

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE  
CREATINA SOBRE A MORFOLOGIA E A EXPRESSÃO DA MIOSINA DE  
CADEIA PESADA (MHC) NO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE  
RATOS WISTAR**

Andreo Fernando Aguiar

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre no  
Programa de PG em Biologia Geral e  
Aplicada

BOTUCATU - SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE  
CREATINA SOBRE A MORFOLOGIA E A EXPRESSÃO DA MIOSINA DE  
CADEIA PESADA (MHC) NO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE  
RATOS WISTAR**

Andreo Fernando Aguiar

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre no  
Programa de PG em Biologia Geral e  
Aplicada

BOTUCATU - SP  
2007

## *Dedicatória*

*“Dedico este trabalho aos meus pais José Fernando Aguiar e Laura de Fátima Montanha Aguiar que, em nenhum momento, mediram esforços para conduzir os filhos ao estudo, ensinando como seguir o melhor caminho, sem precisar transpor as amizades e o respeito para com as outras pessoas. Esta dedicatória significa muito pouco, perto de todo esforço, amor e carinho que desprenderam, para que hoje e sempre, seus filhos tenham uma vida embasada nos ensinamentos de Deus”.*

## ***Agradecimentos***

*Este trabalho, pelos fins acadêmicos, é considerado um trabalho individual, mas não posso deixar de ressaltar que outras pessoas colaboraram, direta ou indiretamente, para que este objetivo fosse concretizado. A colaboração que tive de muitas pessoas, não se restringe apenas à relação científica e prática, mas também a um sorriso, um incentivo, um conselho, uma palavra de motivação, uma conversa, uma compreensão, etc... Todos os agradecimentos listados abaixo são especiais, espero não ter esquecido de ninguém.*

*Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada neste mundo é concebido. A verdade esta em Deus, o amor esta em Deus, a paz esta em Deus, a família esta em Deus. Tudo esta sob o seu controle, é por isto que conseguimos nos levantar a cada queda, nos preparar para as situações mais difíceis e acreditar que não estamos aqui por acaso. “Tudo posso naquele que me fortalece”*

*Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pois confiou na minha capacidade e nos frutos deste projeto, sempre transmitindo com extrema dedicação e profissionalismo seu conhecimento científico. Estes dois anos foram muito valiosos para a minha formação científico-pessoal, isto jamais será perdido. Sou imensamente grato por toda a sua inclinação, para que seus orientados não sejam apenas mais “um”.*

*Agradeço o meu irmão Danilo Henrique Aguiar, pois o seu apoio e incentivo foram essenciais para a elaboração deste trabalho. Espero que Deus continue abençoando a sua vida. “O coração de um homem pode fazer muito planos, mas a resposta certa vem do senhor”*

*Agradeço a minha namorada Rachel Colauto Milanezi por todo o seu amor, carinho, amizade, incentivo e dedicação nas horas de alegria e sofrimento, fazendo com que nosso namoro seja sustentado e guiado na palavra de Deus.*

*Agradeço a todos os amigos que integram o grupo de pesquisa em Biologia do Músculo Estriado Esquelético (Alan, Aline, Danilo, Denis, Eduardo, Fernanda Carani, Fernanda Losi, Francis, Henrique, Rachel, Robson, Rodrigo, Vivian, William). Obrigado pela amizade, compreensão, colaboração e respeito neste período. “Unidos seremos fortes”*

*Agradeço a Sueli, funcionária do Departamento de Morfologia, pela dedicação, amizade e auxílio prestado com muito bom humor e sinceridade aos discentes do Departamento.*

*Agradeço a todos os professores do Departamento de Morfologia (UNESP/IBB/Botucatu), que participaram, positivamente, na minha formação científica durante estes dois anos de mestrado.*

*Agradeço ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira do Departamento de Farmacologia e os alunos Fábio e Guilherme, pela amizade, colaboração e troca de conhecimentos.*

*Agradeço aos amigos do Departamento de Morfologia: Clariana, Danilo, Elaine, Flávia, Joice, João, Justulin, Kelly, Lívia, Lucas, Marcos, entre outros, que estão sempre por perto para uma boa conversa e trocas de conhecimentos.*

*Agradeço a Luciana Cristina Montes, secretária do Departamento de Morfologia, pela competência na organização e colaboração prestada, durante a realização deste trabalho.*

## Índice

Resumo .....	7
<i>Abstract</i> .....	9
I – INTRODUÇÃO .....	10
1. Características Gerais das Fibras Musculares .....	10
2. Plasticidade do Músculo Esquelético .....	17
3. Adaptações das Fibras Musculares ao Treinamento Contra Resistência (TCR) .....	17
4. Adaptações das Fibras Musculares ao Treinamento de Resistência (Treinamento aeróbico) .....	20
5. Mecanismos Envolvidos no Controle do Fenótipo Muscular ao Treinamento Físico .....	23
6. Adaptações Musculares ao Treinamento físico e a Suplementação de Creatina .....	32
7. Objetivos .....	34
II – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
III – CAPÍTULO: Efeitos do treinamento resistido e da suplementação de creatina sobre a morfologia e a expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo estriado esquelético de ratos Wistar .....	53
IV – CONCLUSÕES GERAIS .....	83

## Resumo

**Objetivo:** Este estudo avaliou os possíveis efeitos do treinamento resistido e da suplementação de creatina sobre a morfologia e a expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo estriado esquelético de ratos. **Métodos:** Ratos wistar machos (3 a 4 semanas, 80 a 100 g) foram divididos em quatro grupos: Não treinados sem a suplementação de creatina (Controle, CO; n= 8), Não treinados com a suplementação de creatina (Creatina, CR; n= 8), Treinados sem a suplementação de creatina (Exercício, EX; n= 8) e Treinados com a suplementação de creatina (Creatina + Exercício, CREX; n= 8). Os grupos EX e CREX foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido de 30 dias, na qual foram realizadas sessões de saltos em uma cuba contendo água à 30°C e 38 cm de profundidade, com intervalos de 40 segundos entre as séries. A sobrecarga de treinamento foi ajustada por meio de um colete acoplado na região torácica do animal, sendo equivalente a 50% do peso corporal, durante a fase de adaptação ao meio líquido (1° ao 5° dia), 60% nos dias subsequentes (6° ao 25°), e 70% na fase final do treinamento físico (26° ao 30°). Os grupos CR e CREX foram suplementados com creatina (0,5 g/kg peso corporal) durante todo o período de treinamento físico, administrada via oral (gavage). Ao final do experimento, os animais foram pesados e sacrificados, o músculo sóleo foi retirado e os fragmentos musculares foram congelados em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido a -156°C. Cortes histológicos (10 µm) foram submetidos à reação da ATPase miofibrilar (mATPase) (pH 4,4), para a identificação dos tipos de fibras musculares (I, IC, IIC e IIA). Foi calculada a área de secção transversal (AST) dos tipos de fibras (200 fibras/ animal), utilizando-se um analisador de imagens Leica Qwin. A expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) foi analisada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Resultados:** Todos os grupos ganharam peso do início ao final do experimento, mas não houve diferença estatística entre eles. Os valores do consumo de ração diário de cada animal (CRA) e o consumo de ração total diário dos grupos (CRT) experimentais não foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Não houve diferença significativa na retenção hídrica intramuscular e na AST das fibras I, IC, IIC e IIA entre os grupos. O grupo CR apresentou um aumento significativo no percentual da MHCI e redução no percentual da MHCII, comparado ao CO. O grupo EX aumentou o percentual de MHCII e reduziu a MHCI, em relação ao CO. Por outro lado, o grupo CREX não apresentou alterações no percentual de miosinas. **Conclusão:** A

suplementação de creatina associada ao treinamento resistido não afetou a proporção das isoformas de miosinas. Porém, a creatina isolada promoveu um efeito antagônico ao treinamento resistido na modulação das isoformas de MHCs. Para a creatina ser efetiva na hipertrofia muscular, precisa ser incorporada ao regime de treinamento, sendo dependente dos ajustes de sobrecarga (intensidade), nas sessões subsequentes de treinamento.

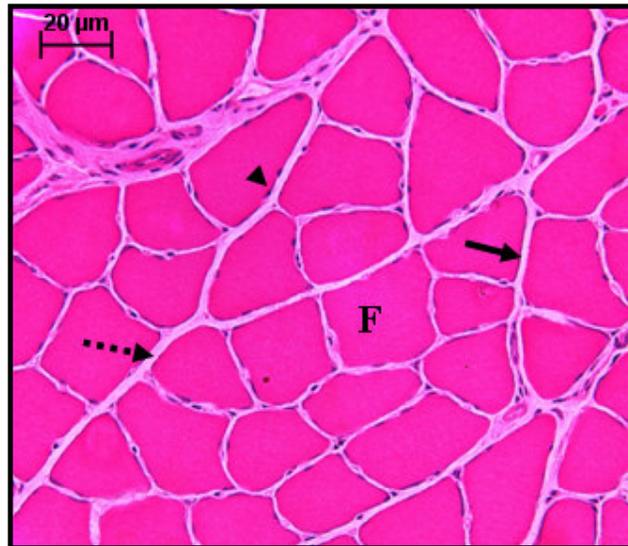
## Abstract

**Objective:** This study evaluated the possible effect of resistance training and creatine supplementation on the morphology and myosin heavy chain (MHC) expression in the skeletal muscle of rats. **Methods:** Male Wistar rats (3-4 weeks, 80-100g) were divided into four groups: Not trained without creatine supplementation (Control, CO; n=8), Not trained with creatine supplementation (Creatine, CR; n=8), Trained without creatine supplementation (Exercise, EX; n=8), and Trained with creatine supplementation (Creatine + Exercise, CREX; n=8). EX and CREX were submitted to a 30 day resistance training protocol. This involved individual training sessions where animals performed 04 sets of 10 jumps in a 38cm deep vat of water, at ~30°C with 40s rest intervals between each set. Training overload was accomplished with a vest attached to the animal's thorax equivalent to 50% body weight during liquid adaptation phase (1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> day), 60% in the intermediate (6<sup>th</sup> to 25<sup>th</sup>), and 70% in the final physical training phase (26<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup>). CR and CREX rats were given 0.5g/Kg body weight creatine orally for each training period by gavage. At the end of training animals were weighed, sacrificed, and the soleus muscle was removed and immersed in n-Hexane cooled in liquid nitrogen (-156 °C). Histological sections (10 µm) were submitted to myofibril ATPase reaction (mATPase) (pH 4.4) to identify muscle fiber types (I, IC, IIC, and IIA). Cross-section area (CSA) of each fiber type was calculated (200fibers/animal) using a Leica Qwin image analyzer. MHC expression was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Results:** All groups showed statistically similar body weight gains throughout the experiment. Daily animal food consumption (CRA) and group total food consumption (CRT) were not statistically different between groups. There was no significant difference between groups for intramuscular water retention or AST for I, IC, IIC, and IIA fibers. CR presented a significant increase in MHCI% and reduction in MHCII% compared with CO. The EX group increased MHCII% and reduced MHCI% compared to CO. However CREX did not present alterations in myosin percentages. **Conclusion:** Creatine supplementation associated with resistance training did not affect the proportion of myosin isoforms. However isolated creatine promoted an antagonistic effect to resistance training by MHC isoform modulation. For creatine to be effective in muscle hypertrophy, it needs to be incorporated into the training regimen, being dependent on overload adjustments (intensity), in subsequent training sessions.

## I - INTRODUÇÃO

### 1. Características Gerais das Fibras Musculares

O músculo estriado esquelético é um tecido complexo, versátil e heterogêneo, constituído por células especializadas, as fibras musculares, que são multinucleadas e os núcleos estão localizados na região periférica da fibra, abaixo da membrana plasmática (figura 1). O diâmetro das fibras varia, em média, de 10 a 100  $\mu\text{m}$  e o comprimento pode chegar até 10 cm, sendo variável, na dependência da arquitetura do músculo (Dal Pai-Silva et al., 2005). A disposição altamente organizada dos diferentes tipos de fibras musculares confere a este tecido uma ampla diversidade estrutural, metabólica e funcional (Schiaffino & Reggiani, 1994; Pette & Staron, 2000).

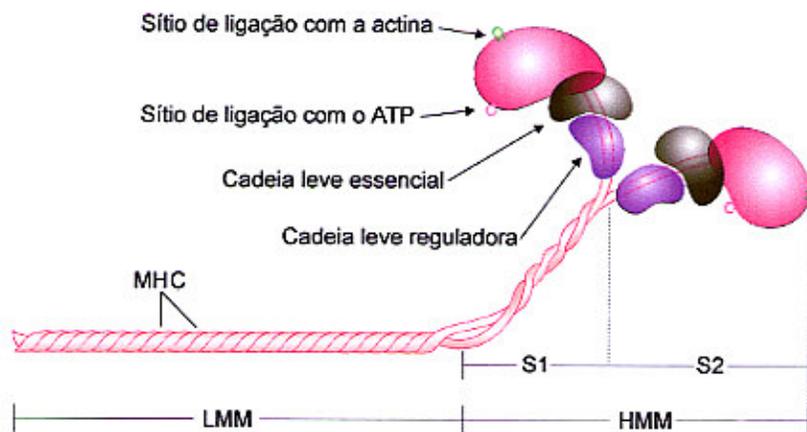


**Figura 1** – Corte transversal das fibras do músculo sóleo de ratos. Fibras musculares (F); Perímísio (seta descontínua); Endomísio (seta contínua) e Mionúcleos (ponta da seta). Coloração HE.

As fibras musculares são constituídas por estruturas repetidas, os sarcômeros, unidade contrátil fundamental da fibra muscular (Huxley, 1969). Cada sarcômero é formado por várias proteínas: as proteínas contráteis miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino), além das proteínas estruturais, responsáveis pela organização e integridade funcional do sarcômero. O filamento fino é formado pela actina e duas proteínas reguladoras, a troponina e tropomiosina (McComas, 1996). O filamento

grosso é formado pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II (Dal Pai-Silva et al., 2005).

A miosina é um hexâmero formado por seis polipeptídeos: duas cadeias pesadas de miosina (Myosin Heavy Chain, MHC), enroladas em  $\alpha$ -hélice e quatro cadeias leves de miosina (Myosin Light Chain, MLC) (Lowey et al., 1969; Weeds & Lowey, 1971; Elliot & Offer, 1978; Scott et al., 2001). Cada cadeia pesada pode ser separada em duas porções: meromiosina leve (light meromyosin, LMM), em forma de bastão, e meromiosina pesada (heavy meromyosin, HMM), conhecida como porção globosa (globular) da miosina, que contém um sítio de interação com a actina e uma região capaz de ligar-se à molécula de ATP e hidrolisá-la (atividade ATPásica) (Huxley 1969; Lowey et al., 1969). As HMM podem ser subdivididas nas porções S1 (parte globular com atividade ATPásica) e S2 (pequeno fragmento também em forma de bastão). As cadeias leves estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (Huxley 1969; Lowey et al., 1969; Dal Pai-Silva et al., 2005) (figura 2).



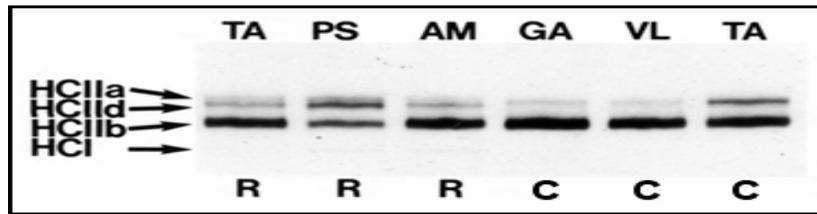
**Figura 2** – Esquema da molécula de miosina da classe II. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MHC podem ser clivadas e gerar as meromiosina leves (LMM) e meromiosina pesadas (HMM). As HMM são compostas pela porção globosa S1 e pela porção  $\alpha$  hélice em forma de bastão, S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (Dal Pai-Silva et al., 2005).

A contração muscular ocorre através da interação entre os filamentos finos (actina) e os filamentos grossos (porção globular da molécula de miosina) do sarcômero

(Huxley, 1969; Huxley, 1971), após a hidrólise do ATP, pela miosina ATPase (mATPase) (Lowey et al., 1969).

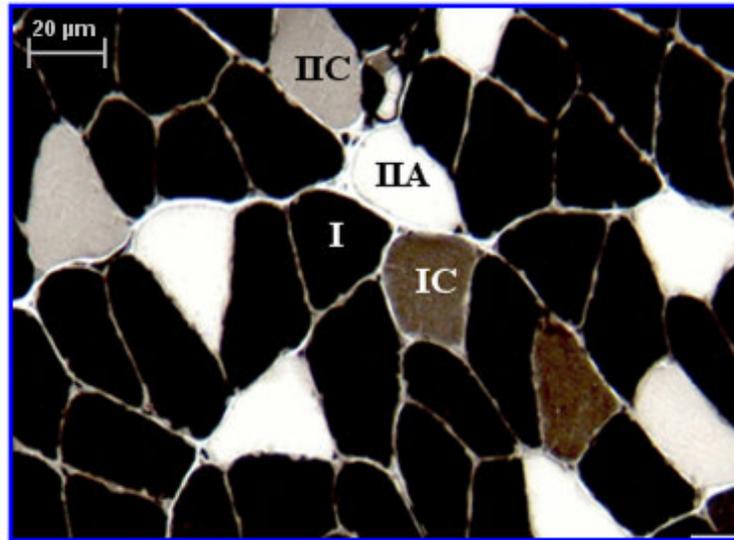
Os primeiros estudos envolvendo o tecido muscular classificavam os músculos em “vermelhos” ou “brancos” (Ranvier, 1873). A cor vermelha está relacionada com a presença do pigmento mioglobina e com o grau de vascularização do músculo. Com a utilização de técnicas histoquímicas, observou-se que a maioria dos músculos estriados dos mamíferos é constituída por uma população heterogênea de fibras, que apresentam características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (Dubowitz & Pearse, 1960). Inicialmente as fibras musculares foram classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas (Ogata, 1958). Posteriormente, três tipos principais de fibras musculares foram descritas, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB, de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase na porção globular da miosina (mATPase) (Brooke & Kaiser, 1970).

Segundo Talmadge & Roy (1993), a velocidade de contração de um músculo é diretamente proporcional a atividade da mATPase, na porção globular da miosina. Este evento foi demonstrado em análises de fibras isoladas, que revelaram uma alta correlação entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com a especificidade da miosina de cadeia pesada (MHC) (Barany, 1967; Pette & Staron, 2000). Pette & Staron (2001), utilizando-se da reação histoquímica para a ATPase miofibrilar, da Imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos para isoformas de miosina (MHC) e da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), classificaram os tipos de fibras musculares em fibras de contração lenta – Tipo I (Slow Fibers), expressando MHCI e fibras de contração rápida – Tipo II (Fast Fibers), subdivididas em tipo IIA, expressando MHCIIa; tipo IID, expressando MHCIId e tipo IIB, expressando MHCIIb. As fibras do tipo IID (MHCIId) se equivalem as fibras IIX (MHCIIx), descritas em ratos (Schiaffino & Reggiani, 1994). Os autores classificaram estas fibras como puras, uma vez que, expressavam uma única isoforma de miosina de cadeia pesada (figura 3).



**Figura 3** - Separação eletroforética das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC) em diferentes músculos de ratos (R) e camundongos (C). Expressão das Isoformas rápidas MHCIIa, MHCIIc e MHCIIb e da Isoforma lenta MHCI. TA, tibial anterior; PS, porção profunda do psoas; AM, adutor magno; GA, gastrocnêmio; VL, vasto lateral; TA, tibial anterior. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE. (adaptado de Hamalainen & Pette, 1993).

Além das fibras puras (Tipo I, Tipo IIA, Tipo IID e Tipo IIB), existem as fibras “híbridas”, que expressam duas ou mais isoformas de miosina. Estas fibras foram classificadas em Tipo IC (MHC I > MHC IIA), tipo IIC (MHC IIA > MHC I), tipo IIAD (MHC IIA > MHC IID), tipo IIDA (MHC IID > MHC IIA), tipo IIDB (MHC IID > MHC IIB) e tipo IIBD (MHC IIB > MHC IID) (Pette & Staron, 2000; Pette & Staron, 2001). A associação entre as fibras puras e híbridas constitui um contínuo de fibras lentas em direção as fibras rápidas: tipo I – tipo I/IIA – tipo IIA/I – tipo IIA – tipo IIA/D – tipo IID/A – tipo IID – tipo IID/B – tipo IIB/D – tipo IIB (Pette et al., 1999). Deste modo, assume-se uma organização seqüencial das fibras puras, as quais são intermediadas por fibras híbridas (I ↔ IC ↔ IIC ↔ IIA ↔ IIAD ↔ IID ↔ IIDB ↔ IIB) (Pette & Staron, 2000) (figura 4).



**Figura 4** – Corte transversal do músculo sóleo de rato. Fibras musculares puras (I e IIA) e híbridas (IC e IIC). Reação da ATPase miofibrilar, pH 4,35.

A especificidade na expressão das diferentes isoformas de MHCs, de acordo com o tipo de fibra e músculo analisado, revela uma ampla diversidade estrutural, funcional e metabólica do músculo esquelético (Pette & Staron, 2000).

Baseando-se na intensidade da reação histoquímica ATPase miofibrilar (mATPase) em diferentes pHs, 7 tipos de fibras musculares foram identificadas em humanos: tipos I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAB e IIB (Staron & Hikida, 1992; Staron, 1997; Scott et al., 2001), onde destaca-se uma maior heterogeneidade nas fibras do tipo II. Já, Biral et al., (1988), utilizando-se da análise eletroforética, identificou três isoformas de miosina de cadeia pesada no músculo vasto lateral humano: MHCI, MHCIIa e MHCIIb. No entanto, a expressão da MHCIIb não foi evidente no músculo quadríceps femoral, o qual revelou a expressão das miosinas: MHCI, MHCIIc e MHCIIa (Hilber & Galler, 1997). Segundo Pette & Staron (2001), as fibras musculares humanas parecem não expressar a MHCIIb. A classificação prévia de fibras IIB equivale as fibras do tipo IIX (IID) (MHCIIx ou MHCIIId), de acordo com a similaridade da MHC descrita em ratos (Smerdu et al., 1994).

Vários estudos procuraram investigar as possíveis correlações entre as diferentes isoformas de miosinas e as propriedades metabólicas oxidativas e glicolíticas das fibras musculares (Reiser et al., 1985; Rivero et al., 1999; Pette & Staron, 2001). Desta forma, a combinação entre o padrão de reação para a atividade da mATPase e reações

histoquímicas de algumas enzimas metabólicas, foram utilizadas para classificar as fibras musculares de acordo com o seu metabolismo energético (Pette & Staron, 1997).

Rivero et al., (1999), utilizando-se de métodos histoquímicos, investigaram as interrelações entre a atividade da mATPase, a atividade das enzimas metabólicas (succinato desidrogenase, SDH e  $\alpha$ -glicerolfosfatase desidrogenase, GPD) e a área de secção transversal (AST) das fibras musculares do músculo gastrocnêmio de ratos. Este estudo indicou uma correlação positiva entre a isoforma de MHC e atividades das enzimas mATPase e GPD (enzimas associadas ao metabolismo glicolítico), na qual evidenciou um padrão de atividade destas enzimas, de acordo com o tipo de fibra: IIB>IID/XB>IID/X>IIAX>IIA>I+IIA>I. Por outro lado, a atividade da SDH, enzima associada ao metabolismo oxidativo, foi maior nas fibras IIA>I>IIB. Contudo, as fibras com maior AST (IIB e IID/X), apresentaram maior atividade da GPD e menor atividade da SDH, inversamente, as fibras com menor AST (I e IIA), apresentaram maior atividade da SDH e menor atividade da GPD. Estes resultados apontam uma associação entre a isoforma de miosina expressa, AST e propriedade metabólica muscular, de acordo com as características contráteis, morfológicas e bioquímicas, a fim de garantir a especificidade funcional dos diferentes músculos.

De acordo com os vários parâmetros descritos para identificar os diferentes tipos de fibras musculares, tais como: as diferenças nas isoformas das MHCs, o perfil das enzimas metabólicas, as características bioquímicas e fisiológicas, e suas propriedades estruturais e contráteis (Dubowitz & Pearce, 1960; Pette & Staron, 2001; D' Antona et al., 2006), tem sido utilizada uma nomenclatura geral para classificar os diferentes tipos de fibras musculares: Fibras de contração lenta – Tipo I (slow-twitch fibers), dependentes do metabolismo oxidativo (SO – slow oxidative); Fibras de contração rápida – Tipo IIA (fast-twitch fibers), dependentes do metabolismo oxidativo e glicolítico (FOG – fast oxidative and glycolytic) e Fibras de contração rápida - Tipo IIB (fast-twitch fibers), dependentes do metabolismo glicolítico (FG – fast-twitch glycolytic) (Peter et al., 1972; Simoneau & Bouchard, 1995; Powers & Howley, 2000; Wilmore & Costill, 2001) (tabela 1).

**Tabela 1** - Características estruturais, bioquímicas e morfofuncionais das fibras musculares esqueléticas Tipo I, IIA e IIB.

CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES			
Características	Tipos de Fibras		
	Contração Rápida		Contração Lenta
	Tipo IIB (FG)	Tipo IIA (FOG)	Tipo I (SO)
<b>Morfologia</b>			
Cor	Branca	Branca/Vermelha	Vermelha
Área da fibra	Grande	Intermediária	Pequena
Capilares/mm <sup>2</sup>	Baixo	Intermediário	Alto
Densidade mitocondrial	Baixa	Intermediária	Alta
<b>Substratos Energéticos</b>			
Reserva de fosfocreatina	Alta	Alta	Baixa
Reserva de glicogênio	Alta	Alta	Baixa
Reserva de triglicérides	Baixa	Média	Alta
<b>Histoquímica e Bioquímica</b>			
Atividade da mATPase	Alta	Alta	Baixa
Atividade de enzimas glicolíticas	Alta	Alta	Baixa
Atividade de enzimas oxidativas	Baixa	Média/Alta	Alta
Capacidade Glicolítica	Alta	Alta	Baixa
Capacidade Oxidativa	Baixa	Média/alta	Alta
<b>Função e Contratilidade</b>			
Velocidade de contração	Rápida	Rápida	Lenta
Velocidade de relaxamento	Rápida	Rápida	Lenta
Resistência à fadiga	Baixa	Moderada/alta	Alta
Produção de força	Alta	Intermediária	Baixa
Elasticidade	Alta	Alta	Baixa

Adaptado de Kraus W, Torgan CE, Taylor DA (1994) Skeletal muscle adaptation low frequency motor nerve stimulations. *Exerc Sport Sci Rev* 22:313-60.

## **2. Plasticidade do Músculo Esquelético**

A diversidade funcional e metabólica dos diferentes tipos de fibras confere ao músculo esquelético uma alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais (Campos et al., 2002). Contudo, as fibras musculares exibem uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, como resposta a estímulos específicos (Pette & Staron, 2000; Fluck & Hoppeler, 2003; Magaúda et al., 2004). Esta plasticidade muscular tem sido investigada em diferentes estímulos, tais como o treinamento de resistência (aeróbico) (Demirel et al., 1999), o treinamento contra resistência (força) (Harber et al., 2004), a estimulação elétrica (Simoneau & Pette, 1988), a desnervação (Gutmann et al., 1972), a reinervação cruzada (Buller et al., 1960), a microgravidade (Caiozzo et al., 1996; Fitts et al., 2001), a intervenção nutricional (Moura et al., 2002; Willoughby & Rosene, 2003; Andersen et al., 2005), o envelhecimento (Klitgaard et al., 1990; Frontera et al., 1991) e os fatores hormonais (Caiozzo et al., 1992; Adams et al., 1999).

As possíveis adaptações do músculo esquelético em resposta ao exercício físico têm sido amplamente investigadas (Williamson et al., 2000; Sharman et al., 2001; Parcell et al., 2003; Harber et al., 2004). Os estímulos sucessivos dos diferentes modelos de treinamento físico podem provocar ajustes específicos no fenótipo das fibras musculares, a fim de suprir as necessidades do organismo, e, otimizar o desempenho físico (Siu et al., 2004).

## **3. Adaptações das Fibras Musculares ao Treinamento Contra Resistência (TCR)**

Está bem relatado que o treinamento contra resistência (TCR) pode provocar adaptações funcionais, estruturais e metabólicas no músculo esquelético (Green et al., 1999; Sharman et al., 2001). Vários estudos mostram um aumento da massa (hipertrofia), força e área muscular em diferentes modelos de TCR (McCall et al., 1996; Sharman et al., 2001; Widrick et al., 2002). A magnitude das respostas musculares a este modelo de treinamento é dependente da intensidade (carga), do número de séries e repetições (volume), do período de descanso entre as séries e exercícios, da frequência de treinamento e da velocidade das repetições (Kraemer et al., 2002; Galvão & Taaffe, 2004). Galvão & Taaffe (2005), em um estudo com idosos (65 – 78 anos), mostraram

que o TCR consistindo de 1 série (série única) de 8 repetições é suficiente para melhorar a força e resistência muscular, porém, os ganhos são maiores com volumes mais altos (múltiplas séries) de treinamento (3 séries de 8 repetições). Resultados semelhantes foram observados em mulheres pós-menopausa (1 a 8 anos após a menopausa) previamente treinadas, que apresentaram maiores valores de força máxima, com protocolo de múltiplas séries, comparado a série única (Kemmler et al., 2004). Em contraste aos estudos anteriores, Hass et al., (2000), analisando homens experientes na prática de treinamento com pesos (TCR), não encontraram diferenças significantes entre os protocolos de série única (1 série) e séries múltiplas (3 séries), na promoção da força e resistência muscular. Neste contexto, a disparidade encontrada nos resultados destes estudos, aponta para uma especificidade nas adaptações musculares, de acordo com o modelo de TCR, a idade, o sexo, o grau de treinabilidade e a experiência dos indivíduos com o treinamento.

Campos et al., (2002), analisaram os efeitos de três regimes de treinamento contra resistência, G1: Baixa Repetição, 4 séries de 3 a 5 repetições máximas (RM); G2: Intermediária repetição, 3 séries de 9 a 11 RM e G3: Alta repetição, 2 séries de 20 a 28 RM, sobre a área de secção transversal das fibras musculares (AST), a força dinâmica máxima (FDM), o percentual relativo dos tipos de fibras, as miosinas de cadeia pesada (MHC) e a resistência muscular localizada (RML), em indivíduos jovens ( $22,5 \pm 5,8$  anos). O treinamento com baixas repetições (alta carga - Intensidade), promoveu maiores ganhos de FDM. Por outro lado, o grupo Alta repetição (baixa carga - Intensidade) apresentou uma maior RML, após o período de treinamento. Além disso, houve um aumento na AST das fibras musculares do tipo I, IIA e IIB nos grupos Baixa e Intermediária repetição, o que confirma uma maior efetividade do TCR de alta intensidade e baixo volume, em promover uma maior hipertrofia das fibras musculares. Interessantemente, estas adaptações musculares estiveram acompanhadas de alterações no perfil fenotípico das fibras musculares, na qual foi evidenciado, através da reação da ATPase miofibrilar, um aumento no percentual de fibras IIAB e redução das fibras IIB, em todos os grupos. Em paralelo, a análise eletroforética revelou uma redução no conteúdo de MHCIIb, com concomitante aumento da MHCIIa, após o período de treinamento.

Em adição, Harber et al., (2004), analisando os efeitos de 10 semanas de TCR em circuito, em indivíduos jovens (21 – 25 anos), observaram um aumento na força dinâmica máxima (1RM) e AST das fibras IIA, acompanhado de um aumento na

expressão da MHCIIa e redução da MHCIIb, sem alterações significantes no percentual de fibras (mATPase). Com isto, os autores sugerem um ajuste nas isoformas de MHCs, precedente a modulação das fibras musculares, como observado em indivíduos não treinados após 2 semanas de TCR (Staron et al., 1994) e idosos não treinados após 12 semanas de TCR (80% 1RM) (Williamson et al., 2000).

As adaptações das fibras musculares, observadas em indivíduos jovens submetidos a diferentes programas de TCR, são semelhantes às encontradas em idosos (60 – 75 anos), as quais demonstram um aumento da força dinâmica máxima (FDM), associada à redução da MHCIIb e aumento da MHCIIa (Sharman et al., 2001). Segundo este autor, o ajuste fenotípico da isoforma MHCIIb em direção a MHCIIa (MHCIIb → MHCIIa), ocorre devido a plasticidade da MHCIIb para ajustar-se em direção a fibras mais oxidativas, como consequência do recrutamento em protocolos de TCR. Contudo, o ajuste da MHCIIb para MHCIIa como resultado do TCR em sujeitos jovens, foi amplamente demonstrado (Adams et al., 1993; Jurimae et al., 1996; Carroll et al., 1998).

O trabalho de Staron et al., (1984), confirma a efetividade do TCR, em provocar um ajuste fenotípico entre a população de fibras rápidas (IIB → IIA), na qual foi observada uma alta proporção de fibras IIA, em atletas levantadores de peso, comparados a não-treinados, que apresentaram uma maior proporção de fibras IIB. Em mulheres submetidas a 20 semanas de TCR, estes autores observaram uma redução do percentual de fibras IIB e aumento da população de fibras IIA, acompanhado de um aumento na AST (hipertrofia) das fibras I (15%), IIA (45%) e IIA + IIB (57%) (Staron et al., 1990).

Nesta linha de investigação, Williamson et al., (2001), mostraram um aumento da MHCIIa, concomitante a uma redução da proporção de fibras híbridas (I/IIA + I/IIA/IIIX + IIA/IIIX), em indivíduos jovens (homens; 25 ± 2 anos e Mulheres; 22 ± 1 ano), após 12 semanas de TCR.

Parece estar claro que o estímulo do TCR é suficiente para provocar mudanças específicas no fenótipo muscular, nas quais indicam um ajuste entre a população de fibras rápidas (tipo IIB → tipo IIA), que contribui para uma maior eficiência e capacidade oxidativa das fibras musculares.

Vale ressaltar que outros protocolos de treinamento físico, como por exemplo, os protocolos de treinamento aeróbico, podem ocasionar respostas adaptativas semelhantes às observadas no treinamento contra resistência, porém, a magnitude destas

respostas parece ser diferente, devido ao padrão de estímulo nervoso e recrutamento das fibras musculares.

#### **4. Adaptações das Fibras Musculares ao Treinamento de Resistência (Treinamento Aeróbico).**

As respostas aos diferentes modelos de treinamento de resistência (treinamento aeróbico) têm sido associadas a adaptações morfológicas e metabólicas dos músculos, tais como o aumento no número de mitocôndrias e na atividade das enzimas do metabolismo oxidativo, a elevação na concentração de proteínas mitocondriais (Stone et al., 1996; Hawley, 2002), e a melhora na captação de oxigênio em exercício submáximo (Demirel et al., 1999; Trappe et al., 2006).

As adaptações musculares agudas e crônicas, que ocorrem em resposta à relação Estímulo/Resposta de treinamento aeróbico, as quais promovem um aumento da capacidade oxidativa e antioxidante muscular, estão bem estabelecidas (Dudley, 1982; Powers, 1994). No entanto, as possíveis mudanças no perfil fenotípico das fibras musculares em resposta ao treinamento aeróbico, relacionadas ao padrão de recrutamento das fibras musculares, permanecem pouco esclarecidas.

Vários estudos procuram investigar as possíveis adaptações das fibras musculares a padrões de impulsos nervosos de baixa frequência, assim como em modelos de treinamento físico de longa duração (treinamento de resistência ou aeróbico, endurance training) (Demirel et al., 1999; O'Neill et al., 1999; Trappe et al., 2006) e Estimulação Elétrica Crônica de Baixa Frequência (CLFS - Chronic low-frequency stimulation) (Salmons & Vrbova, 1969; Simoneau & Pette, 1988). A CLFS causa maiores mudanças no fenótipo das fibras musculares, comparada ao treinamento aeróbico, as quais seguem uma ordem de ajuste, das isoformas rápidas em direção as isoformas lentas, como descrito em músculos de contração rápida de ratos (MHCIIb → MHCIIc → MHCIIa) e coelhos (MHCIIc → MHCIIa → MHCI) (Pette & Staron, 2000). As adaptações fenotípicas das fibras musculares, aos estímulos da CLFS, são quantitativamente maiores, mas qualitativamente similares quando comparadas ao estímulo pelo treinamento físico (Pette & Staron, 2001). Embora os estímulos dos diferentes protocolos de treinamento aeróbico e treinamento de força (contra resistência) sejam suficientes para provocar um ajuste das fibras rápidas em direção a lentas (IIB → IIA) (Sullivan et al., 1995; Sharman et al., 2001; Putman et al., 2004), estas mudanças

não atingem a transição entre os diferentes tipos de fibras, como observado na CLFS (IID → IIA → I) (Pette & Staron, 2001).

Demirel et al., (1999), investigando a relação Estímulo/Resposta de 10 semanas de treinamento aeróbico (corrida a 75%  $VO_2$  máx) em 3 grupos de ratos (G1: 30 min/ dia; G2: 60 min/ dia; G3: 90 min/ dia), observaram um aumento da MHCI, MHCIIa e MHCIIb/x e redução da MHCIIb, no músculo extensor longo dos dedos (EDL), do grupo de maior volume (G3). Além disso, houve uma redução na MHCIIb, acompanhada de um aumento na MHCIIa, no músculo plantar dos três grupos. No músculo sóleo, o treinamento com duração maior do que 60 minutos (G3) provocou redução da MHCIIa, com concomitante aumento da MHCI. De acordo com os autores, o aumento na duração do treinamento pode ampliar a magnitude dos ajustes fenotípicos das isoformas de MHCs rápidas em direção as lentas, semelhantes às mudanças induzidas pela CLFS (IIB → IIA → I). Este estudo aponta uma associação entre o tempo (duração do estímulo) e o volume de treinamento (intensidade do estímulo), na magnitude de modulação das fibras musculares. Além disso, o volume de treinamento suficiente para induzir a estas mudanças fenotípicas, varia entre os diferentes músculos, mostrando as diferenças no padrão de recrutamento das fibras e especificidade nos ajustes das fibras musculares.

Em humanos, algumas evidências da modulação das fibras musculares, atingindo a transição de fibras rápidas para lentas (tipo II → tipo I), foram observadas em indivíduos que praticavam treinamento aeróbico há 10 anos. A análise do músculo vasto lateral revelou um maior percentual de fibras do tipo I no grupo treinado (70,9%), comparado ao grupo sedentário (37,7%), enquanto que o percentual de fibras do tipo II foi menor (25,3%) versus (51,8%), no sedentário (Thayer et al., 2000). Em adição, Harber et al., (2002), observaram que o músculo gastrocnêmico de corredores de longa distância (fundistas), apresentava maior proporção de fibras do tipo I (MHCI) (71%), quando comparados a corredores de média distância (56,3%) e corredores recreativos (59,8%). Além disso, os corredores de média distância apresentaram um alto percentual de fibras IIA (MHCIIa) (43,3%), em relação aos fundistas (28,5%) e recreativos (30,2%). O trabalho mostrou também uma alta distribuição de fibras tipo IIB (MHCIIb) (10,0%) em recreativos, quando comparados aos outros corredores (0,4%). Frente aos resultados, os autores sugerem um aumento na expressão de MHCI, posteriormente ao treinamento de corrida de longa distância, e uma prevalência de MHCIIa, após treinamento para eventos de média distância.

Entretanto, vale ressaltar que os estudos anteriores analisaram o perfil muscular de atletas já treinados, sem investigar a modulação das fibras musculares nos momentos pré e pós o período de treinamento, o que não exclui a possibilidade genética destes atletas já apresentarem maiores proporções de um determinado tipo de fibra, antes de iniciarem o período de treinamento. Indivíduos que foram submetidos a 8 semanas de treinamento aeróbico, mostraram um aumento no percentual das fibras do tipo IIA (65% para 75 %), sem qualquer alteração no percentual de fibras do tipo I, após o treinamento (Andersen & Henriksson, 1977). De modo semelhante, Trappe et al., (1995), analisando 28 atletas, corredores de longa distância altamente treinados, em 1973 e, novamente em 1992, observaram que nos indivíduos que continuavam altamente treinados, não foram evidenciadas alterações no percentual de fibras do tipo I por ocasião da análise realizada 20 anos depois. Já, Trappe et al., (2006), investigando os efeitos de 13 semanas de treinamento de maratona (treinamento aeróbico) em corredores recreacionais, observaram uma redução no diâmetro das fibras do tipo I e tipo II, acompanhada de um aumento no percentual de fibras do tipo I e da MHCI, além de um aumento na potência e velocidade de contração nas fibras do tipo I. De acordo com os autores, estas adaptações apontam as mudanças musculares adicionais, necessárias para melhora do rendimento físico, em eventos de longa duração.

Alguns autores sugerem que ocorra uma hipertrofia seletiva das fibras musculares, de acordo com o tipo de treinamento, o que explicaria uma maior ocupação das fibras do tipo I na área muscular de corredores de longa distância (atletas de endurance), e fibras do tipo II em atletas submetidos a treinamento anaeróbico (Costill et al., 1976).

Contudo, embora alguns trabalhos apontem um aumento no percentual de fibras do tipo I (MHCI) seguida de treinamento aeróbico, existem evidências limitadas da ocorrência de transição das fibras do tipo II para fibras do tipo I, independente do tipo de treinamento (treinamento aeróbico ou treinamento contra resistência) (tabela 2).

**Tabela 2** – Representação esquemática da direção dos ajustes das fibras musculares ao treinamento contra resistência e treinamento aeróbico em humanos e animais. Presença de modulação (seta contínua), Ausência de modulação (seta interceptada), Possibilidade de modulação (seta descontinua).

<b>Modelos</b>	<b>TREINAMENTO CONTRA RESISTÊNCIA</b>		
<b>Humanos</b>	← /	←	←
<b>Animais</b>	← /	←	←
	<b>TREINAMENTO AERÓBICO</b>		
<b>Humanos</b>	← - - - - -	←	←
<b>Animais</b>	←	←	←

### **5. Mecanismos Envolvidos no Controle do Fenótipo Muscular ao Treinamento Físico**

Diferentes modelos de treinamento físico podem provocar mudanças específicas no músculo esquelético, as quais estão relacionadas a uma melhor capacidade de resposta metabólica para suprir a demanda funcional (Scott, 2001). O treinamento contra resistência (TCR), tem sido amplamente divulgado como um estímulo adicional, capaz de promover um aumento na área de secção transversal das fibras musculares (hipertrofia) (Campos et al., 2002; Kraemer et al., 2002). Contudo, a magnitude da resposta hipertrófica muscular, pode ser influenciada pela seleção dos diversos modelos de TCR (frequência, intensidade e duração das sessões individuais), que contribuem para as respostas celulares e moleculares, que promovem os ajustes musculares (Haddad & Adams, 2002).

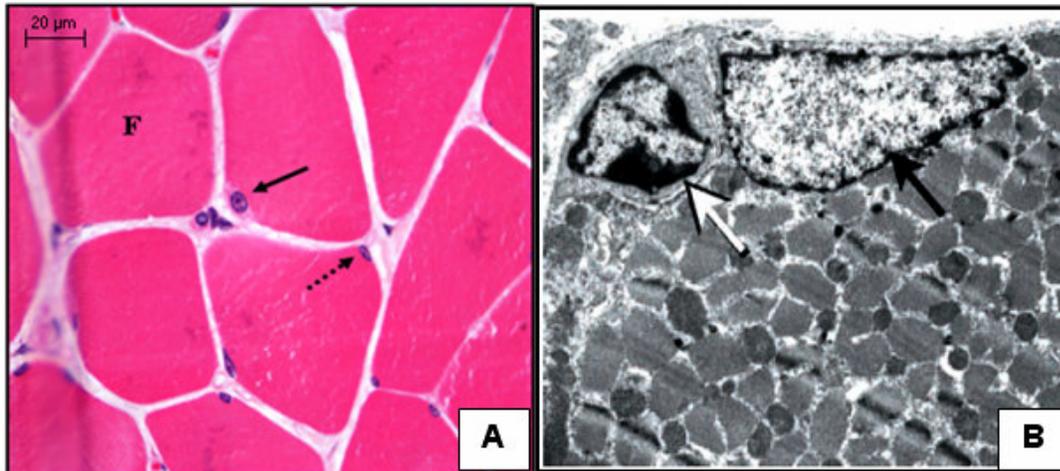
As principais adaptações musculares envolvidas no mecanismo de hipertrofia são atribuídas a uma população de células residentes no músculo esquelético adulto, as células satélites ou mio-satélites (Hawke & Garry, 2001).

As células mio-satélites são mioblastos que não se fundiram durante a miogênese, permanecendo quiescentes entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal, sendo denominados também de mioblastos adultos indiferenciados (Hawke & Garry, 2001). As células satélites foram descritas pela primeira vez em músculos de rã, recebendo essa denominação pela sua posição em relação às fibras

diferenciadas, sendo posteriormente identificadas em músculos de aves, répteis e mamíferos (Mauro, 1961; Muir et al., 1965; Gamble et al., 1978; Campion et al., 1981; Hartley et al., 1992; Bischoff, 1994; Hawke & Garry, 2001).

O número de células satélites no músculo é dependente da espécie, da idade e do tipo de fibra considerado (Schultz & McCormick, 1994). Em camundongos, ao nascimento, 32% dos núcleos das fibras correspondem às células satélites e nos animais adultos e senis, a porcentagem diminui para 5 e 2%, respectivamente (Snow, 1977). Considerando-se a velocidade de contração dos músculos, em ratos adultos, os músculos de contração rápida apresentam menor porcentagem de células satélites, enquanto nos músculos de contração lenta essa porcentagem é maior (Gibson & Schultz, 1982). Em ratos e no homem, a frequência desse tipo celular varia ao longo da fibra muscular, sendo 20% maior na região da junção mioneural (Wokke et al., 1989) e próximo de capilares sanguíneos (Schmalbruch & Hellhammer, 1977).

As células satélites são precursores miogênicos com extensa atividade mitogênica, que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, a regeneração das fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto (Seale & Rudnicki, 2000), além de exibirem uma alta capacidade de auto-renovação (Deasy et al., 2001). Na ausência de estímulo, as células satélites permanecem inativas (estado quiescente), apresentando uma alta relação núcleo/ citoplasma, com poucas organelas, núcleo menor e aumento da heterocromatina, comparado aos núcleos adjacentes da fibra muscular (mionúcleos) (figura 5).



**Figura 5** – A: Corte transversal de músculo estriado de rato. Localização periférica da célula satélite (seta contínua), Fibra muscular (F) e Mionúcleo (seta descontinua). Coloração H.E. B: Ultra-estrutura de uma fibra muscular. Célula satélite (seta branca) e Mionúcleo (seta preta).

Em resposta a estímulos adaptativos (microtrauma do treinamento resistido) ou estímulos mais severos (ação de toxinas e distrofia muscular), as células satélites são ativadas, proliferam-se e se diferenciam em mioblastos (Hawke & Garry, 2001). Durante a regeneração (reparo) da microlesão muscular ocasionada pelo estímulo do treinamento físico (treinamento resistido), os mioblastos irão migrar para a região danificada e, fundir-se a fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão (hipertrofia), porém, em casos de lesões mais severas, os mioblastos poderão se alinhar e fundir-se entre si, para formar uma nova miofibrila (Bischoff, 1994; Hawke & Garry, 2001; Chargé & Rudnicki, 2004) (figura 8). Na fase ativa, as células satélites exibem um aumento na relação citoplasma/ núcleo, aumento no número de organelas intracelulares e redução da heterocromatina (Schultz & McCormick, 1994).

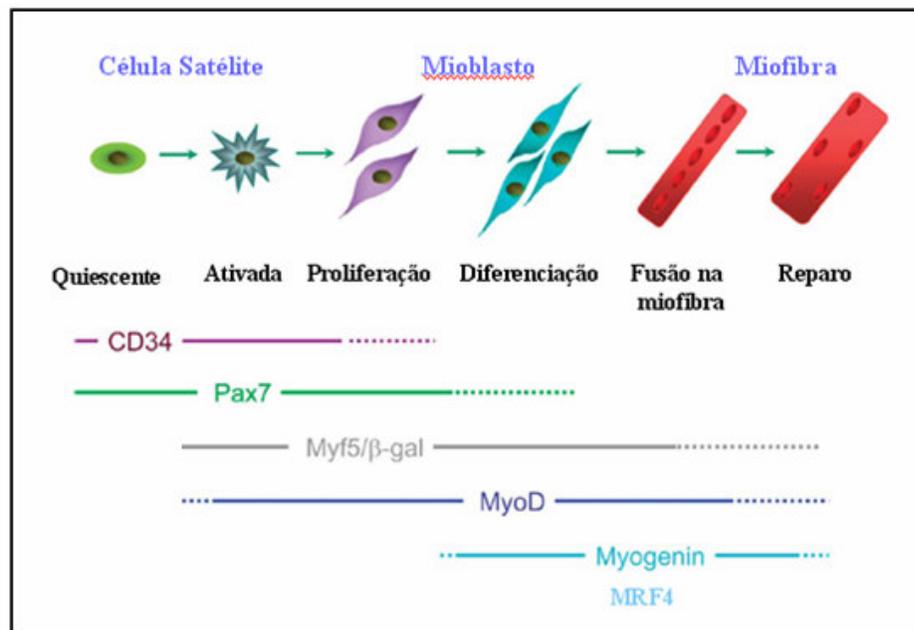
A microlesão muscular (microtrauma adaptativo) é essencial para a promoção do crescimento e reparo muscular, por meio da ativação das células satélites. Este fato explica a maior hipertrofia promovida pela contração excêntrica, uma vez que, este tipo de contração gera uma maior sobrecarga, e conseqüentemente, uma maior microlesão das fibras musculares, ocasionando maiores adaptações (Bacurau, 2001).

Durante o processo de regeneração, vários fatores de crescimento são expressos para atender ao controle e ativação das células satélites, podendo atuar como reguladores positivos: os hormônios (GH, growth hormone; insulina; testosterona), os

fatores de crescimento (IGF, insulin-like growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; FGF, fibroblast growth factor) e as citocinas (interleucina 6, IL-6; Interleucina 15, IL-15), e/ou reguladores negativos: o TGF- $\beta$ , Fator  $\beta$  de crescimento em transformação (Chargé & Rudnicki, 2004).

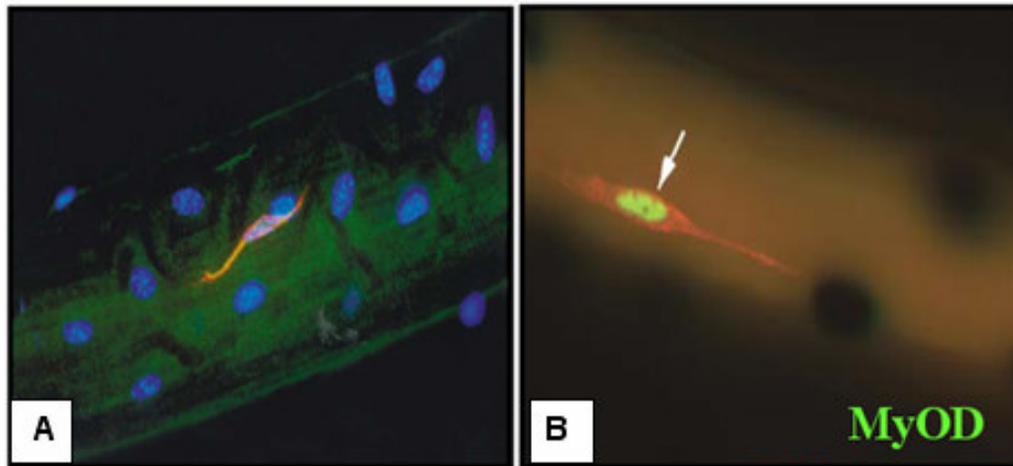
Além disso, as células satélites tanto no estado de quiescência como no estado ativado, expressam marcadores miogênicos (Hawke & Garry, 2001), que controlam as fases de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites durante o processo de reparo muscular (Seale & Rudnicki, 2000).

Vários marcadores para as células satélites foram identificados, entre eles estão os fatores de transcrição MNF(Foxk1) (Hawke & Garry, 2001), Pax7 (Charge & Rudnicki, 2004) e Sox 8 (Schmidt et al., 2003), o c-Met (Cornelison et al., 2000), as proteínas CD34 (Michal et al., 2002) e p27 Kip (Spangenburg et al., 2002) e os fatores de regulação miogênica (myogenic regulatory factors ou MRFs), que são proteínas pertencem a família dos fatores transcricionais “basic helix-loop-helix” (BHLH), da qual fazem parte a Miogenina, MRF4, MyoD e o Myf5 (Seale & Rudnicki, 2000) (figura 6).



**Figura 6** – Representação esquemática das células satélites e marcadores específicos de cada estágio. As células satélites quiescentes expressam CD34 e Pax 7. Após a ativação, as células satélites proliferam e expressam MyoD e Myf5. Posteriormente, essas células se diferenciam e há maior expressão de miogenina e MRF4. (Adaptado de Zammit et al., 2006).

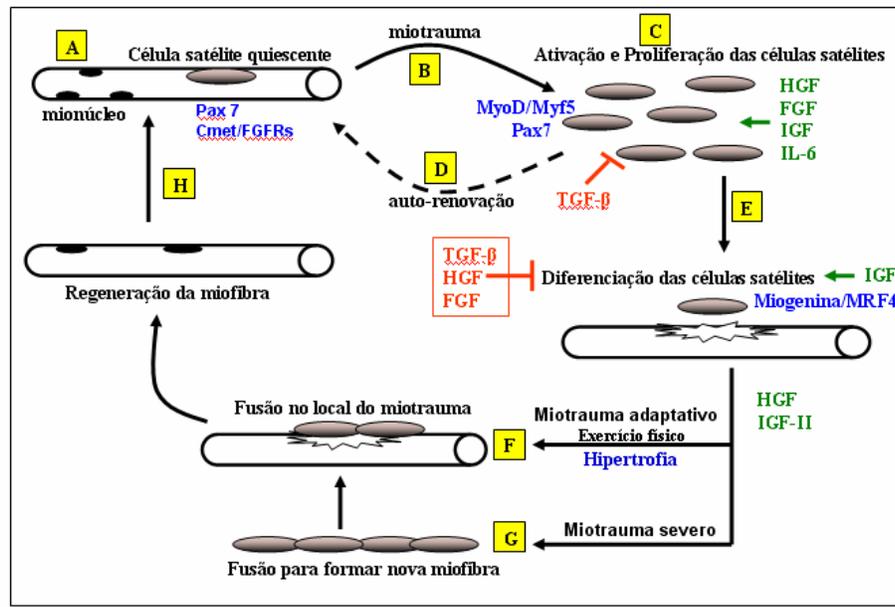
Pesquisas com a utilização da microscopia eletrônica, evidenciaram algumas proteínas que são expressas pelas células satélites (como exemplo a M-caderina; molécula de adesão celular dependente de cálcio), mas não são expressas pelos mionúcleos, tornando mais simples o seu estudo e de outros componentes musculares (Morgan & Partridge, 2003) (figura 7).



**Figura 7** – Fibra muscular mostrando uma célula satélite. A: Célula satélite marcada com o anticorpo para M-caderina (vermelho), Estriações das fibras musculares coradas com anticorpo para Desmina (verde) e Mionúcleo (azul). B: Célula satélite ativada para a proliferação, expressando MyoD (verde) e CD34 (vermelho) (Adaptado de Morgan & Partridge, 2003).

Os MRFs compartilham um domínio homólogo bHLH, que é necessário para a ligação com o DNA e para a dimerização com fatores transcricionais da família da proteína E. Os heterodímeros MRF-proteína E e os monômeros de MRFs ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo – específicos (Murre et al., 1989), levando à expressão de proteínas do sarcômero (Davis et al., 1990).

As células satélites quiescentes não expressam os MRFs, porém, em consequência de um miotrauma, são ativadas, proliferam, se diferenciam e passam a expressar os fatores de regulação miogênica (Seale & Rudnicki, 2000) (figura 8).



**Figura 8** – Regeneração Muscular. (A) Fibra muscular normal com célula satélite quiescente e mionúcleo. Após o dano (miotrauma) da fibra muscular (B), as células satélites quiescentes são ativadas, proliferam-se (C) e, em seguida, diferenciam-se em mioblastos (E). Em ocasião da microlesão adaptativa (miotrauma adaptativo) provocada pelo estímulo do treinamento físico (treinamento resistido), os mioblastos irão migrar para a região danificada e, fundir-se a fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão (hipertrofia) (F), porém, em casos de miotraumas mais severos, os mioblastos se alinham e fundem-se entre si, para formar uma nova miofibrila (G), e reparar o dano da fibra muscular (H). Durante o processo de regeneração, alguns mioblastos retornam ao estado quiescente e restabelecem a população de células satélites para subsequente reparo muscular (D). A fase de ativação das células satélites é caracterizada pela alta expressão de MyoD e Myf5 e na diferenciação dos mioblastos ocorre um aumento na expressão de Miogenina e MRF4 (Azul). Cada estágio do processo de regeneração é mediado por fatores de crescimento, que atuam como reguladores positivos (verde) ou reguladores negativos (vermelho) (Adaptado de Charge & Rudnick, 2004).

O estudo de Psilander et al., (2003), aponta um aumento nos níveis de mRNA para Miogenina, MyoD e MRF4 no músculo vasto lateral (VL) humano, após um único período de treinamento resistido. Segundo estes autores, o aumento na síntese protéica (hipertrofia) observada nos modelos de treinamento contra resistência pode ser resultado de uma melhora transcricional, de uma maior estabilidade nas moléculas de mRNA, de uma maior taxa de tradução, ou a combinação destes processos (Psilander et al., 2003). De modo semelhante, Bickel et al., (2005), mostraram um aumento na expressão de

mRNA para MyoD e miogenina, no músculo VL, após um único período de contração máxima, por meio de estimulação elétrica neuromuscular. Estes trabalhos suportam a idéia de que os MRFs estão envolvidos no processo de hipertrofia e/ou transição dos tipos de fibras.

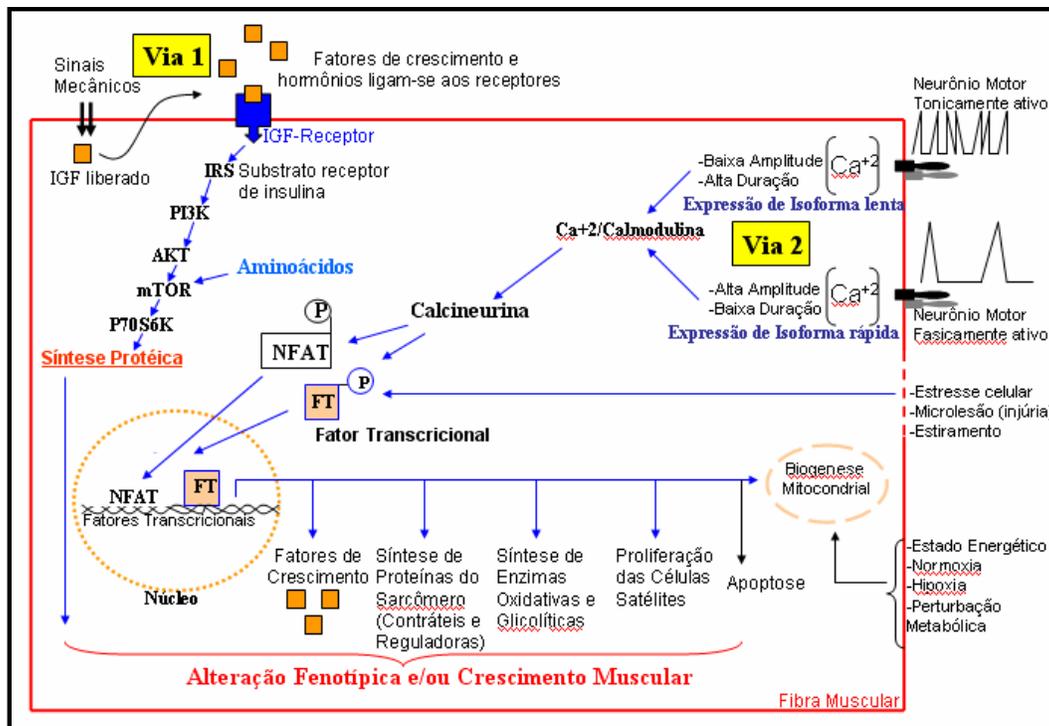
As adaptações fenotípicas musculares observadas em diferentes modelos de treinamento físico são dependentes da força, velocidade e duração dos padrões de contração muscular (Impulso nervoso), cuja magnitude esta associada aos estímulos extrínsecos (carga ou estresse mecânico) e intrínsecos (níveis de cálcio intracelular, hipóxia e o estado redox) (Baar et al., 1999).

Os estímulos específicos (perturbações mecânicas, estiramento, microlesão/injúria e estresse celular), originados de diferentes tipos e protocolos de exercício físico são transduzidos por receptores de superfície celular (moléculas transmembranas), ativando uma “cascata” de moléculas intracelulares (vias moleculares), que integram esta informação (Wackerhage & Woods, 2002), e assim, controlam as mudanças quantitativas e qualitativas no músculo, por meio da ativação ou repressão de genes músculo específicos (Bassel-Duby & Olson, 2006). Dentre as vias moleculares, destaca-se a via da Calcineurina (proteína fosfatase dependente da  $Ca^{+2}$  /Calmodulina) (Dun et al., 1999). Em resposta ao aumento nos níveis de  $Ca^{+2}$  intracelular, a Calcineurina torna-se ativa, e assim, será responsável pela retirada do fosfato ligado ao substrato NFAT (fator nuclear de ativação das células T, nuclear factor of activated T cells), que em condições basais encontra-se no citoplasma (Chin et al., 1998). Após a retirada do fosfato o NFAT é translocado para a região promotora nuclear (DNA) (Rao et al., 1997), onde irá promover ativação de genes que expressam proteínas relacionadas a fibras de contração lenta (metabolismo oxidativo) (Chin et al., 1998; Dupont-versteegden et al., 2002).

Pesquisas recentes apontam à participação de várias outras vias moleculares no controle do fenótipo muscular, incluindo a via das proteínas kinases CaMKs ( $Ca^{+2}$ /calmodulin-dependent protein kinases, proteínas kinase dependentes da  $Ca^{+2}$ /Calmodulina) (Chin, 2005), a via das AMPKs (AMP-activated protein kinase - proteínas kinases ativada pela AMP) (Kemp et al., 2002), a via do NF- $\kappa$ B (nuclear factor Kappa  $\beta$  – fator nuclear kappa  $\beta$ ) (Ma et al., 2001), a via do MEF2 (myocyte enhancer factor 2, fator de aumento do miócito) (Chin, 2005) e os hormônios insulina (Wackerhage & Woods, 2002; Chin, 2005) e IGF-I (insulin-like growth factor, fator de crescimento ligado à insulina) (Tidball, 2005).

Vários estudos fornecem evidências da atuação do IGF-I como um potente sinal anabólico no tecido muscular (Hobler et al., 1998; Barton-Davis et al., 1999; Glass, 2003; Goldspink, 2005). Os sinais mecânicos que atingem as células musculares, como por exemplo, a perturbação mecânica nas fibras musculares, ocasionada pelo processo de contração durante o exercício físico (treinamento resistido), induzem à liberação do IGF, que se liga ao receptor na superfície celular, e, assim, ativa uma “cascata” de eventos intracelulares, através da via (IRS→PI3K→AKT→Mtor→p70<sup>s6k</sup>). O IGF ligado ao receptor irá recrutar o IRS (substrato responsivo a insulina, insulin response substrate), causando a ativação da PI3K (kinase fosfatidil-inositol-3, phosphatidylinositol-3), que adiciona fosfato na AKT (serine-threonine kinase), tornando-a ativa para fosforilar o mTOR (mammalian target of rapamycin), e subsequentemente a p70<sup>s6k</sup> (p70 S6 Kinase), que atua como um potente estimulador da síntese protéica (Glass, 2003; Tidball, 2005).

As diferentes vias de sinalização intracelular são ativadas de acordo com a especificidade das respostas funcionais, na qual múltiplos processos são necessários para regular a expressão de genes específicos, responsáveis pelas alterações das propriedades contráteis e metabólicas das fibras musculares (figura 9).



**Figura 9** – Vias de sinalização intracelular envolvidas nas mudanças fenotípicas do músculo esquelético ao exercício físico. Via (1) Os sinais mecânicos que atingem a fibra muscular, como por exemplo, a perturbação mecânica ocasionada pelo processo de contração durante o exercício físico (treinamento resistido), induz à liberação do IGF, que se liga ao receptor na superfície celular, e, assim, ativa uma “cascata” de eventos intracelulares, através da via IRS→PI3K→AKT→Mtor→p70<sup>s6k</sup>, aumentando a síntese protéica. (2) – Diferentes estímulos, tais como as mudanças na concentração de cálcio relacionada à contração muscular (padrão de atividade do neurônio motor), as perturbações mecânicas (estresse celular), o estiramento, a microlesão/injúria, o estado energético e a hipóxia, podem ativar a calcineurina e outras vias moleculares, que controlam os eventos intracelulares que ativam a expressão de proteínas contráteis, enzimas, fatores de crescimento, proliferação de células satélites, biogênese mitocondrial e apoptose, de acordo com a especificidade da resposta funcional (Adaptado de Tidball, 2005).

## **5. Adaptações Musculares ao Treinamento físico e a Suplementação de Creatina.**

O fenômeno esportivo atual é um conjunto complexo de elementos que envolve atletas, clubes, espectadores, torcidas e patrocinadores, responsáveis diretos pela transformação do esporte em um dos principais negócios do planeta. Neste contexto, o sucesso nos esportes de alto rendimento tem sido vinculado a uma oportunidade de melhora na condição financeira e social dos indivíduos.

Em uma época na qual o sucesso esportivo, individual ou de uma equipe, é politicamente e socialmente resumido a títulos e vitórias, a reflexão sobre o alto rendimento esportivo conduz para a frase “vencer a qualquer custo”. Diante da importância do esporte e da busca constante pela superação dos records, tem sido amplamente investigadas, nas diferentes linhas de pesquisas científicas, as estratégias para controlar e aprimorar os fatores fisiológicos, bioquímicos, psicológicos e nutricionais que podem interferir no rendimento físico do atleta.

Investigações recentes mostram que a intervenção nutricional pode contribuir para as adaptações musculares, necessárias para a melhora do rendimento físico. Nessa linha de investigação, a suplementação de creatina tem sido apontada como um potente adicional ergogênico para o desempenho físico, podendo promover um aumento na área das fibras musculares (Becque et al., 1999; Volek et al., 1999; Moura et al., 2002;) e na performance durante os exercícios breves e de alta intensidade (Casey et al., 1996; Earnest et al., 1997; Brenner et al., 2000; Burke et al., 2000; Casey & Greenhaff, 2000).

A creatina é um composto não-essencial que pode ser obtida da dieta (carne) ou sintetizada de forma endógena, pelo fígado, pâncreas e rins (Walker, 1979; Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Aproximadamente 95% do total de creatina corporal é armazenada no músculo esquelético, na qual 60 a 70% liga-se ao grupo fosfato, para formar a fosfocreatina (PCr), enquanto 30 a 40% permanecem sob a forma de creatina livre (Williams et al., 2000). A PCr é encontrada em maior proporção nas fibras do tipo II, comparada com as fibras do tipo I (Greenhaff et al., 1994). Clark et al., (1996) mostraram que a quantidade de PCr no músculo de contração rápida, tipo II (bíceps) é 31% mais elevada, em relação ao músculo de contração lenta, tipo I (sóleo).

A suplementação de creatina (Cr) promove um aumento da concentração total de creatina intramuscular, armazenada na forma de creatina livre e fosfocreatina (PCr) (Balsom et al., 1994; Hultman et al., 1996; Branon et al., 1997). Os elevados níveis de PCr, que atua como doador de fosfato para o ADP, favorece uma maior

ressíntese e fornecimento de ATP durante os exercícios breves e de alta intensidade (Cordain, 1998), Assim, a creatina pode otimizar a realização de uma única série ou séries repetidas de exercícios, aumentando a intensidade do treinamento físico, e, conseqüentemente, as maiores respostas adaptativas na estrutura (hipertrofia) e função muscular (potência, força, velocidade) (Earnest et al., 1995). Neste contexto, alguns pesquisadores atribuem os efeitos benéficos da creatina, em resposta ao treinamento físico, a maior qualidade nas sessões de treino, pelo aumento dos ajustes de sobrecarga muscular. (Volek & Kraemer, 1996; Kreider et al., 1998; Volek et al., 1999).

Diante dos relatos científicos e populares sobre a utilização deste suplemento, a administração de creatina tornou-se uma prática popular entre os participantes dos diferentes esportes, como também dos mais variados praticantes de atividade física (Harris et al., 1992).

Vários estudos mostram que a suplementação de creatina, associada aos diferentes modelos de treinamento físico, pode provocar um aumento no peso corporal (Greenhaff et al., 1994; Balson et al., 1995; Green et al., 1996; Kreider et al., 1998; Volek et al., 1999; Kutz & Gunter, 2003). Este ganho de peso pode ser atribuído a uma maior retenção de água intramuscular e/ou um aumento das proteínas miofibrilares (hipertrofia das fibras) (Williams & Branch, 1998). Porém, alguns estudos apontam resultados contraditórios (Thompson et al., 1996; Stout et al., 1999).

Ainda que esteja bem estabelecido o efeito ergogênico da creatina na melhora da performance muscular (Izquierdo et al., 2002), novos trabalhos são necessários para elucidar os efeitos e mecanismos, pelos quais a creatina pode influenciar o fenótipo das fibras musculares. Louis et al. (2004) observaram que a adição de creatina em cultura de células C2C12, induz a uma maior hipertrofia miofibrilar, mediada pelo aumento na expressão de mRNA para IGF-I (insulin-like growth factor) e para os fatores de regulação miogênica (Myogenic Regulatory Factors, MRFs). Pesquisas recentes com humanos sugerem que a creatina pode regular a expressão dos MRFs e IGF, envolvidos com a expressão das isoformas de MHCs e hipertrofia das fibras musculares (Willoughby & Rosene, 2003; Deldicque et al., 2005), O IGF-I é um fator de crescimento que atua como um potente sinal anabólico no tecido muscular, estimulando a síntese protéica em diferentes condições fisiológicas (Hobler et al., 1998; Barton-Davis et al., 1999; Glass, 2003; Goldspink, 2005). Os MRFs controlam a expressão de genes músculos específicos durante a miogênese, o crescimento e às adaptações musculares (Seale & Rudnicki, 2000). Estes trabalhos suportam a idéia de que a

creatina, associada ao treinamento físico, pode estar envolvida na ativação dos fatores transcricionais, responsáveis pela expressão de genes músculo específicos, relacionados à hipertrofia e/ou expressão das isoformas de MHCs.

Embora a hipertrofia das fibras musculares esteja associada a uma maior síntese de proteína miofibrilar, Louis et al, (2003), não apontaram qualquer efeito anabólico da creatina, no aumento da síntese protéica. Por outro lado, alguns trabalhos mostraram que a creatina, por si só, pode estimular a síntese protéica muscular, em cultura de mioblastos (Ingwall et al., 1972; Ingwall et al., 1974; Zilber et al., 1975; Ingwall, 1976).

Nesta linha de investigação, são postuladas duas vias de atuação da creatina, por meio da ativação dos fatores transcricionais: A primeira seria uma ação direta da creatina na ativação dos fatores transcricionais, ocasionando um aumento na síntese protéica. A segunda seria uma ação indireta da creatina, pelo aumento da intensidade de treinamento, provocando maiores adaptações musculares e, conseqüentemente, a ativação dos fatores transcricionais.

Em adição, a creatina tem um potencial efeito ergogênico em algumas atividades de alta intensidade, mas não em outras (Hart & Kreider, 2001), como no trabalho de McKenna et al., (1999), que não apontaram diferenças entre os indivíduos suplementados com creatina durante 5 dias (30 g/ dia) e não suplementados (placebo), durante teste intermitente máximo em cicloergômetro. A discrepância entre os estudos pode ser resultado do protocolo de treinamento físico (intensidade x volume), do tempo de treinamento e descanso entre as séries e exercício, do músculo analisado, da dose de creatina e, também, pela especificidade no mecanismo de ação da creatina.

Embora estejam bem relatados os benefícios da creatina na melhora do rendimento físico durante os exercícios breves e de alta intensidade, poucos estudos procuraram elucidar os efeitos da creatina, na presença (CREX) e ausência (CR) do treinamento físico, sobre a modulação das fibras musculares e das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC).

## **6. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da suplementação de creatina associada ao treinamento resistido, sobre a morfologia e a expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo sóleo de ratos.

## II – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA (1993) Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 74:911-915.

Adams GR, McCue SA, Zeng M, Baldwin KM (1999) Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. *Am J Physiol* 276:R954–R961.

Andersen P & Henriksson J (1977) Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 99:123-125.

Andersen L, Tufekovic G, Zebis M, Cramer R, Verlaan G, Kjær M, Suetta C, Magnusson P, Aagaard P (2005) The effect of resistance training combined with timed ingestion of protein on muscle fiber size and muscle strength. *Metabolism* 54(2):151-156.

Baar K & Esser KA (1999) Phosphorylation of p70S6k correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 276:C120–C127.

Bacurau RF, Navarro F, Uchida MC, Rosa LFC (2001) Hipertrofia hiperplasia: fisiologia, nutrição e treinamento do crescimento muscular. 1ed São Paulo: Phorte. 242p.

Balsom PD, Soderlund K, Ekblom B (1994) Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med* 18:268-280.

Balsom P, Soderlund K, Sjodin B, Hultman E (1995) Skeletal muscle metabolism during short duration high-intensity exercise: influence of creatine supplementation. *Acta Physiol Scand* 154:303–310.

Barany M (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50:197-218.

Barton-Davis ER, Shoturna DI, Sweeney HL (1999) Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 167(4):301-305.

Bassel-Duby R & Olson EN (2006) Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annu. Rev. Biochem* 75:19-37.

Becque MD, Lochmann JD, Melrose DR (1999) Effects of oral creatine supplementation on muscular strength and body composition. *Med Sci Sports Exerc* 32:654–658.

Bickel CS, Slade J, Mahoney ED, Haddad D, Dudley A, Adams GR (2005) Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol* 98:482–488.

Biral D, Betto R, Danieli-Betto D, Salviati G (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem J* 250:307-308.

Bischoff R (1994) The satellite cell and muscle regeneration. In: *Myology*, edited by Engel AG & Frazini-Armstrong C. New York: McGraw-Hill p.97-118.

Brannon TA, Adams GR, Conniff CL, Baldwin KM (1997) Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 29:489–495.

Brenner M, Rankin JK, Sebolt D (2000) The effect of creatine supplementation during resistance training in women. *J Strength Cond Res* 14(2):207-213.

Brooke MH & Kaiser KK (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 18:670-672.

Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM (1960) Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J Physiol (Lond)* 150:417–439.

Burke DG, Silver S, Holt LE, Smith Palmer T, Culligan CJ, Chilibeck PD (2000) The effect of continuous low dose creatine supplementation on force, power, and total work *Int J Sport Nutr* 10(3):235-244.

Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM (1992) Response of slow and fast muscle to hypothyroidism - maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol* 263:C86–C94.

Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, Herrick RE, Prietto N, Baldwin KM (1996) Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle *J Appl Physiol* 81:123-132.

Campion DR, Richardson RL, Reagan JO, Kraeling RR (1981) Changes in the satellite cell population during postnatal growth of pig skeletal muscle. *J Anim Sci* 52:1014-1018.

Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88:50–60.

Carroll TJ, Abernethy PJ, Logan PA, Barber M, McEniery MT (1998) Resistance training frequency: strength and myosin heavy chain responses to two and three bouts per week. *Eur J Appl Physiol* 78:270-275

Casey A, Constantin-Teodosiu D, Howell S, Hultman E, Greenhaff PL (1996) Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans *Am J Physiol* 271:E31-E37.

Casey A & Greenhaff PL (2000) Does dietary creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance? *Am J Clinical Nutrition* 72(2):607S - 617S.

Chargé SBP & Rudnick MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84:209-238.

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12:2499-2509.

Chin ER (2005) Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol* 99:414-423.

Clark JF, Conway MA, Clarck JF (1996) Uses of creatine phosphate and creatine supplementation for the athlete. In: Creatine and creatine phosphate: scientific and clinical perspectives. San Diego: Academic Press. p217-226.

Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ (2000) MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol* 224(2):122-137.

Cordain L (1998) Does creatine supplementation enhance athletic performance? *J Am Coll Nutr* 17:205-206.

Costill DL, Daniels J, Evans w, Fink W, Krahenbuhl G, Saltin B (1976) Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J Appl Physiol* 40(2):149-154.

D' Antona G, Lanfranconi F, Pellegrino MA, Brocca L, Adami R, Rossi R, Moro G, Miotti D, Canepari M, Bottinelli R (2006) Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders. *J Physiol* 570(3):611-627.

Dal Pai-Silva M, Dal Pai V, Carvalho RF (2005) Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (Eds) Células: uma abordagem multidisciplinar. Editora Manole, São Paulo: p83-94

Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60:733–746.

Deasy BM, Jankowski RJ, Huard J (2001) Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells. Molecules, and Diseases* 27(5):924-933.

Deldicque L, Louis M, Theisen D, Nielsen H, Dehoux M, Thissen JP, Rennie MJ, Francaux M (2005) Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 37(5):731-736.

Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, Coombes JS (1999) Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship *Am Physiol Soc* 86:1002-1008.

Dubowitz V & Pearse AG (1960) A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Histochem cell biol* 2:105-117.

Dudley GA, Abraham WA, Terjung RL (1982) Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 53:844–850.

Dunn SE, Burns JL, Michel RN (1999) Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 274:21908-21912.

Dupont-Versteegden EE, Knox M, Gurley CM, Houle JD, Peterson CA (2002) Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin–NFAT pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1387–C1395.

Earnest C, Snell PG, Rodriguez AL, Almada AL, Mittleman K (1995) The effect of creatine monohydrate ingestion on anaerobic power indices, muscular strength and body composition. *Acta Physiol Scand* 153:207-209.

Earnest CP, Almada AL, Mitchell TL (1997) Effects of creatine monohydrate ingestion on intermediate duration anaerobic treadmill running to exhaustion. *J Strength Cond Res* 11:234–8.

Elliott A & Offer G (1978) Shape and flexibility of the myosin molecule. *J Mol Biol* 123(4):505-519.

Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ (2001) Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity *The Journal of Experimental Biology* 204, 3201-3208.

Fluck M & Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:160-161.

Frontera WR, Hughes VR, Lutz KJ, Evans WJ (1991) A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 75-yr-old men and women *J Appl Physiol* 71: 644–650.

Galvão DA & Taaffe DR (2005) Resistance Exercise Dosage in Older Adults: Single-Versus Multiset Effects on Physical Performance and Body Composition. *J Am Geriatr Soc* 53(12):2090–2097.

Galvao DA & Taaffe DR (2004) Single- vs. multiple-set resistance training: recent developments in the controversy. *J Strength Cond Res* 18(3):660-667.

Gamble HJ, Fenton J, Allsopp G (1978) Electron microscope observations on human fetal striated muscle. *J Anat* 126(3):567-589.

Gibson MC & Schultz E (1982) The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec* 202(3):329-337.

Glass DL (2003) Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trend Mol med* 9(8):344-350.

Goldspink G (2005) Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology* 20:232-238.

Green AL, Hultman E, MacDonald IA, Sewell DA, Greenhaff PL (1996) Carbohydrate feeding augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. *Am J Physiol* 271:E821-E826.

Green H, Goreham C, Ouyang J, Ball-Burnett M, Ranney D (1999) Regulation of fiber size, oxidative potential, and capillarization in human muscle by resistance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276:R591-R596.

Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Casey A, Hultman E (1994) The effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle ATP degradation during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. (Abstract). *J Physiol* 476:484P.

Greenhaff PL, Boldin K, Söderlund K, Hultman E (1994) Effects of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. *Am J Physiol* 266:E725-E730.

Gutmann E, Melichna J, Syrový I (1972) Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. *Exp Neurol* 36:488-497.

Haddad F & Adams GR (2002) Exercise Effects on Muscle Insulin Signaling and Action Selected Contribution: Acute cellular and molecular responses to resistance exercise. *J Appl Physiol* 93:394-403.

Hamalainen N & Pette D (1993) The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, ID, and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat, and Rabbit. *J Histochem Cytochem* 41(5):733-743.

Harber MP, Gallagher PM, Trautmann J, Trappe SW (2002) Myosin heavy chain composition of single muscle fibers in male distance runners. *Int J Sports Med* 23(7):484-488.

Harber MP, Fry AC, Rubin MR, Smith JC, Weiss LW (2004) Skeletal muscle and hormonal adaptations to circuit weight training in untrained men. *Scand J Med Sci Sports* 14:176–185.

Harris RC, Söderlund K, Hultman E (1992) Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci* 83:367-374.

Hart LE & Kreider, RB (2001) Creatine for Enhancement of High-Intensity Performance. *Clin J Sport Med* 11(4):282.

Hartley RS, Bandman E, Yablonka-Reuveni Z (1992) Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis. *Dev Biol* 153(2):206-216.

Hass CJ, Garzarella L, De Hoyos D, Pollock ML (2000) Single versus multiple sets in long-term recreational weightlifters. *Med Sci Sports Exerc* 32(1):235-242.

Hawke TJ & Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 9(2):534-551.

Hawley JA (2002) Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pham Physiol* 29:218-222.

Hilber K & Galler S (1997) Mechanical properties and myosin heavy chain isoform composition of skinned skeletal muscle fibres from a human biopsy sample. *Pflugers Arch* 434(5):551-558.

Hobler SC, Williams AB, Fischer JE, Hasselgren PO (1998) IGF-I stimulates protein synthesis but does not inhibit protein breakdown in muscle from septic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274:571-576.

Hultman E, Soderlund K, Timmons JA, Cederblad G, Greenhaff PL (1996) Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* 81:232-237.

Huxley HE (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science* 164(886):1356-1365.

Huxley HE (1971) Structural changes during muscle contraction. *Biochem J* 125(4):85P.

Ingwall JS, Morales MF, Stockdale FE (1972) Creatine and the Control of Myosin Synthesis in Differentiating Skeletal Muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2250-2253.

Ingwall JS, Weiner CD, Morales MF, Davis E and Stockdale FE (1974) Specificity of creatine in the control of muscle protein synthesis. *J Cell Biol* 62:145–151.

Ingwall JS (1976) Creatine and the control of muscle-specific protein synthesis in cardiac and skeletal muscle. *Circ Res* 38(5 Suppl 1):I115-I123.

Izquierdo M, Ibanez J, Gonzalez-Badillo JJ, Gorostiaga EM (2002) Effects of creatine supplementation on muscle power, endurance, and sprint performance. *Med Sci Sports Exerc* 34:332-343.

Jurimae J, Abernethy PJ, Blake K, McEniery MT (1996) Changes in the myosin heavy chain isoform profile of the triceps brachii muscle following 12 weeks of resistance training. *Eur J Appl Physiol* 74:287-292.

Kemmler WK, Lauber D, Engelke K, Weineck J (2004) Effects of single- vs. multiple-set resistance training on maximum strength and body composition in trained postmenopausal women. *J Strength Cond Res* 18(4):689–694.

Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, Van Denderen B, Jennings IG, Iseli T, Michell BJ, Witters LA (2003) AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* 31(1):162-168.

Klitgaard H, Mannoni M, Schiaffino S, Ausoni S, Gorza L, Laurent-Winter C, Schnohr P, Saltin, B (1990) Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men male with different training backgrounds. *Acta Physiol. Scand.* 140: 41–54.

Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, Fleck SJ, Franklin B, Fry AC, Hoffman JR, Newton RU, Potteiger J, Stone MH, Kraus W, Torgan CE, Ratamess NA, Triplett-McBride (2002) American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 34:364-380.

Kraus WE, Torgan CE, Taylor DA (1994) Skeletal muscle adaptation to chronic low-frequency motor nerve stimulation. *Exerc Sport Sci Rev* 22:313–360.

Kreider RB, Ferreira M, Wilson M, Grinstaff P, Plisk S, Reinardy J, Cantler E, Almada AL (1998) Effects of creatine supplementation body composition, strength, and sprint performance. *Med Sci Sports Exerc* 30(1):71-82.

Kutz MR & Gunter MJ (2003) Creatine monohydrate supplementation on body weight and percent body fat. *J Strength Cond Res* 17:817–821.

Louis M, Poortmans JR, Francaux M, Berre J, Boisseau N, Brassine E, Cuthbertson D, Smith K, Babraj JA, Waddell T, and Rennie M (2003) No effect of creatine supplementation on human myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis after resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1089–E1094.

Louis M, Van Beneden R, Dehoux M, Thissen JP, Francaux M (2004) Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory factor mRNA in C2C12 cells. *FEBS Lett.* 557:243–247.

Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H (1969) Substructure of the myosin molecule.I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 42(1):1-29.

Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S (2001) Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *American Journal of Physiology* 281:E1128-E1136.

Magaudda L, Mauro DD, Trimarchi F, Anastasi G (2004) Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14(1):17-21.

Mauro A (1961) Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-495.

McCall GE, Byrnes WC, Dickinson A, Pattany PM, Fleck SJ (1996) Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *J Appl Physiol* 81:2004–2012.

McComas AJ (1996) Skeletal Muscle: Form and Function. *Champaign, III: Human Kinetics*.

McKenna MJ, Morton J, Selig SE, Snow RJ (1999) Creatine supplementation increases muscle total creatine but not maximal intermittent exercise performance. *J Appl Physiol* 87(6):2244–2252.

Michal J, Xiang Z, Davenport G, Hayek M, Dodson MV, Byrne KM (2002) Isolation and characterization of canine satellite cells. *Vitro Cell Dev Biol Anim* 38(8):467-80.

Morgan JE & Partridge TA (2003) Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35(8):1151–1156.

Moura IMW, Dos Santos FF, Moura JAA, Curi R, Fernandes LC (2002) Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional área in skeletal muscle fibers of wistar rats after swimming training. *J Sports Sci and Med* (1):87-95.

Muir AR, Kanji AH, Allbrook D (1965) The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat* 99:435-444.

Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.

O'Neill DS, Zheng D, Anderson WK, Dohm GL, Houmard JA (1999) Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 276:414-419.

Ogata TA (1958) Histochemical studies on red and white muscle fibres. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. *Acta Med Okayama* 12:233-240.

Parcell AC, Sawyer RD, Poole RC (2003) Single muscle fiber myosin heavy chain distribution in elite female track athletes. *Med Sci Sports Exerc* 35(3):434-438.

Peter JB, Barnard VR, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscles in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11:2627-2633.

Pette D & Staron RS (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 170:143-223.

Pette D, Peuker H, Staron RS (1999) The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol Scand* 166:261-278.

Pette D & Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509.

Pette D & Staron RS (2001) Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem cell biol* 115:359-372.

Powers SK & Howley ET (2000) Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3 ed. São Paulo: Manole, 527 p.

Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Ji LL, Herb RA, Dudley G (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 266:R375-R380.

Psilander N, Damsgaard R, Pilegaard H (2003) Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 95:1038–1044.

Putman CT, Xu X, Gillies E, Maclean IM, Bell GJ (2004) Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. *Eur J Appl Physiol* 92:376–384.

Ranvier L (1873) Properties et structures differents des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *CR Hebd Seances Acad Sci* 7:2062-2072.

Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707–747.

Reiser PJ, Moss RL, Giulian GC, Greaser ML (1985) Shortening velocity in single fibres from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J Biol Chem* 260:9097–9080.

Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR (1999) Interrelationships of myofibrillar ATPase activity and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 111:277–287.

Salmons S & Vrbova' G (1969) The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J Physiol* 201:535–549.

Schiaffino S & Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77(2):493–501.

Schmalbruch H & Hellhammer U (1977) The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec* 189(2):169-175.

Schmidt K, Glaser G, Wernig A, Wegner M, Rosorius O (2003) Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 278(32):29769-29775.

Schultz E & McCormick KM (1994) Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123:213-57.

Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* 81(11):1810-1816.

Seale P & Rudnicki MA (2000) A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Exp Biol* 218:115-124.

Sharman MJ, Newton RU, Triplett-McBride T, McGuigan MRM, McBride JM, Hakkinen A, Hakkinen K, Kraemer WJ (2001) Changes in myosin heavy chain composition with heavy resistance training in 60-to 75-year old men and women. *Eur J Appl Physiol* 84:127-132.

Simoneau J-A & Pette D (1988) Species-specific effects of chronic nerve stimulation upon tibialis anterior muscle in mouse, rat, guinea pig, and rabbit. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 412:86-92.

Simoneau J-A & Bouchard C (1995) Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *Faseb J* 9:1091-1095.

Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Always, SE (2004) Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. *J Appl Physiol* 97:277-285.

Smerdu V, Karsch-Mizrachi L, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S (1994) Type Iix myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol* 267:C1723-C1728.

Snow MH (1977) The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res* 185(3):399-408.

Spangenburg EE, Chakravarthy MV, Booth FW (2002) p27Kip1: a key regulator of skeletal muscle satellite cell proliferation. *Clin Orthop* (403):S221-S227.

Staron RS, Hikida RS, Hagerman FC, Dudley GA, Murray TF (1984) Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. *J Histochem Cytochem* 32(2):146-152.

Staron RS, Malicky ES, Leonardi MJ, Falkel JE, Hagerman FC, Dudley GA (1990) Muscle hypertrophy and fast fiber type conversions in heavy resistance-trained women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1990;60(1):71-9.

Staron RS & Hikida RS (1992) Histochemical, biochemical, and ultrastructural analyses of single human muscle fibers, with special reference to the C-fiber population. *J Histochem Cytochem* 40(4):563-568.

Staron RS, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, Hagerman FC, Hikida RS (1994) Skeletal muscle adaptation during the early phase of heavy resistance training in men and women. *J Appl Physiol* 76: 1247–1255.

Staron RS (1997) Human skeletal muscle fiber types : delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol* 22:307-327.

Stone J, Brannon T, Haddad F, Oin A, Bldwin KM (1996) Adaptive responses of hypertrophying skeletal muscle to endurance training. *J Appl Physiol* 81(2):665-672.

Stout, J.R., Echerson, J., Noonan, D., Moore, G. and Cullen, D (1999) Effects of creatine supplementation on exercise performance and fat free weight in football players during training. *Nutritional Research* 19:217-225.

Sullivan VK, Powers SK, Criswell DS, Tumer N, Larochelle JS, Lowenthal D (1995) Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. *J Appl Physiol* 78(6):2115-2120.

Talmadge RJ & Roy RR (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75(5): 2337-2340.

Thayer R, Collins J, Noble EG, Taylor AW (2000) A decade of aerobic endurance training: histological evidence for fibre type transformation. *J Sports Med Phys Fitness* 40(4):284-289.

Thompson CH, Kemp GJ, Sanderson AL, Dixon RM, Styles P, Taylor DJ, Radda GK (1996) Effect of creatine on aerobic and anaerobic metabolism in skeletal muscle in swimmers. *J Sports Med* 30:222–225.

Tidball JG (2005) Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol* 98:1900-1908.

Trappe SW, Costill DL, Fink WJ, Pearson DR (1995) Skeletal muscle characteristics among distance runners: a 20-years follow-up study. *J Appl Physiol* 78(3):823-829.

Trappe S, Harber M, Creer A, Gallagher P, Slivka D, Minchev K, Whitsett (2006) Single muscle fiber adaptations with marathon training. *J Appl Physiol* 101:721-727.

Volek JS & Kraemer WJ (1996) Creatine supplementation: Its effects on human muscular performance and body composition. *J Strength Con Res* 10(3):200-210.

Volek JS, Duncan ND, Mazzetti SA., Staron RS, Putukian M, Gómez AL, Pearson DR, Fink WJ, Kraemer WJ (1999) Performance and muscle fibre adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. *Med Sci Sports and Exerc* 31:1147–1156.

Wackerhage H & Woods NM (2002) Exercise-induced signal transduction and gene regulation in skeletal muscle. *J Sports Science and medicine* 1:103-114.

Walker J (1979) Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzym* 50:117–242.

Weeds AG & Lowey S (1971) Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J Mol Biol* 3:379-421.

Widrick JJ, Stelzer JE, Shoepe TC, Garner DP (2002) Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (283):R408–R416.

Williams MH & Branch JD (1998) Creatine supplementation and exercise performance: an update. *J Am Coll Nutr* 17: 216–234.

Williams MH, Kreider R, Branch JD (2000) *Creatina*. 1 ed. São Paulo: Manole.

Williamson DL, Godard MP, Porter DA, Costill DL, Trappe, SW (2000) Progressive resistance training reduces myosin heavy chain co-expression in single muscle fibers from older men. *J Appl. Physiol* 88: 627-633.

Williamson DL, Gallagher PM, Carroll CC, Raue U, Trappe SW (2001) Reduction in hybrid single muscle fiber proportions with resistance training in humans. *J Appl Physiol* 91:1955-1961.

Willoughby DS & Rosene JM (2003) Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. *Med Sci Sports Exerc* 35(6):923-929.

Wilmore JH & Costill DL (2001) *Fisiologia do esporte e do exercício*. 2 ed. São Paulo: Manole, 709 p.

Wokke JH, Van den Oord CJ, Leppink GJ, Jennekens FG (1989) Perisynaptic satellite cells in human external intercostal muscle: a quantitative and qualitative study. *Anat Rec* 223(2):174-80.

Wyss M & Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107–1213.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z (2006) The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold *J Histochem Cytochem* 54(11):1177-1191.

Zilber ML, Litvinova VN, Morozov VI, Pliskin AV, Pshendin AI, Rogozkin VA (1975) The creatine effect on RNA and protein synthesis in growing culture of chick embryo myoblasts. *Biokhimiia* 40(4):854-60.

### III - CAPÍTULO

#### **Efeitos do treinamento resistido e da suplementação de creatina sobre a morfologia e a expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo estriado esquelético de ratos Wistar**

Andreo Fernando Aguiar <sup>1</sup>, Danilo Henrique Aguiar <sup>1</sup>, Alan Dantas Santos Felisberto <sup>1</sup>, Fernanda Regina Carani <sup>1</sup>, Rachel Colauto Milanezi <sup>1</sup> e Maeli Dal Pai Silva <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu, 18618-000, São Paulo, Brazil

#### **RESUMO**

**Objetivo:** Este estudo avaliou os possíveis efeitos do treinamento resistido e da suplementação de creatina sobre a morfologia e a expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo estriado esquelético de ratos. **Métodos:** Ratos wistar machos (2 a 3 meses de idade, 250 a 300 g) foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: não-treinados sem a suplementação de creatina (CO, n=8); não-treinados com a suplementação de creatina (CR, n= 8); treinados sem a suplementação de creatina (EX, n= 08); e treinados com a suplementação de creatina (CREX, n= 08). Os grupos EX e CREX foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido de 30 dias, na qual foram realizadas sessões de saltos em uma cuba contendo água à 30°C e 38 cm de profundidade, com intervalos de 40 segundos entre as séries. A sobrecarga de treinamento foi ajustada por meio de um colete acoplado na região torácica do animal, sendo equivalente a 50% do peso corporal, durante a fase de adaptação ao meio líquido (1° ao 5° dia), 60% nos dias subsequentes (6° ao 25°), e 70% na fase final do treinamento físico (26° ao 30°). Os grupos CR e CREX foram suplementados com creatina (0,5 g/kg peso corporal) durante todo o período de treinamento físico, administrada via oral (gavage). Ao final do experimento, os animais foram pesados e sacrificados, o músculo sóleo foi retirado e os fragmentos musculares foram congelados em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido a -156°C. Cortes histológicos (10 µm) foram submetidos à reação da ATPase miofibrilar (mATPase) (pH 4,4), para a identificação dos tipos de fibras musculares (I, IC, IIC e IIA). Foi calculada a área de secção transversal (AST) dos tipos de fibras (200 fibras/ animal), utilizando-se um

analisador de imagens Leica Qwin. A expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) foi analisada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

**Resultados:** Todos os grupos ganharam peso do início ao final do experimento, mas não houve diferença estatística entre eles. Os valores do consumo de ração diário de cada animal (CRA) e o consumo de ração total diário dos grupos (CRT) experimentais não foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Não houve diferença significativa na retenção hídrica intramuscular e na AST das fibras I, IC, IIC e IIA entre os grupos. O grupo CR apresentou um aumento significativo no percentual da MHCI e redução no percentual da MHCII, comparado ao CO. O grupo EX aumentou o percentual de MHCII e reduziu a MHCI, em relação ao CO. Por outro lado, o grupo CREX não apresentou alterações no percentual de miosinas.

**Conclusão:** A suplementação de creatina associada ao treinamento resistido não afetou a proporção das isoformas de miosinas. Porém, a creatina isolada promoveu um efeito antagônico ao treinamento resistido na modulação das isoformas de MHCs. Para a creatina ser efetiva na hipertrofia muscular, precisa ser incorporada ao regime de treinamento, sendo dependente dos ajustes de sobrecarga (intensidade), nas sessões subsequentes de treinamento.

## **Effects of the resistance training and creatine supplementation on the morphology and myosin heavy chain (MHC) expression in the skeletal muscle of Wistar rats**

### **ABSTRACT**

**Objective:** This study evaluated the possible effect of resistance training and creatine supplementation on the morphology and myosin heavy chain (MHC) expression in the skeletal muscle of rats. **Methods:** Male Wistar rats (2-3 months old, 250-300 g) were divided into four groups: Not trained without creatine supplementation (CO; n=8), Not trained with creatine supplementation (CR; n=8), Trained without creatine supplementation (EX; n=8), and Trained with creatine supplementation (CREX; n=8). EX and CREX were submitted to a 30 day resistance training protocol. This involved individual training sessions where animals performed 04 sets of 10 jumps in a 38cm deep vat of water, at ~30°C with 40s rest intervals between each set. Training overload was accomplished with a vest attached to the animal's thorax equivalent to 50% body weight during liquid adaptation phase (1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> day), 60% in the intermediate (6<sup>th</sup> to 25<sup>th</sup>), and 70% in the final physical training phase (26<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup>). CR and CREX rats were given 0.5g/Kg body weight creatine orally for each training period by gavage. At the end of training animals were weighed, sacrificed, and the soleus muscle was removed and immersed in n-Hexane cooled in liquid nitrogen (-156 °C). Histological sections (10 µm) were submitted to myofibril ATPase reaction (mATPase) (pH 4.4) to identify muscle fiber types (I, IC, IIC, and IIA). Cross-section area (CSA) of each fiber type was calculated (200fibers/animal) using a Leica Qwin image analyzer. MHC expression was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Results:** All groups showed statistically similar body weight gains throughout the experiment. Daily animal food consumption (CRA) and group total food consumption (CRT) were not statistically different between groups. There was no significant difference between groups for intramuscular water retention or AST for I, IC, IIC, and IIA fibers. CR presented a significant increase in MHC I% and reduction in MHC II% compared with CO. The EX group increased MHC II% and reduced MHC I% compared to CO. However CREX did not present alterations in myosin percentages. **Conclusion:** Creatine supplementation associated with resistance training did not affect the proportion of myosin isoforms. However isolated creatine promoted an antagonistic effect to resistance training by MHC isoform modulation. For creatine to be effective in

muscle hypertrophy, it needs to be incorporated into the training regimen, being dependent on overload adjustments (intensity), in subsequent training sessions.

## INTRODUÇÃO

A especificidade na expressão das isoformas de miosinas de cadeia pesada (MHC) nos tipos de fibras, revela uma ampla diversidade estrutural, funcional e metabólica do músculo estriado esquelético (Pette & Staron, 2000).

Baseando-se no padrão de expressão das isoformas de MHC as fibras musculares podem ser classificadas em puras, expressando uma única isoforma de MHC (Tipo I, expressando MHCI; Tipo IIA, MHCIIa; Tipo IID, MHCIIId e Tipo IIB, MHCIIb) e fibras híbridas, expressando duas ou mais isoformas de MHC (Tipo IC, MHCI > MHCIIa; tipo IIC, MHCIIa > MHCI; tipo IIAD, MHCIIa > MHCIIId; tipo IIDA, MHCIIId > MHCIIa; tipo IIDB, MHCIIId > MHCIIb; e tipo IIBD, MHC IIb > MyHCIIId). A organização sequencial das fibras puras, as quais são intermediadas por fibras híbridas, constitui um contínuo de fibras lentas em direção as fibras rápidas (I ↔ IC ↔ IIC ↔ IIA ↔ IIAD ↔ IID ↔ IIDB ↔ IIB) (Pette & Staron, 2000).

Contudo, as fibras musculares exibem uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, como resposta a estímulos específicos (Pette & Staron, 2000; Magaudda et al., 2004). Vários estudos mostram que os diferentes modelos de treinamento físico podem provocar ajustes específicos no fenótipo das fibras musculares, alterando as propriedades morfofuncionais do músculo (Green et al., 1999; Sharman et al., 2001).

Investigações recentes mostram que a intervenção nutricional, associada ao treinamento físico, também pode contribuir para as adaptações fenotípicas das fibras musculares, necessárias para a melhora do rendimento físico. Nessa linha de investigação, a suplementação de creatina tem sido apontada como um potente adicional ergogênico para o desempenho físico, podendo promover um aumento na área das fibras musculares (Becque et al., 1999; Volek et al., 1999; Moura et al., 2002;) e na performance durante os exercícios breves e de alta intensidade (Casey et al., 1996; Earnest et al., 1997; Brenner et al., 2000; Burke et al., 2000; Casey & Greenhaff, 2000).

A suplementação de creatina (Cr) aumenta a concentração total de creatina intramuscular, armazenada na forma de creatina livre e fosfocreatina (PCr) (Balsom et al., 1994; Hultman et al., 1996; Branon et al., 1997; Williams & Branch, 1998). Esses níveis favorecem o aumento das reservas de fosfato de alta energia, para suportar as altas demandas de ATP, durante os exercícios de alta intensidade (McBride & Gregory, 2002). Assim, os efeitos benéficos da creatina no aumento da força, da potência

(Rawson & Volek, 2003; Volek & Rawson, 2004) e da área das fibras musculares (Becque et al., 1999; Volek et al., 1999; Moura et al., 2002;) tem sido associados a uma melhora na capacidade de trabalho muscular (Kirksey et al., 1999), pelo aumento da resistência à fadiga. Deste modo, a creatina pode contribuir para um aumento no volume de treinamento durante uma única série ou séries repetidas de exercício, favorecendo um maior estímulo para o aumento da massa e força muscular (McBride & Gregory, 2002). No entanto, para a creatina ser efetiva precisa ser incorporada ao regime de treinamento, sendo dependente dos ajustes de sobrecarga nas sessões subsequentes de treinamento (Young & Young, 2007).

Em adição, vários estudos mostram que a suplementação de creatina, associada a diferentes modelos de treinamento físico, pode provocar um aumento no peso corporal (Greenhaff et al., 1994; Balson et al., 1995; Green et al., 1996; Kreider et al., 1998; Volek et al., 1999; Kutz & Gunter, 2003). Este ganho de peso pode ser atribuído a uma maior retenção de água intramuscular e/ou um aumento das proteínas miofibrilares (hipertrofia das fibras) (Williams & Branch, 1998). Porém, alguns estudos apontam resultados contraditórios (Thompson et al., 1996; Stout et al., 1999).

Embora esteja bem estabelecido o efeito da creatina como um estímulo ergogênico adicional ao treinamento físico, a sua ação isolada ou associada ao treinamento com sobrecargas fixas, sobre o músculo estriado esquelético, permanece pouco esclarecida.

No presente estudo, investigamos os possíveis efeitos da suplementação de creatina e do treinamento resistido, sobre a morfologia e a expressão das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo sóleo de ratos Wistar.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais e grupos experimentais*

Foram utilizados 32 ratos Wistar machos (80 dias de idade, 250 a 300 g), provenientes do Biotério central da UNESP, Campus de Botucatu, SP. Os animais foram transferidos para o Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia e mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e ciclo de luminosidade claro/escuro (12/12h), com ração e água *ad libitum*.

Os ratos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: não-treinados sem a suplementação de creatina (CO, n=8); não-treinados com a suplementação de creatina (CR, n= 8); treinados sem a suplementação de creatina (EX, n= 08); e treinados com a suplementação de creatina (CREX, n= 08).

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Protocolo N° 017/06-CEEA.

### *Suplementação de creatina*

Os animais dos grupos CR e CREX foram suplementados, diariamente, com creatina monoidratada (Sigma, C-3630), tendo a água como veículo, administrada via gavagem. Os grupos CO e EX receberam somente a água via gavagem. A suplementação de creatina teve início cinco dias precedente ao período de treinamento físico e permaneceu até o final do experimento (30 dias). Os animais foram pesados diariamente para a preparação da solução de creatina, e a dose de creatina consumida por cada animal foi de 0,5 g/Kg peso corporal (McBride & Gregory, 2002), que excede a quantidade necessária para elevar os níveis de creatina muscular em humanos (Greenhaff, 1995)

### *Protocolo de treinamento*

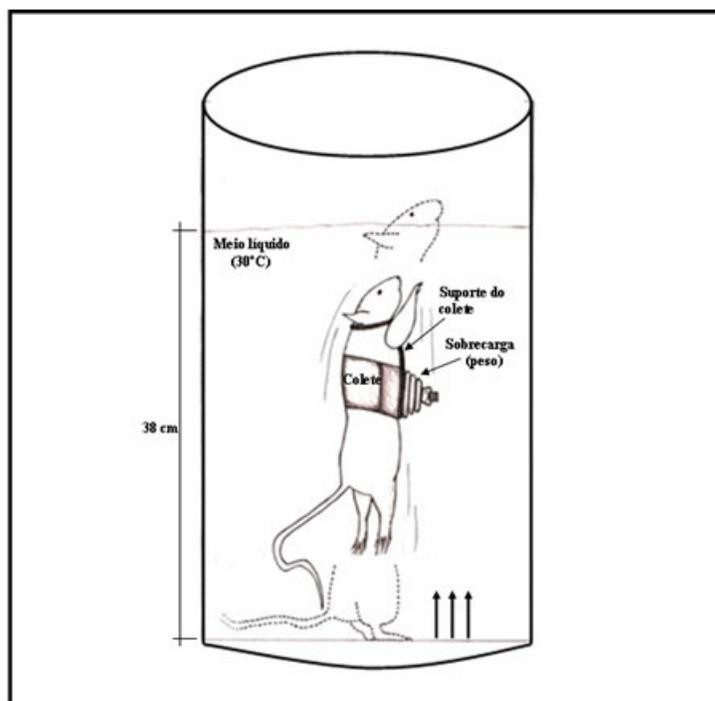
Os animais dos grupos EX e CREX foram submetidos a um programa de treinamento físico de 30 dias (Tabela I). O protocolo de treinamento físico foi similar ao descrito por Cunha et al., 2005. Os animais realizaram, individualmente, sessões de saltos em uma cuba contendo água à  $30^{\circ}\text{C}$  e 38 cm de profundidade, com um peso extra

de sobrecarga (Figura 1). A profundidade foi adequada para permitir a respiração do animal na superfície da água, durante os saltos sucessivos.

Inicialmente, os animais tiveram um período de adaptação ao meio líquido, do 1º ao 5º dia, com número crescente de séries e saltos. Em seguida, iniciaram o período de treinamento físico, que consistiu de 25 sessões de saltos (6º ao 30º dia), cinco dias consecutivos por semana (2ª a 6ª feira). Em cada sessão foram realizadas 4 séries de 10 saltos, com intervalos de 40 segundos entre as séries. A sobrecarga de treinamento foi ajustada por meio de um colete acoplado na região torácica do animal, sendo equivalente a 50% do peso corporal, durante a fase de adaptação ao meio líquido (1º ao 5º dia), 60% nos dias subsequentes (6º ao 25º) e 70% na fase final do treinamento físico (26º ao 30º) (Tabela I). Os animais saltavam até a superfície da água para respirar, não necessitando de qualquer estímulo direto para concluírem as sessões de saltos. A contagem de cada salto era realizada quando o animal atingia a superfície da água e retornava ao fundo da cuba, realizando continuamente este movimento, de acordo com o número de saltos e séries de cada fase do treinamento. O treinamento foi aplicado sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16 horas. Os animais dos grupos não-treinados foram mantidos sem treinamento físico.

**Tabela I** – Programa de treinamento físico utilizado no experimento.

<b>Dia</b>	<b>Séries / Saltos</b>	<b>Sobrecarga (% Peso corporal)</b>
1º	2 x 5	50%
2º	3 x 5	50%
3º	4 x 5	50%
4º	4 x 7	50%
5º	4 x 9	50%
6º ao 15º	4 x 10	60%
16º ao 25º	4 x 10	60%
26º ao 30º	4 x 10	70%



**Figura 1** – Figura representativa do equipamento utilizado no treinamento físico.

### ***Dados Anatômicos***

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg, i.p) e sacrificados por decapitação. O músculo soleo (SOL) direito foi retirado e pesado. Foi calculado o peso do músculo sóleo (Psol), que foi normalizado pelo comprimento da tíbia (Rel Psol/T) e o pelo peso corporal (Rel Psol/P). Para o cálculo da retenção hídrica muscular foi utilizada a relação entre o peso úmido e peso seco (Rel Pu/Ps) de uma fração da porção média do músculo, pesada antes e após 48 h de desidratação à 80°C.

### ***Análise Morfológica***

Após a retirada do músculo sóleo (SOL), a porção média foi separada e imediatamente congelada em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido a -156°C. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise. Cortes histológicos (10 µm) foram obtidos em um criostato a -20°C; algumas lâminas foram submetidas à coloração HE para a análise da morfologia geral das fibras musculares e

outras utilizadas para a análise histoquímica da mATPase (miofibrillar adenosine triphosphatase), após pré incubação em pH 4,4 (Staron et al., 1999). Foram identificados 4 tipos de fibras musculares (I, IC, IIC e IIA).

Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (Leika Qwin), foi determinada a frequência dos tipos de fibras (I, IC, IIC e IIA) e mensurada a área de secção transversal de aproximadamente 200 fibras (cinco campos aleatórios) por animal no músculo estudado.

### ***Análise Bioquímica***

A análise bioquímica das miosinas de cadeia pesada (MHC) foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram coletados 8 cortes de 12  $\mu$ m de espessura de cada amostra. Estes foram colocados em 0,5 ml de uma solução contendo glicerol 10% (w/vol), 2-mercaptoethanol 5 % (vol/vol) e sodium dodecylsulfate (SDS) 2,3 % (w/vol) em Tris/HCl buffer 0.9% (pH 6,8) (w/vol). Os cortes foram agitados durante um minuto e aquecidos por 10 minutos a 60 °C. Foi realizada a eletroforese de pequenas quantidades dos extratos (5-8  $\mu$ l), em gel (gradiente de 7-10%) de poliacriamida (SDS), com um gel de empacotamento a 4%, em um período de 19-21 horas de corrida a 120 V e, em seguida, corados com Coomassie Blue (Bar & Pette, 1988).

Os géis foram utilizados para determinar a presença das isoformas de MHC identificadas de acordo com seus respectivos pesos moleculares, evidenciando bandas em regiões correspondentes a MHCI e MHCII. Foi incluída também uma amostra do músculo extensor longo dos dedos (EDL) como controle para comparação, por apresentar cerca de 90% de MHCII e 10% de MHCI.

### ***Análise densitométrica***

Os géis contendo as bandas de miosina foram escaneados e as imagens foram capturadas pelo programa VDS (Pharmacia Biotech). Em seguida, as imagens foram transferidas para o programa Image Master VDS (versão 3.0) e obtida a percentagem relativa (IOD) das isoformas MHCI e MHCII.

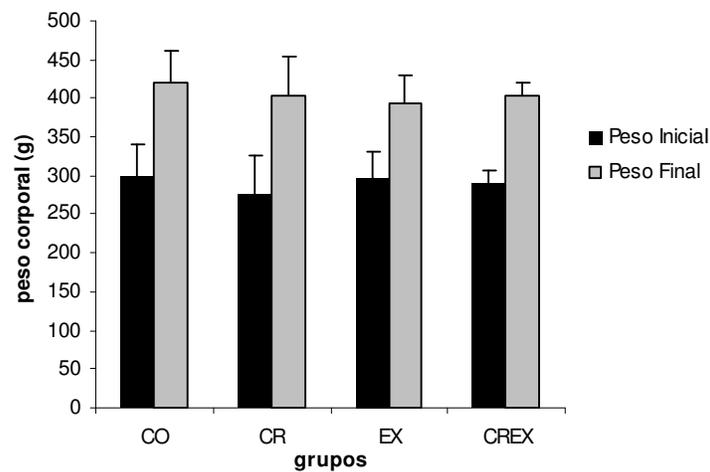
### *Análise estatística*

Os valores referentes ao peso corporal inicial (PI), peso corporal final (PF), consumo de ração diário de cada animal (CRA), consumo de ração diário dos grupos experimentais (CRG) e área dos tipos de fibras foram expressos em média e desvio padrão. Para a análise estatística desses dados, foi utilizada a análise de variância para o modelo com dois fatores (Zar, 1999). Para a análise da frequência dos tipos de fibras foi utilizado o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (Goodman, 1964, 1965). Os resultados referentes à análise da eletroforese foram expressos em média e desvio padrão e foi utilizada a análise de variância para o modelo com dois fatores (Zar, 1999).

## RESULTADOS

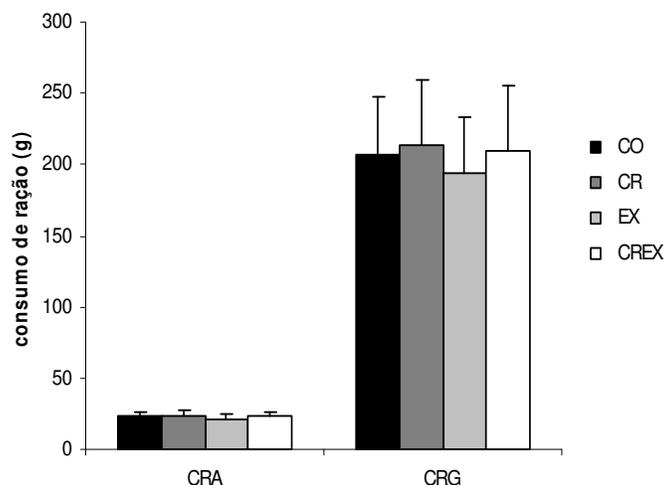
### *Dados Anatômicos*

Não houve diferença significativa no peso corporal inicial e final entre os grupos experimentais (Figura 2). Ao final do experimento, observou-se um ganho de peso corporal de 28,4%, 31,8%, 24,8% e 28,2% nos grupos CO, CR, EX e CREX, respectivamente (Figura 2). Os valores não foram estatisticamente diferentes entre os grupos.



**Figura 2.** Peso corporal dos animais dos grupos CO, CR, EX e CREX. Valores expressos em média  $\pm$  DP.

Os valores do consumo de ração diário de cada animal (CRA) e o consumo de ração diário dos grupos (CRG) experimentais, não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Figura 3).



**Figura 3.** Consumo de ração diário de cada animal (CRA) e consumo de ração diário dos grupos (CRG) CO, CR, EX e CREX. Valores expressos em média  $\pm$  DP.

Não houve diferença significativa no peso do músculo sóleo (Psol) entre os grupos estudados. A correção feita através das relações entre o peso do músculo e peso corporal (Rel Psol/P), não evidenciou diferenças significantes no peso do sóleo entre os grupos. Com relação à retenção hídrica intramuscular, identificada pela relação entre o peso úmido e peso seco de uma fração da porção média do sóleo (Rel Pu/Ps), os valores não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Tabela II).

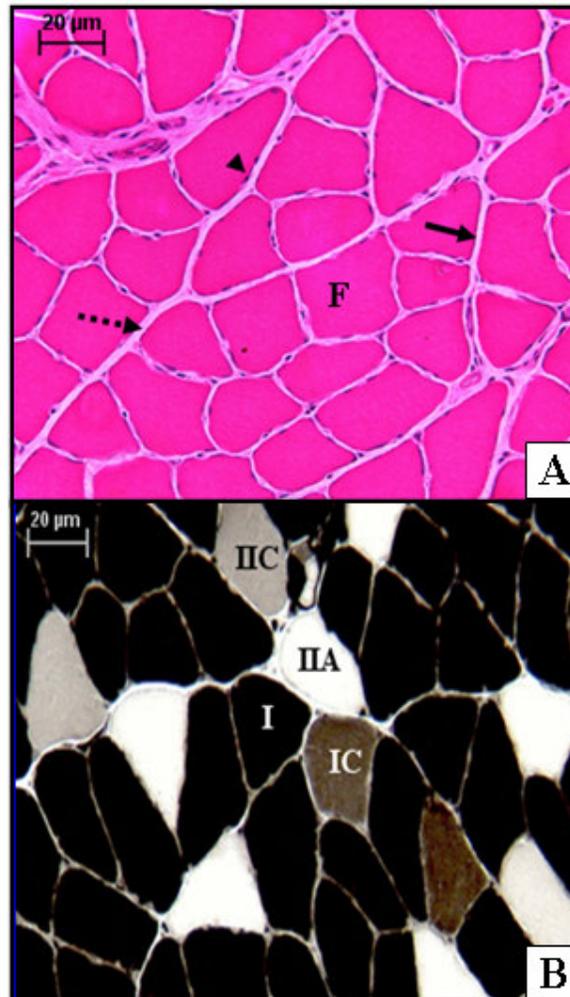
**Tabela II.** Valores referentes ao peso do sóleo (Psol), relação entre peso do sóleo/ peso corporal (Rel Psol/P) e relação entre o peso úmido e seco do sóleo (Rel Pu/Ps), nos grupos estudados. Valores expressos em média  $\pm$  DP.

	CO	CR	EX	CREX
<b>Psol (g)</b>	0,215 $\pm$ 0,06	0,185 $\pm$ 0,012	0,178 $\pm$ 0,02	0,191 $\pm$ 0,02
<b>Rel Psol/P (mg/g)</b>	0,51 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,03
<b>Rel Pu/Ps</b>	3,48 $\pm$ 0,1	3,45 $\pm$ 0,2	3,29 $\pm$ 0,2	3,41 $\pm$ 0,3

### **Morfologia**

A análise morfológica do músculo sóleo mostrou características normais em todos os grupos estudados. As fibras apresentaram aspecto poligonal ou arredondado, com núcleos periféricos, estando envoltas pelo endomísio de tecido conjuntivo frouxo (Figura 4a).

A reação histoquímica da mATPase, após a pré incubação em pH 4,4 mostrou os tipos de fibras puras: I e IIA e as fibras híbridas: IC e IIC (Figura 4b).



**Figura 4.** Corte transversal das fibras do músculo sóleo de ratos. **A:** Fibras musculares (F); Perimísio (seta descontínua); Endomísio (seta contínua) e Mionúcleos (ponta da seta). Hematoxilina e Eosina. **B:** Fibras musculares puras (I e IIA) e híbridas (IC e IIC). ATPase miofibrilar, pH 4,4.

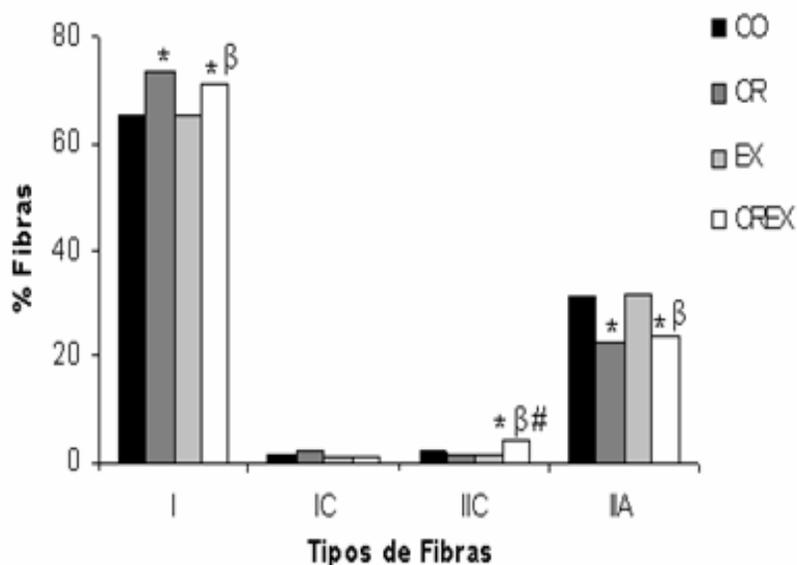
Não houve diferença significativa na área dos tipos de fibras musculares entre os grupos estudados (Tabela III).

Os animais do grupo CR apresentaram um percentual estatisticamente maior de fibras do tipo I, e um menor percentual de fibras do tipo IIA, em relação ao CO. O grupo EX apresentou um percentual estatisticamente menor de fibras do tipo I, e um maior percentual de fibras do tipo IIA, em relação aos grupos CR e CREX. Não houve

diferença significativa entre os grupos, com relação ao percentual de fibras do tipo IC. Por outro lado, os animais do grupo CREX apresentaram um percentual de fibras IIC estatisticamente maior comparado aos grupos CO, CR e EX (Figura 5).

**Tabela III.** Área de secção transversal (AST) ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras do tipo I, IC, IIC e IIA do músculo sóleo dos grupos CO, CR, EX e CREX. Valores expressos em média  $\pm$  DP.

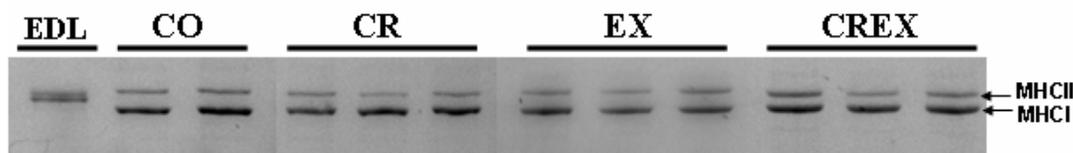
Grupos	AST ( $\mu\text{m}^2$ )			
	Tipo I	Tipo IC	Tipo IIC	Tipo IIA
CO	4228 $\pm$ 878	3597 $\pm$ 1212	3746 $\pm$ 1205	3772 $\pm$ 1061
CR	4005 $\pm$ 710	2773 $\pm$ 567	3495 $\pm$ 889	3339 $\pm$ 804
EX	4111 $\pm$ 1014	3911 $\pm$ 1396	3534 $\pm$ 828	3766 $\pm$ 817
CREX	4106 $\pm$ 477	2924 $\pm$ 205	3121 $\pm$ 396	3270 $\pm$ 438



**Figura 5** - Percentual de fibras (I, IC, IIC e IIA) do músculo sóleo nos grupos CO, CR, EX e CREX. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo CO, <sup>β</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo EX, <sup>#</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CR.

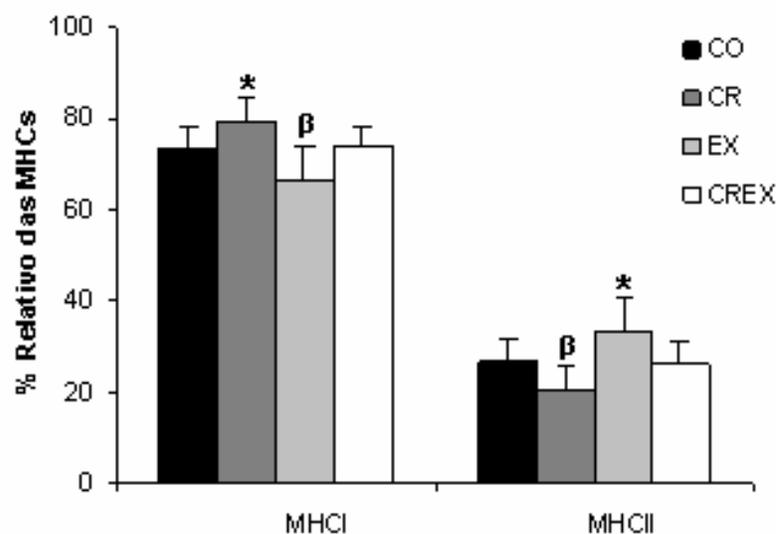
### *Análise Bioquímica*

Através da análise pela eletroforese foi evidenciada a presença de duas isoformas de miosina, MHCI e MHCII, em todos os grupos estudados (Figura 6). O músculo sóleo apresentou um maior percentual de MHCI, com grande diferença na distância de migração entre a MHCI e MHCII.



**Figura 6.** Separação eletroforética das isoformas de miosina (MHC) do músculo sóleo (SOL) dos animais dos grupos estudados. MHCI, Miosina de Cadeia Pesada tipo I; MHCII, Miosina de Cadeia Pesada tipo II. EDL, Extensor longo dos dedos.

De acordo com os resultados, houve um aumento significativo no percentual de MHCI, com concomitante redução da MHCII, no grupo CR, comparado ao grupo CO. O grupo EX apresentou uma diminuição significativa no percentual de MHCI e um aumento da MHCII, em relação ao grupo CO. Estas alterações não foram evidentes no grupo CREX, quando comparado ao grupo CO (Figura 7).



**Figura 7.** Percentual relativo das isoformas de miosinas de cadeia pesada (MHCI e MHCII), dos grupos CO, CR, EX e CREX. Valores expressos em Média  $\pm$  DP ( $p < 0,05$ ). \* Valor estatisticamente maior comparado ao CO; <sup>β</sup> Valor estatisticamente menor comparado ao CO.

## **DISCUSSÃO**

Os resultados deste estudo mostraram que a suplementação de creatina promoveu um aumento significativo no percentual da MHCI e redução no percentual da MHCII no músculo sóleo de ratos. O treinamento físico aumentou o percentual de MHCII e reduziu a MHCI. Por outro lado, a suplementação de creatina associada ao treinamento físico, não provocou alterações no percentual das miosinas. Com relação à hipertrofia muscular, analisada pela relação entre o peso do sóleo/ peso corporal (Rel Psol/P) e área de secção transversal (AST) das fibras musculares, não foram evidenciadas alterações significantes no músculo sóleo em ambos os grupos que realizaram o treinamento físico, na presença (CREX) e ausência (EX) da suplementação de creatina.

Estudos envolvendo a suplementação de creatina e o treinamento físico mostraram que a creatina pode ser efetiva como adicional ergogênico, promovendo um aumento na área das fibras musculares (Becque et al., 1999; Volek et al., 1999; Moura et al., 2002) e na performance durante os exercícios breves e de alta intensidade (Casey et al., 1996; Earnest et al., 1997; Brenner et al., 2000; Burke et al., 2000; Casey & Greenhaff, 2000). No entanto, a creatina tem um potencial efeito ergogênico em algumas atividades de alta intensidade, mas não em outras (Hart et al., 2001). McKenna et al., (1999), não encontraram diferenças entre os indivíduos suplementados com creatina durante 5 dias (30 g/ dia) e não suplementados, durante teste intermitente máximo em cicloergômetro. Nessa linha de investigação, Cribb et al., (2007), mostraram que o efeito benéfico da creatina na hipertrofia muscular pode apresentar variação, na dependência da morfologia do músculo e da população estudada.

Em adição, vários trabalhos mostram que a suplementação de creatina, associada a diferentes modelos de treinamento físico, pode provocar um aumento no peso corporal (Greenhaff et al., 1994; Balson et al., 1995; Green et al., 1996; Kreider et al., 1998; Volek et al., 1999; Kutz & Gunter, 2003). Este ganho de peso pode ser atribuído a uma maior retenção de água intramuscular e/ou um aumento das proteínas miofibrilares (hipertrofia das fibras) (Williams & Branch, 1998; Demant & Rhodes, 1999). Contudo, alguns estudos envolvendo curto prazo de suplementação de creatina, não apontaram um aumento do peso corporal em mulheres corredoras de distância (Terrillion et al., 1997) e nadadoras atletas (Thompson et al., 1996), sugerindo um efeito funcional específico de acordo com o gênero (Williamns & Branch, 1998). No entanto, deve-se

considerar que os indivíduos que participaram do estudo de Terrillion et al., (1997), foram mulheres corredoras de distância, uma população com baixo potencial para o aumento do peso corporal.

Em nosso estudo, todos os grupos aumentaram o peso corporal do início ao final do experimento, porém, não foi evidente um maior ganho de peso nos grupos suplementados com creatina, na ausência (CR) e presença (CREX) do treinamento físico. Nossos resultados corroboram o trabalho de Moura et al., (2002), que não observaram um maior ganho de peso corporal em ratos suplementados com creatina, submetidos a treinamento anaeróbio de natação. Embora nossos resultados não tenham evidenciado um aumento na AST do músculo sóleo, dos grupos experimentais, Moura et al., (2002), argumentam que um aumento de 30% na AST das fibras dos músculos sóleo, EDL; extensor longo dos dedos e gastrocnêmio, não é suficiente para provocar um aumento no peso corporal total. Os autores mantiveram o mesmo volume de treinamento (% peso corporal) nos grupos que realizaram o treinamento, na ausência (EX) e presença (CREX) da creatina, fornecendo evidências de uma ação direta da creatina no aumento da AST, independente de uma maior sobrecarga de treinamento no grupo suplementado com creatina. Já, Young & Young, (2007), investigando os efeitos da creatina no músculo sóleo de ratos induzidos à hipertrofia compensatória, pela retirada dos músculos sinergistas, não evidenciaram um aumento do peso corporal e hipertrofia, similar ao que foi observado em nosso estudo.

Vários autores sugerem que o ganho de peso e o aumento da massa muscular, observado após curto prazo de suplementação de creatina, seja resultado de um aumento na retenção hídrica. Isto ocorre pelo influxo osmótico de água, decorrente de um aumento na concentração de creatina muscular (Volek et al., 1996). No entanto, o treinamento físico pode ampliar o efeito da creatina no aumento da retenção hídrica (MCBride & Gregory, 2002). Nossos achados não apontaram um aumento da retenção hídrica intramuscular nos grupos suplementados com creatina, na ausência (CR) e presença do treinamento físico (CREX).

De acordo com as investigações, o mecanismo de ação da creatina, associada ao treinamento físico, no aumento da área de secção transversal (AST) das fibras musculares é decorrente de uma melhor capacidade de trabalho muscular (Kirksey et al., 1999). Este mecanismo ocorre pela elevação na concentração total de creatina intramuscular, armazenada na forma de creatina livre e fosfocreatina (PCr) (Balsom et al., 1994; Hultman et al., 1996; Branon et al., 1997; Williams & Branch, 1998). O

aumento nos níveis de PCr, que atua como doador de fosfato para o ADP, favorece uma maior ressíntese e fornecimento de ATP durante os exercícios breves e de alta intensidade (Cordain, 1998). Assim, a creatina pode otimizar a realização de uma única série ou séries repetidas de exercícios, aumentando a intensidade do treinamento físico, e, conseqüentemente, as maiores respostas adaptativas na hipertrofia e função muscular (potência, força, velocidade) (Earnest et al., 1995). Nessa linha de investigação, alguns pesquisadores atribuem os efeitos benéficos da creatina, em resposta ao treinamento físico, a maior qualidade nas sessões de treino, pelo aumento dos ajustes de sobrecarga muscular. (Volek & Kraemer, 1996; Kreider et al., 1998; Volek et al., 1999).

Em nosso trabalho, com o objetivo de analisar os efeitos da creatina, independente dos ajustes de sobrecarga de treinamento, sobre a hipertrofia muscular, os animais dos grupos EX e CREX treinaram sobre a mesma intensidade, o que exclui a possibilidade de uma maior resposta adaptativa, através de cargas superiores de treinamento no grupo CREX. O protocolo de treinamento utilizado em nosso estudo, não promoveu uma maior hipertrofia das fibras do músculo sóleo, nos grupos que realizaram exercício com (CREX) e sem a suplementação de creatina (EX). Nossos resultados mostram que a creatina não promove qualquer efeito ergogênico adicional, em protocolos que não atingem uma intensidade suficiente para provocar as adaptações musculares necessárias para o aumento da área das fibras musculares. Segundo Young & Young, (2007), o potencial benéfico da suplementação de creatina não está relacionado a um efeito direto no músculo, mas sim, com um estímulo adicional, favorável ao aumento da sobrecarga de treinamento. Semelhante aos nossos resultados, Syrotuik et al., 2000; Stevenson & Dudley, 2001 e McBride & Gregory, (2002), mostraram que para a creatina ser efetiva no aumento da força e massa muscular, precisa ser incorporada ao regime de treinamento, sendo dependente dos ajustes de sobrecarga (intensidade), nas sessões subseqüentes de treinamento.

Embora a hipertrofia das fibras musculares esteja associada a uma maior síntese de proteína miofibrilar, Louis et al, (2003), não apontaram qualquer efeito anabólico da creatina, no aumento da síntese protéica. Por outro lado, alguns trabalhos mostraram que a creatina, por si só, pode estimular a síntese protéica muscular, em cultura de mioblastos (Ingwall et al., 1972; Ingwall et al., 1974; Zilber et al., 1975; Ingwall, 1976). Nossos achados corroboram o trabalho de Moura et al., (2002), os quais mostraram que a creatina, na ausência de exercício (CR), não promoveu um aumento na área das fibras do sóleo. No presente estudo, devido ao estímulo do treinamento (período e intensidade)

não ter sido suficiente para promover as adaptações musculares, a creatina não exerceu qualquer efeito no aumento da área das fibras do músculo sóleo. Estes dados evidenciam a ação benéfica da creatina, como um adicional ergogênico do treinamento, somente em protocolos suficientes para induzir as adaptações musculares.

Ainda que esteja bem estabelecido o efeito ergogênico da creatina na melhora da performance muscular (Izquierdo et al., 2001), novos trabalhos são necessários para elucidar os efeitos e mecanismos, pelos quais a creatina pode influenciar o fenótipo das fibras musculares. Louis et al. (2004) observaram que a adição de creatina em cultura de células C2C12, induz a uma maior hipertrofia miofibrilar, mediada pelo aumento na expressão de mRNA para IGF-I (insulin-like growth factor) e para os fatores de regulação miogênica (Myogenic Regulatory Factors, MRFs). Pesquisas recentes com humanos sugerem que a creatina pode regular a expressão dos MRFs e IGF, envolvidos com a expressão das isoformas de MHCs e hipertrofia das fibras musculares (Willoughby & Rosene, 2003; Deldicque et al., 2005). O IGF-I é um fator de crescimento que atua como um potente sinal anabólico no tecido muscular, estimulando a síntese protéica em diferentes condições fisiológicas (Hobler et al., 1998; Barton-Davis et al., 1999; Glass, 2003; Goldspink, 2005). Os MRFs controlam a expressão de genes músculos específicos durante a miogênese, o crescimento e às adaptações musculares (Seale & Rudnicki, 2000). Estes trabalhos suportam a idéia de que a creatina, associada ao treinamento físico, pode estar envolvida na ativação dos fatores transcricionais, responsáveis pela expressão de genes músculo específicos, relacionados a hipertrofia e/ou expressão das isoformas de MHCs.

Embora estejam bem relatados os benefícios da creatina na melhora do rendimento físico durante os exercícios breves e de alta intensidade, poucos estudos procuraram elucidar os efeitos da creatina, na presença (CREX) e ausência (CR) do treinamento físico, sobre a modulação das fibras musculares e das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC).

Um notável resultado do presente estudo foi que a creatina, na ausência do exercício (CR), aumentou significativamente o percentual de MHCI e reduziu o percentual de MHCII no músculo sóleo, em relação ao grupo CO. Essas mudanças foram acompanhadas de um aumento significativo no percentual de fibras do tipo I e redução das fibras do tipo IIA no grupo CR e CREX, em relação ao CO. Contudo, a redução no percentual de fibras IIA, foi paralela ao aumento das fibras IIC, no grupo CREX, em relação aos grupos CO, CR e EX. Nosso trabalho contradiz o estudo de

Brannon et al., (1997), que não evidenciaram alterações significantes na distribuição das isoformas de MHCs, nos músculos sóleo e plantar de ratos suplementados com creatina, na presença e ausência de exercício de alta intensidade. Embora contraditório ao trabalho de Brannon et al., (1997), o aumento no percentual de MHCI e redução da MHCII, observado em nosso estudo, é consistente com o aumento da resistência à fadiga (McGuire et al., 2001) e melhora na capacidade oxidativa do músculo sóleo (Brannon et al., 1997). Porém, o aumento da capacidade oxidativa e resistência à fadiga não foram evidentes, em músculos de contração rápida (plantar e EDL, extensor longo dos dedos), sugerindo um efeito da creatina, dependente do tipo de fibra (Brannon et al., 1997, McGuire et al., 2001). Com base em nossos resultados, podemos sugerir que a suplementação de creatina, precedente a um período de treinamento para eventos de longa duração, seja benéfica em aumentar o percentual de MHCI, favorecendo um aumento da resistência à fadiga e capacidade oxidativa no músculo sóleo de ratos.

Vários estudos envolvendo diferentes populações e protocolos de treinamento contra resistência (TCR), observaram um ajuste no percentual de MHCIIb em direção a MHCIIa, favorecendo um aumento na eficiência e capacidade oxidativa muscular (Adams et al., 1993; Jurimae et al., 1996; Carroll et al., 1998; Sharman et al., 2001; Campos et al., 2002; Harber et al., 2004). Em nosso trabalho, o grupo que realizou o treinamento físico, na ausência de creatina (EX), significativamente reduziu o percentual de MHCI e aumentou a MHCII, em relação ao grupo CO. O músculo sóleo é constituído, predominantemente, por fibras do tipo I (90%) e fibras do tipo IIA (10%) (Moura et al., 2002). Esse ajuste da MHCI em direção a MHCII pode favorecer uma maior capacidade muscular para suprir os aumentos de sobrecarga, nas sessões subseqüentes de treinamento.

As mudanças observadas nas MHCs, não foram seguidas de alterações no percentual de fibras do tipo I, IC, IIC e IIA no grupo EX, comparado ao CO. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Harber et al., (2004), na qual observaram um ajuste das isoformas de MHCs, sem alterações significantes no percentual dos fibras. Os autores sugerem um ajuste nas isoformas de MHCs, precedente a modulação das fibras musculares, como observado em indivíduos não treinados após 2 semanas de TCR (Staron et al., 1994) e idosos não treinados após 12 semanas de TCR (80% 1RM) (Williamson et al., 2000).

De acordo com os resultados do presente estudo, os efeitos isolados da creatina (CR) no aumento da MHCI e redução da MHCII foram contrários ao treinamento físico

(EX), que aumentou a MHCII e reduziu a MHCI, em relação ao CO. Estas alterações não foram evidentes quando o treinamento físico foi combinado com a suplementação de creatina (CREX). Estes dados são valiosos, pois relatam um efeito antagônico da creatina (CR) em relação ao treinamento físico (EX), que, quando combinados (CREX), não induzem a modulação nas isoformas de MHCs. Nossos resultados não corroboram o estudo de Willoughby & Rosene, (2001), que mostraram um aumento na expressão das isoformas MHCI e MHCIIa, concomitante ao aumento da expressão de mRNA para MHCI, MHCIIA e MHCIIIX, no músculo vasto lateral humano, após 12 semanas de treinamento resistido (85-90% 1-RM), combinado com a suplementação de creatina. A diferença nos resultados pode ser decorrente do modelo de treinamento físico (frequência, intensidade e volume), do período de treinamento, da espécie, do sexo, do músculo analisado e do protocolo de suplementação da creatina. Pesquisas futuras são necessárias para elucidar os efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico e suplementação de creatina, sobre os ajustes fenotípicos dos diferentes tipos de fibras e das isoformas de MHCs, nos diferentes músculos.

Em conclusão, a suplementação de creatina isolada não promove um aumento na área de secção transversal das fibras do músculo sóleo de ratos. Os efeitos benéficos da creatina no aumento da massa e força muscular são atribuídos a maior qualidade nas sessões de treinamento, pelo ajuste das sobrecargas de treinamento. Assim, a creatina não promove qualquer efeito adicional, em protocolos de treinamento que não atingem uma intensidade suficiente para provocar as adaptações musculares. O efeito isolado da creatina, no aumento da MHCI e redução da MHCII, foi antagônico ao treinamento físico, que aumentou a MHCII e reduziu a MHCI. No entanto, estas alterações não foram evidentes quando o treinamento físico foi combinado com a suplementação de creatina (CREX). Novas pesquisas serão necessárias para elucidar os efeitos e os mecanismos envolvidos nas adaptações fenotípicas dos diferentes tipos de fibras e nas isoformas de MHCs, sobre diferentes modelos de treinamento físico e protocolos de suplementação de creatina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA (1993) Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 74:911-915.

Balsom PD, Soderlund K, Ekblom B (1994) Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med* 18:268-280.

Balsom P, Soderlund K, Sjodin B, Hultman E (1995) Skeletal muscle metabolism during short duration high-intensity exercise: influence of creatine supplementation. *Acta Physiol Scand* 154:303-310.

Bar A & Pette D (1988) Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235:153.

Barton-Davis ER, Shoturna DI, Sweeney HL (1999) Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 167(4):301-305.

Becque MD, Lochmann JD, Melrose DR (1999) Effects of oral creatine supplementation on muscular strength and body composition. *Med Sci Sports Exerc* 32, 654-658.

Brannon TA, Adams GR, Conniff CL, Baldwin KM (1997) Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 29:489-495.

Brenner M, Rankin JK, Sebolt D (2000) The effect of creatine supplementation during resistance training in women *J Strength Cond Res* 14(2):207-213.

Burke DG, Silver S, Holt LE, Smith Palmer T, Culligan CJ, Chilibeck PD (2000) The effect of continuous low dose creatine supplementation on force, power, and total work *Int J Sport Nutr* 10(3):235-244.

Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88:50–60.

Carroll TJ, Abernethy PJ, Logan PA, Barber M, McEniery MT (1998) Resistance training frequency: strength and myosin heavy chain responses to two and three bouts per week. *Eur J Appl Physiol* 78:270-275.

Casey A, Constantin-Teodosiu D, Howell S, Hultman E, Greenhaff PL (1996) Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans *Am J Physiol* 271(1):E31-E37.

Casey A & Greenhaff PL (2000) Does dietary creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance? *Am. J. Clinical Nutrition* 72 (2):607S - 617S.

Cordain L (1998) Does creatine supplementation enhance athletic performance? *J Am Coll Nutr* 17:205-206.

Cribb PJ, Williams AD, Stathis CG, Carey MF, Hayes A (2007) Effects of whey isolate, creatine, and resistance training on muscle hypertrophy *Med Sci Sports Exerc* 39(2):298-307

Cunha TS, Tanno AP, Moura MJCS, Marcondes FK (2005) Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content *Life Sciences* 77:1030-1043.

Deldicque L, Louis M, Theisen D, Nielsen H, Dehoux M, Thissen JP, Rennie MJ, Francaux M (2005) Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 37(5):731-736.

Demant TW & Rhodes EC (1999) Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med* 28(1):49–60.

Earnest C, Snell PG, Rodriguez AL, Almada AL, Mittleman K (1995) The effect of creatine monohydrate ingestion on anaerobic power indices, muscular strength and body composition. *Acta Physiol Scand* 153:207-209.

Earnest CP, Almada AL, Mitchell TL (1997) Effects of creatine monohydrate ingestion on intermediate duration anaerobic treadmill running to exhaustion. *J Strength Cond Res* 11:234-8.

Glass DL (2003) Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol med* 9(8):344-350.

Goodman LA (1964) Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics* 35(2):716-725.

Goodman LA (1965) On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7(2):247-254.

Goldspink G (2005) Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology* 20:232-238.

Green AL, Hultman E, MacDonald IA, Sewell DA, Greenhaff PL (1996) Carbohydrate feeding augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. *Am J Physiol* 271:E821-E826.

Green H, Goreham C, Ouyang J, Ball-Burnett M, Ranney D (1999) Regulation of fiber size, oxidative potential, and capillarization in human muscle by resistance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276:R591-R596.

Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Casey A, Hultman E (1994) The effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle ATP degradation during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. (Abstract). *J Physiol* 476:84P.

Greenhaff PL (1995) Creatine and its use as an ergogenic aid. *Int J Sport Nutr* 5:S100-S110.

Harber MP, Fry AC, Rubin MR, Smith JC, Weiss LW (2004) Skeletal muscle and hormonal adaptations to circuit weight training in untrained men. *Scand J Med Sci Sports* 14:176–185.

Hart LE & Kreider, RB (2001) Creatine for Enhancement of High-Intensity Performance. *Clin. J. Sport Med.* 11(4):282.

Hobler SC, Williams AB, Fischer JE, Hasselgren PO (1998) IGF-I stimulates protein synthesis but does not inhibit protein breakdown in muscle from septic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274:571-576.

Hultman E, Soderlund K, Timmons JA, Cederblad G, Greenhaff PL (1996) Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* 81:232–237.

Ingwall JS, Morales MF, Stockdale FE (1972) Creatine and the Control of Myosin Synthesis in Differentiating Skeletal Muscle *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2250-2253.

Ingwall JS, Weiner CD, Morales MF, Davis E and Stockdale FE (1974) Specificity of creatine in the control of muscle protein synthesis. *J Cell Biol* 62:145–151.

Ingwall JS (1976) Creatine and the control of muscle-specific protein synthesis in cardiac and skeletal muscle. *Circ Res* 38(5 Suppl 1):I115-I123.

Izquierdo M, Ibanez J, Gonzalez-Badillo JJ, Gorostiaga EM (2002) Effects of creatine supplementation on muscle power, endurance, and sprint performance. *Med Sci Sports Exerc* 34:332-343.

Jurimae J, Abernethy PJ, Blake K, McEniery MT (1996) Changes in the myosin heavy chain isoform profile of the triceps brachii muscle following 12 weeks of resistance training. *Eur J Appl Physiol* 74:287-292.

Kirksey B, Stone MH, Warren BJ, Johnson R, Stone M, Haff G, Williams F, and Proulx C (1999) The effects of 6 weeks of creatine monohydrate supplementation on performance measures and body composition in collegiate track athletes. *J Str Cond Res* 13:148–156.

Kreider RB, Ferreira M, Wilson M, Grinstaff P, Plisk S, Reinardy J, Cantler E, Almada AL (1998) Effects of creatine supplementation body composition, strength, and sprint performance. *Med Sci Sports Exerc* 30(1):71-82.

Kutz MR & Gunter MJ (2003) Creatine monohydrate supplementation on body weight and percent body fat. *J Strength Cond Res* 17:817–821.

Louis M, Poortmans JR, Francaux M, Berre J, Boisseau N, Brassine E, Cuthbertson D, Smith K, Babraj JA, Waddell T, and Rennie M (2003) No effect of creatine supplementation on human myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis after resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1089–E1094.

Louis M, Van Beneden R, Dehoux M, Thissen JP, Francaux M (2004) Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory factor mRNA in C2C12 cells. *FEBS Lett.* 557:243–247.

Magaudda L, Mauro DD, Trimarchi F, Anastasi G (2004) Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14(1):17-21.

McBride TA & Gregory MA (2002) Effect of creatine supplementation during high resistance training on mass, strength, and fatigue resistance in rat skeletal muscle. *J Strength and Cond Res* 16(3):335-342.

McGuire M, Bradford A, MacDermott M (2001) The effects of dietary creatine supplements on the contractile properties of rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *Experimental Physiology* 86(2):185-190.

McKenna MJ, Morton J, Selig SE, Snow RJ (1999) Creatine supplementation increases muscle total creatine but not maximal intermittent exercise performance. *J Appl Physiol* 87(6):2244–2252.

Moura IMW, Dos Santos FF, Moura JAA, Curi R, Fernandes LC (2002) Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional area in skeletal muscle fibers of wistar rats after swimming training. *J Sports Sci and Med* 1:87-95.

Pette D & Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509.

Rawson ES & Volek JS (2003) Effects of creatine supplementation and resistance training on muscle strength and weightlifting performance. *J Strength Cond Res* 17(4):822-831.

Seale P & Rudnicki MA (2000) A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Exp Biol* 218:115-124.

Sharman MJ, Newton RU, Triplett-McBride T, McGuigan MRM, McBride JM, Hakkinen A, Hakkinen K, Kraemer WJ (2001) Changes in myosin heavy chain composition with heavy resistance training in 60-to 75-year old men and women. *Eur J Appl Physiol* 84:127-132.

Staron RS, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, Hagerman FC, Hikida RS (1994) Skeletal muscle adaptation during the early phase of heavy resistance training in men and women. *J Appl Physiol* 76:1247–1255.

Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 111(2):117-123.

Stevenson SW & Dudley GA (2001) Dietary creatine supplementation and muscular adaptation to resistive overload. *Med Sci Sports and Exerc* 33(8):1304–1310.

Stout JR, Echerson J, Noonan D, Moore G, Cullen D (1999) Effects of creatine supplementation on exercise performance and fatfree weight in football players during training. *Nutritional Research* 19:217-225.

Syrotuik DG, Bell GJ, Burnham R, Sim LL, Calvert RA, MacLean IM (2000) Absolute and relative strength performance following creatine monohydrate supplementation combined with periodized resistance training. *J Strength Cond Res* 14 (2):182–190.

Terrillion KA, Kolkhorst FW, Dolgener FA, Joslyn SJ (1997) The effect of creatine supplementation on two 700-m maximal running bouts. *Int J Sport Nutr* 7:138–143.

Thompson CH., Kemp GJ, Sanderson AL, Dixon RM, Styles P, Taylor D J, Radda GK (1996) Effect of creatine on aerobic and anaerobic metabolism in skeletal muscle of swimmers. *British Journal of Sports Medicine* 30:222-225.

Volek JS & Kraemer (1996) Creatine supplementation: Its effects on human muscular performance and body composition. *J Strength Con Res* 10(3):200-210.

Volek JS, Duncan ND, Mazzetti SA., Staron RS, Putukian M, Gómez AL, Pearson DR, Fink WJ, Kraemer WJ (1999) Performance and muscle fibre adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. *Med Sci Sports and Exerc* 31:1147–1156.

Volek JS & Rawson ES (2004). Scientific basis and practical aspects of creatine supplementation for athletes. *Nutrition* 20:609–614.

Williams MH & Branch JD (1998) Creatine supplementation and exercise performance: an update. *J Am Coll Nutr* 17:216–234.

Williamson DL, Godard MP, Porter DA, Costill DL, Trappe, SW (2000) Progressive resistance training reduces myosin heavy chain co-expression in single muscle fibers from older men. *J Appl Physiol* 88:627-633.

Willoughby DS & Rosene JM (2003) Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. *Med Sci Sports Exerc* 35(6):923-929.

Willoughby DS, Rosene JM (2001) Effects of oral creatine and resistance training on myosin heavy chain expression. *Med Sci Sports Exerc* 33(10):1674-1681.

Young RE & Young JC (2007) The effect of creatine supplementation on mass and performance of rat skeletal muscle. *Life Sci* 81(9):710-716.

Zar JH (1999) Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice-Hall New Jersey, 633p.

Zilber ML, Litvinova VN, Morozov VI, Pliskin AV, Pshendin AI, Rogozkin VA (1975) The creatine effect on RNA and protein synthesis in growing culture of chick embryo myoblasts. *Biokhimiia* 40(4):854-860.

#### **IV – CONCLUSÕES GERAIS**

- A suplementação de creatina isolada ou associada ao treinamento resistido, não promoveu um maior ganho de peso corporal nos animais estudados.
  
- O consumo alimentar foi semelhante entre os grupos experimentais.
  
- O efeito isolado da creatina, induzindo ao aumento da MHCI e redução da MHCII foi contrário ao treinamento físico, que aumentou a MHCII e reduziu a MHCI. Estas alterações não foram evidentes quando o treinamento físico foi combinado com a suplementação de creatina.
  
- A suplementação de creatina isolada ou associada ao treinamento resistido não promoveu um aumento na retenção hídrica e área das fibras do tipo I, IC, IIC e IIA entre os grupos.
  
- Para a creatina ser efetiva na hipertrofia muscular, precisa ser incorporada ao regime de treinamento, sendo dependente dos ajustes de sobrecarga (intensidade), nas sessões subsequentes de treinamento.