durante a quarta semana, os animais efetuaram os saltos estando a

água com profundidade de 145% do comprimento dos animais e sobrecarga de 45% do peso corporal durante toda a semana. Na quinta semana, os animais realizaram o protocolo de exercício estando a água com profundidade de 150% do comprimento dos animais e sobrecarga de 50% do peso corporal (adaptado de Oliveira et al., 2000).



Figura 1.2. Modelo de exercício anaeróbico intermitente de saltos verticais na natação.

Delineamento Experimental

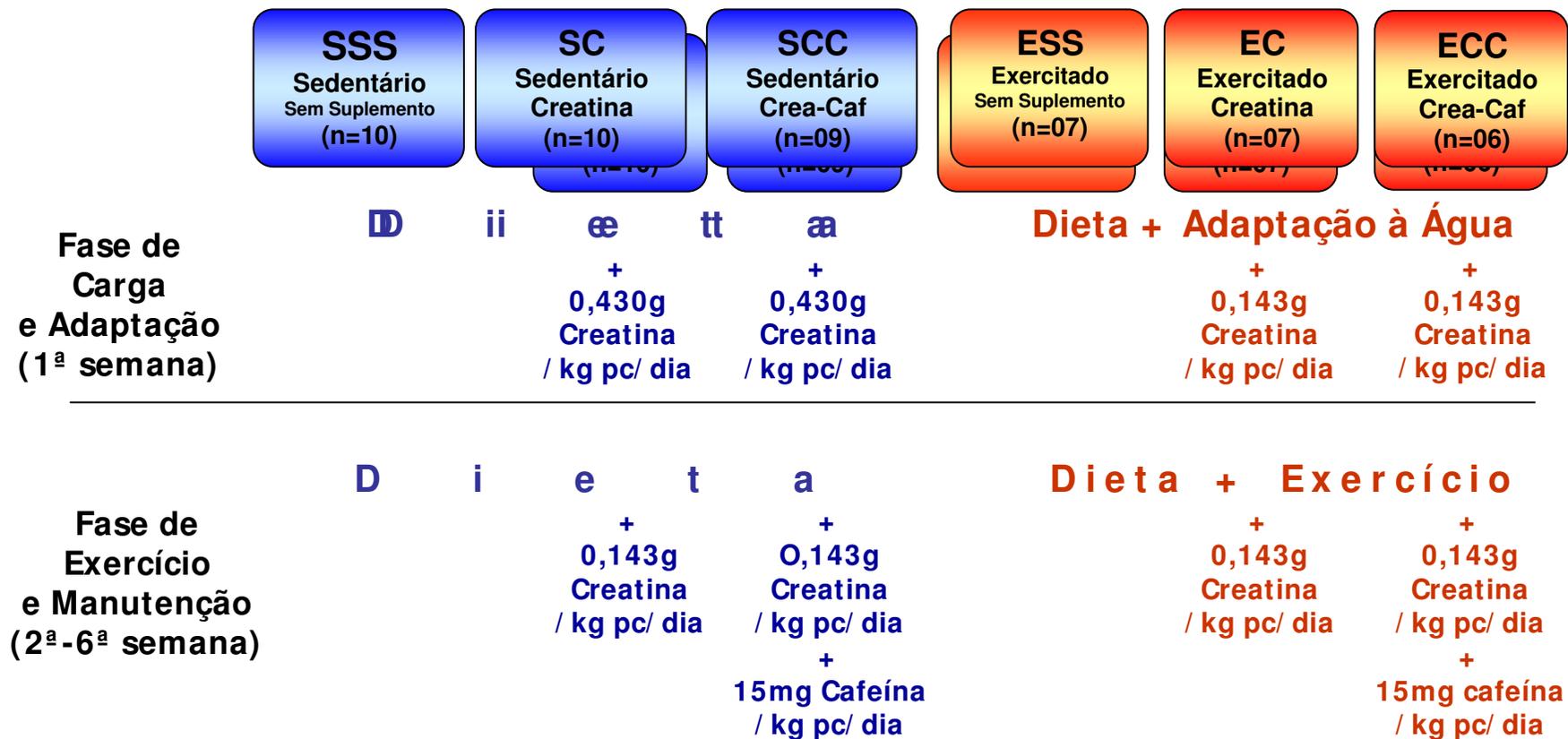


Figura 1.3. Delineamento Experimental

Determinação da Concentração de Lactato Sangüíneo

Para caracterizar a natureza do esforço executado pelos animais durante o programa de exercício empregado neste estudo, após o período de tratamento, determinou-se a concentração do lactato sangüíneo dos animais dos grupos ESS, EC e ECC durante a realização de quatro séries de dez saltos com intervalo de um minuto entre as séries (uma sessão de treino), estando a profundidade da água a 150% do comprimento dos animais que suportavam uma sobrecarga de 50% do peso corporal. As medidas foram realizadas em três momentos: 1) antes do exercício; 2) após a segunda série de dez saltos; e 3) após a quarta séries de dez saltos. O sangue foi coletado da extremidade distal do rabo dos animais e a concentração de lactato analisada usando-se o equipamento Accusport BM-Lactate (Roche®) e fitas para determinação de lactato sangüíneo da mesma marca.

Determinação da Composição Corporal

O ganho de peso corporal foi determinado através da diferença entre o peso aferido no dia do sacrificio, ao término do experimento, e o peso aferido no primeiro dia da primeira semana, também foi aferido o peso corporal semanalmente. Utilizou-se de balança eletrônica digital (Marte - Brasil) contendo a precisão em miligrama, sendo os animais sempre pesados no mesmo horário do dia.

A composição corporal foi determinada por métodos diretos. Após o período de tratamento e das avaliações pertinentes, os animais foram sacrificados (CO₂) a pele e todas as vísceras do animal foram separadas dos músculos e ossos, denominado carcaça vazia. Foram descartados apenas cabeça e rabo. Pele e vísceras e carcaça vazia foram armazenadas separadamente em freezer ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) para análises futuras.

O percentual hídrico da carcaça vazia foi avaliado pelo método gravimétrico com emprego de calor baseado na evaporação da água numa estufa (Fanem - Brasil) a 105°C por 24 horas. O percentual de gordura foi determinado pelo processo gravimétrico com emprego do aparelho de Soxhlet usando éter etílico como solvente na extração por 8 horas. O percentual de proteína foi calculado em triplicata pelo método indireto de determinação do nitrogênio (Conteúdo de Proteína (g) = conteúdo de nitrogênio (g) x 6,25) através da metodologia de Kjeldahl (AOAC, 1998).

Determinação da Creatinina Urinária

A urina dos animais foi coletada por um período de 24 horas nas primeira, segunda e sexta semanas utilizando-se gaiolas metabólicas individuais. O volume de urina coletado foi completado para 10mL com água deionizada e centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm (Excelsa-Fanem-Brasil). Do sobrenadante da urina centrifugada, 50µL foi pipetada numa cubeta diluída por 500µL de água deionizada para a determinação da creatinina urinária através do método automatizado de espectrometria de UV/VIS, segundo Henry et al. (1974). As análises foram realizadas utilizando kits da marca Bioclin[®] no equipamento ALIZÉ[®] (Biomérieux-França) do Laboratório Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa.

Análise Estatística

Inicialmente os dados foram submetidos ao Teste de Komogorov-Smirnov para verificar a simetria. Para as variáveis com distribuição normal, as análises entre três ou mais grupos independentes (grupos individualmente e fator suplementação) foram efetuados usando-se Análise de Variância (ANOVA One-Way). Para análises de dois grupos distintos (fator exercício) foi usado o Teste-*t* de Student. Para análises entre períodos diferentes do mesmo grupo (amostras dependentes) foram utilizados o Teste-*t* Pareado ou ANOVA One-Way Medidas Repetidas. Para determinar a existência ou não de relação entre as variáveis foram empregados os testes de correlação de Pearson e Spearman. Foram usados testes não-paramétricos compatíveis a cada um anteriormente referido, quando o teste de simetria não apresentou distribuição normal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão (DP) e mediana, tanto para os dados analisados por testes paramétricos, quanto para testes não-paramétricos.

Para as análises de múltiplas comparações *post hoc* foi utilizado o teste de Tukey, no caso de testes paramétricos, ou teste de Dunn's, para testes não-paramétricos. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o software Sigma Stat 3.0, sendo empregado o nível de significância estatística de até 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Caracterização do Programa de Exercício

A concentração de lactato sangüíneo dos animais exercitados exibiu um aumento significativo (ANOVA One-Way Medidas Repetidas, $p < 0,05$) entre os momentos pré-exercício/repouso ($2,59 \pm 0,6$; média \pm DP), após a segunda série ($7,01 \pm 1,5$) e após a quarta série de saltos ($9,75 \pm 2,0$). Os níveis de lactato sangüíneo observados indicam que o esforço realizado pelos animais envolveu predominantemente o metabolismo anaeróbico glicolítico.

Ganho de Peso Corporal

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o peso dos animais dos diferentes grupos no início dos tratamentos (SSS: $141,90 \pm 8,4$; SC: $140,10 \pm 9,9$; SCC: $144,40 \pm 9,1$; ESS: $139,60 \pm 13,4$; EC: $141,20 \pm 12,4$ e ECC: $143,10 \pm 10,4$ g; média \pm desvio padrão), contudo, ao final do período do estudo, na sexta semana, observou-se um ganho de peso corporal significativo (Teste-t de Student Pareado, $p < 0,05$) em todos os grupos, em relação ao peso corporal inicial (SSS: 121,3 %; SC: 118,8 %; SCC: 113,0 %; ESS: 103,8 %; EC: 103,1 % e ECC: 97,9 %). Na sexta semana, os grupos ESS e ECC ($284,57 \pm 11,0$ e $283,33 \pm 19,5$; respectivamente) apresentaram pesos corporais significativamente menores ($p < 0,05$) comparados aos dos grupos SSS e SCC ($314,00 \pm 7,7$ e $307,56 \pm 12,2$; respectivamente).

O ganho de peso corporal ocorreu de forma progressiva em todos os grupos ($P < 0,05$; Figura 1.4).

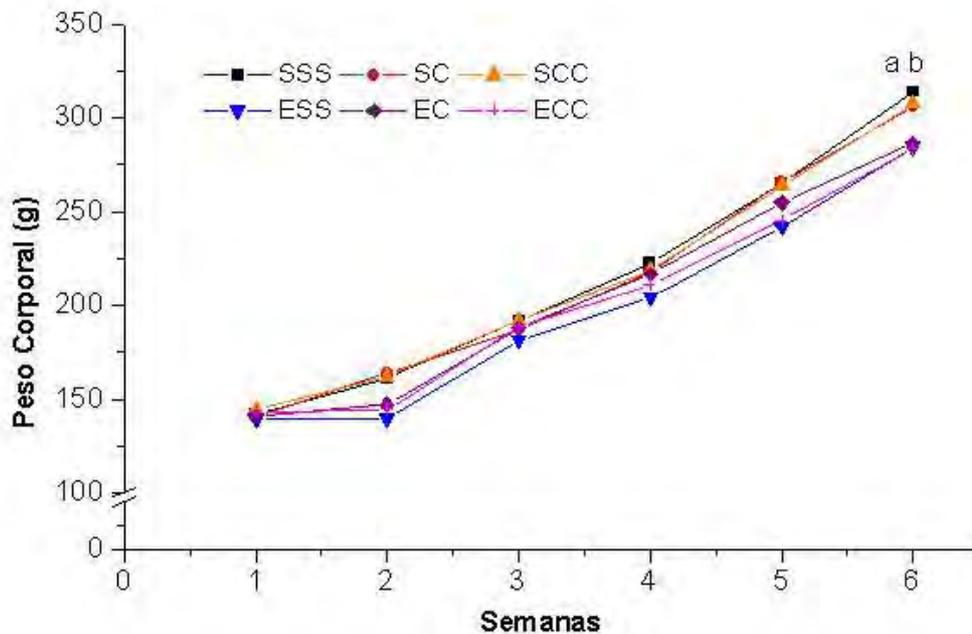


Figura 1.4. Peso corporal ao longo do período de tratamentos.

Significâncias ($P < 0,05$): ^a vs 1ª Semana; ^b vs Sedentário (^a Friedman ou ANOVA Medidas Repetidas; ^b Teste-t de Student)

Os pesos corporais dos animais em função do exercício e da suplementação no início e ao final do experimento estão apresentados na tabela 1.2. Os animais que exercitaram mostraram ganho de peso corporal significativamente inferior (8,8%; $p < 0,05$) comparado ao dos animais sedentários na 6ª semana. Ao comparar o ganho de peso em função da suplementação observou-se que o ganho de peso ao final do experimento, na sexta semana, não foi diferente entre os animais suplementados e não suplementados ($p > 0,05$).

Tabela 1.2. Peso corporal em função do exercício e da suplementação (g).

Exercício	1ª Semana		6ª Semana	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sedentários	142,13±9,0	140,00	309,45±13,4 ^b	310,00
Exercitados	140,40±12,6	139,50	284,95±16,6 ^{ab}	286,50
Suplementação^c				
Sem Suplemento	140,75±10,9	140,00	301,88±17,4 ^b	305,00
Creatina	140,65±10,9	139,50	298,41±20,2 ^b	299,00
Creatina Cafeína	143,75±9,5	145,00	297,87±20,5 ^b	297,00

Significâncias (P<0,05): ^a vs Sedentário; ^b vs 1ª Semana (^a Teste-t de Student; ^b Teste-t de Student Pareado; ^c ANOVA).

Composição Corporal da Carcaça e das Vísceras

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1.3. Não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) das percentagens de água, proteína e gordura na carcaça vazia e nas vísceras entre os grupos experimentais. Contudo, constatou-se que a percentagem de água foi maior na carcaça (31,5%) comparada à das vísceras, e que a percentagem de gordura foi maior nas vísceras (161,3%) comparada à da carcaça vazia. A fração protéica apresentou valores semelhantes em ambas às partes.

Tabela 1.3. Percentual de água, gordura e proteína na carcaça e nas vísceras (%).

Carcaça ^a	Água		Gordura		Proteína	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
SSS	69,01±1,3	69,56	21,95±4,3	20,99	84,34±2,0	84,76
SC	68,25±1,7	68,85	24,84±4,2	24,10	83,77±2,2	83,57
SCC	68,92±1,0	68,80	23,40±3,2	24,21	82,52±2,0	81,69
ESS	68,73±0,9	69,60	15,51±3,1	15,15	83,06±0,8	82,91
EC	69,79±2,2	68,90	18,46±4,3	18,20	82,71±1,7	82,25
ECC	69,09±0,9	68,87	20,27±2,4	20,86	83,53±1,4	83,39
Vísceras^a						
SSS	53,98±4,1	53,83	50,58±6,5	49,91	81,81±1,5	82,38
SC	50,67±3,2	51,21	57,69±4,9	58,97	81,38±1,5	81,88
SCC	50,49±3,3	50,13	57,50±5,5	58,82	82,42±4,9	82,19
ESS	53,34±2,4	52,88	53,50±4,3	55,18	81,57±1,8	81,96
EC	53,37±5,9	54,05	51,58±10,2	52,27	81,86±1,7	82,44
ECC	52,94±3,1	52,51	54,38±5,3	55,83	82,00±2,1	81,60

^a ANOVA.

A tabela 1.4 apresenta os dados da composição corporal da carcaça e das vísceras em função do exercício. Observou-se que os animais exercitados apresentaram um percentual de gordura na carcaça vazia significativamente menor (30,2%, $p < 0,05$) quando comparados ao dos animais sedentários. Não foram observadas nenhuma diferença estatística para as percentagens das frações água e proteína entre os grupos exercitados e sedentários, como também para a percentagem de proteína nas vísceras.

Tabela 1.4. Percentual de água, gordura e proteína na carcaça e nas vísceras em função do exercício (%).

Carcaça	Água		Gordura		Proteína	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sedentário	68,75±1,4	69,01	23,40±4,0	23,51	83,58±2,1	83,52
Exercício	69,21±1,5	69,19	17,97±3,8 ^a	18,02	83,08±1,3	82,99
Vísceras						
Sedentário	51,76±3,8	51,82	55,18±6,4	55,38	81,85±1,6	82,08
Exercício	53,23±3,8	53,27	53,10±6,9	54,69	81,70±1,8	81,82

^a Significância ($P < 0,05$) vs Sedentários (Teste-t de Student).

Os dados da composição corporal da carcaça e das vísceras em função da suplementação estão apresentados na tabela 1.5. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre as percentagens das frações de água, gordura e proteína na carcaça vazia e nas vísceras entre os animais suplementados e não suplementados.

Tabela 1.5. Percentual de água, gordura e proteína na carcaça e nas vísceras em função da suplementação (%).

Carcaça ^a	Água		Gordura		Proteína	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sem Suplemento	68,94±1,2	69,29	19,30±5,0	18,73	83,81±1,7	83,52
Creatina	68,88±2,0	69,28	22,21±5,2	22,77	83,33±2,0	83,07
Creatina Cafeína	68,99±0,9	68,88	22,15±3,3	21,73	82,93±1,8	81,35
Vísceras ^a						
Sem Suplemento	53,72±3,4	53,00	51,78±5,7	53,96	81,71±1,6	82,08
Creatina	51,78±4,5	52,36	55,17±7,9	54,72	81,57±1,5	81,90
Creatina Cafeína	51,47±3,4	51,81	56,25±5,5	56,73	82,26±1,9	81,82

^a ANOVA.

Creatinina Urinária

Os resultados obtidos na determinação da creatinina urinária estão apresentados nas tabelas 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 e 1.10. Não houve diferença significativa ($p>0,05$; Tabela 1.6) no conteúdo de creatinina urinária absoluta entre os grupos no início do tratamento (1ª semana). Na segunda semana, após a ingestão da carga de creatina, porém, o conteúdo de creatinina urinária absoluta foi significativamente maior (37,4%, $p<0,05$) no grupo SC comparado ao da 1ª semana. Todavia, entre os grupos, não foi observada nenhuma diferença estatística ($p>0,05$). Da mesma forma, na sexta semana, não houve diferença estatística entre o conteúdo de creatinina urinária absoluta dos grupos experimentais. Todavia, o conteúdo de creatinina urinária absoluta aumentou significativamente em todos os grupos se comparados ao da primeira semana (SSS: 80,5; SC: 112,6; SSC: 83,9; ESS: 69,3; EC: 100,6 e ECC: 68,1%) e ao da segunda semana (SSS: 95,6; SC: 54,7; SSC: 93,5; ESS: 69,9; EC: 54,2 e ECC: 59,2%).

Tabela 1.6. Conteúdo de creatinina urinária absoluta (mg/24h).

Grupos ^c	1ª Semana		2ª Semana		6ª Semana	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
SSS	37,87±13,3	40,68	34,93±6,2	34,68	68,34±13,8 ^{ab}	68,58
SC	34,08±9,9	37,95	46,84±4,4 ^a	45,60	72,47±11,3 ^{ab}	76,80
SCC	39,44±6,5	40,81	37,48±11,8	38,76	72,53±10,6 ^{ab}	69,48
ESS	33,79±7,9	33,44	33,67±10,5	33,00	57,19±4,9 ^{ab}	57,96
EC	34,98±8,7	36,96	42,33±7,0	46,32	68,48±5,0 ^{ab}	70,74
ECC	39,67±2,8	35,05	41,90±9,1	44,52	66,70±9,1 ^{ab}	66,27

Significâncias ($P<0,05$): ^a vs 1ª Semana; ^b vs 2ª Semana (^{a,b} ANOVA Medidas Repetidas; ^c ANOVA).

O fator exercício não causou nenhuma alteração significativa ($p>0,05$; Tabela 1.7) no conteúdo de creatinina urinária absoluta nas primeira e segunda semana. Na sexta semana, entretanto, foi observada uma significativa redução ($p<0,05$) da creatinina urinária absoluta nos animais exercitados comparados ao dos sedentários (12,3%). Observou-se, também, um aumento significativo da creatinina urinária absoluta nos animais exercitados e sedentários quando comparados aos da primeira (93,2 %) e segunda (78,4%) semanas.

Em função da suplementação, na primeira semana, o conteúdo de creatinina urinária absoluta não apresentou diferença estatística ($p>0,05$; Tabela 1.7) entre os animais não

suplementados e os suplementados com creatina e creatina mais cafeína. Mas, na segunda semana, os animais suplementados com creatina exibiram um aumento significativo (33,6%; $p < 0,05$) em comparação à primeira semana e em comparação aos animais sem suplementação (33,0%). Na sexta semana, todos os grupos apresentaram uma elevação significativa do conteúdo de creatinina urinária absoluta aos da primeira (SSS/ESS: 78,4; SC/EC: 111,8 e SCC/ECC: 77,5%) e da segunda (SSS/ESS: 86,0; SC/EC: 58,5 e SCC/ECC: 76,9%) semanas. Os animais suplementados com creatina mostraram conteúdo de creatinina urinária absoluta maior que o dos animais não suplementados (13,3%).

Tabela 1.7. Conteúdo de creatinina urinária absoluta em função do exercício e da suplementação (mg/24h)

Exercício	1ª Semana		2ª Semana		6ª Semana	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sedentário	37,21±10,0	40,15	39,67±9,5	42,1	71,88±11,1 ^{ab}	71,40
Exercício	35,86±7,1	36,80	40,00±10,1	42,06	63,99±8,0 ^{abc}	62,79
Suplementação						
Sem Suplemento	35,73±10,7	35,64	34,27±8,6	33,72	63,75±12,2 ^{ab}	62,40
Creatina	34,11±8,8	37,95	45,57±6,5 ^{ad}	45,96	72,24±7,4 ^{ab}	72,45 ^d
Creatina-Cafeína	39,55±4,9	40,15	39,69±10,5	42,60	70,20±10,1 ^{ab}	69,48

Significâncias ($P < 0,05$): ^a vs 1ª Semana; ^b vs 2ª Semana; ^c vs Sedentários; ^d vs Sem

Suplemento (^{a,b} ANOVA Medidas Repetidas; ^c Teste-t de Student; ^d Kruskal-Wallis).

Os resultados da correlação entre o conteúdo de creatinina urinária absoluta obtida na sexta semana e os parâmetros da composição corporal da carcaça e das vísceras estão apresentados na tabela 1.8. Observou-se que não houve correlação significativa entre estes parâmetros (Correlação de Pearson ou Spearman, $p > 0,05$). Todavia, foi observada uma correlação positiva regular (Correlação de Spearman, $r_s = 392$ e $p = 0,0066$) entre o ganho de peso com a elevação do conteúdo de creatinina urinária absoluta durante ao longo das seis semanas de tratamento.

Tabela 1.8. Correlação entre creatinina e fatores da composição corporal na sexta semana.

	Creatinina	Valor de p
Peso Corporal	r = 0,240	0,099
Água (Carcaça)	rs = 0,239	0,173
Água (Vísceras)	rs = 0,029	0,844
Gordura (Carcaça)	rs = -0,099	0,500
Gordura (Vísceras)	rs = -0,006	0,966
Proteína (Carcaça)	rs = -0,017	0,966
Proteína (Vísceras)	rs = -0,051	0,732

Em função da correlação positiva observada acima, os dados de creatinina urinária (mg/24h) foram normalizados pelo peso corporal dos animais. Desta forma, foi determinado o conteúdo de creatinina urinária relativa (mg/24h/g).

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$; Tabela 1.9) no conteúdo de creatinina urinária relativa entre os grupos na primeira semana. Na segunda semana, o conteúdo de creatinina urinária relativa foi significativamente menor no grupo SSS (90,4%) e maior no ESS (18,5%) comparados aos da 1ª semana. Além disso, os grupos SC e ESS apresentaram conteúdos de creatinina urinária relativas significativamente maiores que os do grupo SSS (97,8 e 62,4%, respectivamente). Na sexta semana, observaram-se uma elevação no grupo SSS (129,6%) e uma redução no grupo ESS (72,3%) significativas comparadas à segunda semana. Nesta mesma época, o grupo SSS apresentou conteúdo de creatinina urinária relativa significativamente maior que o do grupo ESS (77,6%).

Tabela 1.9. Conteúdo de creatinina urinária relativa (mg/24h/g)

Grupos	1ª Semana		2ª Semana		6ª Semana	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
SSS	0,495±0,145	0,462	0,260±0,072 ^b	0,271	0,597±0,163 ^c	0,602
SC	0,445±0,166	0,415	0,522±0,247	0,440 ^a	0,504±0,306	0,393
SCC	0,339±0,055	0,322	0,326±0,105	0,296	0,370±0,079	0,361
ESS	0,465±0,089	0,488	0,551±0,193 ^b	0,536 ^a	0,320±0,071	0,339 ^{ac}
EC	0,438±0,121	0,425	0,468±0,185	0,428	0,327±0,057	0,341
ECC	0,420±0,109	0,439	0,496±0,248	0,490	0,367±0,125	0,298

Significâncias ($P < 0,05$): ^a vs SSS; ^b vs 1ª Semana; ^c vs 2ª Semana (^a Kruskal Wallis; ^{bc}

Friedman ou ANOVA Medidas Repetidas).

O fator exercício não promoveu alteração significativa ($p > 0,05$; Tabela 1.10) no conteúdo de creatinina urinária relativa na primeira semana. Porém, na segunda semana, foi

observado um conteúdo de creatinina urinária relativa significativamente maior nos animais exercitados comparado ao dos sedentários (56,1%), entretanto, na sexta semana, foi observada uma redução significativa nos animais exercitados comparados aos sedentários (38,1%). Também, na sexta semana, foi identificada uma elevação significativa para os animais sedentários e uma redução para os exercitados comparados à segunda semana (45,2 e 48,5%, respectivamente).

Em função da suplementação, o conteúdo de creatinina urinária relativa não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$; Tabela 1.10) no decorrer das semanas. No entanto, na primeira semana, os animais suplementados com creatina mais cafeína mostraram conteúdo de creatinina urinária relativa menor que o dos animais não suplementados (11,6%).

Tabela 1.10. Conteúdo de creatinina urinária relativa em função do exercício e da suplementação (mg/24h/g)

Exercício	1ª Semana		2ª Semana		6ª Semana	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sedentário	0,424±0,142	0,380	0,368±0,189	0,312	0,490±0,219	0,453 ^c
Exercício	0,441±0,105	0,455	0,505±0,206	0,487 ^a	0,337±0,095 ^c	0,328 ^a
Suplementação						
Sem Suplemento	0,479±0,116	0,478	0,413±0,208	0,421	0,483±0,191	0,470
Creatina	0,441±0,140	0,423	0,494±0,212	0,440	0,431±0,249	0,345
Creatina-Cafeína	0,380±0,095 ^b	0,339	0,411±0,205	0,362	0,369±0,095	0,347

Significâncias ($P < 0,05$): ^a vs Sedentário; ^b vs Sem Suplemento; ^c vs 2ª Semana (^a Mann Whitney; ^b ANOVA; ^c Friedman ou ANOVA Medidas Repetidas).

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar se um programa de exercício de saltos intermitentes associados à suplementação de creatina e cafeína poderia promover alterações na composição corporal de ratos. A caracterização do modelo de exercício foi realizada através da avaliação da concentração de lactato sanguíneo durante a execução de uma tarefa idêntica a uma sessão de treinamento aplicada aos animais ao longo do período experimental. Os resultados mostraram que a concentração de lactato sanguíneo elevou-se significativamente da situação de repouso para a segunda série e desta para a quarta série ($2,59 \pm 0,6$; $7,01 \pm 1,5$ e $9,75 \pm 2,0$; média \pm DP, respectivamente).

Durante o exercício de curta duração e alta intensidade há uma maior participação da glicólise anaeróbica a fim de promover a liberação de energia para o exercício e o piruvato é reduzido a lactato por recepção dos elétrons do NADH e conseqüente regeneração do NAD^+ , reação necessária para que o fluxo glicolítico prossiga (Denadai, 2000, Foss e Ketetian, 2000). Em repouso, os níveis de lactato são baixos e estáveis (~ 2 mmol/L em ratos, Gobatto et al., 2001), pois a produção é balanceada pela remoção. O acúmulo de lactato durante o exercício não é resultado simplesmente do aumento da produção muscular, mas também da liberação, distribuição e eliminação do lactato sanguíneo. Um desequilíbrio entre produção e remoção leva o lactato a se acumular primeiramente no músculo e posteriormente no sangue (Brooks, 1995).

No presente estudo, os níveis de lactato sanguíneo apresentados pelos animais em repouso e durante as séries de saltos são similares aos observados em outros estudos usando natação contínua com sobrecarga (Gobatto et al., 2001; Freitas, 2004). Observa-se que a concentração de lactato sanguíneo que indica a ocorrência do desequilíbrio entre produção e remoção em ratos durante natação com sobrecarga é em torno de 5.5 mmol/L (Gobatto et al., 2001). Assim, os níveis apresentados pelos animais do presente estudo, a partir da segunda série de saltos, indicam que a energia utilizada para a execução de uma sessão de exercício de saltos verticais intermitentes com sobrecarga era proveniente da glicólise anaeróbia, predominantemente.

No presente estudo todos os animais ganharam peso significativamente ao longo do período experimental (Figura 1.4), pois eram animais em fase de crescimento (45 a 92

dias). Apesar da indicação de que a creatina eleva o peso corporal após as fases de carga e manutenção de sua suplementação (Kinugasa et al., 2004; Brose et al., 2003; Lehmkuhl et al., 2003), os dados do presente estudo mostram que não ocorreu alteração no ganho de peso corporal decorrente da ingestão de creatina, resultados similares aos de outros estudos (Mendes et al., 2004; Parise et al., 2001; Stout et al., 2001). Da mesma forma, a ingestão de creatina mais cafeína não afetou o ganho de peso dos animais.

Entretanto, o fator exercício reduziu o ganho de peso dos animais. Entre os grupos, os animais exercitados (ESS e ECC) exibiram ganho de peso corporal significativamente menor se comparados aos do grupo SSS e SCC (10,3 e 8,6 %; respectivamente). Independentemente da suplementação (Tabela 1.2), os animais exercitados também apresentaram menor ganho de peso se comparados aos sedentários (10,6 %; $p < 0,05$), após a 6ª semana. Esta redução de peso corporal em função do exercício é normalmente creditada ao treinamento de endurance (Osei-Tutu e Campagna, 2005; Franco et al., 2003; Cortright et al., 1997). Porém, em resposta ao exercício anaeróbico era esperado que esta alteração ocorresse em menor magnitude devido ao efeito do excesso de “consumo de oxigênio pós-exercício” (efeito EPOC) (Fukuba et al., 2000).

Um dos principais achados deste estudo foi que a ingestão de creatina e de creatina associada à cafeína não estimulou a retenção de água no músculo (Tabelas 1.3 e 1.5), contrariando a proposição de vários autores (Murphy et al., 2004; Yoshizumi e Tsourounis, 2004; Nomura et al., 2003; Powers et al., 2003; Vandenberghe et al., 1996). Tal proposição baseou-se em que a suplementação de creatina poderia elevar os estoques intramusculares de creatina livre e PCr, que, por sua vez, induziria um efeito osmótico de reter maior quantidade de água (Ceddia et al., 2004; Brose et al., 2003; Louis et al., 2003). Além disso, o aumento na retenção hídrica poderia promover uma elevação no peso corporal (Brilla et al., 2003; Louis et al., 2003), o que também não foi observado no presente estudo (Tabela 1.2 e Figura 1.4). Contudo, apesar da utilização de métodos indiretos, Eckerson et al. (2004) e Mendes et al. (2004) também não observaram aumento de peso corporal em resposta à suplementação com creatina.

De acordo com Lloyd et al. (1998), a cafeína exerce uma ação diurética leve podendo reduzir o volume total de água corporal, efeito este antagônico ao da creatina. Os resultados do presente estudo identificaram que os animais dos grupos que consumiram

creatina associada à cafeína não exibiram diferença na fração de água da carcaça ou das vísceras comparada a dos animais dos grupos que ingeriram apenas creatina. Isto sugere que a adição da cafeína a creatina não afetou a retenção hídrica (Tabelas 1.3 e 1.5). Persky et al. (2003) e Vanakoski et al. (1998) relataram que a ingestão de cafeína não alterou a absorção e a farmacocinética da creatina, o que reforça os resultados do presente estudo. Contudo, há de se observar que no presente estudo, utilizou-se uma dose de creatina semelhante ao usado no trabalho de Vanakoski et al. (1998), porém, a dose de cafeína usada no presente estudo foi 2,14 vezes maior que a usada por estes autores e, ainda assim, não interferiu no conteúdo de água corporal.

Tem sido reportado que a suplementação de creatina incrementa o ganho de massa muscular pela acentuada retenção hídrica (Murphy et al., 2004; Nomura et al., 2003; Powers et al., 2003) e/ou pela elevada taxa de síntese protéica (Volek et al., 2004; Brose et al., 2003; Louis et al., 2003). A retenção de água seria responsável pelo aumento na pressão osmótica intramuscular, que, por sua vez, promoveria uma maior taxa de incorporação de leucina na miosina de cadeia pesada nos músculos esquelético e cardíaco (Parise et al., 2001). Todavia, os resultados do presente estudo mostram que tanto a administração de creatina, como de creatina mais cafeína, não afetou o ganho de peso corporal (Tabela 1.2), a incorporação de compostos nitrogenados no músculo e vísceras e o conteúdo de água muscular (Tabelas 1.3 e 1.5), sugerindo não ter havido modificação na taxa de incorporação de proteína. Resultados semelhantes foram reportados em outros estudos (Mendes et al., 2004; Eijnde et al., 2003; Parise et al., 2001).

A possível ação anti-catabólica da creatina sobre os aminoácidos de cadeia ramificada reduzindo a taxa de oxidação e degradação de leucina muscular poderia refletir num alterado turnover protéico atenuando a proteólise, que seria mais significativo devido à massa muscular representar de 25 a 30% do turnover protéico corporal total (Jówko et al., 2001; Parise et al., 2001). Contudo, isto não foi observado no presente estudo, pois não houve diferença no conteúdo de proteína entre os animais dos grupos com e sem suplementação de creatina (Tabelas 1.3 e 1.5).

O estudo de Jówko et al. (2001) verificou, através do balanço de nitrogênio urinário, onde excluía as perdas pelo suor e matéria fecal, que a creatina não alterou a retenção de nitrogênio corporal, sugerindo que este suplemento não promoveu aumento líquido de

nitrogênio, sendo improvável que tenha afetado a síntese de proteína líquida. Os resultados observados nos animais deste estudo, onde foi administrada uma dose de creatina 33,3% maior e utilizou-se método de determinação de nitrogênio na carcaça e vísceras pela técnica de Kjeldahl, foram semelhantes, sugerindo também que a creatina não interferiu na incorporação de nitrogênio corporal total.

No presente estudo, nenhum efeito da ingestão de creatina e desta associada à cafeína sobre a incorporação de proteína foi identificado (Tabelas 1.3 e 1.5). Esperava-se que a cafeína, por elevar as catecolaminas e inibir o receptor de adenosina, fosse capaz de melhorar a performance durante o exercício e, assim, promover maior hipertrofia muscular (Deslandes et al., 2004; Johnston et al., 2003). Por outro lado, a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático induzida pela ingestão prolongada de cafeína poderia direcionar uma depleção crônica nos níveis intracelulares de cálcio induzindo a fadiga e prejudicando a síntese protéica (Xing et al., 2004). Além disso, tem sido relatado que a interação da cafeína com a creatina pode reduzir os estoques e a farmacocinética da creatina, que poderia afetar negativamente o processo da síntese protéica (Vandenberghe et al., 1996).

No presente estudo, o modelo de exercício utilizado não afetou o percentual de proteína na carcaça e vísceras, independente da suplementação (Tabelas 1.3 e 1.4). Todavia, em estudo prévio observou-se que o exercício intermitente de saltos verticais aumentou significativamente o percentual de proteína na carcaça de ratos adultos (120 dias; Franco et al., 2004). Outros estudos têm demonstrado que o exercício anaeróbico intermitente acentua a hipertrofia da fibra muscular (Volek et al. 2004; Hespel et al. 2001; Vandenberghe et al., 1996), área da seção transversal muscular (Hespel et al. 2001), e expressão mRNA da miosina da cadeia pesada e a síntese de proteína (Volek et al., 2004).

Os resultados do presente estudo mostraram que a suplementação, independente do exercício, também não afetou o percentual de proteína (Tabela 1.5). A ineficácia da creatina associada ao exercício em interferir na incorporação de proteína também foi verificada por McClung et al. (2003) que relataram que a suplementação de creatina associada ao exercício elevou a síntese protéica muscular cardíaca, mas não da proteína corporal total. Da mesma forma, Louis et al. (2003) observaram que o exercício de potência anaeróbica (leg press) acentuou a taxa de síntese protéica miofibrilar e sarcoplasmática, mas a creatina não apresentou nenhum efeito anabólico sobre a proteína muscular.

No presente estudo, a ingestão de cafeína e creatina não afetaram os percentuais de gordura da carcaça e das vísceras (Tabela 1.5). Tem sido sugerido que a administração de creatina não exerce efeito direto sobre o consumo de gordura, porém, a ingestão de cafeína pode elevar a mobilização, transporte e oxidação de ácidos graxos livres (Acheson et al., 2004; Greenway et al., 2004), poupar os estoques de glicogênio muscular (McLellan et al., 2004; Hespel et al., 2001) e reduzir o peso corporal (Greenway et al., 2004). Esta ação sobre as gorduras poderia ocorrer em função da cafeína inibir os receptores de adenosina A1 e a enzima fosfodiesterase, que, por sua vez, elevaria os níveis de AMPc promovendo maior lipólise, liberação de catecolaminas e ativação do SNC (Halldner et al., 2004; Tieges et al., 2004). Os resultados observados no presente estudo sugerem que a creatina pode ter reduzido a ação da cafeína em acentuar a oxidação de gordura, mas, análises específicas são necessárias.

Os estoques de gordura corporal não são limitantes da performance do exercício anaeróbico, pois sua disponibilidade em fornecer energia é mais lenta que a demanda do exercício de curta duração e alta intensidade (Jackman et al., 1996). Todavia, tem sido mencionado que o consumo de oxigênio (VO_2) permanece elevado por diversas horas após o exercício de alta intensidade e curta duração (até 60 segundos), sendo acompanhado por um processo bioquímico específico no músculo ativo aumentando o metabolismo energético (Stefanova, 2000). Acredita-se que tais alterações promovem o efeito do “consumo de oxigênio pós-exercício” (EPOC), onde sua magnitude tem mostrado ser um fator importante na perda de peso (Thornton e Potteiger, 2002; Fukuba et al., 2000). No presente estudo observou-se que o percentual de gordura reduziu (30,2%) em função do exercício após a 6ª semana (Tabela 1.4). Contudo, acredita-se que esta redução não tenha ocorrido pelo gasto energético direto do exercício, mas sim, pela ação do exercício anaeróbico em promover um déficit de oxigênio elevando o custo energético pós-exercício pelo efeito EPOC, que tem sido exibido manter-se incrementado por até 7 horas após o término do exercício (Fukuba et al., 2000). A elevação da concentração de lactato entre as medidas pré-exercício e após a 4ª série de saltos ($2,59 \pm 0,6$ e $9,75 \pm 2,0$; média \pm DP, respectivamente, 286,7%) representa a magnitude das alterações metabólicas anaeróbicas glicolíticas promovidas pelo exercício desenvolvido, sugerindo um maior gasto energético pós-exercício para equilibrar o déficit de oxigênio.

Os resultados do presente estudo mostraram que na sexta semana o exercício promoveu uma redução na excreção de creatinina urinária absoluta (12,3%; Tabela 1.7) e relativa (38,1%; Tabela 1.10), como também na creatinina urinária relativa da 2ª para a 6ª semana (48,5%; Tabela 1.10), independentes da suplementação. Estes resultados não eram esperados e a explicação para este fenômeno não é conhecida. As principais fontes energéticas para o exercício de curta duração e alta intensidade são os estoques de ATP musculares, o sistema ATP-PC e a glicólise anaeróbica. Devido ao acelerado metabolismo energético decorrente do exercício, o sistema ATP-PC apresenta alta participação na geração de energia, pois a PCr fornece fosfato para regenerar o ADP formado pela hidrólise do ATP. Em função disso grande quantidade de creatina pode ser convertida em creatinina após exercício intermitente máximo (Mendes et al., 2004; Gil et al., 2004; Turgut et al., 2003). Os níveis urinários de creatinina estão relacionados com a atividade da enzima creatina-quinase e a força muscular (Chung et al., 2003; Havenetidis e Bourdas, 2003). No entanto, o grupo ESS apresentou uma elevação na excreção de creatinina urinária relativa da primeira para a segunda semana e uma maior creatinina relativa comparada ao grupo SSS na segunda semana (18,5 e 97,8%; respectivamente, Tabela 1.9). Também, na segunda semana, os animais exercitados exibiram maiores valores comparados aos dos animais sedentários (56,1; Tabela 1.10). Estes resultados são coerentes ao mecanismo acima referido. Assim, sugere-se que em novos estudos o uso de creatina e creatinina marcadas com isótopos estáveis possa identificar a verdadeira via da utilização da creatina e a procedência da creatinina excretada após o exercício.

Neste estudo mostrou-se que o conteúdo de creatinina urinária absoluta apresentou-se elevado nas segunda e sexta semanas em comparação ao da primeira semana (Tabelas 1.6 e 1.7). A elevação dos estoques de creatina corporal, devido sua suplementação, poderia aumentar a excreção de creatinina urinária, decorrente de uma reação não enzimática em pH baixo e temperatura de aproximadamente 25°C (Havenetidis e Bourdas, 2003; Smith-Palmer, 2002). Esta excreção tem sido usada como um marcador do tamanho de massa muscular, devido este ser o local de maior estocagem de creatina (Chung et al., 2003; Taes et al., 2003). Além do mais, esta alteração poderia ser justificada pelo aumento do peso corporal dos animais no decorrer do experimento, observada pela correlação positiva regular (Correlação de Spearman, $r_s = 0,392$ e $p = 0,0066$) entre o ganho de peso corporal e

a elevação do conteúdo de creatinina urinária absoluta entre as semanas avaliadas. Tais resultados são confirmados ao analisarmos a maioria dos dados de creatinina urinária relativa.

Também, foi mostrado que a ingestão de creatina elevou o conteúdo de creatinina urinária absoluta dos animais suplementados, tanto na segunda (33,0%) como na sexta (13,3%) semana, quando comparado ao do grupo sem suplemento (Tabela 1.7), independente do exercício, como também, elevou o conteúdo de creatinina urinária relativa na segunda semana para o grupo SC quando comparado ao grupo SSS (62,4%; Tabela 1.9). Tais resultados são coerentes com os de outros estudos (Tarnopolsky et al., 2004; Havenetididis e Bourdas, 2003; Farquhar e Zambraski, 2002; Edmunds et al., 2001). Isso poderia ser explicado pela limitada capacidade de estocar creatina, quando esta apresenta em altos níveis plasmáticos, devido ao sistema de transporte ser saturado e reduzir a expressão da proteína transportadora de creatina (Speer et al., 2004; Tarnopolsky et al., 2003). Segundo Havenetididis e Bourdas (2003), após a suplementação de diferentes doses de creatina, a excreção urinária de creatina e creatinina apresentam-se linearmente elevadas, demonstrando o quanto este índice é sensível à administração de creatina. Contudo, o fator suplementação não interferiu no conteúdo de creatinina urinária relativa na segunda e sexta semanas (Tabela 1.10), sugerindo que os diferentes tipos de suplementação utilizada não foram responsáveis pela elevação da creatinina urinária absoluta observada (Tabela 1.7). Nestes estudos acima mencionados os dados do conteúdo de creatinina foram apresentados em valores absolutos, não sendo normalizados pelo peso corporal, insinuando que a ação da creatina em elevar a excreção de creatinina urinária poderia ser minimizada ao determinar a taxa de creatinina urinária relativa.

A ingestão de creatina associada à cafeína não alterou significativamente a excreção de creatinina urinária absoluta e relativa (Tabelas 1.7 e 1.10), independente do exercício. Uma possível interferência nos estoques e na farmacocinética da creatina pela ação em conjunto com a cafeína (Vandenbergh et al., 1996) poderia minimizar a absorção da creatina dietética elevando, assim, a excreção de creatina urinária, mas isto não foi avaliado no presente estudo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação de creatina, assim como a sua combinação com a cafeína, não interferiram no ganho de peso corporal e na composição de água, proteína e gordura da carcaça e vísceras dos animais, independentes do exercício. O programa de exercício, por sua vez, independente da suplementação, reduziu o ganho de peso corporal e o percentual de gordura na carcaça, mas não alterou o conteúdo de proteína e a retenção de água. As ingestões aguda e crônica de creatina elevaram os conteúdos de creatinina urinária absoluta, independentes do exercício; enquanto que o programa de exercício, independente da suplementação, reduziu a creatinina urinária absoluta na sexta semana. A administração de creatina adicionada à cafeína não alterou a excreção de creatinina, independente do exercício. No entanto, a suplementação de creatina não interferiu no conteúdo de creatinina urinária relativa na segunda e sexta semanas, independente do exercício; ao passo que o programa de exercício elevou a creatinina relativa na segunda semana e reduziu na sexta semana, independente da suplementação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Acheson, K.J.; Gremaud, G.; Meirim, I.; Montigon, F.; Krebs, Y.; Fay, L.B.; Gay, L.J.; Schneiter, P.; Schindler, C.; Tappy, L. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? *American Journal of Clinical Nutrition*; **79**(1): pp.40-6; 2004.

Altimari, L.R.; Cyrino, E.S.; Zucas, S.M.; Okano, A.H.; Burini, R.C. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. *Rev. Bras. Ciên. e Mov*; 9 (3): pp.57-64, 2001.

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*. Official methods of analysis. Washington, D.C.; 1998.

Ashizawa, N.; Ouchi, G.; Fujimura, R.; Yoshida, Y.; Tokuyama, K.; Suzuki, M. Effects of a Single Bout of Resistance Exercise on Calcium and Bone Metabolism in Untrained Young Males. *Calcif Tissue Int*; 62: pp.104–8; 1998.

Bell, D.G.; McLellan, T.M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J. Appl. Physiol*; 93(4): pp.1227-34; 2002.

Birnbaum, L.J.; Herbst, J.D. Physiologic effects of caffeine on cross-country runners. *J Strength Cond Res*; 18(3): pp.463-465; 2004.

Braga, L.C. e Alves, M.P. A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de endurance. *Rev. Bras. Ciên. e Mov*; 8(3): pp.33-7, 2000.

Brilla, L.R.; Giroux, M.S.; Taylor, A.; Knutzen, K.M. Magnesium-creatine supplementation effects on body water. *Metabolism: Clinical & Experimental*; 52(9): pp.1136-40; 2003.

Brooks, G.A. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. *Medicine and Science in Sports and Exercise*; 17: pp. 22-31; 1985.

Brose, A.; Parise, G.; Tarnopolsky, M.A. Creatine supplementation enhances isometric strength and body composition improvements following strength exercise training in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*; 58(1): pp.11-9; 2003.

Ceddia, R.B.; Sweeney, G. Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *J Physiol*; 555(Pt 2): pp.409-21; 2004.

Chesley, A.; Howlett, R.A.; Heigenhauser, J.F.; Hultman, E.; Spriet, L.L. Regulation of muscle glycogenolytic flux during intense aerobic exercise after caffeine ingestion. *J. Appl. Physiol*; 44: pp.R596-R603; 1998.

Chung, Y.L.; Wassif, W.S.; Bell, J.D.; Hurley, M.; Scott, D.L. Urinary levels of creatine and other metabolites in the assessment of polymyositis and dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*; 42(2): pp.298-303; 2003.

Cortright, R.N.; Chandler, M.P.; Lemon P.W.; Dicarlo, S. Daily exercise reduces fat, protein and body mass in , male but not female rats. *Physiol. Behav.* 62(1): pp. 105-111; 1997.

Denadai, B.S.; Greco, C.C.; Campbell, C.S.G.; Simões, H.G.; Guglielmo, L.G.A.; Denadai, M.L.D.R.; Gonçalves, M. *Avaliação aeróbia: determinação da resposta do lactato sanguíneo*. Editora Motrix: pp.154; São Paulo; 2000.

Deslandes, A.C.; Veiga, H.; Cagy, M.; Piedade, R.; Pompeu, F.; Ribeiro, P. Effects of caffeine on visual evoked potential (P300) and neuromotor performance. *Arq Neuropsiquiatr*; 62(2-B): pp.385-90; 2004.

Doherty, M.; Smith, P.; Hughes, M.; Davison, R. Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. *J Sports Sci*; 22(7): pp.637-43; 2004.

Doherty, M.; Smith, P.; Davison, R.; Hughes, M. Caffeine ergogenic after supplementation of oral creatine monohydrate. *Med Sci Sports Exerc*; 34(11): pp.1785-92; 2002.

Dulloo, A.G.; Duret, C.; Rohrer, D.; Girardier, L.; Mensi, N.; Fathi, M.; Chantre, P.; Vandermander, J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*; 70: pp.1040-5; 1999.

Eckerson, J.M.; Stout, J.R.; Moore, G.A.; Stone, N.J.; Nishimura, K.; Tamura, K. Effect of two and five days of creatine loading on anaerobic working capacity in women. *J Strength Cond Res*; 18(1): pp.168-73, 2004.

Edmunds, J.W.; Jayapalan, S.; Dimarco, N.M.; Saboorian, M.H.; Aukema, H.M. (2001) Creatine supplementation increases renal disease progression in Han:SPRD-cy rats. *Am J Kidney Dis*; 37(1): pp.73-8; 2001.

Eijnde, B.O.; Van Leemputte, M.; Goris, M.; Labarque, V.; Taes, Y.; Verbessert, P.; Vanhees, L.; Ramaekers, M.; Vanden Eynde, B.; Van Schuylenbergh, R.; Dom, R.; Richter, E.A.; Hespel, P. Effects of creatine supplementation and exercise training on fitness in men 55-75 yr old. *J Appl Physiol*; 95(2): pp.818-28, 2003.

Farquhar, W.B.; Zambraski, E.J. Effects of creatine use on the athlete's kidney. *Curr Sports Med Rep*; 1(2): pp.103-6; 2002.

Foss, M.L.; Keteyian, S.J. *Bases fisiológicas do exercício e do esporte*. Editora Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro; p.560; 2000.

Franco, F.S.C.; Lunz, W.; Cruz, E.O.; Mendes, A.M.; Cardoso, A.; Neves, M.T.D.; Chaves-Dias, C.M.G.; Peluzio, M.C.G.; Natali, A.J. Efeitos do exercício e esteróide anabólico sobre a composição corporal de ratos alimentados com ração comercial. In: IV Congresso Internacional de Nutrição Esportiva, 2003. **Anais**: 18: pp.S71; 2003.

Franco, F.S.C.; Gomes, G.J.; Carneiro Júnior, M.A.; Lunz, W.; Mendes, A.M.; Natali, A.J. Programa de exercício com saltos verticais intermitentes altera a composição corporal de ratos Wistar. In: XXVI Simpósio Internacional de Ciências do Esporte; 2004. *Revista Brasileira de Ciências e Movimento Anais*: Edição Especial: pp.199; 2004.

Fukuba, Y.; Yano, Y.; Murakami, H.; Kan, A.; Miura, A. The effect of dietary restriction and menstrual cycle on excess post-exercise oxygen consumption (EPOC) in young women. *Clinical Physiology*; 20(2): pp.165-9; 2000.

Germinario, E.; Esposito, A.; Megighian, A.; Midrio, M.; Betto, R.; Danieli-Betto, D. Effects of modulators of sarcoplasmic Ca²⁺ release on the development of skeletal muscle fatigue. *J Appl Physiol*; 96: pp.645-9, 2004.

Gill, N.D.; Hall, R.D.; Blazeovich, A.J. Creatine serum is not as effective as creatine powder for improving cycle sprint performance in competitive male team-sport athletes. *J Strength Cond Res*; 18(2): pp.272-5; 2004.

Graham, T.E. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports Med*; 31(11): pp.785-807; 2001.

Greenhaff, P.L. The creatine-phosphocreatine system: there's more than one song in its repertoire. *J Physiol*; 537(Pt 3): p.657; 2001.

Greenway, F.L.; De Jonge, L.; et al. Effect of a dietary herbal supplement containing caffeine and ephedra on weight, metabolic rate, and body composition. *Obes Res*; 12(7): pp.1152-7; 2004.

Halldner, L.; Adén, U.; Dahlberg, V.; Johansson, B.; Ledent, C.; Fredholm, B.B. The adenosine A1 receptor contributes to the stimulatory, but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A1 and/or A2A receptors. *Neuropharmacology*; 46: pp.1008–17; 2004.

Hartley, T.R.; Lovallo, W.R.; Whitsett, T.L. Cardiovascular effects of caffeine in men and women. *American Journal of Cardiology* 93(8): pp.1022-6; 2004.

Havenetidis, K.; Bourdas, D. Creatine supplementation: effects on urinary excretion and anaerobic performance. *J Sports Med Phys Fitness*; 43(3): 347-55; 2003.

Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J.W. *Clinical chemistry and technics*. 2^a ed. New York, Harper e Row, 1974.

Hespel, P., Eijnde, B. O., Van Leemputte, M. et al. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J. Physiol*; 536, pp.625-33; 2001.

Hespel, P.; Eijnde, B.O.; Van Leemputte, M. Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxation time in humans. *J Appl Physiol*; 92(2): pp.513-8; 2002.

Jackman, M.; Wendling, P.; Friars, D; Graham, T. Metabolic, catecholamine, endurance responses to caffeine during intense exercise. *J. Appl. Physiol*; 81(4): pp.1658–63, 1996.

James, R.S.; Robbie, S.W.; Graham, N.A. Effects of caffeine on mouse skeletal muscle power output during recovery from fatigue. *J Appl Physiol*; 96: pp.545–52, 2004.

Johnston, K.L.; Clifford, M.N.; Morgan, L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal of Clinical Nutrition*; 78(4): pp.728-33; 2003.

Jówko, E.; Ostaszewski, P.; Jank, M.; Sacharuk, J.; Zieniewicz, A.; Wilczak, J.; Nissen, S. Creatine and b-Hydroxy-b-Methylbutyrate (HMB) Additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. *Nutrition*; 17: pp.558–66; 2001.

Kalmar, J.M.; Cafarelli, E. (2004). Central fatigue and transcranial magnetic stimulation: effect of caffeine and the confound of peripheral transmission failure. *J Neurosci Methods*; 138(1-2): pp.15-26; 2004.

Kinugasa, R.; Akima, H.; Ota, A.; Ohta, A.; Sugiura, K.; Kuno, S. Short-term creatine supplementation does not improve muscle activation or sprint performance in humans. *Eur J Appl Physiol*; 91: pp.230–7; 2004.

Lehmkuhl, M.; Malone, M.; Justice, B.; Trone, G.; Pistilli, E.; Vinci, D.; Haff, E.E.; Kilgore, J.L.; Haff, G.G. The effects of 8 weeks of creatine monohydrate and glutamine supplementation on body composition and performance measures. *Journal of Strength & Conditioning Research*; 17(3): pp.425-38; 2003.

Lloyd, T.; Rollings, N.; Kieselhorst, K.; Egli, D.; Mauer, E. Dietary caffeine intake is not correlated with adolescent bone gain. *J. Am. College of Nutrition*; 17(5): pp.454-7; 1998.

Louis, M.; Poortmans, J.R.; Francaux, M.; Hultman, E.; Berré, J.; Boisseau, N.; Young, V.R.; Smith, K.; Meier-Augenstein, W.; Babraj, J.A.; Waddell, T.; Rennie, M.J. Creatine supplementation has no effect on human muscle protein turnover at rest in the postabsorptive or fed states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 284(4): pp.E764-70; 2003.

McBride, T.A.; Greory, M.A. Effect of creatine supplementation during high resistance training on mass, strength, and fatigue resistance in rat skeletal muscle. *J Strength Cond Res*; 16(3): pp.335-42, 2002.

McClung, M.; Hand, A.; Davis, M.; Carson, A. Effect of creatine supplementation on cardiac muscle of exercise-stressed rats. *European Journal of Applied Physiology*; 89(1): pp.26-33; 2003.

McLellan, T.M.; Bell, D.G.; Kamimori, G.H. Caffeine improves physical performance during 24 h of active wakefulness. *Aviat Space Environ Med*; 75(8): pp.666-72; 2004.

Mendes, R.R.; Pires, I.; Oliveira, A.; Tirapegui, J. Effects of creatine supplementation on the performance and body composition of competitive swimmers. *J Nutr Biochem*; 15(8): pp.473-8; 2004.

Mendes, R.R.; Tirapegui, J. Creatine: the nutritional supplement for exercise - current concepts. *Arch Latinoam Nutr*; 52(2): pp.117-27; 2002.

Murphy, R.M.; Stephenson, D.G.; Lamb, G.D. Effect of creatine on contractile force and sensitivity in mechanically-skinned single fibers from rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*; in press; 2004.

Nomura, A.; Zhang, M.; Sakamoto, T.; Ishii, Y.; Morishima, Y.; Mochizuki, M.; Kimura, T.; Uchida, Y.; Sekizawa, K. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *British Journal of Pharmacology*; 139(4): pp.715-20; 2003.

O'Connor, P.J.; Motl, R.W.; Broglio, S.P.; Ely, M.R. Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. *Pain* 109(3): pp.291-8; 2004.

Osei-Tutu, K.B.; Campagna, P.D. The effects of short- vs. long-bout exercise on mood, VO₂max., and percent body fat. *Preventive Medicine* 40: pp.92– 8; 2005, disponível online em www.sciencedirect.com.

Paluska, S.A. Caffeine and exercise. *Current Sports Med Reports*; 2(4): pp.213-9; 2003.

Parise, G.; Mihic, S.; MacLennan, D.; Yarasheski, K.E.; Tarnopolsky, M. A. Effects of acute creatine monohydrate supplementation on leucine kinetics and mixed-muscle protein synthesis. *J Appl Physiol*; 91(3): pp.1041-7; 2001.

Persky, A.M.; Brazeau, G.A.; G. Hochhaus, G. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. *Clin Pharmacokinet*; 42(6): pp.557-574; 2003.

Powers, M.E.; Arnold, B.L.; Weltman, A.L.; Perrin, D.H.; Mistry, D.; Kahler, D.M.; Kraemer, W.; Volek, J. Creatine Supplementation Increases Total Body Water Without Altering Fluid Distribution. *J Athl Train*; 38(1): pp.44-50; 2003.

Rawson, E.S.; Clarkson, P.M. Controvérsia Científica: A Creatina Vale quanto Pesa? *Sports Science Exchange*; 40: pp.1-6; 2004.

Reeves, P.G; Nielsen, F.H; Fahey, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal Nutrition*; 123: pp.1939-51, 1993.

Smith-Palmer, T. Separation methods applicable to urinary creatine and creatinine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 781(1-2): pp.93-106; 2002.

Speer, O.; Neukomm, L.J.; Murphy, R.M.; Zanolla, E.; Schlattner, U.; Henry, H.; Snow, R.J.; Wallimann, T. Creatine transporters: a reappraisal. *Mol Cell Biochem*; 256(1-2): pp.407-24; 2004.

Stefanova, D. Prediction method for the volume of the excess post-exercise oxygen consumption (EPOC) following supramaximal exercise. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*; 25(2): pp.63-8; 2000.

Stout, J.R.; Eckerson, J.M.; May, E.; Coulter, C.; Bradley-Popovich, G.E. Effects of resistance exercise and creatine supplementation on myasthenia gravis: a case study. *Med Sci Sports Exerc*; 33(6): pp.869-72; 2001.

Taes, Y.E.C.; Delanghe, J.R.; Wuyts, B.; van de Voorde, J.; Lameire, N.H. Creatine supplementation does not affect kidney function in an animal model with pre-existing renal failure. *Nephrol Dial Transplant*; 18: pp.258–64; 2003.

Tarnopolsky, M.; Parise, G.; Fu, M.H.; Brose, A.; Parshad, A.; Speer, O.; Wallimann, T. Acute and moderate-term creatine monohydrate supplementation does not affect creatine transporter mRNA or protein content in either young or elderly humans. *Molecular & Cellular Biochemistry*; 244(1-2): pp.159-66; 2003.

Tarnopolsky, M.A.; Mahoney, D.J.; Vajsar, J.; Rodriguez, C.; Doherty, T.J.; Roy, B.D.; Biggar, D. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*; 62(10): pp.1771-7; 2004.

Thornton, M.K.; J. A. Potteiger, J.A. Effects of resistance exercise bouts of different intensities but equal work on EPOC. *Med Sci Sports Exerc*; 34(4): pp.715-22; 2002.

Tieges, Z.; Ridderinkhof, K.R.; Snel, J.; Kok, A. Caffeine strengthens action monitoring: evidence from the error-related negativity. *Cognitive Brain Research*; 21: pp.87–93; 2004.

Tinley, E.M.; Durlach, P.J.; Yeomans, M.R. How habitual caffeine consumption and dose influence flavour preference conditioning with caffeine. *Physiology & Behavior*; 82: pp.317– 324; 2004.

Turgut, G.; Kaptanoglu, B.; Turgut, S.; Genc, O.; Tekinturk, S. Influence of acute exercise on urinary protein, creatinine, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 concentrations in children. *Tohoku J Exp Med*; 201(3): pp.165-170, 2003.

van Loon, L.J.; Murphy, R.; Oosterlaar, A.M.; Cameron-Smith, D.; Hargreaves, M.; Wagenmakers, A.J.; Snow, R. Creatine supplementation increases glycogen storage but not GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*; 106(1): pp.99-106; 2004.

Vanakoski, J.; Kosunen, V.; Meririnne, E.; Seppala, T. Creatine and caffeine in anaerobic and aerobic exercise: effect on physical performance and pharmacokinetic consideration. *Int J Clin Pharmacol Ther*; 36(5): pp.258-62; 1998.

Vandenberghe, K.; Gillis, N.; Van Leemputte, M.; Van Hecke, P.; Vanstapel, F.; Hespel, P. Caffeine counteracts the ergogenic action of muscle creatine loading. *J Appl Physiol*; 80(2): pp.452-7; 1996.

Volek, J.S.; Ratamess, N.A.; Rubin, M.R.; Gómez, A.L.; French, D.N.; McGuigan, M.M.; Scheett, T.P.; Sharman, M.J.; Häkkinen, K.; Kraemer, W.J. The effects of creatine supplementation on muscular performance and body composition responses to short-term resistance training overreaching. *Eur J Appl Physiol*; 91: pp.628-37; 2004.

Warskulat, U., U. Flogel, et al. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *Faseb J*; 18(3): pp.577-9; 2004.

Williams, J.H. Effects of fatigue on depolarization- and caffeine-induced contractures of skinned fibres. *Acta Physiol Scand*; 180, pp.265-9; 2004.

Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*; 80(3): pp.1107-213; 2000.

Xing, H.; Azimi-Zonooz, A.; Shuttleworth, C.W.; Connor, J. A. Caffeine releasable stores of Ca²⁺ show depletion prior to the final steps in delayed CA1 neuronal death. *J Neurophysiol*; in press; 2004.

Yoshizumi, W.M.; Tsourounis, C. Effects of creatine supplementation on renal function. *J Herb Pharmacother*; 4(1): pp.1-7; 2004.

Zheng, G.; Sayama, K.; Okubo, T.; Juneja, L.R.; Oguni, I. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In Vivo*; 18(1): pp.55-62; 2004.

Site consultado:

Portal do International Olympic Committee-WADA: **The 2004 Prohibited List: The World Anti-Doping Code**. Disponível em: <www.wada-ama.org>. Acesso em: 28 jan 2004.

CAPÍTULO 2:

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA ASSOCIADA OU NÃO À CAFEÍNA SOBRE A PERFORMANCE E A RESISTÊNCIA ÓSSEA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A EXERCÍCIO ANAERÓBICO INTERMITENTE

INTRODUÇÃO

A creatina e a cafeína têm sido muito utilizadas no meio esportivo e na prática de atividade física objetivando melhora da performance física. Entretanto, os efeitos destes ergogênicos associados ao treinamento físico sobre a performance em diferentes tipos de exercício não são ainda conclusivos.

O benefício ergogênico da creatina baseia-se nas suas funções em fornecer energia temporária, transportar energia do sítio de produção (mitocôndria) para o sítio de consumo (citossol) e manutenção da taxa de ressíntese de ATP/ADP (Greenhaff, 2001), como também fornecer prótons de hidrogênio e regular a glicólise (Demant e Rhodes, 1999). A ingestão de creatina pode incrementar o pool de energia intracelular em função da elevação da taxa de ressíntese de fosfocreatina (PCr), que reduz o acúmulo de fosfato inorgânico e eleva o pH promovendo, assim, melhores condições para a performance física (Yquel et al., 2002). A fosfocreatina regenera o ATP hidrolisado durante o exercício pela ação da isoenzima creatina quinase, que catalisa reversivelmente a fosforilação da creatina proporcionando mais fosfato de alta-energia ao músculo esquelético (Kaasik et al., 2003; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

De acordo com Delecluse et al. (2003), os potenciais efeitos ergogênicos da creatina são o aumento da potência e da força e a redução do tempo total de performance. Entretanto, segundo McBride et al. (2002), a administração de creatina não resulta num aumento da resistência à fadiga, mas sim, na redução do tempo de recuperação pós-fadiga. Alguns estudos indicam que a suplementação de creatina beneficia a performance em exercícios de curta duração e alta intensidade (Eckerson et al., 2004; Branch, 2003), seja em eventos de velocidade máxima com esforço único (Selsby et al., 2003) ou com várias repetições (Kreider, 2003), como também em eventos de potência anaeróbica (Kurosawa et al., 2003), mas não em eventos de força (McKenna et al., 2003). Entretanto, em outros

estudos (Kinugasa et al., 2004; Delecluse et al. 2003; Dawson et al., 2002) estes efeitos sobre a performance nestes eventos não foram observados.

A ingestão de cafeína, por sua vez, pode reduzir a taxa de glicogenólise muscular durante o exercício aeróbico, em função de agir como agente capaz de poupar o uso do glicogênio pelo aumento da mobilização e oxidação de gordura intra e extramuscular (McLellan et al., 2004; Hespel et al., 2001). De acordo com Bell et al. (2002), doses baixas de cafeína poderiam melhorar a performance em exercício de longa duração, por mobilizar gordura e poupar glicogênio.

Apesar da sugestão de alguns estudos de que a cafeína não promova nenhum efeito sobre a performance em exercício de curta duração e alta intensidade (James et al., 2004; Vandenberghe et al., 1996), a melhora da performance em exercícios de potência (Bell et al., 2002), do exercício de esforço máximo (Doherty et al., 2004; Sekiguchi et al., 2003), da capacidade anaeróbica (Doherty et al., 2004; Bell et al., 2002), e de endurance de curta duração (Bruce et al., 2000) têm sido reportadas. A ação direta no músculo esquelético, que eleva a transmissão de estímulos no processo excitação-contração, é o efeito mais importante da cafeína no exercício anaeróbico (Greer et al., 1998). Tem sido sugerido que a cafeína incrementaria o tempo até a fadiga durante o exercício de força máxima (Williams, 2004; Paluska, 2003; Graham, 2001) em função da maior liberação de íons de cálcio (Ca^{2+}) do retículo sarcoplasmático (RS) (Germinario et al., 2004; James et al., 2004), e que a administração de cafeína potencializaria a produção de força muscular (James et al., 2004; Paluska, 2003; Graham, 2001). Assim, a cafeína poderia aumentar o desempenho durante o exercício intenso (Doherty et al., 2004), mas, como consequência, elevaria a concentração de lactato sanguíneo (Jackman et al., 1996), que ao contrário, poderia reduzir a performance devido a estes altos níveis de lactato durante o exercício prejudicarem a performance (Warskulat et al., 2004).

Baseados nos possíveis efeitos da creatina em elevar a massa corporal e a performance durante exercício anaeróbico (Eckerson et al., 2004; Branch, 2003; Kreider, 2003; Kurosawa et al., 2003; Selsby et al., 2003), e da cafeína por sua capacidade de agir diretamente no músculo esquelético elevando a transmissão de estímulos na interação neuro-muscular (Germinario et al., 2004; Greer et al., 1998), pode se imaginar que elas poderiam interagir e potencializar seus efeitos individuais sobre a performance durante

exercício anaeróbico. Contudo, a farmacocinética da creatina pode sofrer interferência de substâncias dietéticas como cafeína, carboidratos e outros (van Loon et al., 2004; Hespel et al., 2002; Vandenberghe et al., 1996), onde a cafeína poderia reduzir os estoques e a farmacocinética da creatina (Doherty et al., 2002; Hespel et al., 2002) prejudicando seus possíveis efeitos ergogênicos (Vandenberghe et al., 1996).

Vandenberghe et al. (1996) investigaram o possível efeito da cafeína sobre a cinética da creatina, ou seja, se a cafeína facilitaria a elevação da creatina exógena no tecido muscular. Eles demonstraram que a ingestão aguda da creatina melhorou a produção de força dinâmica e aumentou a concentração de fosfocreatina (PCr) muscular em humanos, porém o efeito ergogênico foi completamente eliminado quando a cafeína foi ingerida junto a creatina. Hespel et al. (2002) identificaram que a cafeína teria um efeito inverso a creatina sobre o tempo de relaxamento muscular durante o exercício intenso. Em contrapartida, Wyss et al. (2000) afirmaram que a cafeína não estimulou o acúmulo de creatina muscular em resposta à sua suplementação. Doherty et al. (2002) observaram que a cafeína poderia ter um efetivo ergogênico quando ingerida após o período de suplementação da carga de creatina. Entretanto, pouco se sabe sobre a interferência da cafeína na cinética da creatina. Considerando que a cafeína aumentaria o tempo até a fadiga em exercício de força máxima e que a suplementação de creatina reduziria o tempo de recuperação pós-fadiga, a interação destes efeitos, por um longo período de ingestão, associado a um programa de treinamento físico anaeróbico intermitente não foi investigado até o momento.

Tem sido mencionado que a cafeína por ser um suave diurético (Lloyd et al., 1998) poderia aumentar a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) e atenuar sua recaptura (Sekiguchi et al., 2003; Huang et al., 2002; Ashizawa et al., 1998), além de elevar o risco da formação de cálculo renal (Massey e Sutton, 2004). A acidose metabólica proveniente do pH reduzido, alta concentração de bicarbonato, aumento na ingestão de proteína e produção de corpos cetônicos, também aumentaria a excreção urinária de Ca^{2+} e absorção intestinal deste (Rapuri et al., 2001; Ashizawa et al., 1997). O efeito da ingestão de cafeína ao longo prazo sobre o metabolismo de cálcio é complexo, podendo reduzir inclusive a absorção intestinal do cálcio endógeno (Jasminka e Kerstetter, 2000). A secreção de cálcio é sensível também ao conteúdo de cálcio plasmático (Ashizawa et al.,

1998; Ashizawa et al., 1997). No entanto, o possível efeito deletério da ingestão de cafeína sobre a excreção de cálcio tornaria mais pronunciado quando a ingestão de cálcio é inadequada (Heaney, 2002; Rapuri et al., 2001), pois sua excreção não é compensada após o consumo de cafeína (Massey e Sutton, 2004; Jasminka e Kerstetter, 2000). Recentemente, tem sido hipotetizado que a disponibilidade de PCr também poderia regular a liberação de cálcio no RS (James et al., 2004; Yang e Steele, 2002; Duke e Steele, 1999), sugerindo que a ingestão de creatina, ao elevar o conteúdo de PCr, poderia potencializar a liberação de Ca^{2+} do RS, porém, a interação da ingestão de creatina mais cafeína não foi investigada a este respeito.

Bullen et al. (1999) relatam que a excreção de Ca^{2+} na urina não foi alterada após o exercício aeróbico. Tem sido sugerido que o exercício de alta intensidade e curta duração fornece maior estímulo para o aumento da deposição e repleção dos estoques de cálcio (Iuliano-Burns et al., 2003), entretanto, uma única série de exercício de força elevaria a excreção de cálcio em função da maior acidose metabólica, decorrente da concentração de lactato ser elevada (Smith et al., 2003). Todavia, a excreção de cálcio em função da combinação da ingestão aguda ou crônica de creatina e cafeína associada ao exercício anaeróbico intermitente não tem sido estudada, até o presente momento.

A osteoporose caracteriza-se pela redução na microestrutura e densidade mineral óssea (DMO) e, por conseqüência, maior suscetibilidade à fratura óssea (Huang et al., 2002; Jasminka e Kerstetter, 2000). O metabolismo ósseo pode ser regulado, entre outros, pelo hormônio da PTH, vitamina D e por aspectos nutricionais, como adequada ingestão de cálcio e o consumo de cafeína (Jasminka e Kerstetter, 2000). A baixa ingestão de cálcio induz sua reduzida absorção, como também, uma diminuição na DMO associadas à atenuação dos receptores de vitamina D, metabólito ativo que facilita a absorção intestinal de cálcio (Rapuri et al., 2001).

A ingestão de altas doses de cafeína, além de ser diurética (Lloyd et al., 1998), pode causar prejuízo ao organismo tais como desordens reprodutivas e cognitivas (Paluska et al., 2003; Sardão et al., 2002), aumento da pressão sangüínea (James et al., 2004) e desenvolvimento de carcinógenos (Caubet et al., 2004). Contudo, seus principais efeitos deletérios são atribuídos ao aumento na liberação de Ca^{2+} do SR e a atenuação de sua recaptura (Sekiguchi et al., 2003; Huang et al., 2002; Ashizawa et al., 1998), que pode

implicar em redução da DMO e maior risco de fratura (Rapuri et al., 2001; Lloyd et al., 1996), em função do osso representar o maior reservatório corporal de cálcio (Jasminka e Kerstetter, 2000) e o cálcio ósseo ser o primeiro a ser excretado (Ashizawa et al., 1997). A cafeína também poderia inibir a mineralização óssea, diferenciação de osteoblastos e formação da matriz extracelular, que poderia interferir negativamente em seus estoques corporais de cálcio (Massey e Sutton, 2004; Sekiguchi et al., 2003; Huang et al., 2002), agravando os riscos de osteoporose devido às alterações na microestrutura óssea (Heaney, 2002; Lloyd et al., 1998).

A maximização do pico de massa óssea tem sido considerada o fator mais importante na prevenção da perda óssea em função da elevação da idade e subsequente risco de fratura (Iwamoto et al., 1999). Contudo, a prática esportiva pode ser considerada um fator positivo para o metabolismo ósseo, pois a carga mecânica determina um importante papel na regulação da massa óssea (Steinberg e Trueta, 1981). O treinamento de endurance, tais como corrida e ciclismo, proporciona pouco (Huang et al., 2002; Rong et al., 1997) ou nenhum benefício (Creighton et al., 2001; Ashizawa et al., 1998) à DMO, porém, os exercícios de alta intensidade e curta duração (Iuliano-Burns et al., 2003; Ashizawa et al., 1998) e de alto impacto (Smith et al., 2003; Creighton et al., 2001; Iwamoto et al., 1999) fornecem maior estímulo para o aumento da massa óssea e DMO. Entre alguns dos benefícios promovidos pelos exercícios observa-se a redução da atividade dos osteoclastos (Guillemant et al., 2004), aumento no volume e espessura trabecular óssea (Huang et al., 2002; Iwamoto et al., 1999) e aumento da osteocalcina (Rong et al., 1997). Todavia, os efeitos da interação do exercício anaeróbico intermitente associado à ingestão de creatina mais cafeína sobre a excreção de cálcio poderiam ser potencializados, ou não, afetando os riscos de osteoporose e fratura óssea.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar se a suplementação de creatina associada ou não à ingestão de cafeína interfeririam na performance e na força de resistência à fratura óssea em ratos Wistar sedentários e submetidos ao treinamento com saltos verticais intermitentes. Objetivou-se ainda identificar se as suplementações aguda ou crônica associadas ao exercício intermitente de saltos verticais afetariam a excreção de cálcio urinário.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de Experimentação e Tratamento

Foram utilizados inicialmente 60 animais (*Rattus norvegicus* – Wistar) adulto-jovens machos com 45 dias de idade e peso inicial médio de $142,7 \pm 7,41\text{g}$, obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa - MG. Estes foram alocados aleatoriamente em um dos 6 grupos (10 por grupo): SSS – sedentários sem suplementos (n=10); SC – sedentário com creatina (n=10); SCC – sedentário com creatina e cafeína (n=09); ESS – exercitado sem suplementos (n=07); EC – exercitado com creatina (n=07); e ECC – exercitado com creatina e cafeína (n=06). As perdas de animais ocorreram por causas independentemente à execução do programa de exercício.

Os animais foram alojados em gaiolas individualmente, por um período de 6 semanas, mantidos em ambiente com temperatura média de 24°C, fotoperíodo de 12 horas. Todos os animais receberam de 15 a 20g de dieta semipurificada AIN-93M (Reeves et al., 1993) e água destilada *ad libitum*.

O peso corporal foi aferido no primeiro dia de cada semana e no dia do sacrifício, utilizando-se uma balança eletrônica digital (Marte - Brasil) com precisão em miligrama, sendo o peso dos animais sempre aferidos no mesmo horário do dia.

Suplementação de Creatina e Cafeína

Os animais dos grupos SC e EC receberam suplementação diária de creatina; os animais dos grupos SCC e ECC receberam suplementação diária de creatina mais cafeína, adotando-se o procedimento para suplementação de creatina de 2 fases: carga e manutenção.

A fase de carga teve a duração de sete dias e foi iniciada na primeira semana de experimento. Os animais dos grupos com creatina receberam uma dose de 0,430g de creatina (Power Nutrition[®])/kg de peso corporal/dia adicionada a 15g de dieta semipurificada (AIN-93 M), em função da melhor absorção da creatina quando administrada juntamente com carboidrato (van Loon et al., 2004).

A fase de manutenção teve duração de cinco semanas e foi iniciada na segunda semana. Nesta fase, os animais dos grupos com creatina receberam uma dose de 0,143g/kg de peso corporal/dia adicionada a 15 a 20g de dieta semipurificada (AIN-93 M). Os animais dos grupos com creatina e cafeína receberam uma dose de 15mg de cafeína/kg de peso corporal/dia, que foi adicionada à dieta semipurificada dos animais.

Os animais dos grupos SSS e ESS receberam os mesmos procedimentos dos demais grupos, contendo apenas a dieta semipurificada (AIN-93 M).

As doses da suplementação de creatina foram determinadas com base numa dose de 30g na fase de carga e 10g na fase de manutenção para um homem de 70kg, doses estas de creatina expressas por diversos autores como as maiores administradas em estudos com humanos e animais (Lehmkuhl et al., 2003; Persky et al., 2003; van Loon et al., 2003), bem como as doses de cafeína (Doherty et al., 2004; Hartley et al., 2004; O'Connor et al., 2004).

Programa de Exercício

Para a adaptação dos animais dos grupos ESS, EC e ECC ao meio líquido, na primeira semana de experimento os mesmos foram colocados num tanque de alvenaria azulejado (largura: 60cm, comprimento: 75cm, altura: 80cm) com água na profundidade de 15cm e temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$, por 30 minutos diários.

Para a realização do programa de exercício foram colocados dois tubos de PVC (diâmetro, 15cm; e altura, 60cm) fechado em sua extremidade inferior com tela de nylon vazada. A sobrecarga do exercício, percentagem do peso corporal, foi adicionada ao animal utilizando-se esferas de chumbo inseridas em um colete (lycra) especialmente confeccionado para os animais. A profundidade da água foi determinada por um percentual da média do comprimento dos animais, maior distância entre as extremidades dos membros posteriores e as narinas estando o animal com o corpo e membros inferiores estendidos.

Após uma semana de adaptação à água, o programa de exercício foi iniciado. O exercício consistiu de saltos de impulsão vertical desde o fundo do tanque (apoio dos pés) até a superfície da água (narinas fora d'água). Os animais realizavam quatro séries de dez saltos (40 saltos) com intervalo de descanso de um minuto entre as séries. Este programa foi realizado 5 dias por semana, durante 5 semanas. A sobrecarga do exercício foi empregada da seguinte forma: na primeira semana os ratos realizaram as quatro séries de

dez saltos estando a água com profundidade de 120% do comprimento dos animais (média) e com 20% do peso corporal do animal, nos dois primeiros dias, e 25% nos três dias seguintes. Durante a segunda semana, os animais exercitaram estando a água com profundidade de 130% do comprimento dos animais e com sobrecarga de 30% de peso corporal nos dois primeiros dias e 35% nos três dias seguintes. Durante a terceira semana, os animais realizaram os saltos estando a água com profundidade de 140% do comprimento dos animais e sobrecarga de 40% do peso corporal durante toda a semana. Durante a quarta semana, os animais efetuaram os saltos estando a água com profundidade de 145% do comprimento dos animais e sobrecarga de 45% do peso corporal durante toda a semana. Na quinta e sexta semanas, os animais realizaram o programa de exercício estando a água com profundidade de 150% do comprimento dos animais e sobrecarga de 50% do peso corporal (adaptado de Oliveira et al., 2000).

Avaliação da Performance

Determinação do Tempo de Exercício

Após o período de tratamento, os animais realizaram quatro séries de dez saltos verticais com intervalo de 1 minuto entre as séries, com sobrecarga de 50% do peso corporal do animal, estando a profundidade da água a 150% do comprimento dos animais. O tempo gasto para a realização de cada série de dez saltos verticais previstos foi monitorado (cronômetro digital Casio® Stopwatch HS-30W). O cronômetro foi acionado no momento em que o animal perdeu contato com o solo no primeiro salto e travado quando o animal atingiu a superfície da água com as narinas no décimo salto.

Determinação da Concentração de Lactato Sangüíneo

Após o período de tratamento, concomitante ao procedimento para a determinação do tempo de exercício, foi realizada a avaliação da concentração do lactato sangüíneo. As medidas foram realizadas em três momentos: 1) antes do exercício; 2) após a segunda série de dez saltos; e 3) após a quarta séries de dez saltos. O sangue foi coletado da extremidade distal do rabo dos animais e a concentração de lactato analisada usando-se o equipamento Accusport BM-Lactate (Roche®) e fitas para determinação de lactato sangüíneo da mesma marca.

Determinação do Cálcio Urinário

A urina dos animais foi coletada por um período de 24 horas nas segunda, terceira e sexta semanas de tratamento utilizando-se gaiolas metabólicas individuais. O volume de urina coletado foi completado para 10mL com água deionizada e centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm (Excelsa-Fanem-Brasil). Do sobrenadante da urina centrifugada, 100µL foram pipetados numa cubeta diluída com 300µL de água deionizada tendo seu pH estabilizado entre 3,0 e 4,0 com ácido clorídrico (HCl). Deste estabilizado foram utilizados 50µL para a determinação do cálcio urinário pelo método automatizado de espectrometria de UV/VIS, segundo Henry et al. (1974). As análises foram realizadas utilizando kits da marca Biomérieux® no equipamento ALIZÉ® (Biomérieux-França) do Laboratório Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa.

Avaliação da Resistência à Fratura Óssea

Após o período de tratamento e das avaliações pertinentes, os animais foram sacrificados por anestesia de CO₂. O fêmur direito foi dissecado livre de tecido mole e armazenado refrigerado à temperatura de aproximadamente 4°C para análises futuras. O comprimento do fêmur, distância da borda superior da cabeça até a borda inferior do côndilo medial, e a espessura, no ponto intermédio da medida do comprimento, foram feitos utilizando-se um paquímetro de aço inox (Stainless Hardened - China). O peso ósseo foi aferido em balança de precisão em miligrama (Marte - Brasil). O comprimento relativo, espessura relativa e peso relativo foram calculados em relação ao peso corporal total do momento do sacrifício.

Para a análise da resistência à fratura óssea utilizou-se o texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc.), conectado a um computador equipado com o programa *Texture Expert*® empregando um “probe” de 3 pontas. Cada extremidade do osso ficou apoiada em um “probe” a uma distância de 2,5 cm e o terceiro “probe” apoiou-se sobre o ponto intermédio do osso, onde foi realizada a força até a fratura. O aparelho registrou o pico de força necessária para que o osso fraturasse, e desta foi calculada a força relativa de resistência ao peso absoluto do fêmur.

Análise Estatística

Inicialmente os dados estudados foram submetidos ao Teste de Komogorov-Smirnov para verificar a simetria. Para as variáveis com distribuição normal, as análises entre três ou mais grupos independentes (grupos individualmente e fator suplementação) foram efetuados usando Análise de Variância (ANOVA One-Way). Para análises de dois grupos distintos (fator exercício) foi usado o Teste-*t* de Student. Para análises entre momentos diferentes do mesmo grupo (amostras dependentes) foi utilizado ANOVA One-Way Medidas Repetidas. Para determinar a existência ou não de relação entre as variáveis foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Foram usados testes não-paramétricos compatíveis a cada um anteriormente referido, quando o teste de simetria não apresentasse uma distribuição normal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão (DP) e mediana, tanto para os dados analisados por testes paramétricos, quanto para testes não-paramétricos.

Para as análises de múltiplas comparações *post hoc* foram desenvolvidos o teste de Tukey, no caso de testes paramétricos, ou teste de Dunn's, para testes não-paramétricos. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software Sigma Stat 3.0, sendo empregado o nível de significância estatística de até 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Performance

Os dados relativos à concentração de lactato sanguíneo em repouso e em resposta à execução do teste de performance (execução das 4 séries) estão apresentados na tabela 2.1. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) entre os momentos pré-exercício, após a segunda série e após a quarta série de saltos em todos os grupos. Os níveis de lactato observados indicam que o esforço realizado pelos animais envolveu predominantemente o metabolismo glicolítico. Observou-se também, uma maior concentração de lactato no sangue no grupo suplementado com creatina e cafeína comparada à do grupo sem suplemento.

Tabela 2.1. Concentração de lactato sanguíneo (mmol/L).

Grupo	Pré-Exercício		2ª Série		4ª Série	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sem Suplemento	2,86±0,8	2,80	6,19±1,3 ^a	6,60	8,40±1,5 ^{ab}	8,00
Creatina	2,45±0,2	2,45	7,42±1,8 ^a	7,50	9,62±1,5 ^{ab}	9,60
Creatina-Cafeína	2,40±0,1	2,40	7,66±1,0 ^a	8,00	11,80±1,6 ^{abc}	12,00

Significâncias ($P < 0,05$): ^a vs Pré-exercício; ^b vs 2ª Série; ^c vs Sem Suplemento (^{a,b} ANOVA Medidas Repetidas; ^c ANOVA).

O tempo de execução das quatro séries de saltos foi utilizado como índice de performance dos animais. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.2. Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tempos de execução das séries individuais dos grupos, tampouco, entre os tempos de execução de cada uma destas séries em cada grupo (1ª vs. 2ª vs. 3ª vs. 4ª). O tempo total de execução das quatro séries também não foi diferente entre os grupos ESS, EC e ECC (mediana; 98,90; 88,44 e 94,20; respectivamente; médias±DP; 106,78±39,9; 90,73±13,9 e 100,66±28,0; respectivamente).

Tabela 2.2. Tempo de execução das quatro séries de saltos (s).

Séries ^a	1ª Série		2ª Série		3ª Série		4ª Série	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sem Suplemento	27,12±7,1	27,22	25,57±11,3	21,89	26,59±14,9	22,89	27,50±9,7	29,47
Creatina	26,07±2,1	25,88	22,55±6,3	21,17	22,23±5,9	20,23	19,88±5,0	18,43
Creatina-Cafeína	26,14±9,2	23,47	24,57±11,4	21,57	26,01±9,2	23,88	23,94±4,3	24,32

^a ANOVA Medidas Repetidas; ^b ANOVA.

Cálcio Urinário

Os dados relativos à excreção de cálcio urinário estão exibidos na tabela 2.3. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre o cálcio urinário dos animais dos grupos no início do tratamento (2ª semana). Na terceira semana, após a ingestão aguda de cafeína, também não houve diferença estatisticamente significativa entre o cálcio urinário dos animais dos grupos experimentais. Da mesma forma, na sexta semana, após ingestão crônica, não foi observada diferença significativa entre o cálcio urinário dos animais dos diferentes grupos.

Tabela 2.3. Conteúdo de cálcio urinário (mg/24h)

Grupo ^a	2ª Semana		3ª Semana		6ª Semana	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
SSS	4,54±2,9	4,78	nd	Nd	1,88±0,3	1,70
SC	2,96±2,2	2,34	2,85±2,2	2,37	2,95±0,5	3,36
SCC	4,28±5,1	1,71	1,39±1,1	1,14	4,62±1,0	2,88
ESS	3,82±1,7	3,43	nd	Nd	1,92±0,3	2,12
EC	4,94±2,6	4,26	2,03±1,7	1,67	2,41±0,3	2,76
ECC	3,70±1,0	3,85	1,77±1,5	1,53	5,73±2,8	4,21

nd = não determinado (^a Kruskal-Wallis).

Os dados relativos à excreção de cálcio urinário em função do exercício e da suplementação estão apresentados na tabela 2.4. Quanto ao fator exercício, não houve alteração significativa ($p>0,05$) no cálcio urinário ao comparar os resultados dos animais exercitados com os dos animais sedentários, independente da suplementação, nas diferentes etapas de avaliação. Os diferentes tipos de suplementação também não afetaram o cálcio

urinário dos animais, independente do exercício, nas segunda e terceira semanas, porém, na sexta semana, foi observada uma elevação significativa ($p < 0,05$) no cálcio urinário dos animais dos grupos que consumiram creatina e cafeína comparado ao dos animais dos grupos sem suplementos (106,4%) e creatina (26,8%).

Tabela 2.4. Conteúdo de cálcio urinário em função do exercício e da suplementação (mg/24h)

Exercício ^c	2ª Semana		3ª Semana		6ª Semana	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sedentário	3,93±3,6	2,59	2,2±1,9	1,67	3,10±2,2	2,76
Exercício	4,15±1,9	3,85	1,90±1,6	1,15	3,84±4,4	2,63
Suplementação						
Sem Suplemento	4,16±2,4	3,64	Nd	nd	1,90±0,3	1,88
Creatina	3,99±2,6	3,67	2,46±1,9	2,17	2,73±0,3	3,06
Creatina-Cafeína	3,99±3,6	3,60	1,57±1,3	1,14	5,86±1,3 ^{ab}	3,88

Significâncias ($P < 0,05$): ^a vs Sem Suplemento; ^b vs Creatina (^{a,b} ANOVA; ^c Mann Whitney).

Resistência à Fratura Óssea

Para eliminar a interferência do tamanho do animal sobre o comprimento, espessura e peso e a força de resistência à fratura do fêmur, o comprimento absoluto, espessura absoluta e peso absoluto do fêmur foram normalizados pelo peso corporal do animal e a força de resistência à fratura foi normalizada pelo peso absoluto do fêmur. Os resultados estão exibidos na tabela 2.5. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na espessura relativa do fêmur dos animais dos grupos ESS (15,0%) e ECC (15,1%) comparados ao dos grupos SSS e SCC, respectivamente. Também, foram observados aumento significativo do peso relativo do fêmur dos animais dos grupos ESS (18,0%), EC (17,1%) e ECC (13,1%), comparados ao dos animais dos grupos SSS, SC e SCC, respectivamente. A força relativa de resistência à fratura óssea foi significativamente maior nos animais do grupo ESS (14,5%) comparada à dos animais do grupo SSS. Todavia, não foi observada diferença significativa no comprimento relativo do fêmur entre os grupos ($p > 0,05$).

Os dados de comprimento relativo, espessura relativa e peso relativo do fêmur e da força relativa de resistência à fratura em função do exercício e da suplementação estão apresentados na tabela 2.6. Os animais dos grupos exercitados mostraram comprimento relativo (8,9%), espessura relativa (12,4%), peso relativo (16,6%) e força relativa de

resistência à fratura (9,2%) significativamente maior que os dos grupos sedentários, independentes da suplementação.

A fim de verificar a associação entre os parâmetros de dimensão e o peso relativo do fêmur com a força relativa à fratura óssea, foram realizados testes de correlação entre estes parâmetros ósseos. Obteve-se correlação positiva regular significativa (Correlação de Spearman, $p < 0,05$) da força relativa à fratura óssea com o comprimento relativo ($p = 0,003$ e $r_s = 0,418$), a espessura relativa ($p = 0,006$ e $r_s = 0,388$), e o peso relativo ($p = 0,004$ e $r_s = 0,407$).

Tabela 2.5. Comprimento, espessura e peso relativos e força relativa de fratura do fêmur.

Grupos	Comprimento Relativo (Comprimento Absoluto/ Peso Corporal) (mm/g)		Espessura Relativa (Espessura Fêmur/ Peso Corporal) (mm/g)		Peso Relativo (Peso Fêmur/ Peso Corporal) (mg/g)		Força Relativa (Força Absoluta/ Peso do Fêmur) (N/g)	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
SSS	1,00±0,02	1,00	0,127±0,005	0,126	1,72±0,115	1,72	186,78±15,4	191,43
SC	1,01±0,05	1,00	0,132±0,007	0,132	1,75±0,118	1,76	185,18±9,0	182,48
SCC	1,01±0,04	1,01	0,126±0,007	0,124	1,75±0,075	1,75	201,83±10,9	205,48
ESS	1,09±0,06	1,08	0,146±0,007 ^a	0,144	2,03±0,118 ^a	2,04	213,95±18,3 ^a	219,84
EC	1,10±0,09	1,07	0,143±0,011	0,139	2,05±0,195 ^b	2,03	204,74±18,10	206,85
ECC	1,10±0,06	1,11	0,145±0,009 ^c	0,145	1,98±0,088 ^c	1,93	206,54±16,5	207,62

Significâncias (P<0,05): ^a vs SSS; ^b vs SC; ^c vs SCC (^{a,b,c} ANOVA).

Tabela 2.6. Comprimento, espessura e peso relativos e força relativa de fratura do fêmur em função do exercício e suplementação.

Fator Exercício	Comprimento Relativo (Comprimento Absoluto/ Peso Corporal) (mm/g)		Espessura Relativa (Espessura Fêmur/ Peso Corporal) (mm/g)		Peso Relativo (Peso Fêmur/ Peso Corporal) (mg/g)		Força Relativa (Força Absoluta/ Peso do Fêmur) (N/g)	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
Sedentários	1,01±0,04	1,01	0,129±0,007	0,127	1,74±0,10	1,75	190,90±13,9	191,92
Exercitados	1,10±0,06 ^a	1,08	0,145±0,009 ^a	0,144	2,03±0,13 ^a	2,03	208,51±17,27 ^a	209,29
Fator Suplemento^b								
Sem Suplemento	1,04±0,06	1,02	0,135±0,011	0,132	1,85±0,197	1,86	197,97±21,2	197,16
Creatina	1,04±0,08	1,05	0,137±0,010	0,137	1,87±0,215	1,83	193,23±16,3	191,92
Creatina Cafeína	1,05±0,06	1,01	0,134±0,012	0,132	1,84±0,139	1,84	203,71±13,10	207,10

^a Significância (P<0,05) vs Sedentários (^a Teste-t de Student; ^b ANOVA).

DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que durante a realização das séries de saltos verticais com sobrecarga (teste de performance) a concentração de lactato sanguíneo elevou-se progressivamente da condição de repouso (pré-exercício) para as condições de exercício em todos os grupos (Tabela 2.1). Os níveis de lactato sanguíneo apresentados pelos animais em repouso e durante as séries de saltos foram similares aos observados em outros estudos usando natação contínua com sobrecarga (Freitas, 2004; Gobatto et al., 2001), entretanto, após saltos verticais não encontra relato de estudos até o momento. Considerando que este teste foi idêntico a uma sessão de treinamento aplicada aos animais ao longo do experimento, ficou estabelecido que o programa de treinamento utilizado no presente estudo é considerado um treinamento de saltos intermitentes caracteristicamente anaeróbico, por utilizar a via glicolítica anaeróbica para fornecimento de energia.

As adaptações dos níveis de lactato sanguíneo advindas da repetição sistemática deste tipo de exercício (treinamento) associada à suplementação de creatina mais cafeína e apenas creatina não são conhecidas. No presente estudo, os animais suplementados com creatina não apresentaram diferença se comparados aos animais não suplementados (Tabela 2.1), entretanto, os animais suplementados com creatina e cafeína exibiram concentração de lactato significativamente mais alta após a execução da 4ª série de exercício comparado aos animais do grupo sem suplemento ($11,8 \pm 1,6$ vs $8,4 \pm 1,5$ mmol/L, respectivamente, Tabela 2.1). Estes resultados indicam que os animais que ingeriram a cafeína associada à creatina usaram a via energética glicolítica com mais intensidade para executar a tarefa exigida que os não suplementados.

A explicação para este fenômeno não é simples. Uma possibilidade seria que a cafeína poderia reduzir os estoques de creatina diminuindo a capacidade de fornecimento de energia pelo sistema ATP-PC (Hespel et al., 2002), o que induziria a utilização da via glicolítica antecipadamente. O estudo de Vandenberghe et al. (1996) demonstrou que a ingestão de creatina proporcionou um efeito ergogênico ao exercício anaeróbico, mas, a cafeína eliminou completamente este efeito. Doherty et al. (2002) observaram que a carga de creatina (0,3g/kg/dia) associada à ingestão de cafeína aguda (5mg/kg) elevou em 10% o tempo até a exaustão comparado a apenas administração de creatina, mas não alterou o

lactato sangüíneo. Vanakoski et al. (1998) afirmaram que nem a creatina sozinha nem sua interação com a cafeína melhoraram a performance no exercício anaeróbico. Porém, mesmo que não se tenha determinado os conteúdos musculares de creatina e fosfocreatina no presente estudo, torna difícil acreditar que a cafeína ingerida em associação com a creatina tenha provocado tal efeito, ou seja, que os conteúdos musculares de creatina dos animais não suplementados fossem menores dos que os suplementados.

Outra possibilidade seria a ação da cafeína como estimulante no sistema neuro-muscular (Germinario et al., 2004), o que justificaria a execução das séries com mais velocidade (intensidade) e, como consequência, poderia ocorrer um maior acúmulo de lactato em função da maior intensidade do exercício. Isto se caracterizaria como uma adaptação positiva da produção de energia para o exercício da via glicolítica destes animais. Entretanto, ao observar os dados do tempo de execução das séries, índice de performance usado no presente estudo (Tabela 2.2), nota-se que o grupo ECC não foi mais eficiente que o grupo ESS ($p > 0,05$; medianas: 98,90 vs. 94,20; respectivamente), apesar da tendência.

O efeito ergogênico da creatina sobre a performance em exercício anaeróbico tem sido apoiado na redução do tempo de recuperação pós-fadiga entre séries de exercícios e do tempo total de performance (McBride et al., 2002), por elevar a taxa de ressíntese de ATP/ADP (Gregor et al., 2003). A ação direta da cafeína na transmissão neuro-muscular (Germinario et al., 2004) poderia, também, elevar o tempo de atividade até a fadiga (Kalmar e Cafarelli, 2004) em função da liberação de cálcio do RS (James et al., 2004), que potencializaria a produção de força (Paluska, 2003; Graham, 2001). No presente estudo, entretanto, a performance não foi afetada pelas suplementações empregadas (Tabela 2.2). Contudo, torna-se importante mencionar que o grupo EC exibiu progressiva redução nos valores de tempo de execução das séries de saltos, assim como o menor tempo total de execução das quatro séries em comparação aos grupos ESS e ECC ($p > 0,05$; médias \pm DP: 90,73 \pm 13,9; 106,78 \pm 39,9 e 100,66 \pm 28,0; respectivamente) apesar da não ter significância estatística. Talvez o número da amostra ($n=6$) tenha sido insuficiente para identificar uma diferença significativa.

Os dados do conteúdo de cálcio urinário dos animais em resposta aos diferentes tratamentos utilizados no presente estudo demonstram que os animais que consumiram creatina e cafeína apresentaram maior excreção de cálcio urinário que os dos grupos sem

suplemento e apenas creatina na sexta semana, independente do treinamento (Tabelas 2.3 e 2.4).

Objetivando obter o maior benefício ergogênico possível da cafeína sem haver interferência de sua ingestão sobre a absorção de creatina (Kurosawa et al., 2003; Lambert et al., 2003; van Loon et al., 2004), neste estudo, foi iniciada a ingestão de cafeína apenas na segunda semana, ou seja, após uma semana de carga de creatina. Nenhum dos tipos de suplementação aguda, tampouco, a combinação da ingestão aguda de cafeína e creatina interferiram na excreção de Ca^{2+} na terceira semana no presente estudo (Tabelas 2.3 e 2.4). De acordo com Massey e Sutton (2004), animais jovens poderiam aumentar a absorção de Ca^{2+} intestinal para compensar as perdas urinárias. O fato de no presente estudo terem sido usados animais adulto-jovens com ingestão de 100% de cálcio recomendada poderia explicar porque a excreção de Ca^{2+} urinário não aumentou após a ingestão aguda de creatina-cafeína, apesar de Massey e Sutton (2004) e Huang et al. (2002) mostrarem a perda de cálcio na urina após a ingestão aguda apenas de cafeína. Além disso, a concomitante ingestão de creatina junto à cafeína no presente experimento pode ter atenuado a liberação de Ca^{2+} do RS evitando sua maior excreção como efeito agudo desta ingestão, pois segundo Yang et al. (2002) e Duke e Steele (1999), o conteúdo de PCr também poderia regular o cálcio no RS, onde a ausência de PCr reduziria a liberação de Ca^{2+} , como também diminuiria a velocidade de propagação, frequência e amplitude desta liberação no RS. Entretanto, a ausência de um grupo apenas com a ingestão de cafeína, no presente estudo, não permitiu estabelecer relação.

A cafeína acentua a liberação de Ca^{2+} do RS reduzindo o limiar de excitabilidade e prolongando a duração da contração, além de inibir a recaptura do Ca^{2+} pelo RS (James et al., 2004; Braga e Alves, 2000). Porém, o mecanismo de liberação de Ca^{2+} do RS desencadeado pela prolongada ingestão de cafeína poderia direcionar a uma depleção crônica nos níveis intracelulares de Ca^{2+} elevando e acelerando a perda de tensão muscular (Germinario et al., 2004), e conseqüentemente, induzindo o processo da fadiga (James et al., 2004; Xing et al., 2004; Duke e Steele, 1999). Isto poderia ser uma explicação para a elevação da concentração de lactato observada no grupo ECC durante o teste de performance (Tabela 2.1), que pode ter ocorrido em função do maior esforço realizado devido à maior perda de cálcio na urina por este grupo.

Uma possível explicação da ação da cafeína em aumentar a excreção de cálcio observada na sexta semana seria a maior liberação do Ca^{2+} do RS (James et al., 2004), devido aos mecanismos de sua liberação serem induzidos pelo próprio Ca^{2+} mediado por receptores rianodina (RyR), ou pelo inositol-trifosfato ativando receptores de membrana (Xing et al., 2004); e principalmente, pela redução da reabsorção de Ca^{2+} nos túbulos renais e menor secreção do hormônio da PTH (Conigrave e Lok, 2004; Ashizawa et al., 1998). Huang et al. (2002) mostraram que o conteúdo total de cálcio no fêmur de ratos pode ser reduzido em função da alta ingestão da cafeína por 10 semanas, sugerindo que sua excreção urinária teria sido elevada.

Neste estudo não foi identificada diferença na excreção de cálcio urinário em função de uma semana de treinamento do exercício (Tabelas 2.3 e 2.4). Uma única série de exercício de força poderia elevar a excreção de Ca^{2+} em função da maior acidose metabólica, decorrente da elevação da concentração de lactato, bicarbonato e corpos cetônicos, redução do pH e maior absorção intestinal (Smith et al., 2003; Ashizawa et al., 1997). Contudo, a ineficácia deste experimento em mostrar maior excreção de cálcio após uma semana de treinamento do exercício, poderia ser explicado devido à análise do cálcio urinário ter sido realizada após uma semana de exercício (5 seções), que poderia ser tempo suficiente para haver uma adaptação sobre os efeitos deletérios causados pela maior acidez metabólica promovida numa única seção de exercício.

Também não foi mostrado, neste estudo, que a excreção de cálcio sofreu interferência após seis semanas de treinamento do exercício (Tabelas 2.3 e 2.4). A prática habitual do exercício de alta intensidade e curta duração fornece maior estímulo para o aumento da repleção dos estoques de cálcio (Iuliano-Burns et al., 2003), onde adaptações fisiológicas do treinamento promoveriam menor acidez metabólica atenuando a excreção de cálcio (Ashizawa et al., 1998). Contudo, Huang et al. (2002) também não identificaram alteração no conteúdo de cálcio ósseo em ratos exercitados por 10 semanas, sugerindo que a excreção de cálcio não tenha sido alterada. Todavia, pouco se sabe das adaptações metabólicas sobre a excreção de cálcio entre uma única e repetidas séries de exercício.

Nenhum tipo de suplementação utilizada neste estudo afetou os parâmetros ósseos analisados (Tabela 2.6). Também, não foi identificada alteração significativa sobre o comprimento relativo do fêmur entre os grupos (Tabela 2.5). Entretanto, os animais que

apenas exercitaram (ESS), assim como os animais que exercitaram e receberam suplementação (EC, ECC) apresentaram peso relativo ósseo maior que o dos seus respectivos controles sedentários. Também foram observados que a espessura relativa óssea mostrou-se maior nos grupos ESS e ECC comparados aos grupos SSS e SCC, respectivamente (Tabela 2.5). Estes resultados sugerem que as alterações no peso relativo e espessura relativa óssea ocorreram em resposta apenas do exercício, independente do tipo de suplementação. Isso fica evidente quando se compara o peso relativo e a espessura relativa do fêmur entre os animais exercitados e sedentários e entre os suplementados e não suplementados (Tabela 2.6). Estes resultados são coerentes aos encontrados por Iwamoto et al. (1999), que observaram aumento no peso e volume ósseo em função do treinamento do exercício, sugerindo que o exercício tenha elevado a taxa de deposição mineral e a taxa de formação óssea, todavia, estes utilizaram ratos Spaguey-Dawley e corrida em esteira a 24m/min por 8 e 12 semanas.

Em decorrência da suplementação, os resultados deste estudo diferem dos apresentados por Huang et al. (2002), pois observaram que alta dose de cafeína aumentou o crescimento ósseo (comprimento), mas reduziu o peso e a DMO. Também, contrariam os efeitos promovidos por 10 semanas do treinamento de exercício, que não alterou o comprimento ósseo, apesar, destes utilizarem corrida em esteira a 70% do VO_2max .

O aumento de peso relativo e as medidas de dimensão óssea observadas no presente estudo podem ter ocorrido em função da maior incorporação de cálcio ósseo promovido pelo estímulo osteogênico causado pelo exercício de saltos verticais. Apesar de alguns resultados exibirem o contrário (Creighton et al., 2001; Ashizawa et al., 1998), existem evidências do efeito positivo do exercício de alta intensidade e curta duração (Iuliano-Burns et al., 2003; Ashizawa et al., 1997) e de impacto (Smith et al., 2003; Creighton et al., 2001; Iwamoto et al., 1999) sobre a massa óssea e DMO, pois a capacidade de suportar sobrepeso fornece um estímulo osteogênico ao osso (Creighton et al., 2001), e que o osso pode ser mais responsivo à magnitude da carga que à sua frequência (Smith et al., 2003).

Evidências de que a cafeína pode aumentar a excreção de cálcio, observado no presente estudo, poderia interferir negativamente em seus estoques corporais (Massey e Sutton, 2004; Sekiguchi et al., 2003; Huang et al., 2002) e, por consequência, reduzir a DMO e a massa óssea (Heaney, 2002; Lloyd et al., 1998). A cafeína ingerida em associação

com a creatina parece não ter alterado a densidade óssea, pois o comprimento, a espessura e o peso relativos do fêmur não foram diferentes entre os grupos com e sem suplementação (Tabela 2.6).

Demonstrou-se no presente estudo que o programa de treinamento empregado aumentou a força de resistência à fratura do fêmur dos animais, independente da suplementação, portanto, que os diferentes tipos de suplementação não afetaram este parâmetro (Tabelas 2.5 e 2.6). Benefícios promovidos pelos exercícios sobre aspectos ósseos têm sido observados, tais como a redução da atividade dos osteoclastos (Guillemant et al., 2004), aumento no volume e espessura trabecular óssea (Huang et al., 2002; Iwamoto et al., 1999) e aumento da osteocalcina (Rong et al., 1997). Estes parâmetros poderiam justificar o efeito do treinamento com saltos verticais sobre a força relativa de resistência à fratura do fêmur observado no presente estudo.

Parece pertinente inferir que o comprimento, a espessura e peso relativos do fêmur, também incrementados pelo programa de treinamento neste estudo, estão associados ao aumento da força relativa de resistência à fratura óssea. Estas associações foram demonstradas pelas correlações positivas regulares significativas observadas entre todos os parâmetros analisados.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a suplementação de creatina-caféina promoveu maior concentração de lactato sanguíneo ao final da execução do esforço físico, em comparação ao grupo sem suplemento. A suplementação crônica, mas não a aguda, de creatina-caféina, independente do exercício, elevou a excreção de cálcio urinário. Nenhum protocolo de suplementação, independente do exercício, interferiu nos parâmetros ósseos analisados. No entanto, o programa de exercício empregado aumentou a força relativa de resistência à fratura óssea, assim como o comprimento, espessura e peso relativos do fêmur. A força de resistência à fratura óssea parece estar associada às alterações no comprimento, espessura e peso ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*. Official methods of analysis. Washington, D.C.; 1998.

Ashizawa, N.; Fujimura, R.; Tokuyama, K.; Suzuki, M. A bout of resistance exercise increases urinary calcium independently of osteoclastic activation in men. *J. Appl. Physiol*; 83(4): pp.1159–63, 1997.

Ashizawa, N.; Ouchi, G.; Fujimura, R.; Yoshida, Y.; Tokuyama, K.; Suzuki, M. Effects of a Single Bout of Resistance Exercise on Calcium and Bone Metabolism in Untrained Young Males. *Calcif Tissue Int*; 62: pp.104–8; 1998.

Bell, D. G.; McLellan, T. M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J. Appl. Physiol*; 93(4): pp.1227-34; 2002.

Braga, L.C. e Alves, M.P., A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de endurance. *Rev. Bras. Ciên. e Mov*; 8(3): pp.33-7, 2000.

Branch, J.D., Effect of creatine supplementation on body composition and performance: a meta-analysis. *International Journal of Sport Nutrition*; 13(2): pp.198-226; 2003.

Bruce, C.R.; Anderson, M.E.; Fraser, S.F.; Stepto, N.K.; Klein, R.; Hopkins, W.G.; Hawley, J.A. Enhancement of 2000-m rowing performance after caffeine ingestion. *Med Sci Sports Exerc*; 32(11): pp.1958-63; 2000.

Bullen, D.B.; O'Toole, M.L.; Johnson, K.C. Calcium losses resulting from an acute bout of moderate-intensity exercise. *Int J Sport Nutr*; 9(3): pp.275-84; 1999.

Caubet, M-S; Comte, B.; Brazier, J-L. Determination of urinary ¹³C-caffeine metabolites by liquid chromatography–mass spectrometry: the use metabolic ratios to assess CYP1A2 activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 34: pp.379–89; 2004.

Conigrave, A.D.; Lok, H.C. Activation of renal calcium and water excretion by novel physiological and pharmacological activators of the calcium-sensing receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 31(5-6): pp.368-71; 2004.

Creighton, D.L.; Morgan, A.L.; Boardley, D.; Brolinson, P.G. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *J Appl Physiol*; 90: pp.565–70, 2001.

Dawson, B.; Vladich, T.; Blanksby, B.A. Effects of 4 weeks of creatine supplementation in junior swimmers on freestyle sprint and swim bench performance. *J Strength Cond Res*; 16(4): pp.485-90; 2002.

Delecluse, C.; Diels, R.; Goris, M. Effect of creatine supplementation on intermittent sprint running performance in highly trained athletes. *Journal of Strength & Conditioning Research*; 17(3): pp.446-54; 2003.

Demant, T.W.; Rhodes, E.C. Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med*; 28(1): pp.49-60; 1999.

Doherty, M.; Smith, P.; Hughes, M.; Davison, R. Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high-intensity cycling. *J Sports Sci*; 22(7): pp.637-43; 2004.

Doherty, M.; Smith, P.; Davison, R.; Hughes, M. Caffeine is ergogenic aft supplementation of oral creatine monohydrate. *Med Sci Sports Exerc*; 34(11): pp.1785-92; 2002.

Duke, A.M.; Steele, D.S. Effects of creatine phosphate on Ca⁺² regulation by the sarcoplasmic reticulum in mechanically skinned rat skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*; 517(2): pp.447-58; 1999.

Eckerson, J.M.; Stout, J.R.; Moore, G.A.; Stone, N.J.; Nishimura, K.; Tamura, K. Effect of two and five days of creatine loading on anaerobic working capacity in women. *J Strength Cond Res*; 18(1): pp.168-73, 2004.

Freitas, J.S. *Efeito do treinamento aeróbio de baixa intensidade sobre o limiar de lactato em ratos*. Monografia de conclusão de curso de graduação. Departamento de Educação Física. Universidade Federal de Viçosa; pp.30; 2004.

Germinario, E.; Esposito, A.; Megighian, A.; Midrio, M.; Betto, R.; Danieli-Betto, D. Effects of modulators of sarcoplasmic Ca^{2+} release on the development of skeletal muscle fatigue. *J Appl Physiol*; 96: pp.645-9, 2004.

Gobatto, C.A.; Mello, M.A.R.; Sibuya, C.Y.; Azevedo, J.R.M.; Santos, L.A.; Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 130(A): pp.21-7; 2001.

Graham, T.E. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports Med*; 31(11): pp.785-807; 2001.

Greenhaff, P.L. The creatine-phosphocreatine system: there's more than one song in its repertoire. *J Physiol*; 537(Pt 3): pp.657; 2001.

Greer, F., McLean, C; Graham, T.E. Caffeine, performance, and metabolism during repeated Wingate exercise tests; *J Appl Physiol*; 85(4): pp.1502-8; 1998.

Gregor, M.; Janovska, A.; Stefl, B.; Zurmanova, J.; Mejsnar, J. Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH conditions. *Exp Physiol*; 88(1): pp.1-6; 2003.

Guillemant, J.; Accarie, C.; Peres, G.; Guillemant, S. Acute Effects of an Oral Calcium Load on Markers of Bone Metabolism During Endurance Cycling Exercise in Male Athletes. *Calcif Tissue Int*; 2004.

Hartley, T.R.; Lovallo, W.R.; Whitsett, T.L. Cardiovascular effects of caffeine in men and women. *American Journal of Cardiology* 93(8): pp.1022-6; 2004.

Heaney, R. P. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol*; 40(9): pp. 1263-70, 2002.

Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J.W. *Clinical chemistry and technics*. 2^a ed. New York, Harper e Row, 1974.

Hespeel, P., Eijnde, B. O., Van Leemputte, M. et al. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J. Physiol*; 536, pp.625-33; 2001.

Hespeel, P.; Eijnde, B.O.; Van Leemputte, M. Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxation time in humans. *J Appl Physiol*; 92(2): pp.513-8; 2002.

Huang, T.H.; Yang, R.S.; Hsieh, S.S.; Liu, S.H. Effects of Caffeine and Exercise on the Development of Bone: A Densitometric and Histomorphometric Study in Young Wistar Rats. *Bone*; 30(1): pp.293-9; 2002.

Iuliano-Burns, S.; Saxon, L.; Naughton, G.; Gibbons, K.; Bass, S. L. Regional specificity of exercise and calcium during skeletal growth in girls: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res*; 18(1): pp.156-62; 2003.

Iwamoto, J.; Yeh, J.K.; Aloia, J.F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone*; 24(3): pp.163-9; 1999.

Jackman, M.; Wendling, P.; Friars, D; Graham, T.E. Metabolic, catecholamine, endurance responses to caffeine during intense exercise. *J Appl Physiol*; 81(4): pp.1658-63, 1996.

James, R.S.; Robbie, S.W.; Graham, N.A. Effects of caffeine on mouse skeletal muscle power output during recovery from fatigue. *J Appl Physiol*; 96: pp.545–52, 2004.

Jasminka, Z.I.; Kerstetter, J.E. Review Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium. *Journal of the American College of Nutrition*; 19(6): pp.715–37; 2000.

Kaasik, A.; Veksler, V.; Boehm, E.; Novotova, M.; Ventura-Clapier, R. From energy store to energy flux: a study in creatine kinase-deficient fast skeletal muscle. *Faseb J*; 17(6): pp.708-10; 2003.

Kalmar, J.M.; Cafarelli, E.. Central fatigue and transcranial magnetic stimulation: effect of caffeine and the confound of peripheral transmission failure. *J Neurosci Methods*; 138(1-2): pp.15-26; 2004.

Kinugasa, R.; Akima, H.; Ota, A.; Ohta, A.; Sugiura, K.; Kuno, S. Short-term creatine supplementation does not improve muscle activation or sprint performance in humans. *Eur J Appl Physiol*; 91: pp.230–7; 2004.

Kreider, R.B. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Molecular & Cellular Biochemistry*; 244(1-2): pp.89-94, 2003.

Kurosawa, Y.; Hamaoka, T.; Katsumura, T.; Kuwamori, M.; Kimura, N.; Sako, T.; Chance, B. Creatine supplementation enhances anaerobic ATP synthesis during single 10” maximal handgrip exercise. *Molecular & Cellular Biochemistry*; 244(1-2): pp.105-12; 2003.

Lambert, C.P.; Archer, R.; Carrithers, J.A.; Fink, W.J.; Evans, W.J.; Trappe, T.A. Influence of creatine monohydrate ingestion on muscle metabolites and intense exercise capacity in individuals with multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil*; 84(8): pp.1206-1210; 2003.

Lloyd, T.; Rollings, N.; Kieselhorst, K.; Eggli, D.; Mauger, E. Dietary caffeine intake is not correlated with adolescent bone gain. *J. Am. College of Nutrition*; 17(5): pp.454–7; 1998.

Massey, L.K.; Sutton, R.A. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. *J Urol*; 172(2): pp.555-8; 2004.

McBride, T.A.; Greory, M.A. Effect of creatine supplementation during high resistance training on mass, strength, and fatigue resistance in rat skeletal muscle. *J Strength Cond Res*; 16(3): pp.335-42, 2002.

McKenna, M.; Morton, J.; Selig, S.; Snow, R. Creatine supplementation increases muscle total creatine but not maximal intermittent exercise performance. *J. Appl. Physiol*; 87: pp.2244-52; 2003.

McLellan, T.M.; Bell, D.G.; Kamimori, G.H. Caffeine improves physical performance during 24 h of active wakefulness. *Aviat Space Environ Méd*; 75(8): pp.666-72; 2004.

O'Connor, P.J.; Motl, R.W.; Broglio, S.P.; Ely, M.R. Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. *Pain* 109(3): pp.291-8; 2004.

Paluska, S.A. Caffeine and exercise. *Current Sports Med Reports*; 2(4): pp.213-9; 2003.

Rapuri, P.B.; Gallagher, J.C.; Kinyamu, H.K.; Ryschon, K.L. Caffeine intake increase the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr*; 74: pp.694–700; 2001.

Reeves, P.G; Nielsen, F.H; Fahey, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal Nutrition*; 123: pp.1939-51, 1993.

Rong, H.; Berg, U.; Topping, O.; Sundberg, C. J.; Granberg, B.; Bucht, E. Effect of acute endurance and strength exercise on circulating calcium-regulating hormones and bone markers in young healthy males. *Scand J Med Sci Sports*; 7(3): pp.152-9; 1997.

Sardão, V.A.; Oliveira, P.J.; Moreno, A.J.M. Caffeine Enhances the Calcium-Dependent Cardiac Mitochondrial Permeability Transition: Relevance for Caffeine Toxicity. *Toxicology and Appl. Pharmacology*; 179(1): pp. 50-6; 2002.

Sekiguchi, F.; Kawata, K.; Shimamura, K.; Sunano, S. Reduced effect of caffeine on twitch contraction of oesophageal striated muscle from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*; 30(4): pp.223-31; 2003.

Selsby, J.; Beckett, K.; Kern, M.; Devor, S. Swim performance following creatine supplementation in Division III athletes. *Journal of Strength & Conditioning Research*; 17(3): pp.421-4; 2003.

Smith, S.M.; Davis-Street, J.E.; Fesoerman, J.V.; Calkins, D.S.; Bawa, M.; Macias, B.R.; Meyer, R.S.; Hargens, A.R. Evaluation of Treadmill Exercise in a Lower Body Negative Pressure Chamber as a Countermeasure for Weightlessness-Induced Bone Loss: A Bed Rest Study With Identical Twins. *J Bone Miner Res*; 18: pp.2223-30; 2003.

Steinberg, M.; Trueta, J. Effects of activity on bone growth and development in the rat. *Clin Orthop*; 156: pp. 52-60; 1981.

van Loon, L.J.; Murphy, R.; Oosterlaar, A.M.; Cameron-Smith, D.; Hargreaves, M.; Wagenmakers, A.J.; Snow, R. Creatine supplementation increases glycogen storage but not GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*; 106(1): pp.99-106; 2004.

Vanakoski, J.; Kosunen, V.; Meririnne, E.; Seppala, T. Creatine and caffeine in anaerobic and aerobic exercise: effect on physical performance and pharmacokinetic consideration. *Int J Clin Pharmacol Ther*; 36(5): pp.258-62; 1998.

Vandenbergh, K.; Gillis, N.; Van Leemputte, M.; Hespel, P. Caffeine counteracts the ergogenic action of muscle creatine loading. *J Appl Physiol*; 80(2): pp.452-7; 1996.

Warskulat, U.; Flogel, U.; Jacoby, C.; Hartwig, H.; Thewissen, M.; Merx, M.; Molojavyi, A.; Heller-Stilb, B.; Schrader, J.; Haussinger, D.; Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *Faseb J*; 18(3): pp.577-9; 2004.

Williams, J.H. Effects of fatigue on depolarization- and caffeine-induced contractures of skinned fibres. *Acta Physiol Scand*; 180: pp.265-9; 2004.

Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*; 80(3): pp.1107-213; 2000.

Xing, H.; Azimi-Zonooz, A.; Shuttleworth, C.; Connor, J. Caffeine releasable stores of Ca²⁺ show depletion prior to the final steps in delayed CA1 neuronal death. *J Neurophysiol*; in press; 2004.

Yang, Z.; Steele, D.S. Effects of phosphocreatine on SR Ca²⁺ regulation in isolated saponin-permeabilized rat cardiac myocytes. *J Physiol*; 539(Pt 3): pp.767-77; 2002.

Yquel, R.J.; Arsac, L.M.; Thiaudiere, E.; Canioni, P.; Manier, G. Effect of creatine supplementation on phosphocreatine resynthesis, inorganic phosphate accumulation and pH during intermittent maximal exercise. *J Sports Sci*; 20(5): pp.427-37; 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao investigar os efeitos da suplementação de creatina associada ou não à ingestão de cafeína em animais sedentários e exercitados com saltos intermitentes, identificou-se que este programa de exercício melhorou a composição corporal, ao reduzir o peso e a gordura corporal, todavia foi ineficiente em aumentar o conteúdo de proteína corporal. Além do mais, o programa de exercício incrementou os parâmetros ósseos avaliados, como a força de resistência à fratura, comprimento, espessura e peso. Estes resultados expressam a eficiência deste modelo de exercício no auxílio ao desenvolvimento ósseo, assim como à perda de peso.

Um dos principais achados deste estudo foi verificar a ineficácia da suplementação de creatina em interferir na composição corporal, principalmente quanto à retenção hídrica e incorporação protéica. Tais resultados contradizem a maioria dos estudos divulgados na literatura científica da área, que menciona a ação da creatina em elevar a retenção de água intramuscular pelo seu efeito osmótico. Importante também foi a observação de que esta suplementação não elevou a incorporação de proteína, idealizado como o grande benefício desta administração. Esta suplementação não agiu na redução do tempo de performance do exercício, assim, questiona-se a utilização deste tipo de ingestão, pois além de não apresentar os benefícios imaginados, é extremamente oneroso ao consumidor.

A ingestão de creatina elevou a excreção de creatinina urinária absoluta, no entanto pouco interferiu no conteúdo de creatinina urinária relativa. Isto sugere ser interessante o emprego desta taxa de creatinina urinária proporcional ao tamanho corporal, devido a creatinina ser um metabólito de magnitude semelhante à massa corporal magra.

A administração de creatina associada à cafeína também não exibiu efeitos benéficos sobre a composição corporal, no entanto, mostrou ser prejudicial à performance do exercício anaeróbico intermitente ao elevar a concentração de lactato, além de elevar a excreção de cálcio urinário na sexta semana. Estes resultados sugerem a investigação da ação da cafeína em reduzir a absorção e farmacocinética da creatina, além de seus efeitos em mobilizar gordura e/ou estimular a interação neuro-muscular do processo excitação-contracção muscular. Também foi observado que nenhum protocolo de suplementação alterou os parâmetros ósseos analisados, apesar da ingestão de creatina mais cafeína ter

elevado a excreção de cálcio urinário. Esta excreção elevada poderia apresentar maior impacto sobre indivíduos que não consomem uma ingestão adequada de cálcio ou que apresentem maior risco de patologias ósseas, como osteoporose.