

**17º Congresso de Iniciação Científica****PLASTICIDADE MUSCULAR NA FASE AGUDA DA IMOBILIZAÇÃO ARTICULAR MEDIANTE SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA: ESTUDO EM RATOS****Autor(es)**

EDER JOAO DE ARRUDA

Co-Autor(es)

LUCIANO JULHO CHINGUI
DANIEL DE OLIVEIRA GRASSI
ADRIANO ROCCO PARDI
MARIA TEREZA MUNHOS SEVERI**Orientador(es)**

CARLOS ALBERTO DA SILVA

1. Introdução

O tecido musculoesquelético é um tecido dinâmico dotado de uma capacidade intrínseca de alterar suas características fenotípicas, a fim de se adaptar aos estímulos ambientais como resultado de mudanças qualitativas e quantitativas na expressão gênica, sendo esta capacidade definida como plasticidade (CAPITANIO et al., 2006).

Neste sentido o desuso muscular tem se configurado como uma forma de estímulo da plasticidade muscular, visto que este induz uma gama de efeitos deletérios, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, redução das reservas de glicogênio, da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, redução da força e resistência à fadiga e aumento de radicais livres (CHINGUI, 2007).

Alguns estudos evidenciaram que fibras lentas oxidativas (tipo I), sentem de forma mais deletéria aos efeitos do desuso muscular, sendo caracterizadas por alterações morfológicas e histo-fisiológicas como; irregularidades no retículo sarcoplasmático, fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, linhas Z estendidas, condensação e fragmentação da cromatina nuclear, redução de sarcômeros em série e em paralelo, bem como alterações dos marcadores fisiológicos (TANAKA et al., 2004; PEARLMAN e FIELDING, 2006, SILVA et al, 2009).

Na tentativa de criar uma situação que mimetize a realidade da prática ortopédica, que se utiliza da imobilização como recurso, Silva et al (2006) desenvolveram um modelo de imobilização para o membro posterior de ratos, que se resume a um dispositivo de metacrilato de etila e policloreto de vinil (PVC). Esse modelo tem se demonstrado eficaz em mimetizar as alterações observadas na síndrome do desuso conforme atesta Arruda et al (2008).

Sabendo-se dos efeitos deletérios instalados pelo desuso, pesquisadores de todo mundo tem se dedicado a buscar recursos que minimizem a deflagração resultante do desuso. Assim, diversas técnicas têm sido utilizadas, com destaque para estimulação elétrica neuromuscular, fármacos como o clenbuterol e suplementos como o sulfato de vanadil, a glutamina e a metformina (DELFINO et al., 2006; BOSI et al., 2008). Nesse sentido, fica evidenciada a necessidade de investigações que apontem estratégias favoráveis a um suporte energético adicional à musculatura sob a condição de desuso.

Tendo em vista a necessidade supracitada, Greenhaff (1996) atesta que a creatina caracteriza-se como um agente ergogênico

nutricional eficaz em aumentar o desempenho, além de ser uma fonte de energia importante para o tecido muscular ao propiciar re-síntese imediata de adenosina trifosfato (ATP).

A partir dos aminoácidos arginina, glicina e metionina, a creatina é sintetizada no fígado e no pâncreas, sendo que 95% desta encontram-se estocadas no tecido muscular, onde sua função é auxiliar na geração de energia e síntese protéica (NEWSHOLME; HARDY, 1998). Convém ressaltar que a utilização de creatina na forma de suplemento, propicia um aumento na concentração intramuscular de fosfocreatina, além de elevar a hidratação celular criando um meio propício para a síntese protéica e ao mesmo tempo desfavorecendo a proteólise conforme constatado em humanos suplementados que apresentaram aumento da massa muscular (NEWSHOLME; HARDY, 1998).

Muito embora este composto esteja a tempo disponível para a suplementação ergogênica relacionada ao desempenho esportivo, apenas recentemente houve esforços concentrados na investigação desse mesmo potencial enquanto recurso terapêutico (EIJNDE et al., 2001).

Visto que existem poucos estudos direcionados à compreensão dos eventos ligados a suplementação de músculos imobilizados, principalmente no que se refere à fase aguda do desuso, o alvo do presente estudo é avaliar a responsividade do tecido muscular frente a suplementação com creatina durante a fase aguda da imobilização.

2. Objetivos

Avaliar no tecido muscular condicionado a restrição, aspectos metabólicos que evidenciem a efetividade da suplementação com creatina durante a fase aguda do desuso gerado pela imobilização articular.

3. Desenvolvimento

Utilizou-se ratos Wistar, com idade variando de 3-4 meses mantidos em condições ideais de bioterismos. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais com n=6 e assim denominados: Controle, Suplementado com creatina, Imobilizado 3 dias, Imobilizado 3 dias suplementado com creatina. Como modelo de imobilização foi utilizado a órtese de metacrilato de etila segundo a proposta de Silva et al. (2006) e apresentado na figura 1. O tratamento com creatina seguiu a proposta de Baker, 2005. Para determinação do conteúdo de glicogênio foi utilizado o método do fenol sulfúrico descrito por Siu, Russeau e Taylor (1970). Na avaliação da concentração de proteínas foi utilizado kit laboratorial da marca Bio Diagnóstica? e na concentração de DNA foi utilizado o método da difenilamina o método proposto por Giles e Myers (1965). Para a realização do teste de peso constante o músculo sóleo foi retirado pesado e submetido à desidratação em estufa a 55°C. A cada hora o músculo foi retirado da estufa e novamente pesado até que o peso manifeste-se homogêneo. A avaliação estatística dos dados foi feita através da ANOVA seguido do teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico de 5%.

4. Resultado e Discussão

Inicialmente realizou-se um estudo cuja ênfase foi avaliar parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade em ratos suplementados com creatina e como pode-se observar na tabela 1, o grupo suplementado não difere do controle, descartando toxicidade em detrimento da suplementação. A seguir foi avaliado o índice de hidratação muscular tendo em vista que alguns substratos metabólicos alteram o equilíbrio homeostático celular. Neste sentido, foi observado que os músculos de ratos suplementados apresentaram elevação de 32% na hidratação se comparado ao grupo controle como mostra a tabela 1.

Com relação ao conteúdo muscular de glicogênio foi verificado que o grupo imobilizado apresentou uma expressiva redução nas reservas atingindo 39% no sóleo, 59% no gastrocnêmio porção branca e 36% no gastrocnêmio misto. Na seqüência experimental foi avaliado o comportamento das reservas glicogênicas dos músculos normais e imobilizados suplementados com creatina. Nos músculos normais observou-se elevação de 14% nas reservas do músculo sóleo, 15% no gastrocnêmio porção branca e 14% no gastrocnêmio porção mista ($p < 0,05$). Neste íterim, também foi avaliado o efeito do suplemento nos músculos imobilizados e como se pode observar na tabela 2, o conteúdo glicogênico do músculo sóleo foi elevado em 41%, no gastrocnêmio porção branca a

elevação foi de 87% e no gastrocnêmio porção mista observou-se reservas 30% maiores.

Outro fator a se considerar, está relacionado ao peso do músculo sóleo (músculo escolhido devido à precisão de seus limites quando coletado) sendo observado que a imobilização promoveu redução de 30% (vide tabela 3). Cabe ressaltar que a suplementação não modificou o peso do músculo normal, no entanto, promoveu elevação de 12% nos imobilizados. A seguir, foi avaliada a relação proteína total/DNA nos diferentes grupos e observou-se que o grupo imobilizado apresenta valores 17% menores no sóleo, 24% no gastrocnêmio porção branca e 19% no gastrocnêmio porção vermelha, se comparado ao grupo controle. Por sua vez, ao analisar-se o grupo suplementado observou-se que não difere do controle, por outro lado, o grupo imobilizado suplementado apresentou valores 22% maiores no sóleo, 17% no gastrocnêmio porção branca e 12% no gastrocnêmio porção vermelha, se comparado ao imobilizado não suplementado como mostra a tabela 4.

No âmbito metabólico tem sido relatado uma significativa diminuição na ação da insulina no músculo imobilizado, ocorrendo entre a terceira e oitava hora após a imobilização do membro sugerindo redução na captação de substratos metabolizáveis e na formação das reservas energéticas (NICHOLSON; WATSON, 1984).

Tanaka et al (2004), destacam que as fibras tipo I são mais susceptíveis aos efeitos deletérios e dentro desta linha de raciocínio, foi observado que o músculo gastrocnêmio porção branca foi o mais afetado pela imobilização e possivelmente se deve ao fato de ser bi-articular e neste modelo de desuso, apresentar limitação na sua condição fisiológica. Assim, por haver descarga de peso, o músculo sóleo recebia estímulo constante enquanto o animal deambulava. Uma vez que, tem sido descrito que frente à elevação da atividade contrátil há elevação na captação de glicose decorrente da translocação de transportadores GLUT 4, é sugestivo o fato que o sóleo adquiriu um status energético diferenciado dos outros músculos, razão pela qual os dados diferem do consenso presente na literatura. Em relação ao índice de hidratação muscular foi observado que os músculos tratados com creatina apresentaram-se mais hidratados quando comparado aos não suplementados. Estes resultados mostram que as ações da creatina podem ser facilitadas pela elevação na hidratação tecidual, visto que, um ambiente super-hidratado propicia uma significativa melhora em diferentes funções celulares como, por exemplo, coeficientes de absorção, ação enzimática e síntese protéica, sugerindo assim a ativação de sistemas anticatabólicos (PARISE et al., 2001).

Dentro da proposta experimental, avaliou-se o comportamento glicogênico dos músculos imobilizados frente à suplementação com creatina e foi observado que o efeito glicogênico também se manifesta no músculo imobilizado ressaltando que neste caso, o gastrocnêmio porção branca apresentou maiores reservas, destacando que a melhor resposta se refere as fibras tipo II, como sugerido por Casey et al., 1996.

Um fator importante para considerar a creatina como agente protetor da musculatura se refere ao fato de estar descrito em animais e humanos que a creatina previne a perda de GLUT4 em músculos submetidos ao desuso além de promover elevação da população até níveis de normalidade na fase de recuperação, fator que facilita a formação de reservas glicogênicas precoces a fase de suplementação (FREIRE et al., 2008)

5. Considerações Finais

Sem promover toxicidade, a suplementação com creatina foi favorável ao mecanismo da plasticidade minimizando os efeitos deletérios do desuso, visto que demonstrou ativação de sistemas anabólicos em músculos normais e anticatabólicos em músculos imobilizados, fato este evidenciado pelas condições metabólicas apresentadas.

Contudo, é elucidada hipótese de que a suplementação com creatina tem efeitos terapêuticos durante a imobilização e assim pode ser inserida como um recurso coadjuvante na reabilitação. Neste sentido, é de merecimento que estudos similares em período pré-imobilização, sejam direcionados a investigar uma possível potencialização na ativação de sistemas anticatabólicos frente ao desuso.

Referências Bibliográficas

ARRUDA, E. J. et al . Perfil quimiometabólico de músculos esqueléticos de ratos submetidos a diferentes modelos de imobilização articular. In: 6º Mostra Acadêmica da UNIMEP - XVI Congresso de Iniciação Científica, 2008, Piracicaba. Anais da 6º Mostra Acadêmica da UNIMEP, 2008.

BAKER, D.H. Tolerance form Branched-Chain Amino Acid in experimental animals and humans. J. Nutr. v. 135, p. 1585-1590, 2005.

- BOSI, P.L. et al. Pharmacological protection with metformin in the muscle metabolic alteration inherent of the functional limitation. *Braz Arch of Biol Tech.* v. 51, n. 3, 2008.
- CAPITANIO, M. et al. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 103, n. 1, p. 87-92, 2006.
- CASEY A. et al. Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. *Am J Physiol.* v. 271, n. 31-37, 1996.
- CHINGUI, L.J. et al. Comportamento quimim metabólico do músculo sóleo na fase aguda da imobilização articular. *Fisiot Pesq. São Paulo*, v.15, n.2, p.194-9, abr./jun. 2008.
- DELFINO, G.B. et al. Efeito do sulfato de vanadil sobre o comprometimento metabólico. *Rev Bras Med Esporte.* v.12, p. 356-360, 2006.
- EIJNDE, B.O. et al. Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT4 protein content after immobilization. *Diabetes.* v. 50, n. 1, p 18-23, 2001.
- FREIRE, T.O. et al. Efeito da suplementação de creatina na captação de glicose em ratos submetidos ao exercício físico. *Rev Bras Med Esporte.* v. 14, n. 5, p. 1-8, 2008.
- GILES, K.W.; MYERS. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature.* v. 206, n. 4979, 1965
- GREENHAFF, P.L. et al. Creatine ingestion augments muscle creatine uptake and glycogen synthesis during carbohydrate feeding in man. *J Physiol.* v. 491, p. 63-64, 1996.
- HENRIKSEN, E.J. et al. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* v. 259, p. 593-598, 1990.
- HIROSE, M. et al. Immobilization depress insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol.* v. 279, n. 6, p. 1235-1241, 2000.
- NEWSHOLME, E.; HARDY, G. Creatine: a review of its nutritional applications in sport. *Nutrition.* v. 14, n. 3, p. 322-324, 1998.
- NICHOLSON, W.F.; WATSON, P.A. Glucose uptake and glycogen synthesis in muscles from immobilized limbs. *J Appl Physiol.* v. 56, p. 431-35, 1984.
- PARISE, G. et al. Effects of acute creatine monohydrate supplementation on leucine kinetics and mixed-muscle protein synthesis. *J Appl Physiol.* v. 91, n. 3, p. 1041-7, 2001.
- PEARLMAN, J.P.; FIELDING, R.A. Creatine monohydrate as a therapeutic aid in muscular dystrophy. *Nutr Rev.* v. 64, n. 2, p. 80-8, 2006.
- REARDON, K.A. et al. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor Mrnas are up regulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle e Nerve.* v. 24, p. 893-899, 2001.
- SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* v. 20, n. 4, p. 665-679, 2006.
- SILVA CA, et al. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Br J Med Biol Res.* v. 39, p. 979-985, 2006.
- SILVA, C. A. et al. Utilization of neuromuscular electric stimulation in the acute phase of ankle immobilization: Study in rats. *J Chin Clinic med.* v. 4, p. 249-257, 2009.
- SIU, L.O.; RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* v. 28, n. 2, p. 234-236, 1970.
- TANAKA, T. et al. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular

Anexos

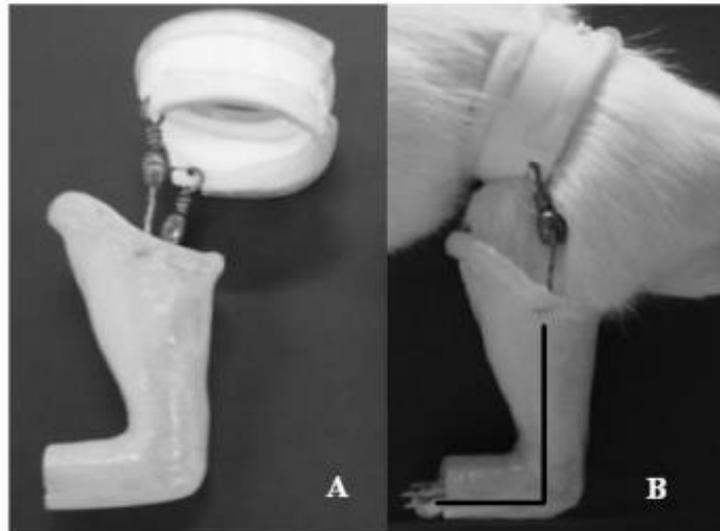


Figura 1 - Adaptação da órtese no membro posterior do animal. (A) modelo de órtese que não interfere na deambulação e permite a descarga de peso no membro imobilizado. (B) modelo de órtese adaptada ao animal mantendo o tornozelo na posição de 90°.

Tabela 1 – Perfil bioquímico plasmático dos ratos na condição controle e suplementados com creatina. Os valores representam a média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Índices	Controle	Suplementado com Creatina
Glicose (mg/dL)	105,24 \pm 4,9	108,75 \pm 4,0
Lactato (mmol/L)	1,72 \pm 0,1	1,83 \pm 0,1
Creatinina (μ mol/L)	36 \pm 1,0	38,6 \pm 0,8
AST (aspartatoaminotransferase)	110,80 \pm 18	122,80 \pm 6,8
ALT (alanina aminotransferase)	46 \pm 12	56 \pm 11
% de hidratação do músculo sóleo	15,5%	27,3%

Tabela 2. Concentração de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção mista (GM). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle; #p<0,05 comparado ao imobilizado.

Grupo	S	GB	GM
Controle	0,28 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01
Imobilizado	0,17 \pm 0,02 [*]	0,16 \pm 0,03 [*]	0,23 \pm 0,02 [*]
Tratado com creatina	0,32 \pm 0,01 ^{*#}	0,45 \pm 0,02 ^{*#}	0,41 \pm 0,01 ^{*#}
Imobilizado tratado com creatina	0,24 \pm 0,02 ^{*#}	0,24 \pm 0,02 ^{*#}	0,30 \pm 0,01 ^{*#}

Tabela 3. Peso (mg) do músculo sóleo dos diferentes grupos experimentais. Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle; #p<0,05 comparado ao imobilizado.

Grupo	Peso
Controle	128,30 \pm 10
Imobilizado	90,00 \pm 3,3 [*]
Tratado com creatina	126,07 \pm 8,2
Imobilizado com creatina	99,13 \pm 2,1 ^{*,#}

Tabela 4. Relação proteína total/DNA dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção mista (GM). Os valores correspondem a média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado.

Grupo	S	GB	GM
Controle	145,31 \pm 3,3	123,2 \pm 11	124,7 \pm 23
Imobilizado	120,04 \pm 3,6 [*]	93,60 \pm 1,4 [*]	100,68 \pm 3,8 [*]
Tratado com creatina	147,25 \pm 2,6	128,78 \pm 21	131,69 \pm 19
Imobilizado tratado com creatina	132,12 \pm 3,4 [#]	109,95 \pm 2,1 [#]	112,96 \pm 8,2 [#]