



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA
PÓS-EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA SINALIZAÇÃO MIOGÊNICA
E RENDIMENTO FÍSICO EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mauro Eduardo Porto da Silveira Junior

Santa Maria, RS, Brasil

2017

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA
PÓS-EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA SINALIZAÇÃO MIOGÊNICA
E RENDIMENTO FÍSICO EM RATOS**

Por

Mauro Eduardo Porto da Silveira Junior

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Bergamaschi Bresciani

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA
PÓS-EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA SINALIZAÇÃO MIOGÊNICA
E RENDIMENTO FÍSICO EM RATOS**

elaborada por
Mauro Eduardo Porto da Silveira Junior

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora:

Luiz Fernando Freire Royes, Dr.
(Presidente/Co-orientador)

Guilherme Bergamaschi Bresciani, Dr. (PUCV)
(Orientador)

Rômulo Pillon Barcelos, Dr. (UPF)
(1º membro da banca)

Leonardo Magno Rambo, Dr. (UNIPAMPA)
(2º membro da banca)

Santa Maria, 1º de Setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as coisas boas que tem acontecido em minha vida, pela oportunidade de ingressar, desenvolver e finalizar uma etapa tão importante na vida acadêmica que é o mestrado, e pela força e o apoio durante os momentos de dificuldade o qual passei. Sei que nunca estou sozinho!

A minha família, minha base, meu Pai Mauro, minha Mãe Clarice, minha Irmã Analice, meu **MUITO OBRIGADO** por tudo. Sem vocês me apoiando eu não teria chegado até aqui. Lembro-me da felicidade da minha mãe quando liguei pra ela contando que tinha passado na seleção de mestrado, era uma quarta-feira de manhã se bem me recordo. Ao meu Pai, agradeço por todo o esforço que fez por mim, pelo apoio financeiro durante toda minha jornada acadêmica. Nunca deixou faltar nada. A minha irmã, agradeço pelas conversas, pelas palavras de conforto durante meus desabafos quando as coisas não iam bem. **AMO MUITO VOCÊS TODOS!!!**

Agradeço também a minha namorada Angélica por todo apoio e companheirismo durante o decorrer do meu mestrado. Sem você do meu lado com certeza as coisas teriam sido muito mais difíceis. Agradeço pela sua compreensão quando não podia estar presente, quando tinha experimentos nos finais de semana e não podia ficar mais tempo com você. **EU TE AMO!!!**

Ao meu orientador Guilherme (Bresci), meu muito obrigado por tudo, pelo apoio e o esforço de me orientar, mesmo a distância. Agradeço pelas nossas conversas no skype. Sempre otimista e sensato. Peço desculpas por qualquer coisa e pelos experimentos e o “review” que deixei de fazer hehehehehe. Muito obrigado por tudo. Ao meu co-orientador Nando, que foi meu orientador desde a iniciação científica, quando entrei no BIOEx em 2012, agradeço por todos os ensinamentos durante a minha jornada acadêmica e pelo apoio durante o decorrer do mestrado. Apesar de ser meu co-orientador e ter ficado ausente durante o período do seu pós-doc no exterior, o senhor salvou o projeto, aos 45 minutos do 2º tempo, quando trouxe os anticorpos do meu trabalho hahahahahaha. Que dor de cabeça deu esses anticorpos... Mas agora são águas passadas!!!

Ao pessoal do BIOEx, Douglas (godinho), Vivi, Samurais (Leandro), Iuri, Luís com quem pude conviver mais durante o meu mestrado, muito obrigado por tudo, pela ajuda, pelas conversas, os almoços no RU. Deixo um agradecimento em especial ao Gustavo, por toda ajuda e

apoio durante o mestrado. Sempre pude contar com ele e nunca me deixou na mão. Obrigado pela força durante os experimentos. Esse trabalho também é teu.

Quero agradecer também ao pessoal do LABNEURO, as gurias, Ana, Thaíze, Ana Cláudia, Nai, Maiara, obrigado pela ajuda de vocês e por nos receberem tão bem no lab, quando o nosso estava em reforma. Aos professores Mauro e Ana Flávia, agradeço pelo apoio, pelo “tira dúvidas do western” e por nos deixar trabalhar em seu laboratório. Muito obrigado a todos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários, muito obrigado por auxiliarem no meu crescimento profissional.

Ao CNPq, obrigado pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço também as demais pessoas que de alguma forma fizeram parte dessa minha caminhada.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA PÓS-EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA SINALIZAÇÃO MIOGÊNICA E RENDIMENTO FÍSICO EM RATOS

AUTOR: Mauro Eduardo Porto da Silveira Junior

ORIENTADOR: Guilherme Bresciani

Local e data da defesa: Santa Maria, 1 de Setembro de 2017.

A creatina (Cr) é um dos compostos mais estudados no mundo devido às suas comprovadas propriedades ergogênicas. Nesse contexto, alguns estudos têm destacado outros benefícios da Cr, demonstrando possíveis efeitos tróficos sobre o músculo esquelético, bem como capacidades de minimizar o processo inflamatório. Exercícios físicos excêntricos (EE) causam microlesões no músculo esquelético, levando a um processo inflamatório exacerbado, o qual aumenta o catabolismo e diminui o anabolismo, retardando a recuperação muscular. Dessa forma, o objetivo desse estudo é investigar a influência da suplementação aguda com Cr sobre os processos de regeneração muscular após uma lesão muscular induzida por EE, verificando se a Cr é capaz de atuar na sinalização miogênica, amenizando as respostas inflamatórias e possibilitando, assim, a manutenção do rendimento físico em subsequentes testes de corrida. Para isso, ratos machos Wistar foram submetidos a um protocolo de EE em esteira rolante em velocidade constante por 90 min (5 min de corrida separados por 2 min de pausa) com 16° de inclinação negativa. Após a corrida, os animais foram divididos em 4 grupos: Controle, CMC (veículo 0,05%) , Cr (300mg/kg/dia), e Ibuprofeno (15mg/kg/dia). Ensaios bioquímicos visando verificar o conteúdo de Cr, IGF-1, PGE-2, Myf-6 e Myo-D, bem como análise histológica, foram realizados no músculo sóleo em 24 e 48 h após EE. Igualmente, análises de desempenho físico foram realizadas 48 h após o protocolo EE. A análise estatística revelou lesão muscular após EE, porém a Cr não foi capaz de minimizar esse processo. Por outro lado, os resultados mostraram que Cr foi eficaz na indução de um aumento nos níveis de IGF-1 e Myf-6 após EE, minimizando os níveis de PGE-2 e mantendo o desempenho físico dos animais 48 h após EE. Assim, nossos resultados sugerem que Cr suplementada de forma aguda pode influenciar processos de regeneração muscular após lesão induzida por EE.

Palavras-Chave: Compostos ergogênicos, exercício excêntrico, lesão muscular, inflamação, sinalização muscular, desempenho físico.

ABSTRACT

Dissertation of Master Degree
Graduate Program in Biology Science: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

INFLUENCE OF CREATINE SUPPLEMENTATION POST-ECCENTRIC EXERCISE ON MYOGENIC SIGNALING AND PHYSICAL PERFORMANCE IN RATS

AUTHOR: Mauro Eduardo Porto da Silveira Junior

ADVISOR: Guilherme Bresciani

Place and date of defense: Santa Maria, September 1th, 2017.

Creatine (Cr) is one of the most studied compounds in sports in the world due to its proven ergogenic properties. In this context, recent studies have highlighted other effects of Cr, demonstrating a possible trophic effect on skeletal muscle, as well as the ability to minimize the inflammatory process triggered by exercise. Eccentric exercise (EE) is associated to skeletal muscle damage, leading to an exacerbated inflammatory process, which ultimately slows muscle recovery. Thus, the objective of this study was to investigate the influence of acute Cr supplementation on myogenesis signaling and exercise performance after an EE-induced muscle damage protocol. Male Wistar rats performed a downhill running exercise on a treadmill at a -16° tilt and a constant speed for 90 min (5 min/bout separated by 2 min of rest). After, the animals were divided into 4 groups: a control unexercised, CMC exercise (vehicle - 0,05%), exercise Creatine (Cr – 300mg/kg/day) and exercise Ibuprofen (IBU – 15mg/kg/day). Biochemical assays to measure Cr concentration, IGF-1 and PGE-2 content, histology, and Myf-6 and Myo-D protein content were performed in soleus muscle at 24 and 48 h after a downhill running. Additionally, an exercise performance test was performed 48 h after the EE bout. Statistical analyses revealed that while IBU was effective on reducing muscle damage, Cr group presented muscle injury but effective to increase IGF-1 levels and Myf-6 protein content after EE. Additionally, Cr group presented lower levels of PGE-2 and sustained the exercise performance 48 h after EE bout. Thus, our results suggest that Cr supplementation may influence in the processes of muscle regeneration induced after injury by an EE bout.

Keywords: ergogenic compounds, eccentric exercise, muscle injury, inflammation, muscle signaling, exercise performance

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido Araquidônico

AINEs – Antiinflamatórios não-esteroidais

AKT – Proteína cinase B (também conhecida como PKB)

Cr – Creatina

CMC – Carboximetilcelulose

COX - Ciclooxygenases

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina 1

IL-1 β – Interleucina 1beta

IL-10 – Interleucina 10

LOXs - Lipoxigenases

mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

MyHC- Miosina de cadeia pesada

Myo-D – Fator de diferenciação miogênica D (ou 1)

MyF-6 - Fator de diferenciação miogênica 6

PGE-2 – Prostaglandina E-2

Pi3K - Fosfatidilinositol 3 cinase

PLA2 – Fosfolipase A2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Exercício Físico	10
1.1.1 Características do exercício físico	11
1.2 Exercício Excêntrico e Lesão Muscular	13
1.3 Inflamação Muscular	15
1.4 Sinalização Miogênica	16
1.5 Estratégias utilizadas para auxiliar na recuperação muscular	18
1.6 Antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs)	19
1.7 Creatina	20
1.7.1 Breve Histórico	20
1.7.2 Síntese e Distribuição	21
1.7.3 Creatina e Exercício	22
1.7.4 Creatina e Miogênese	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MANUSCRITO	27
3.1. Influence of creatine supplementation after an eccentric bout of exercise on myogenic signaling and exercise performance in rats.....	27
4. DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	49
6. CONCLUSÃO FINAL	51
7. ANEXO I	52
6.1. Trabalho em andamento	52
8. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Exercício Físico

A história do exercício físico está estreitamente ligada à história da humanidade. Para o homem primitivo, a atividade física apresentava um caráter utilitário de sobrevivência, uma vez que sua importância era evidenciada em atividades de caça, onde necessitava obter alimento para sobreviver, ou mesmo em situações de fuga de predadores. Hoje, os seres humanos, diferentemente dos animais, não utilizam mais o exercício físico somente como meio de sobrevivência, mas como uma ferramenta para melhora da qualidade de vida, seja como recreação ou como tratamento terapêutico (JI, 1995). De fato, Hipócrates (470-370 aC) foi um dos primeiros estudiosos do mundo ocidental a defender o exercício físico regular para melhorar a saúde (IVY, 2007).

Os efeitos globais do exercício físico sobre a saúde são descritos principalmente sobre o metabolismo e sistema cardiovascular (POWELL e PAFFENBARGER, 1985; BOOTH et al., 2002). Estudos demonstraram que as incidências de casos de diabetes tipo 2, doença cardíaca coronária e alguns tipos de câncer foram reduzidos em mulheres de meia idade através da prática de 30 minutos de exercícios de intensidade moderada (COLDITZ, CANNUSCIO e FRAZIER, 1997; MANSON et al., 1999; HU et al., 2001). Nesse contexto, estudos recentes demonstram que a prática de exercícios apresenta efeito cardioprotetor contra lesões induzidas por isquemia/reperfusão (POWERS, 2017). Entretanto, evidências clínicas e experimentais recentes demonstraram que os efeitos benéficos do exercício físico atuam também sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) (KIM et al., 2014)

Estudos demonstraram a eficiência protetora do exercício físico em diversos modelos de doenças como esclerose múltipla, doença de Huntington, Parkinson e Alzheimer, assim como epilepsia (ARIDA et al., 1999; LAURIN et al., 2001; TILLERSON et al., 2003; KOHL et al., 2007; SOUZA et al, 2009). Outros estudos clínicos e também em modelos animais mostram que o exercício físico é capaz de aumentar a capacidade de aprendizado, diminuir o declínio cognitivo decorrente do envelhecimento (KRAMER et al., 1999; COTMAN e BERCHTOLD, 2002), além

de proteger o SNC de insultos, como o acidente vascular encefálico (SPEISMAN et al., 2013; INOUE et al., 2014; HU et al., 2014) e traumatismo crânio encefálico (LIMA et al., 2009).

Em relação ao sistema periférico, a prática regular de exercícios físicos está bem consolidada na sociedade em consequência do seu grande leque de benefícios à saúde (NIEMAN, 2003; GLEESON, 2007). O exercício físico regular tem sido implicado principalmente na modulação do metabolismo oxidativo e do estado inflamatório, apresentando efeitos positivos sobre o sistema imunológico, estimulando-o a aumentar suas defesas contra infecções e, dessa forma, propiciar um ambiente antiinflamatório e antioxidante ao organismo (GLEESON, 2007). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que o exercício pode contribuir também para melhorar as respostas adaptativas hepáticas (BARCELOS et al; 2017), bem como modular positivamente as vias oxidativas/inflamatórias do fígado após traumatismo crânio encefálico (DE CASTRO et al, 2017). Em relação ao músculo esquelético, estudos destacam os efeitos benéficos do exercício físico na biogênese mitocondrial, manutenção das defesas antioxidantes, síntese de proteínas, hipertrofia muscular e proteção contra atrofias musculares induzidas por inatividade (PEDERSEN, 2012; JI, 2015).

1.1.1 Características do Exercício Físico

O exercício físico regular traz benefícios para a saúde como relatado no item anterior. Entretanto, a intensidade, a duração e a frequência da prática exercem papel chave na determinação das respostas fisiológicas, podendo modular o organismo positiva ou negativamente (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2003).

O exercício realizado de forma aguda, praticado esporadicamente, não possui as mesmas características benéficas que o exercício físico crônico, podendo causar um desequilíbrio em diversas funções do organismo. De fato, a simples realização de uma sessão de exercício intenso pode levar ao dano tecidual, causando pequenas microlesões nas fibras musculares, gerando dor muscular pós-exercício, além de levar um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumento do estresse mecânico e térmico, culminando no aumento da produção mediadores inflamatórios como IL-1b e TNF- α (WOODS et al, 2012).

Já a prática regular de exercícios físicos caracteriza-se pelo processo de adaptação do organismo, gerando uma melhora na capacidade cardiorrespiratória, redução da gordura corporal,

além de uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios, possibilitando um ambiente menos inflamatório ao organismo (GIBALA et al.; 2012). Além de melhorar a saúde e qualidade de vida, o treinamento físico também melhora o desempenho físico em determinadas atividades e ou esportes (GOMES, 2002). Durante cada sessão, variáveis como carga, duração, pausa, ação muscular, velocidade de execução do movimento, frequência semanal e amplitude dos movimentos devem ser manipuladas visando o aumento da força ou melhorias na capacidade aeróbica ou anaeróbica (GOMES, 2002).

Em relação ao tipo de ação muscular, durante a realização de exercícios físicos, o músculo esquelético é capaz de desempenhar 3 tipos de ações: concêntrico, isométrico e excêntrico. As ações concêntricas caracterizam-se quando o músculo gera tensão encurtando-se, ou seja, aproximando a origem da sua inserção muscular (exemplo – subida em escada, fases positivas de exercícios como agachamento e leg press 45°). Na ação isométrica, o músculo gera tensão sem alterar seu comprimento, ou seja, gera força mantendo uma posição estática. Já as ações excêntricas caracterizam-se quando o músculo gera tensão alongando-se, ou seja, afastando a origem da inserção (exemplo - corrida em declive – downhill - descidas em escadas, as fases negativas do agachamento e leg press 45°) (ENOKA, 1996).

Em relação às ações excêntricas, durante o movimento as fibras musculares geram força além de suas capacidades, podendo desempenhar até 20 % a mais de força que a contração concêntrica. Porém, ao contrário da ação concêntrica, menos unidades motoras são ativadas (ENOKA, 1996). Isso faz com que as fibras musculares ultrapassem suas capacidades de sustentar a tensão, ocasionando a interrupção mecânica de alguns sarcômeros, causando um trauma aos componentes contráteis do músculo incluindo a membrana do retículo sarcoplasmático, dos túbulos-T e do sarcolema, levando a pequenas microlesões no tecido muscular (ARMSTRONG et al., 1983; WARREN et al., 1993).

1.2 Exercício Excêntrico e Lesão Muscular

Atualmente, pesquisas científicas têm elucidado as características da contração excêntrica. Segundo Hyldahl e Hubal (2013), mais de 400 estudos sobre lesão muscular relacionada ao exercício excêntrico foram publicados na última década, com uma variedade de aplicações científicas pré-clínicas e clínicas. Nesse contexto, Maruhashi et al. (2007)

demonstraram que o treinamento excêntrico (*downhill*) preveniu o dano muscular causado por exercício excêntrico de alta intensidade. Apesar de estudos cada vez mais sofisticados e a busca constante pela compreensão dos mecanismos envolvidos na lesão muscular, a biologia da lesão muscular pelo exercício excêntrico é muito complexa. Nesse sentido, diversas hipóteses foram sugeridas para explicar a etiologia da lesão. Entretanto, os mecanismos exatos que fundamentam as fases iniciais desta não são completamente compreendidos até a presente data (FRIDEN e LIEBER, 2001; HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; CARMICHAEL et al., 2010; HYLDALH e HUBAL, 2013).

Diversos autores proporam que a tensão aumentada sobre as miofibrilas característica do exercício excêntrico levaria à distensão e ruptura de sarcômeros com consequente degradação de proteínas estruturais (MORGAN, 1990; FRIDEN e LIEBER, 2001; MORGAN e PROSKE, 2004; PROSKE e ALLEN, 2005). No entanto, análises de biopsias de músculos humanos submetidos a exercícios excêntricos têm evidenciado resultados discrepantes entre animais e pesquisas clínicas, mostrando que no músculo humano não ocorre à lesão diretamente na fibra muscular e que os danos musculares pós-exercício são ocasionados pelo processo inflamatório e distúrbios na homeostase do Ca^{+2} intracelular (YU, MALM e TORNELL, 2002; MALM e YU, 2012; YU et al., 2013). Crameri e colaboradores (2007) propuseram que as discordâncias entre resultados podem ocorrer em parte devido as diferenças entre os protocolos de contração muscular nos modelos utilizados, o qual impossibilita uma fidedigna comparação entre os resultados encontrados. A maioria dos estudos em humanos utiliza protocolos de contrações excêntricas em equipamentos específicos, tais como *leg press 45°* e cadeira extensora. Já em modelos animais, a maioria dos protocolos de lesão muscular são através de estimulação elétrica, embora estudos mais relacionados ao estudo da fisiologia do exercício físico utilizem protocolos de corrida em declive (*downhill*) (HYLDALH e HUBAL, 2013).

Independente da compreensão do exato mecanismo pelo qual é gerado o dano muscular pelo exercício excêntrico, é aceito entre a maioria dos autores que o declínio de força inicial é produzido por danos mecânicos. Clarkson e Sayers (1999) apontam os fatores mecânicos e consequente ruptura de sarcômeros como o episódio inicial, seguido por distúrbios na homeostase do cálcio, resposta inflamatória e síntese de proteínas relacionadas ao estresse. O dano gerado pelo exercício excêntrico ao retículo sarcoplasmático e ao sarcolema gera um influxo de Ca^{+2} o qual inicia uma cascata de eventos, gerando a ativação de proteases como a calpaína, levando a

degradação da membrana celular e ocasionando danos ainda maiores na estrutura do músculo esquelético (BYRD, 1992; REID et al., 1994; GISSEL e CLAUSEN, 2001; PROSKE e ALLEN, 2005). Um estudo realizado por nosso grupo mostrou que a atividade da enzima Ca^{+2} ATPase, responsável pelo bombeamento de íons Ca^{+2} de volta ao retículo sarcoplasmático, permaneceu reduzida por 48h após um protocolo de exercício excêntrico (RETAMOSO et al, 2016). Como é conhecido, altas concentrações de Ca^{+2} intracelular podem inibir a atividade a enzima Ca^{+2} ATPase, dessa forma mantendo Ca^{+2} livre dentro da célula (GISSEL e CLAUSEN, 2001).

Dessa forma, uma sobrecarga de Ca^{+2} intracelular tem sido sugerida como fator importante na ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA₂). Uma vez ativada, a PLA₂ catalisa a hidrólise dos fosfolipídeos de membrana, gerando um produto chamado Ácido Araquidônico (AA). O AA pode produzir mediadores inflamatórios, principalmente a partir da via das Ciclooxygenases (COXs), ocasionando a formação de prostaglandinas, tais como a Prostaglandina E2 (PGE₂) (TRAPPE e LIU, 2013). Além da formação de PGE₂, outros produtos de degradação dos componentes celulares são conhecidos por agirem como agentes quimiotáticos, atraindo células do sistema imunológico para o local das lesões (GISSEL E CLAUSEN, 2001). Uma vez no tecido muscular, neutrófilos e macrófagos produzem citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , iniciando um processo de limpeza e removendo os tecidos lesados (TIDBALL, 2005).

Dessa forma, a perda da integridade da membrana e a ativação de cascatas inflamatórias que ocorrem após um exercício excêntrico levam a sintomas que acometem atletas e entusiastas esportivos, os quais inclui inchaço no membro afetado (HOWELL; CHLEBOUN e CONATSER, 1993), diminuição na amplitude dos movimentos (ESTON; PETERS, 1999), diminuição na produção de força (KEHL, TREMPE e HARGREAVES, 2000), dor muscular tardia (ARMSTRONG, 1984), além do extravasamento de proteínas citoplasmáticas para o sangue, tais como a mioglobina, lactato desidrogenase (LDH) e creatina cinase (CK) (PAULSEN et al., 2012). Ambos eventos acabam prejudicando a recuperação muscular de atletas, podendo alterar os padrões de movimento e ocasionando lesões mais graves (CONNOLY et al, 2003; HYLDAHL e HUBAL; 2013). Tais processos podem afetar o rendimento físico de atletas, bem como aumentar o tempo de recuperação necessário entre sessões de treinamento. O resultado disso é uma perda global na performance de atletas de diferentes modalidades (CONNOLY et al, 2003; CLOSE et al, 2016).

1.3 Inflamação Muscular

A resposta inflamatória gerada pelo sistema imunológico tem a finalidade de remover o estímulo indutor e iniciar a recuperação tecidual do local agredido (TIDBALL, 2005; ZANOU e GAILLY, 2013). Após um estímulo lesivo ocorre a ruptura do sarcolema da fibra muscular, aumento da permeabilidade celular (RUDNICKI, 2004; GREFT et al., 2007; JÄRVINEN et al., 2005) e aumento dos níveis séricos de algumas proteínas, como a CK, que frequentemente estão restritas no citoplasma (RUDNICKI, 2004).

Os vasos sanguíneos localizados ao longo das fibras musculares também são lesados, o que possibilita a migração de células inflamatórias para o local da lesão nas fibras musculares (GREFT et al., 2007; JÄRVINEN et al., 2005). As principais células inflamatórias que invadem o local da lesão são neutrófilos e macrófagos (JÄRVINEN et al., 2007). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegar ao local da lesão (TIIDUS, 2008), com significante aumento em seu número nas primeiras 6 horas após lesão por miotoxina ou exercício físico (FIELDING et al., 1993; ORIMO et al., 1991). Sua principal função é a remoção por fagocitose dos elementos indesejáveis relacionados à lesão tecidual, ação considerada com ponto de partida para as respostas de reparo e crescimento tecidual. A quantidade de neutrófilos começa a declinar após 24h e concomitantemente ocorre aumento gradual de macrófagos teciduais no sítio da lesão (TIDBALL, 2005; ZANOU e GAILLY, 2013).

Os macrófagos formam a segunda sub-população de leucócitos que aparecem no local danificado. Existem diferenças de função entre os macrófagos que invadem o tecido danificado (TIDBALL, 2007). Macrófagos M1, os quais invadem o tecido nas primeiras 24h após a lesão, tem um papel mais ativo na remoção do tecido danificado, enquanto os macrófagos M2 entram nos tecidos danificados após 48-96h com a função de reparar o tecido muscular e estimular a regeneração muscular através da ativação de células satélites (TSIVITSE et al; 2003; TIDBALL, 2005; TIDBALL, 2007; ZANOU e GAILLY, 2013). Adicionalmente, os macrófagos residentes liberam mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β e TNF- α , fundamentais na sinalização inflamatória no tecido muscular (SMITH et al., 2008; TIIDUS, 2008).

O aumento da expressão de IL-1 β e TNF- α no músculo esquelético é uma importante resposta inicial das microlesões ocasionadas pelo exercício físico, visto que o aumento destas citocinas promove o próprio acúmulo de neutrófilos e macrófagos a fim de auxiliar no

remodelamento da fibra muscular (ROSA, 2009). Além dessas citocinas, a produção de PGE-2 a partir do metabolismo do AA durante uma resposta inflamatória também participa na modulação de inúmeros processos de adaptação do músculo esquelético ao exercício físico (TRAPPE & LIU, 2013). Alguns estudos demonstraram que em resposta ao exercício excêntrico, em determinadas condições as PGs podem propiciar uma ambiente anabólico no tecido muscular, estimulando a atividade de células satélites e aumentando a síntese de proteínas (TRAPPE et al., 2001; TRAPPE et al., 2002).

1.4 Sinalização Miogênica

A sinalização miogênica tem seu início após um estímulo lesivo que pode ser de natureza química, mecânica, como durante a realização de exercícios excêntricos (JÄRVINEN, 2005; RYALL et al., 2010); térmica, como a exposição do músculo esquelético à altas temperaturas, o que pode causar queimadura (SUGITA et al., 2011) ou à baixas temperaturas, o que pode causar congelamento (MIYABARA et al., 2010).

Como mencionado anteriormente, alguns mediadores inflamatórios liberados por macrófagos, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , além da produção de PGE₂, são capazes de ativar as células satélites (LI, 2003; CHEN et al., 2005; SERRANO et al., 2008; WANG et al., 2008). Estas são células mononucleadas e indiferenciadas, que em condições basais encontram-se em estado quiescente, e localizam-se entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular (GROUNDS, YABLONKA-REUVENI, 1993; MUIR et al., 1965; SCHULTZ, MCCORMICK, 1994). Entretanto, quando o músculo é submetido à estímulo lesivo, as células satélites são ativadas e passam a ser denominadas células precursoras miogênicas ou mioblastos, as quais proliferam-se (HAWKE, GARRY, 2001; WOZNIAK et al., 2005). Após a proliferação, ocorre a diferenciação das células precursoras miogênicas em mioblastos, fase esta marcada pelo aumento da expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs), tais como miogenina, Myo-D e fator miogênico 6 (Myf-6). O processo de diferenciação terminal, por sua vez, é caracterizado pela fusão dos mioblastos para a formação de miotubos, os quais passam a expressar miosina de cadeia pesada (MyHC) neonatal, a qual, posteriormente, é substituída pelas isoformas adultas de MyHC (LE GRAND e RUDNICKI, 2007; ZANOU e GAILLY, 2013). Um estudo em modelo animal conduzido por Touchberry e colaboradores (2012) mostrou que 48 horas após uma corrida

excêntrica houve aumento no conteúdo protéico de Myo-D e MyHC. Nesse mesmo contexto, em modelo animal de hipertrófia induzida por remoção de músculos sinergistas, outro estudo mostrou que a expressão de MRFs, tais como myf-5, myf-6 e miogenina, permaneceram elevados por até 7 dias após exercícios com sobrecarga (LOCKE et al, 2008).

Além das citocinas, vários fatores são responsáveis por ativar as células satélites e, desta forma, é importante ressaltar que o equilíbrio entre estímulos extrínsecos e sinais intracelulares convergem para preservar a função de tais células (RANDO, 2012). Dentre os fatores envolvidos na ativação das células satélites destacam-se: fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*; FGF) e fatores de crescimento semelhante à insulina I e II (*insulin-like growth factor-I* e *insulin-like growth factor-II*; IGF-I e IGF-II) (CAROSIO et al., 2011; GREFT et al., 2007; KUANG et al., 2008). O IGF-I, além de ativar as células satélites, promove a ativação da via de sinalização PI3-K/AKT/mTOR, que é uma importante via responsável por induzir hipertrófia muscular por meio da ativação de síntese proteica, além de ser importante para a etapa de diferenciação muscular (SCHIAFFINO, 2010). Nesse sentido, Pereira e colaboradores mostraram que apenas uma sessão de exercício físico excêntrico em camundongos é capaz de induzir um aumento nos níveis de IGF-1, o qual levou a um aumento na expressão de IRS-1 (Insulina receptor substrato-1) e AKT 24h após o exercício. Além disso, no mesmo estudo foi demonstrado que o treinamento excessivo (*overtrainning*) causado por consecutivas sessões de exercício físico excêntrico leva a uma redução significativa nas vias anabólicas comandadas por IGF-1/AKT após 8 semanas de exercício (PEREIRA et al, 2014).

Apesar da inflamação ser um processo natural de adaptação ao exercício, proteção do músculo esquelético, e estar envolvida, em parte, com o aumento de síntese protéica e hipertrófia muscular (TRAPPE e LIU; 2013), uma resposta inflamatória exacerbada acaba retardando o processo de regeneração muscular, pois muitas proteínas relacionadas com o aumento de síntese protéica, bem como a atividade das células satélites, são inibidas por mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , TNF- α e PGE-2 (PAULSEN et al; 2012). Além disso, o aumento da sinalização catabólica pós-exercício através das proteínas FOXO, as quais inibem a via AKT/mTOR, contribuem para o atraso nos processos regenerativos musculares (SCHIAFFINO et al; 2013; MARCOTTE et al; 2015). Todos esses fatores acabam interferindo no desempenho de atletas em subsequentes exercícios em um curto espaço de tempo (HYLDAHL and HUBAL; 2013). Nesse sentido, com o intuito de amenizar as respostas inflamatórias e acelerar a recuperação muscular, o

uso de intervenções terapêuticas para potencializar a recuperação tem sido amplamente difundido no esporte.

1.5 Estratégias utilizadas para auxiliar na recuperação muscular

A lesão muscular causada pelo exercício é algo muito comum no esporte. Nesse contexto, numerosas intervenções terapêuticas têm sido propostas com o objetivo de ajudar na recuperação dos atletas. Uma das mais conhecidas estratégias de tratamento de lesão é o método PRICE (Proteção, Repouso, Gelo (*Ice*), Compressão e Elevação). O objetivo do princípio PRICE é reduzir ao máximo o edema muscular, dessa forma minimizando o processo inflamatório (FERNANDES et al, 2009). Em relação ao uso do gelo, estudos mostram que o tratamento de crioterapia está associado a uma significativa redução do hematoma nas fibras musculares lesadas, reduzindo assim a inflamação e possibilitando uma regeneração muscular acelerada (HURME et al, 1993).

Outros métodos conhecidos de tratamento de lesão muscular incluem a massagem no local da lesão, alongamentos, exercícios leves, imobilização e descanso, ultra-som e estimulação elétrica (CONNOLY et al, 2003). A suplementação com coquetéis antioxidante pós-exercício também é utilizada no esporte. Evidências sugerem que espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerados pelo exercício físico contribuem para aumentar o dano muscular. Portanto, neutralizando a produção de EROs com suplementos antioxidantes poderia ajudar na redução da lesão pós-exercício físico (PEAKE et al, 2005). Assim, tratamentos que auxiliem a amenizar as respostas inflamatórias, acelerar a recuperação muscular e o rápido retorno as treinos e competições tem sido amplamente usados no meio esportivo (CONNOLY et al, 2003). Neste sentido, o uso de antiinflamatórios não-esteroidais, os chamados AINEs, tem aumentado significativamente entre atletas de diferentes modalidades. Um dos mais utilizados atualmente é o ibuprofeno (TRAPPE e LIU; 2013).

1.6 Antiinflamatórios Não-Esteroidais (AINEs)

Muitas das estratégias de tratamento para acelerar a recuperação e aliviar os sintomas de inflamação pós-exercícios em diversas modalidades esportivas envolvem o uso de AINEs

(CONNOLLY et al; 2003; SCHOENFELD, 2012). Esses podem ser classificados em simples ou dupla-ação. Drogas como Aspirina, Naproxeno e Ibuprofeno têm suas ações baseadas na inibição não-seletiva das enzimas ciclooxygenases (COX), sendo assim considerados drogas de simples ação, diminuindo a produção de PGs e minimizando o processo inflamatório. Já drogas como cetoprofeno e diclofenaco são consideradas de dupla-ação, bloqueando a via de ação das enzimas COXs e LOXs (CONNOLLY et al; 2003). A importância no bloqueio das COXs se deve ao fato que essas enzimas catalisam a oxidação do AA liberado pela membrana celular através da ação da PLA₂ em resposta a estímulos térmicos, mecânicos e/ou químicos (LEES et al., 1991). O produto final do metabolismo do AA são as PGs, prostaciclinas (PC) e tramboxanos (TX), substâncias químicas que são mediadoras do processo de inflamação (TRAPPE and LIU; 2013).

A maioria dos AINES é absorvida rapidamente pelo organismo. Grande parte dos AINEs é metabolizada pelo fígado, através da ação das enzimas citocromo P450, abundantes nesse tecido (EICHELBAUM et al, 2006). Os fármacos normalmente apresentam um pico de concentração plasmática em aproximadamente 1 a 2 horas, dependendo de suas características de formulação, e sua meia-vida ($t_{1/2}$) é de aproximadamente 2,5 horas (GRAHAM e WILLIAMS, 2004). Dessa forma, muitos atletas hoje fazem uso de AINEs com objetivo de diminuir o processo inflamatório e acelerar os processos de recuperação pós-exercício físico, possibilitando assim um rápido retorno aos treinos e competições (KRENTZ et al., 2008).

Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que o uso de antiinflamatórios após a realização de exercícios físicos pode interferir com as respostas adaptativas musculares (SCHOENFELD; 2012). Estudos mostraram que o uso prolongado de AINES podem causar uma diminuição na síntese de proteínas (MARKWORTH et al; 2014), inibição da atividade das células satélites e redução nos níveis de IGF-1 (MIKKELSEN et al; 2009) e consequente redução da hipertrofia muscular (TRAPPE et al; 20011), eventos que poderiam levar a uma diminuição no desempenho físico a longo prazo (CONNOLLY et al; 2003). Além disso, o uso constante de medicamentos antiinflamatórios pode apresentar certos riscos para a saúde, como problemas gastrointestinais (VAN WIJCK et al, 2012). Dessa forma, pesquisas objetivando a descoberta de novas estratégias farmacológicas menos prejudiciais ao organismo e que ajudem a aumentar o desempenho físico de atletas têm ganhado ênfase nas ultimas décadas (CLOSE et al, 2016).

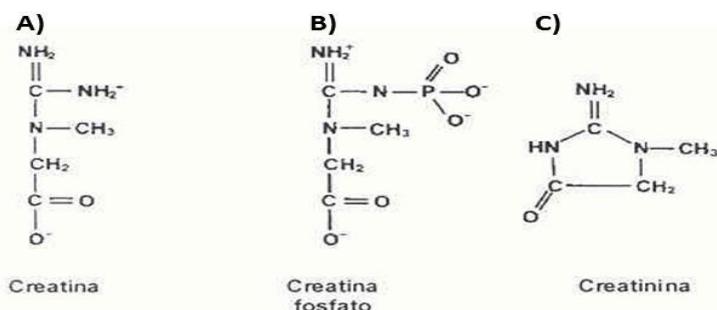
1.7 Creatina

1.7.1 Breve Histórico

A Creatina (ácido 2-metil guanidinoacético) é um composto guanidínico endógeno que foi primeiramente isolado em 1835 por Chevreul em um extrato de carne (Figura 1). Quase cem anos mais tarde, Fiske e Subbarow (1927) juntamente com Eggleton & Eggleton descobriram a PCr, que devido a sua natureza lábil foi chamada de “fosfosgen”. Em 1930, Lundsgaard demonstrou que a contração muscular era acompanhada por uma maior quebra de PCr do que de uma produção de lactato, e propôs que a PCr apresentava um envolvimento central no suporte energético para a contração muscular (PERSKY e BRAZEAU, 2001).

Em 1934, Lohmann descobriu a reação da enzima Creatina Kinase (CK), na qual o grupo γ -fosfato do ATP é transferido a Cr para formar ADP e PCr. A identificação das isoenzimas mitocondrial e citosólica da CK nas décadas de 1960 e 1970 levou Saks e colaboradores (1978) e também Bessman e Geiger (1981) a propor a “lançadeira da PCr”. De acordo com essa hipótese, as isoenzimas mitocondrial e citosólica da CK trabalham em direções opostas. Enquanto a isoenzima mitocondrial da CK catalisa a síntese de PCr a partir do ATP produzido pela fosforilação oxidativa na matriz mitocondrial, a isoenzima citosólica catalisa a regeneração do ATP a partir da PCr nos sítios de consumo. Dessa maneira o sistema CK/PCr/Cr aumenta consideravelmente a capacidade total para o transporte intracelular do fosfato de alta energia (PERSKY e BRAZEAU, 2001).

Figura 1. Estrutura química das moléculas de creatina, fosfocreatina e creatinina. Adaptado de PERSKY e BRAZEAU, 2001

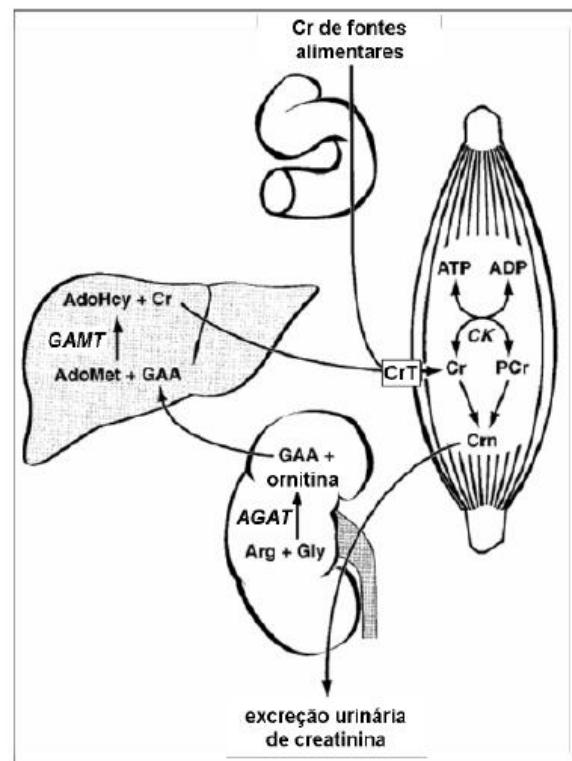


1.7.2 Síntese e distribuição

A síntese de Cr se dá a partir da glicina, arginina e S-adenosilmetionina nos rins, fígado, pâncreas, testículos. O primeiro passo na síntese envolve a transferência reversível de um grupo amidino da arginina formando guanidinoacetato e ornitina na reação catalisada pela enzima L-arginina: glicina amidinotransferase (AGAT) (figura 2). A segunda etapa, onde a transferência irreversível do grupo metil da S-adenosilmetionina é doado para o guanidinoacetato pela S-adenosilmetionina: N-guanidinoacetato metiltransferase (GAMT), formando Cr (PERSKY e BRAZEAU, 2001). A Cr é também obtida exogenamente pela dieta no consumo de carnes e peixes (BALSOM et al., 1994). São necessários aproximadamente dois gramas de creatina diariamente, obtidos tanto da dieta quanto da síntese endógena (CASEY e GREENHAFF, 2000). Sabe-se que a concentração total de Cr intracelular é cerca de 120-125 mmol/kg de peso seco, resultando em 120g deste composto em um indivíduo de 70 kg (PERSKY e BRAZEAU, 2001).

A Cr desempenha uma importante função na ressíntese de ATP e também no tamponamento de íons H^+ nos tecidos, exigindo continuamente uma substituição nos estoques de Cr através da síntese alimentar ou corporal (WALKER, 1979). Uma vez formada, a Cr entra na circulação por difusão e pode ser transportada para o interior dos tecidos contra uma gradiente de concentração por um transportador Na^+/Cl^- dependente (GUERRERO-ONTIVEROS e WALLIMANN, 1998), podendo ser armazenada tanto na forma livre (Cr), quanto na forma fosforilada (PCr). Estima-se que 95% da Cr corporal se encontre no músculo esquelético, principalmente em fibras musculares de contração rápida; 90% da Cr muscular está armazenada na forma de PCr (PERSKY e BRAZEAU, 2001). Os 5% restantes são encontrados no cérebro, fígado, rins e testículos (WALKER, 1979). A Cr pode ser eliminada na forma de creatinina: cerca de 2 g de Cr são convertidas em creatinina diariamente através de uma reação não enzimática. Esta, por sua vez, atravessa livremente a membrana celular sendo posteriormente excretada pelos rins por filtração glomerular (GREENHAFF, 1997; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

Figura 2. Metabolismo da creatina no organismo. GAMT - S-adenosil-Lmetionina: N-guanidinoacetato metil transferase; AGAT - L-arginina: glicina amidino transferase; Crn - creatinina; GAA - guanidino acetato; Arg - arginina; Gly - glicina ; AdoMet - S-adenosil-Lmetionina; AdoHcy - S-adenosil-L-homocisteína; CrT - transportador de creatina (Adaptado de WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).



1.7.3 Creatina e Exercício

Devido a sua importância fisiológica como mecanismo de reserva energética (ATP), principalmente no músculo (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000), como transportador de ATP dos sítios de produção (mitocôndria) para os sítios de consumo (citosol) (WALLIMANN et al., 1998) e como tampão energético (PAN e TAKAHASHI, 2007), a Cr tem sido utilizada por atletas como suplemento alimentar, para melhorar a performance (PERSKY e BRAZEAU, 2001).

Alguns estudos revisaram os resultados de pesquisas e indicaram que a ingestão de Cr não aumenta o desempenho em protocolos de exercícios de resistência (aeróbios), mas eleva o desempenho em atividades de alta intensidade e curta duração (anaeróbios), especialmente quando estas são realizadas de forma intermitente (BEMBEN; LAMONT, 2005; GUALANO et al., 2008). Estudos feitos com corredores de *cross-country* (BALSOM; SODERLUND; EKBLOM, 1994; ASTORINO et al., 2005) e de longa distância (STROUD et al., 1994) não observaram efeito ergogênico na suplementação com Cr, demonstrando que realmente nesse tipo de exercício físico os indivíduos não são beneficiados com a suplementação. Por outro lado,

Kelly e Jenkins (1998) mostraram que após um período de 28 dias de suplementação de Cr atletas de levantamento de peso tiveram aumentos significativos de força em testes de uma repetição máxima (1-RM) e de repetições máximas a 85% de 1-RM.

Nesse mesmo contexto, Tarnopolsky e MacLennan (2000) constataram melhoras significativas na potencia máxima de homens e mulheres medida através de um cicloergômetro após o uso de Cr por um período de sete semanas. Esses resultados discrepantes da suplementação com Cr em exercícios aeróbios X anaeróbios podem ser explicadas pelas fontes energéticas utilizadas durante cada tipo de exercício. Nos exercícios de resistência (aeróbios - 60% a 85% VO₂máx) a principal via energética do organismo é a oxidativa, tendo as gorduras como principal substrato energético. Durante exercícios de alta intensidade e curta duração (anaeróbios – 85% a 100% VO₂máx) o principal fornecimento de energia vem do sistema fosfagênico/glicolítico (MAUGHAN, 2000). Esse sistema é favorecido pela suplementação com Cr, que tem com papel principal a doação de um grupo fosfato de alta energia para a rápida ressíntese de ATP, assim potencializando a produção de força e energia durante exercícios intensos (PERSKY e BRAZEAU, 2001).

Bassit e colaboradores demonstraram que a suplementação prévia com Cr também foi eficaz em reduzir os marcadores de lesão muscular em atletas após uma competição de *Ironman* (BASSIT et al. 2008; BASSIT et al. 2010). Resultados similares foram obtidos por Deminice e colaboradores, que demonstraram que a suplementação com Cr foi capaz de reduzir os marcadores inflamatórios pós-sprints, possibilitando, assim, uma melhora no desempenho físico dos participantes (DEMINICE et a.; 2013). Já Cooke e colaboradores encontraram que a suplementação com Cr foi eficaz em acelerar a recuperação da força em indivíduos submetidos a exercícios físicos excêntricos (COOKE et al, 2009). Em estudos realizados com animais, a suplementação com Cr também apresentou efeitos positivos. Ogborn e colaboradores (2011), utilizando camundongos transgênicos FRG1 (modelo que apresenta atrofia e disfunção muscular), encontraram que a suplementação com Cr apresentou efeitos superiores no desempenho físico nos testes de força, equilíbrio e corrida à exaustão quando comparados ao grupo não suplementado. Além disso, apenas a suplementação com Cr aumentou o peso dos animais e os níveis de PGC-1 α , importante marcador de biogênese mitocondrial (OGBORN et al, 2011).

Dessa forma, diversos estudos demonstram que a suplementação de Cr pré-exercícios contribui para diminuir a fadiga muscular, melhora o aporte energético e proporciona uma rápida recuperação pós-exercício físico (TARNOPOLSKY, 2011). Destaca-se que a maioria dos estudos investigando os efeitos ergogênicos da Cr utiliza um protocolo crônico de suplementação, onde é feita uma fase de saturação com 20g de Cr por dia (em torno de 300 mg/kg) durante 3 a 5 dias antes do exercício, causando um aumento de 15-20% nos níveis de Cr muscular (HULTMAN, 1996). Outros protocolos utilizam 5g de Cr por 15 a 30 dias (CASEY e GREENHAFF, 2000). Cabe destacar que a suplementação com Cr é usualmente feita antes da realização de exercício físico, sendo poucos os estudos que pesquisaram os efeitos de sua suplementação pós-exercício físico (COOPER et al, 2012).

1.7.4 Creatina e Miogênese

Os benefícios da Cr vão além dos obtidos pelos atletas enquanto a melhoramento da performance (SESTILI et al.,2006). Nas últimas décadas, alguns estudos têm sugerido outros papéis que a Cr pode desempenhar no organismo. Suas funções antioxidante (SESTILI et al; 2011), anti-inflamatória (NOMURA et al., 2003), bem como mediador da proliferação e diferenciação de células satélites (OLSEN et al; 2006) tem sido descritas na literatura. Com relação ao crescimento e desenvolvimento musculoesquelético, estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que a Cr apresenta efeitos positivos no aumento da síntese de proteínas (DELDICQUE et al; 2007), hipertrofia de miotubos (LOUIS et al; 2004), e aumento nos níveis de IGF-1 (DELDICQUE et al; 2005) e expressão de MRFs (WILLOUGHBY et al; 2003), bem como diminuição de miostatina, proteína importante na sinalização catabólica muscular pós-exercício físico (SAREMI et al; 2010). Uma acelerada capacidade de recuperação muscular após exercício permite ao atleta voltar aos treinos ou competições mais rapidamente, assim aumentando seu desempenho com o passar do tempo (CONNOLLY et al, 2003; BEMBEM e LAMONT, 2005). Dessa forma, inúmeros atletas beneficiam-se da utilização de Cr com objetivo de melhorar o desempenho e a recuperação muscular (TARNOPOLSKY, 2010; COOPER et al, 2012). Além disso, é conhecido que os processos miogênicos estão relacionados com a via AKT/mTOR, a principal via de síntese proteica e hipertrofia muscular. Da mesma forma, a atividade das células satélites (células-tronco musculares) tem um importante papel na

manutenção do tecido muscular e contribuem significativamente nos processos miogênicos (SCHIAFFINO et al; 2013). Neste sentido, tem-se especulado que a Cr pode aumentar o estado de fosforilação das proteínas AKT/mTOR, agindo como um molécula co-ativadora, assim como estimular a atividade de células satélites, ampliando a sinalização miogênica (GUALANO et al; 2010b). Entretanto, os mecanismos pelos quais a Cr exerce seus efeitos pleiotrópicos no tecido muscular esquelético ainda não foram elucidados (SESTILI et al; 2016). Ressalta-se que a maioria dos estudos fez uso de um protocolo crônico de suplementação; a pesquisa sobre os efeitos agudos da Cr pós-exercício físico ainda é incipiente (HESPEL e DERAVE, 2007).

Assim, sabendo que: 1) o aumento na síntese de proteínas leva ao processo de hipertrofia muscular a longo prazo, 2) a atividade das células satélites acelera os processos de regeneração muscular, e que 3) ambos eventos propiciam uma melhora no desempenho físico de atletas (FERNANDES et al; 2012), o estudo de compostos que ampliem a sinalização miogênica e apresentem capacidades anti-inflamatórias capazes de amenizar a lesão muscular causada pelo exercício físico sem interferir de forma negativa em processos fisiológicos adaptativos torna-se importante na fisiologia do exercício físico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar se a suplementação com Cr é capaz de influenciar as respostas inflamatórias e, consequentemente, potencializar a sinalização miogênica em 24 e 48h após lesão muscular induzida por exercício excêntrico agudo em ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar se a suplementação com Cr 24 e 48h após exercício excêntrico:

- Causa alterações no estado de fosforilação das proteínas Myo-D e Myf-6 no músculo sóleo de ratos;
- Modula os níveis de IGF-1 e PGE-2 no músculo sóleo;
- Altera os níveis de Cr no plasma e sóleo;
- Ameniza os danos teciduais no músculo sóleo;
- Influencia no rendimento físico dos animais.

3. MANUSCRITO

INFLUENCE OF CREATINE SUPPLEMENTATION AFTER AN ECCENTRIC BOUT OF EXERCISE ON MYOGENIC SIGNALING AND EXERCISE PERFORMANCE IN RATS

Mauro E.P. Silveira Junior^{1,2}, Gustavo Cassol^{1,3}, Rômulo P. Barcelos⁴, Marcel H. M. Sari², Cristina W. Nogueira², Karen L. Moreira⁵, Patrícia S. do Nascimento⁵, Michele R. Fighera^{1,6}, Luiz F.F. Royes^{1,2}, Guilherme Bresciani^{7*}

¹*Laboratório de Bioquímica do Exercício, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

³*Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil*

⁴*Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil.*

⁵*Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

⁶*Departamento de Neuropsiquiatria, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

⁷*Grupo de Investigación en Rendimiento Físico y Salud (IRyS), Escuela de Educación Física, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.*

Periódico

Amino Acids

***Corresponding Author:** Guilherme Bresciani
 Grupo de Investigación en Rendimiento Físico y Salud (IRyS)
 Escuela de Educación Física
 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
 Valparaíso, Chile
 Email: guilhermebresciani@gmail.com

INFLUENCE OF CREATINE SUPPLEMENTATION AFTER AN ECCENTRIC BOUT OF EXERCISE ON MYOGENIC SIGNALING AND EXERCISE PERFORMANCE IN RATS

ABSTRACT

Creatine (Cr) is one of the most studied compounds in sports in the world due to its proven ergogenic properties. In this context, recent studies have highlighted other effects of Cr, demonstrating a possible trophic effect on skeletal muscle, as well as the ability to minimize the inflammatory process triggered by exercise. Eccentric exercise (EE) is associated to skeletal muscle damage, leading to an exacerbated inflammatory process, which ultimately slows muscle recovery. Thus, the objective of this study was to investigate the influence of acute Cr supplementation on myogenesis signaling and exercise performance after an EE-induced muscle damage protocol. Male Wistar rats performed a downhill running exercise on a treadmill at a -16° tilt and a constant speed for 90 min (5 min/bout separated by 2 min of rest). After, the animals were divided into 4 groups: a control unexercised, CMC exercise (vehicle - 0,05%), exercise Creatine (Cr – 300mg/kg/day) and exercise Ibuprofen (IBU – 15mg/kg/day). Biochemical assays to measure Cr concentration, IGF-1 and PGE-2 content, histology, and Myf-6 and Myo-D protein content were performed in soleus muscle at 24 and 48 h after a downhill running. Additionally, an exercise performance test was performed 48 h after the EE bout. Statistical analyses revealed that while IBU was effective on reducing muscle damage, Cr group presented muscle injury but effective to increase IGF-1 levels and Myf-6 protein content after EE. Additionally, Cr group presented lower levels of PGE-2 and sustained the exercise performance 48 h after EE bout. Thus, our results suggest that Cr supplementation may influence in the processes of muscle regeneration induced after injury by an EE bout.

Keywords: ergogenic compounds, eccentric exercise, muscle injury, inflammation, muscle signaling, exercise performance

Introduction

Regular exercise has long been recognized as a tool for improving health and quality of life (NIEMAN, 2003; GLEESON, 2007). However, it is well known that exercise modalities that require great amount of eccentric contractions are associated with increased damage to skeletal muscles (HYLDAHL and HUBAL 2013). Evidence accumulated over the last decades suggests that the tension generated on the myofibrils during eccentric contractions leads to distension and rupture of some sarcomeres, causing the loss of myofibrillar functionality, with consequent damage to the cell membrane and subsequent inflammatory response (FRIDEN and LIEBER, 2001; PROSKE and ALLEN, 2005).

In order to repair exercise-related damages, neutrophils and macrophages accumulate in muscle tissue within the first hours after the damaging stimulus (TIDBALL, 2007). The release of inflammatory mediators, such as PGE2, assist the recruitment of neutrophils and macrophages to trigger signaling for muscle regeneration caused by exercise (RYALL et al., 2010). When skeletal muscle undergoes small injuries, satellite cells are activated and are referred to as myogenic precursor cells or myoblasts (WOZNIAK et al., 2005). During proliferation and differentiation of myoblasts, an increase in the expression of myogenic regulation factors (MRFs), such as Myo-D and myogenic factor 6 (Myf-6), takes place to trigger the synthesis of new myotubes (LE GRAND and RUDNICKI, 2007; ZANOU and GAILLY, 2013). In this context, the insulin-like growth factor I (IGF-I) plays a key role in the signaling of satellite cells (CAROSIO et al., 2011). In addition to that, IGF-1 promotes activation of the AKT/mTOR signaling pathway, which is the main responsible for protein synthesis signaling in the exercising muscle (SCHIAFFINO et al., 2013).

It is known that some inflammatory mediators, under physiological conditions, are able to activate muscle satellite cells during muscle regeneration (CHEN et al., 2005; TRAPPE and LIU, 2013). However, although inflammation is a natural process towards exercise adaptation, protection and repair of skeletal muscle (TRAPPE and LIU, 2013), high levels of inflammatory mediators for a prolonged period of time interfere in the activation of the satellite cells and the mechanisms of muscle regeneration (PEDERSEN, 2012). In this sense, athletes make use of several pharmacological strategies to ameliorate inflammatory responses and accelerate muscle recovery after exercise, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (CONNOLLY et al., 2003; TRAPPE and LIU, 2013).

These drugs act as non-selective inhibitors of cyclooxygenase (COX) enzymes, thus being considered as single action drugs, decreasing the production of prostaglandins and minimizing the inflammatory process (SCHOENFELD, 2012). However, studies have shown that anti-inflammatory drugs intake after exercise may also attenuate skeletal muscle adaptations to exercise due to decreases on satellite cell signaling and reduced IGF-1 levels (MIKKELSEN et al., 2009; SCHOENFELD, 2012; MARKWORTH et al., 2014). Thus, the study of new compounds able to modulate inflammation without interfering in the adaptive pathways related to skeletal muscle adaptations to exercise are need.

Creatine (2-methyl guanidinoacetic acid) is a guanidine compound endogenously synthesized from the amino acids glycine, metionin and arginine, and may also be easily obtained through meat and fish consumption (PERSKY

and BRAZEAU, 2001). Considering its natural occurrence, Cr is the most studied compound in sports scenario worldwide (GUALANO et al., 2008). It is well documented that the consumption of Cr provides numerous ergogenic effects, improving the performance of athletes in several sports without potentially damaging side effects under safe doses (COOPER et al., 2012). However, during the last years Cr has proved to present other muscle-related benefits (SESTILI et al., 2016). Recent studies have shown that Cr may present trophic effects on skeletal muscle, such as increased levels of IGF-1 (DELDICQUE et al., 2005), increased MRFs (WILLOUGHBY et al., 2003) as well as reduction of post-exercise muscle catabolic signaling (SAREMI et al., 2010). These findings point out to a possible role of Cr on skeletal muscle myogenic signaling. However, most studies have studied chronic Cr supplementation protocols, while acute protocols to decipher the associated mechanisms are still scarce (HESPEL and DERAVE, 2007). Besides, Cr supplementation has been extensively studied before exercise, while its use after exercise has been scarcely investigated. Therefore, the purpose of this study was to verify the influence of acute supplementation with Cr in parameters related to myogenic signaling, as well as to evaluate the muscular recovery capacity in a subsequent exercise performance test after an eccentric exercise bout in rats

MATERIALS AND METHODS

Animals and Reagents

Adult male Wistar rats (200 - 250g) were kept under controlled environmental conditions (12:12 h light - dark cycle, 24±1 °C, 55% relative humidity). Experimental protocols were designed in order to use as few animals as possible, and also to avoid suffering during the procedures. The animal experimentation reported in this study has been carried out in accordance with the policies of the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996. The local Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Santa Maria approved the study protocols (protocol numb 3947160215). The reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Study design

A total of 80 animals were used in this study. The animals were divided into 4 groups: a control unexercised, CMC exercise (vehicle), exercise Creatine (Cr) and exercise Ibuprofen (IBU). The exercise group performed a downhill running (eccentric exercise) with rest and exercise bouts after an adaptation period. The physical performance analyzes were performed 48h after downhill running. For biochemical assays, the rats were anesthetized, sacrificed and the soleus muscle was immediately removed at 24 and 48h after downhill running and frozen at -80 °C for analysis. Figure 1 depicts the study design

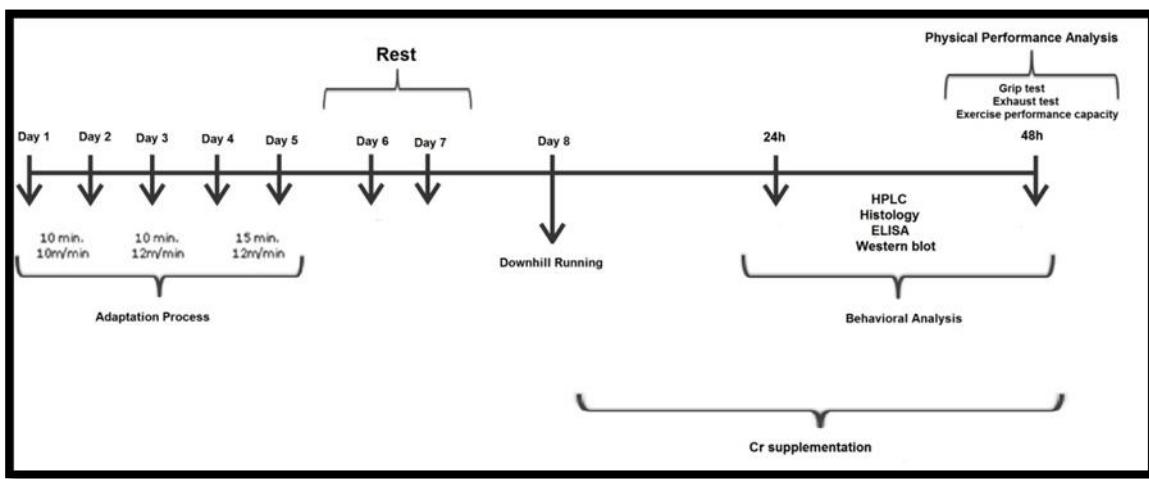


Figure 1- Time line of the experimental procedures of the study

Treadmill Adaptation and Downhill Running

First, the eccentric exercise group was familiarized with the treadmill (Insight Instruments®, model EP-131, Brazil) for 5 days using an adaptation protocol that consisted of 10 m/min for 10 min on the first and second days, 12 m/min on the third day, and 12 m/min for 15 min on the fourth and fifth days (0° of slope throughout the adaptation protocol). Two days after the adaptation period, animals performed a downhill running protocol as previously described (LIMA-CABELLO et al., 2010), with few modifications. Animals ran 90 min running (5 min/bout separated by 2 min of rest) at 16m/min with a -16° incline.

Cr supplementation and ibuprofen administration

After the eccentric exercise, animals were divided into 4 groups: 1) Control (not exercised), 2) Eccentric exercise (EE) + CMC vehicle (0.05%), 3) EE + Cr 300 mg/kg/day (PERSKY and BRAZEAU, 2001) and 4) EE + Ibuprofen 15 mg/kg/day (LILES and FLECKNELL, 1992). Supplementation was given orally and divided into 4 equal doses throughout the day. The use of anti-inflammatory ibuprofen is intended to be a control of myogenic signaling, since studies have shown that anti-inflammatory drugs may attenuate the adaptations of muscle tissue to exercise (MIKKELSEN et al., 2009; TRAPPE and LIU, 2013, MARKWORTH et al., 2014).

Grip test

To evaluate the motor performance/strength production of the rats, a grasping protocol test was used as previously described (BERTELLI and MIRA, 1995) with few modifications. For this, a wire grid (2.5 mm diameter) was fixed to a plate from an ordinary electronic scale. A 500 g weight was put on the balance plate to subtract the results obtained from the grips of rats. Then, the rats were allowed to grasp the wire grid while being lifted by the tail

with increasing firmness until they loosened their grip. The rats were tested three times with 1 min of rest between bouts, and the mean value of performance (500 g - value recorded) was calculated.

Exhaustion test

The exhaustion test was performed as described by ROSA et al. (2009). After 48 h of the eccentric exercise bout, animals were submitted to a protocol (insight equipments, SP, Brazil) consisting on running 50 min at 16m/min for 50 min (0° inclination). After 50 min, speed was subsequently increased by 1m/min until exhaustion, which was determined when animals were no longer able to maintain the racing step and remained on the back of the treadmill for 1 min.

Exercise performance capacity

The exercise performance capacity test was performed according to LOMONOSOVA et al., (2014) with minor modifications. After 48 h of the eccentric bout, each animal was placed on a treadmill (insight equipment, SP, Brazil) at 16m/min with 20° slope for 15 min. The amount of work performed in the running test of each animal was calculated as follows: treadmill speed x running time. This test detects only the net running of the animal, while the walking time is discarded. The data were expressed in Joules (J).

High performance liquid chromatography/ultraviolet (HPLC–UV) detection

The levels of Cr were measured in plasma and soleus muscle according to (ÖZOGUL et al; 2000) with a few modifications. Briefly, samples were homogenized in 0.6 M perchloric acid and centrifuged at 770 x g for 10 min at 4 °C. The supernatant was adjusted to pH 6-6.5 using 1 M potassium hydroxide. Neutralized fractions were kept on ice during 30 min in order for the potassium crystals to completely precipitate and were filtered using a membrane (pore size 0.45 µm Millipore®) before injection on the HPLC equipment (Shimadzu® HPLC, JP). The analytic column contained 5 µm particle size silica with a 100 Å pore size in a Phenomenex® ODS-2 C18 reverse-phase column (4.6 mm × 250 mm, Allcrom, BR). The mobile phase was 50 mM sodium acetate, 50 mM sodium citrate and 8% (v/v) methanol, pH 3.1 (corrected with 12 N HCl). The HPLC analysis was performed under isocratic conditions at a flow rate of 1 ml/min, and the UV detector was set at 274 nm.

Histology

After 48h of downhill running, animals were anesthetized, sacrificed and the soleus muscles were removed, fixed by immersion in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4, cryoprotected in 15% sucrose until sieved, followed by 30% sucrose cryoprotection until sink again. Then, the freezing-mounted muscles (Tissue TEK OCT Coumpound, Sakura, Japan) were frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, cut in a cryostat (Leica, Germany) with a thickness of 40 micrometers, collected on histological laminæ and stained with Hematoxylin and eosin (HE). Histological laminæ were dehydrated in increasing alcohols (90 and 100%), cleared in xylol and mounted with Canadian balsam. Histological images were scanned with 400X magnification using Axio

Scope microscope (Carl Zeiss Microscopy, Germany). The morphological analysis was performed with the software Zen 2.3 (Blue edition; Carl Zeiss Microscopy, Germany) in five images obtained from the muscles of each animal. For this, the inflammatory cells present within the area of interest were counted. The data for each animal represent the mean of the inflammatory cells of the five images. The data shown represent the mean of inflammatory cells of the groups (DO NASCIMENTO et al., 2013, LU et al., 2015, CARDOSO et al., 2016).

Insulin-like growth factor 1(IGF-1) and Prostaglandin E2 (PGE-2) immunoassay

For determination of IGF-1 and PGE-2 levels muscle samples were weighed and homogenized 1:10 in tissue protein extraction reagent (T-PER, Thermo Scientific Pierce, MA, USA). The homogenates were centrifuged at 10,000 x g at 4°C for 5 min to collect the supernatant. Protein concentration in the supernatant was determined using BCA kit (Thermo Scientific Pierce, MA, USA). After, IGF-1 and PGE-2 content was determined using an ELISA kit (R&D Systems, USA) according to the commercially available manufacturer's protocol. The results were expressed in pg/mg of protein.

Western blot

Protein content of Myo-D and Myf-6 were assessed by Western Blot according to standard procedures with some modifications. Briefly, a portion of the soleus muscle was subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Membranes stained with 0.1% Ponceau solution served as the transfer control (ROMERO-CALVO et al; 2010); membranes were photographed, washed with Tris buffered saline containing 0.04% (v/v) Tween 20 (TBS-T) until removal of the Ponceau. After, membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat milk in Tris-buffered saline containing 0.04% (v/v) Tween 20 (TBS-T) for 1 h and incubated overnight at 4 °C with the specific primary antibody anti-rabbit Myo-D (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA, catalog number sc-304), anti-rabbit Myf-6 (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA, catalog number sc-301), in 2.5% non-fat milk in TBS-T. Membranes were washed three times in TBS-T and then incubated with secondary antibodies anti-rabbit (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA, catalog number sc-2004) for 1h. Then, membranes were washed three Times with TBS-T and chemiluminescence was captured using Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA) at a 4000 MM PRO imaging station (Carestream, USA).

Protein determination

The protein content was measured colorimetrically (BRADFORD, 1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as the standard.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (One-way ANOVA) and only F-values of $p < 0.05$ are presented. Post hoc analysis was carried out, when appropriate, through the Student-Newman-Keuls's Test. All data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M).

RESULTS

The eccentric exercise protocol was effective to induce muscle damage as shown by histological analysis [F(4,16)= 9.95; p<0.01; figs 2A and 2B]. While ibuprofen supplementation was able to control muscle damage, Cr did not prevent it. There was no significant difference between the other groups.

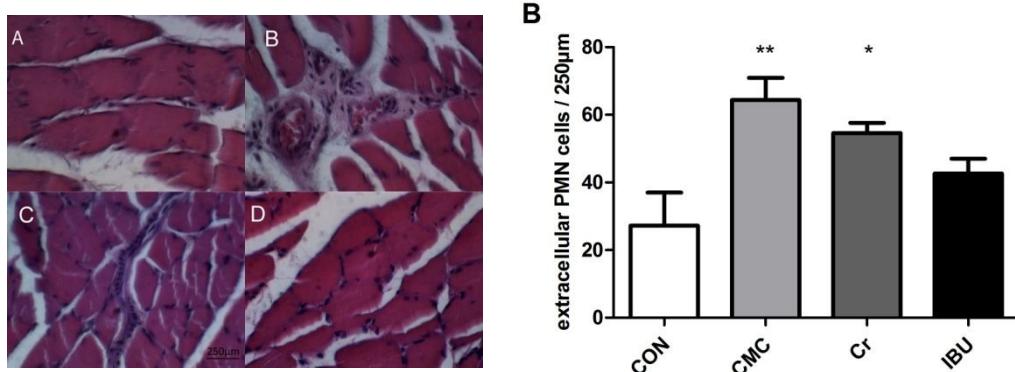


Figure 2. (A) Histological images of the soleus muscle after 48 h of downhill running: A) CON, B) CMC, C) Cr and D) IBU. (B). Quantification of histological images. **p<0.01 and *p<0.05 compared with the control group. The data are presented as the mean \pm S.E.M. for n= 3-6 in each group.

In order to verify muscle and plasma Cr levels after the eccentric exercise bout HPLC quantifications were performed. Plasma analysis revealed that there was significant difference on Cr concentration at 48h in relation to control group [F(5,25)= 7.00; p<0.01; fig 3A]. In muscle, there was no significant difference between groups as shown on figure 3B.

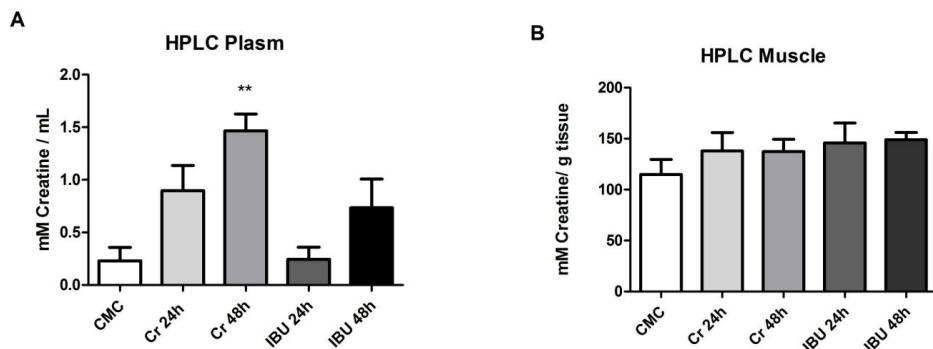


Figure 3. Cr levels after downhill running determined by HPLC in (A) plasma and (B) soleus muscle at 24 and 48 h post exercise. **p<0.01. The data are presented as the mean \pm S.E.M. for n= 5 in each group.

Our results also showed that only Cr supplementation was able to induce a significant increase in IGF-1 levels 24h after the eccentric exercise [$F(7,26) = 3.91$; $p < 0.05$; fig 4A]. Regarding PGE-2 levels, statistical analyses demonstrated a significant increase in the CMC 48h and in the Cr 24h in relation to the control [$F(7,31) = 6.58$; $p < 0.05$; fig 4B], after downhill running. The other groups did not present significant differences.

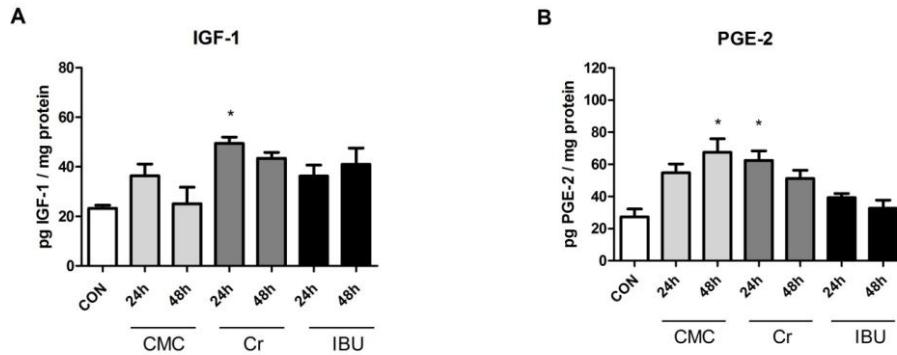


Figure 4. Quantification of levels of (A) IGF-1 and (B) PGE-2 determined by ELISA assays in the soleus muscle at 24 and 48 h after downhill running. * $p < 0.05$. The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n=5$.

To verify the influence of an acute supplementation with Cr in parameters related to myogenic signaling post eccentric exercise, two proteins involved in satellite cell differentiation signaling, Myf-6 and Myo-D, were quantified. Statistical analysis showed no differences at 24h after the eccentric exercise bout (fig 5A and 5B). However, 48h post exercise showed increased Myf-6 content in Cr supplemented group [$F(4,19) = 3.45$; $p < 0.05$; fig 5C].

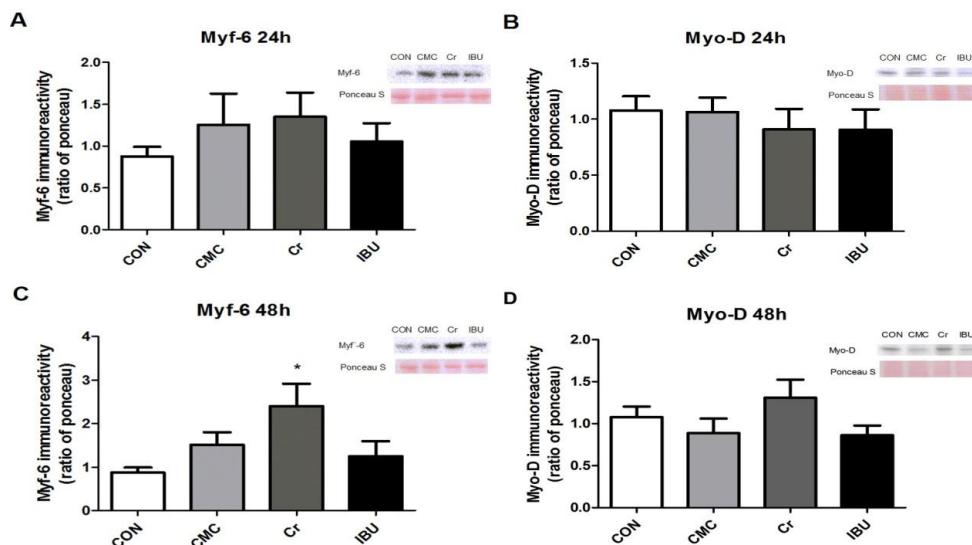


Figure 5. Effect of downhill running on Myf-6 and Myo-D immunoreactivity in the soleus muscle at 24 and 48 h post exercise. * $p < 0.05$. The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n=3-5$.

In order to evaluate the muscular recovery capacity after injury, exercise performance tests were performed. The data revealed that there were no differences between the groups in the muscle strength tests (Fig 6A) and in the exhaustion test (Fig 6B). However, statistical analyses revealed that Cr and ibuprofen supplementation protected the performance capacity 48h after the eccentric exercise bout [$F(4,39)= 7.23$; $p<0.001$; fig 6C].

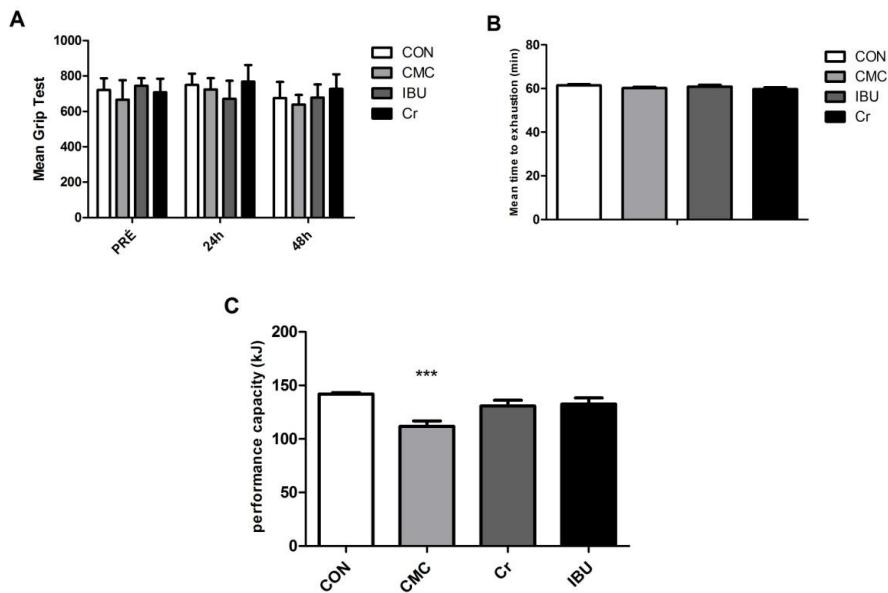


Figure 6. (A) Muscular strength test after downhill running. Analyses were carried out pre-test and at 24 and 48h after exercise. (B) Exhaustion test and (C) Exercise Performance Capacity test. Analyses were carried out 48 h after downhill running. *** $p < 0.001$ compared with the control group. The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n=10$.

DISCUSSION

In the present study, we investigated the influence of acute supplementation with Cr post eccentric exercise on parameters of muscle damage and myogenic signaling after a downhill running, as well as recovery capacity. Here, we verified that the eccentric bout of exercise induced muscle injury and increased the levels of inflammatory mediators. On the opposite, Cr was able to decrease PGE-2 levels 48h after the eccentric bout of exercise, although histological damage was registered. However, Cr was effective to increase IGF-1 levels after exercise, which may be related to higher Myf-6 protein content also found. Taken together, our data demonstrate that acute supplementation with Cr post-eccentric exercise may have the potential to influence myogenic signaling, contributing to improved muscle recovery and performance in subsequent tests.

It is well known that eccentric exercise induce skeletal muscle damage (PROSKE and ALLEN, 2005; CHOI, 2014). Nonetheless, the exact mechanisms underlying the early stages of eccentric exercise-induced muscle

damage are still not completely understood (HYLDAHL and HUBAL, 2013). Several hypotheses have been suggested to explain the etiology of this damage, but it is widely accepted that increased stress on myofibrils during an eccentric exercise leads to distension and rupture of sarcomeres with consequent degradation of structural proteins (CHOI, 2014). In addition, stretching of the sarcomeres causes damage to the membrane and to contractile muscle tissues (FRIDEN e LIEBER, 2001; MORGAN e PROSKE, 2004; PROSKE e ALLEN, 2005). The inflammatory process generated by these mechanisms facilitates the infiltration of inflammatory cells to the injured skeletal muscle, with neutrophils and macrophages accumulation in the first hours after the exercise (JÄRVINEN et al., 2005; TIDBALL, 2007; GREFTE et al., 2007).

Here, the applied EE protocol was able to cause muscle damage, as shown by the histological images 48h after downhill running. Interestingly, results show for the first time that ibuprofen prevented exercise-related damage to skeletal muscle 48h after an eccentric exercise. Thus, although some studies have shown negative effects of ibuprofen on muscle damage (VELLA et al, 2016), data herein presented indicate the anti-inflammatory efficacy this drug in reducing an acute exercise-induced damage (LIMA et al, 2015; MORELLI et al, 2017). On the opposite, Cr supplementation was not able to alleviate the histological damage caused by the EE. Considering the data available in the literature, there are many discrepancies regarding the effects of Cr on muscle injury induced by exercise (KIM et al, 2015). Studies in different models have shown that Cr supplementation has not been able to protect muscle from injury caused by exercise (RAWSON et al, 2001; MCKINNON et al, 2012; SILVA et al, 2013). Still, other studies have demonstrated positive effects of Cr on post-exercise muscle recovery (ROSENE et al, 2009; COOKE et al., 2009; BASSIT et al., 2010; DEMINICE et al, 2013). These discrepancies may be related to the exercise intensity, frequency and type of muscular contraction (MCARDLE, KATCH and KATCH, 2003). The eccentric exercise applied in our study is known to cause muscle injury (ARMSTRONG, 1984; LIMA-CABELLO et al, 2010), which may have directly injured muscle fibers during running (HYLDAHL and HUBAL, 2013). In addition, HPLC results demonstrated that only 48h of supplementation were not enough to increase Cr levels in the muscle, a result which may have contributed to Cr not exerting its protective characteristics to ameliorate histological damages caused by the eccentric exercise. Although some studies have demonstrated a possible anti-inflammatory effect of Cr after exercise (SANTOS et al, 2004; BASSIT et al, 2008), Cr is not a classic anti-inflammatory drug such as ibuprofen. In addition, the few studies available in the literature indicate that Cr has been shown to exhibit discrete anti-inflammatory abilities (KHANNA and TAHASHILDAR, 1985; NOMURA et al., 2003). Thus, our results suggest that although Cr may present anti-inflammatory properties, these are not sufficient to protect skeletal muscles from eccentric exercise-related damage.

Cr supplementation is widely used in sports to increase Cr muscle stocks and enhance exercise performance, strength production, and also to accelerate energy metabolism and post-exercise recovery (PERSKY and BRAZEAU, 2011). Most supplementation protocols use 20g of Cr for 5 days and maintenance of 3-5g on the remaining days to obtain a significant increases in Cr muscle levels (CASEY and GREENHAFF, 2000). However, few studies have used shorter periods of Cr supplementation to access a potential pharmacological role of this compound on exercise recovery (HESPEL and DERAVE, 2007). Thus, our objective was to verify if Cr supplementation was able to present positive effects on skeletal muscle damage 48h when administered after

eccentric exercise. HPLC data showed that 48h of supplementation were not sufficient to alter muscle Cr levels (fig 3B), even though plasma levels were higher at this time. The ibuprofen group did not show any changes in these parameters and there is a lack of data available in the literature regarding this subject. In addition, animals that received ibuprofen did not alter IGF-1 levels in the analyzed times, a result in disagreement with those available in the literature, which demonstrated that the use of anti-inflammatory drugs decreases IGF-1 levels (MIKKELSEN et al, 2009). Regarding the Cr group, even with little supplementation time, animals presented higher levels of IGF-1 than the other groups. This is consistent with previous studies, as Cr supplementation has been shown to positively influence IGF-1 levels (LOUIS et al, 2004; DELDICQUE et al., 2005). However, it is still to be elucidated if Cr is interferes in the mechanisms surrounding the production of IGF-1 (BURKE et al, 2008). IGF-1 is produced in the liver as a result of changes in growth hormone concentrations. Once produced, IGF-1 is able to stimulate protein synthesis through the activation of the PI3-K/AKT/mTOR signaling pathway, which is an important pathway responsible for inducing muscle hypertrophy (SCHIAFFINO et al, 2013). In addition, IGF-1 is known to stimulate satellite cell activity, potentiating muscle regeneration stages by increasing the expression of MRFs, such as Myo-D and Myf-6 (SCHIAFFINO et al, 2013). Thus, results herein found indicate that a short time of Cr supplementation was effective to induce increases on IGF-1 levels, which positively influenced myogenic signaling.

Regarding PGE-2 analyzes, our results showed that eccentric exercise increased levels of this inflammatory mediator in the CMC group at 48h. Again, animals that received ibuprofen did not show PGE-2 changes in comparison to the control group, confirming the protective role of NSAIDs in exercise-induced muscle damage (SCHOENFELD et al, 2012). In relation to the Cr group, 24 h after downhill running the PGE-2 levels were higher than control group. Nevertheless, 48h of Cr supplementation attenuated the increases on PGE-2 concentration, maintaining the levels close to control and similar to the ibuprofen group, similarly to other studies (SANTOS et al, 2004; BASSIT et al, 2008). PGE-2 is a prostaglandin produced by COX enzymes during an inflammatory response and regulates numerous processes of muscle adaptation to exercise (TRAPPE and LIU, 2013). Some studies have demonstrated that under certain conditions PGs may provide a muscular anabolic environment (TRAPPE et al, 2001; TRAPPE et al., 2002). However, it is recognized that high levels of PGE-2 may cause a decrease in muscle regeneration processes (MACKEY, 2013). In this sense, after performing intense exercises, it is common for athletes to use NSAIDs to reduce the inflammatory process and accelerate post-exercise recovery processes, thus allowing a rapid return to training and competitions (KRENTZ et al., 2008). However, studies have also shown that the use of NSAIDs post-exercise may have the ability to inhibit protein synthesis and interfere with adaptive muscle responses to exercise (SCHOENFELD, 2012; MARKWORTH et al., 2014). Thus, it is possible to conclude that the inflammatory process mediated by PGE-2 is necessary to cause muscle adaptation to exercise although supraphysiological levels of this prostaglandin may delay, in at first, the muscle regeneration processes (TRAPPE and LIU, 2013 MACKEY, 2013). Taken together, results from this study indicate that Cr supplementation was effective to contain increases on PGE-2 levels after muscle damage induced by eccentric exercise, providing a balanced environment to muscle regeneration processes.

In the last decades, some studies have suggested that Cr may perform other functions beyond its known ergogenic properties (SESTILI et al., 2016). Olsen and coworkers demonstrated that Cr supplementation act as a

mediator of satellite cell proliferation and differentiation (OLSEN et al, 2006). In the same context, Cr has been shown to have positive effects on increased protein synthesis, myotube hypertrophy and increased MRFs, as well as decreased post-exercise muscle catabolic signaling (WILLOUGHBY et al; 2003; LOUIS et al; 2004; DELDICQUE et al; 2007; SAREMI et al., 2010). However, most studies have used a chronic supplementation protocol and few studies have explored the acute effects of Cr (HESPEL and DERAVE, 2007). Thus, we decided to verify whether acute supplementation with Cr could influence muscle regeneration markers after an eccentric exercise bout. As expected, our data revealed that only the Cr influenced the protein content of myf-6 48h after the downhill running, although it was not sufficient to alter the protein content of myo-d. In addition, it is important to note that ibuprofen did not induce alterations in the levels of these proteins, which partially contradicts previous data (MARKWORTH et al., 2014). Both Myf-6 and Myo-D proteins are known markers of muscle regeneration (ZANOU and GAILLY, 2013). After proliferation of satellite cells, the differentiation of myogenic precursor cells into myoblasts occurs, a stage marked by increased expression of MRFs (LE GRAND and RUDNICKI, 2007). The terminal differentiation process, in turn, is characterized by the fusion of the myoblasts to the formation of new myotubes, a stage in which increased expression of he myf-6 occurs, as this myogenic factor is necessary for the hypertrophy of new muscle fibers (LE GRAND and RUDNICKI, 2007). In our results, there was a significant increase of myf-6 in the Cr group at 48h (fig 5C), which was not observed in myo-d. Considering the stages of myogenesis, it is possible to conclude that analyzes done at 48h have been late for myo-d content, since this protein usually increases its expression in the beginning of satellite cells differentiation. In addition, increased myf-6 levels at 48h in the Cr group confirm that the final stage of the myoblast differentiation process is occurring (LE GRAND and RUDNICKI, 2007).

Currently, numerous athletes benefit from the use of Cr with the goal of improving muscle performance and recovery (TARNOPOLSKY, 2010; COOPER et al, 2012). An accelerated recovery capability allows the athlete to return to training or competition more quickly, thus increasing exercise performance (CONNOLLY et al, 2003; BEMBEN and LAMONT, 2005). Thus, our objective was to verify if acute Cr supplementation after an eccentric exercise bout would be able to improve the recovery of the animals, allowing a better performance in subsequent tests. The results showed that there was no difference between groups in the grip and exhaustion tests. Regarding the grip test, a plausible explanation to justify the results is that this test is performed using the elbow flexors (BERTELLI and MIRA, 1995). There are many differences in muscular architecture of upper and lower limbs, and the injury caused by eccentric exercise is much more prominent in the elbow flexors than in knee extensors (SAKA et al, 2009). As for the results of the exhaustion test, these agree with previous literature, which indicates that differences are mainly related to exercise training (ROSA et al, 2009). Regarding physical capacity, our data showed that only the CMC group presented low performance compared to the other groups. There were no differences between Cr and IBU groups in relation to the control group, demonstrating that both compounds were effective in maintaining exercise performance in these animals, similar to previous studies (VOLEK and RAWSON, 2004, TRAPPE and LIU, 2013, CLOSE et al, 2016, LIMA et al, 2015). In relation to Cr, similar results were obtained by Deminice and coworkers which demonstrated that Cr supplementation reduce inflammatory markers post-sprints, thus enabling an improvement in the participants' physical performance (DEMINICE et al., 2013). In addition, the fact that Cr is a naturally occurring compound and does not present damaging side effects (PERSKY and RAWSON,

2007) makes its use an interesting alternative to anti-inflammatory drugs since the constant use of NSAIDs may present certain health risks (VAN WIJCK et al, 2012)

In conclusion, our study demonstrated that acute Cr supplementation after eccentric exercise was effective to influence myogenic signaling through an increase in IGF-1 levels, which resulted on increased myf-6 expression. In addition, Cr attenuated the increase on PGE-2 levels, presenting similar results to the ibuprofen group. Although ibuprofen did not induce similar changes, both IBU and CR groups preserved exercise capacity in comparison to CMC group. This indicates that post consumption of Cr might be an alternative pharmacological approach in acute exercise scenarios, considering recovery was similar to ibuprofen. Even better, Cr supplementation triggered mechanisms related to muscle regeneration, while ibuprofen did not. Thus, it seems that while ibuprofen enhanced performance capacity through damage control, Cr may present similar benefits via accelerated muscle regeneration. Taken together, our results demonstrate that acute supplementation with eccentric post-exercise Cr may have the potential to influence myogenic signaling and ameliorate inflammatory control, which may contribute to improved muscle recovery and subsequent exercise performance. However, other proteins associated with muscle myogenesis should be studied to clarify the related mechanisms.

REFERENCES

- Armstrong, R. B. "Mechanisms of Exercise-Induced Delayed Onset Muscular Soreness: A Brief Review." *Med Sci Sports Exerc* 16, no. 6 (1984): 529-38.
- Bassit, R. A., R. Curi and L. F. Costa Rosa. "Creatine Supplementation Reduces Plasma Levels of Pro-Inflammatory Cytokines and Pge2 after a Half-Ironman Competition." *Amino Acids* 35, no. 2 (2008): 425-31.
- Bassit, R. A., C. H. Pinheiro, K. F. Vitzel, A. J. Sproesser, L. R. Silveira and R. Curi. "Effect of Short-Term Creatine Supplementation on Markers of Skeletal Muscle Damage after Strenuous Contractile Activity." *Eur J Appl Physiol* 108, no. 5 (2010): 945-55.
- Bemben, M. G. and H. S. Lamont. "Creatine Supplementation and Exercise Performance: Recent Findings." *Sports Med* 35, no. 2 (2005): 107-25.
- Bertelli, J. A. and J. C. Mira. "The Grasping Test: A Simple Behavioral Method for Objective Quantitative Assessment of Peripheral Nerve Regeneration in the Rat." *J Neurosci Methods* 58, no. 1-2 (1995): 151-5.
- Bradford, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal Biochem* 72, (1976): 248-54.
- Burke, D. G., D. G. Candow, P. D. Chilibeck, L. G. MacNeil, B. D. Roy, M. A. Tarnopolsky and T. Ziegenfuss. "Effect of Creatine Supplementation and Resistance-Exercise Training on Muscle Insulin-Like Growth Factor in Young Adults." *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 18, no. 4 (2008): 389-98.
- Carosio, S., M. G. Berardinelli, M. Aucello and A. Musaro. "Impact of Ageing on Muscle Cell Regeneration." *Ageing Res Rev* 10, no. 1 (2011): 35-42.
- Casey, A. and P. L. Greenhaff. "Does Dietary Creatine Supplementation Play a Role in Skeletal Muscle Metabolism and Performance?" *Am J Clin Nutr* 72, no. 2 Suppl (2000): 607S-17S.

- Chen, S. E., E. Gerken, Y. Zhang, M. Zhan, R. K. Mohan, A. S. Li, M. B. Reid and Y. P. Li. "Role of Tnf-{Alpha} Signaling in Regeneration of Cardiotoxin-Injured Muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* 289, no. 5 (2005): C1179-87.
- Choi, S. J. "Cellular Mechanism of Eccentric-Induced Muscle Injury and Its Relationship with Sarcomere Heterogeneity." *J Exerc Rehabil* 10, no. 4 (2014): 200-4.
- Close, G. L., D. L. Hamilton, A. Philp, L. M. Burke and J. P. Morton. "New Strategies in Sport Nutrition to Increase Exercise Performance." *Free Radic Biol Med* 98, (2016): 144-58.
- Connolly, D. A., S. P. Sayers and M. P. McHugh. "Treatment and Prevention of Delayed Onset Muscle Soreness." *J Strength Cond Res* 17, no. 1 (2003): 197-208.
- Cooke, M. B., E. Rybalka, A. D. Williams, P. J. Cribb and A. Hayes. "Creatine Supplementation Enhances Muscle Force Recovery after Eccentrically-Induced Muscle Damage in Healthy Individuals." *J Int Soc Sports Nutr* 6, (2009): 13.
- Cooper, R., F. Naclerio, J. Allgrove and A. Jimenez. "Creatine Supplementation with Specific View to Exercise/Sports Performance: An Update." *J Int Soc Sports Nutr* 9, no. 1 (2012): 33.
- Deldicque, L., M. Louis, D. Theisen, H. Nielens, M. Dehoux, J. P. Thissen, M. J. Rennie and M. Francaux. "Increased Igf Mrna in Human Skeletal Muscle after Creatine Supplementation." *Med Sci Sports Exerc* 37, no. 5 (2005): 731-6.
- Deminice, R., F. T. Rosa, G. S. Franco, A. A. Jordao and E. C. de Freitas. "Effects of Creatine Supplementation on Oxidative Stress and Inflammatory Markers after Repeated-Sprint Exercise in Humans." *Nutrition* 29, no. 9 (2013): 1127-32.
- Friden, J. and R. L. Lieber. "Eccentric Exercise-Induced Injuries to Contractile and Cytoskeletal Muscle Fibre Components." *Acta Physiol Scand* 171, no. 3 (2001): 321-6.
- Gleeson, M. "Immune Function in Sport and Exercise." *J Appl Physiol* (1985) 103, no. 2 (2007): 693-9.
- Grefte, S., A. M. Kuijpers-Jagtman, R. Torensma and J. W. Von den Hoff. "Skeletal Muscle Development and Regeneration." *Stem Cells Dev* 16, no. 5 (2007): 857-68.
- Gualano, B., R. B. Novaes, G. G. Artioli, T. O. Freire, D. F. Coelho, F. B. Scagliusi, P. S. Rogeri, H. Roschel, C. Ugrinowitsch and A. H. Lancha, Jr. "Effects of Creatine Supplementation on Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in Sedentary Healthy Males Undergoing Aerobic Training." *Amino Acids* 34, no. 2 (2008): 245-50.
- Hespel, P. and W. Derave. "Ergogenic Effects of Creatine in Sports and Rehabilitation." *Subcell Biochem* 46, (2007): 245-59.
- Hyldahl, R. D. and M. J. Hubal. "Lengthening Our Perspective: Morphological, Cellular, and Molecular Responses to Eccentric Exercise." *Muscle Nerve* 49, no. 2 (2014): 155-70.
- Jarvinen, T. A., T. L. Jarvinen, M. Kaariainen, H. Kalimo and M. Jarvinen. "Muscle Injuries: Biology and Treatment." *Am J Sports Med* 33, no. 5 (2005): 745-64.
- Khanna, N. K. and J. Tahashildar. "Anti-Inflammatory Activity of Creatine and Indomethacin Drug Mixture in Rats." *Indian J Exp Biol* 23, no. 7 (1985): 402-3.
- Kim, J., J. Lee, S. Kim, D. Yoon, J. Kim and D. J. Sung. "Role of Creatine Supplementation in Exercise-Induced Muscle Damage: A Mini Review." *J Exerc Rehabil* 11, no. 5 (2015): 244-50.

- Krentz, J. R., B. Quest, J. P. Farthing, D. W. Quest and P. D. Chilibeck. "The Effects of Ibuprofen on Muscle Hypertrophy, Strength, and Soreness During Resistance Training." *Appl Physiol Nutr Metab* 33, no. 3 (2008): 470-5.
- Le Grand, F. and M. A. Rudnicki. "Skeletal Muscle Satellite Cells and Adult Myogenesis." *Curr Opin Cell Biol* 19, no. 6 (2007): 628-33.
- Liles, J. H. and P. A. Flecknell. "The Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for the Relief of Pain in Laboratory Rodents and Rabbits." *Lab Anim* 26, no. 4 (1992): 241-55.
- Lima-Cabello, E., M. J. Cuevas, N. Garatachea, M. Baldini, M. Almar and J. Gonzalez-Gallego. "Eccentric Exercise Induces Nitric Oxide Synthase Expression through Nuclear Factor-Kappab Modulation in Rat Skeletal Muscle." *J Appl Physiol* (1985) 108, no. 3 (2010): 575-83.
- Lima, F. D., D. N. Stamm, I. D. Della Pace, L. R. Ribeiro, L. M. Rambo, G. Bresciani, J. Ferreira, M. F. Rossato, M. A. Silva, M. E. Pereira, R. P. Ineu, A. R. Santos, F. Bobinski, M. R. Fighera and L. F. Royes. "Ibuprofen Intake Increases Exercise Time to Exhaustion: A Possible Role for Preventing Exercise-Induced Fatigue." *Scand J Med Sci Sports* 26, no. 10 (2016): 1160-70.
- Lomonosova, Y. N., B. S. Shenkman, G. R. Kalamkarov, T. Y. Kostrominova and T. L. Nemirovskaya. "L-Arginine Supplementation Protects Exercise Performance and Structural Integrity of Muscle Fibers after a Single Bout of Eccentric Exercise in Rats." *PLoS One* 9, no. 4 (2014): e94448.
- Louis, M., R. Van Beneden, M. Dehoux, J. P. Thissen and M. Francaux. "Creatine Increases Igf-I and Myogenic Regulatory Factor Mrna in C(2)C(12) Cells." *FEBS Lett* 557, no. 1-3 (2004): 243-7.
- Lu, M. L., L. Kincl, B. Lowe, P. Succop and A. Bhattacharya. "Muscular Activity of Lower Limb Muscles Associated with Working on Inclined Surfaces." *Ergonomics* 58, no. 2 (2015): 278-90.
- Mackey, A. L. "Does an Nsaid a Day Keep Satellite Cells at Bay?" *J Appl Physiol* (1985) 115, no. 6 (2013): 900-8.
- Markworth, J. F., L. D. Vella, V. C. Figueiredo and D. Cameron-Smith. "Ibuprofen Treatment Blunts Early Translational Signaling Responses in Human Skeletal Muscle Following Resistance Exercise." *J Appl Physiol* (1985) 117, no. 1 (2014): 20-8.
- Mikkelsen, U. R., H. Langberg, I. C. Helmark, D. Skovgaard, L. L. Andersen, M. Kjaer and A. L. Mackey. "Local Nsaid Infusion Inhibits Satellite Cell Proliferation in Human Skeletal Muscle after Eccentric Exercise." *J Appl Physiol* (1985) 107, no. 5 (2009): 1600-11.
- Morelli, K. M., L. B. Brown and G. L. Warren. "Effect of Nsaids on Recovery from Acute Skeletal Muscle Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Am J Sports Med*, (2017): 363546517697957.
- Morgan, D. L., J. E. Gregory and U. Proske. "The Influence of Fatigue on Damage from Eccentric Contractions in the Gastrocnemius Muscle of the Cat." *J Physiol* 561, no. Pt 3 (2004): 841-50.
- Nieman, D. C. "Current Perspective on Exercise Immunology." *Curr Sports Med Rep* 2, no. 5 (2003): 239-42.
- Nomura, A., M. Zhang, T. Sakamoto, Y. Ishii, Y. Morishima, M. Mochizuki, T. Kimura, Y. Uchida and K. Sekizawa. "Anti-Inflammatory Activity of Creatine Supplementation in Endothelial Cells in Vitro." *Br J Pharmacol* 139, no. 4 (2003): 715-20.
- Olsen, S., P. Aagaard, F. Kadi, G. Tufekovic, J. Verney, J. L. Olesen, C. Suetta and M. Kjaer. "Creatine Supplementation Augments the Increase in Satellite Cell and Myonuclei Number in Human Skeletal Muscle Induced by Strength Training." *J Physiol* 573, no. Pt 2 (2006): 525-34.

- Pedersen, L. and P. Hojman. "Muscle-to-Organ Cross Talk Mediated by Myokines." *Adipocyte* 1, no. 3 (2012): 164-167.
- Persky, A. M. and G. A. Brazeau. "Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate." *Pharmacol Rev* 53, no. 2 (2001): 161-76.
- Persky, A. M. and E. S. Rawson. "Safety of Creatine Supplementation." *Subcell Biochem* 46, (2007): 275-89.
- Proske, U. and T. J. Allen. "Damage to Skeletal Muscle from Eccentric Exercise." *Exerc Sport Sci Rev* 33, no. 2 (2005): 98-104.
- Romero-Calvo, I., B. Ocon, P. Martinez-Moya, M. D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin and F. S. de Medina. "Reversible Ponceau Staining as a Loading Control Alternative to Actin in Western Blots." *Anal Biochem* 401, no. 2 (2010): 318-20.
- Rosa, E. F., R. F. Ribeiro, F. M. Pereira, E. Freymuller, J. Aboulafia and V. L. Nouailhetas. "Vitamin C and E Supplementation Prevents Mitochondrial Damage of Ileum Myocytes Caused by Intense and Exhaustive Exercise Training." *J Appl Physiol* (1985) 107, no. 5 (2009): 1532-8.
- Rosene, J., T. Matthews, C. Ryan, K. Belmore, A. Bergsten, J. Blaisdell, J. Gaylord, R. Love, M. Marrone, K. Ward and E. Wilson. "Short and Longer-Term Effects of Creatine Supplementation on Exercise Induced Muscle Damage." *J Sports Sci Med* 8, no. 1 (2009): 89-96.
- Ryall, J. G., J. E. Church and G. S. Lynch. "Novel Role for Ss-Adrenergic Signalling in Skeletal Muscle Growth, Development and Regeneration." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37, no. 3 (2010): 397-401.
- Saka, T., B. Akova, Z. Yazici, U. Sekir, H. Gur and Y. Ozarda. "Difference in the Magnitude of Muscle Damage between Elbow Flexors and Knee Extensors Eccentric Exercises." *J Sports Sci Med* 8, no. 1 (2009): 107-15.
- Santos, R. V., R. A. Bassit, E. C. Caperuto and L. F. Costa Rosa. "The Effect of Creatine Supplementation Upon Inflammatory and Muscle Soreness Markers after a 30km Race." *Life Sci* 75, no. 16 (2004): 1917-24.
- Saremi, A., R. Gharakhanloo, S. Sharghi, M. R. Gharaati, B. Larijani and K. Omidfar. "Effects of Oral Creatine and Resistance Training on Serum Myostatin and Gasp-1." *Mol Cell Endocrinol* 317, no. 1-2 (2010): 25-30.
- Schiaffino, S., K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw and M. Sandri. "Mechanisms Regulating Skeletal Muscle Growth and Atrophy." *FEBS J* 280, no. 17 (2013): 4294-314.
- Schoenfeld, B. J. "The Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Exercise-Induced Muscle Damage: Implications for Skeletal Muscle Development." *Sports Med* 42, no. 12 (2012): 1017-28.
- Sestili, P., E. Barbieri and V. Stocchi. "Effects of Creatine in Skeletal Muscle Cells and in Myoblasts Differentiating under Normal or Oxidatively Stressing Conditions." *Mini Rev Med Chem* 16, no. 1 (2016): 4-11.
- Tarnopolsky, M. A. "Caffeine and Creatine Use in Sport." *Ann Nutr Metab* 57 Suppl 2, (2010): 1-8.
- Tidball, J. G. and M. Wehling-Henricks. "Macrophages Promote Muscle Membrane Repair and Muscle Fibre Growth and Regeneration During Modified Muscle Loading in Mice in Vivo." *J Physiol* 578, no. Pt 1 (2007): 327-36.
- Trappe, T. A., J. D. Fluckey, F. White, C. P. Lambert and W. J. Evans. "Skeletal Muscle PgF(2)(Alpha) and Pge(2) in Response to Eccentric Resistance Exercise: Influence of Ibuprofen Acetaminophen." *J Clin Endocrinol Metab* 86, no. 10 (2001): 5067-70.

- Trappe, T. A. and S. Z. Liu. "Effects of Prostaglandins and Cox-Inhibiting Drugs on Skeletal Muscle Adaptations to Exercise." *J Appl Physiol* (1985) 115, no. 6 (2013): 909-19.
- Trappe, T. A., F. White, C. P. Lambert, D. Cesar, M. Hellerstein and W. J. Evans. "Effect of Ibuprofen and Acetaminophen on Postexercise Muscle Protein Synthesis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, no. 3 (2002): E551-6.
- Van Wijck, K., K. Lenaerts, A. A. Van Bijnen, B. Boonen, L. J. Van Loon, C. H. Dejong and W. A. Buurman. "Aggravation of Exercise-Induced Intestinal Injury by Ibuprofen in Athletes." *Med Sci Sports Exerc* 44, no. 12 (2012): 2257-62.
- Vella, L., J. F. Markworth, G. Paulsen, T. Raastad, J. M. Peake, R. J. Snow, D. Cameron-Smith and A. P. Russell. "Ibuprofen Ingestion Does Not Affect Markers of Post-Exercise Muscle Inflammation." *Front Physiol* 7, (2016): 86.
- Volek, J. S. and E. S. Rawson. "Scientific Basis and Practical Aspects of Creatine Supplementation for Athletes." *Nutrition* 20, no. 7-8 (2004): 609-14.
- Willoughby, D. S. and J. M. Rosene. "Effects of Oral Creatine and Resistance Training on Myogenic Regulatory Factor Expression." *Med Sci Sports Exerc* 35, no. 6 (2003): 923-9.
- Wozniak, A. C. and J. E. Anderson. "Single-Fiber Isolation and Maintenance of Satellite Cell Quiescence." *Biochem Cell Biol* 83, no. 5 (2005): 674-6.
- Zanou, N. and P. Gailly. "Skeletal Muscle Hypertrophy and Regeneration: Interplay between the Myogenic Regulatory Factors (Mrf's) and Insulin-Like Growth Factors (Igf's) Pathways." *Cell Mol Life Sci* 70, no. 21 (2013): 4117-30.

4. DISCUSSÃO

Pesquisas objetivando descobrir novas estratégias que possam melhorar o desempenho físico de atletas e, assim, aumentar o rendimento em treinos e competições tem recebido grande interesse da comunidade científica nos últimos tempos. Inúmeros novos compostos são estudados a cada dia e os resultados mostram que nem todos têm a capacidade de possibilitar uma melhora no desempenho físico (CLOSE et al, 2016). Nesse contexto, um conhecido composto tem ganhado destaque. A Cr surgiu em 1835, descoberta por Chevreul, em um extrato de carne e desde então tem demonstrado, através de estudos, capacidades ergogênicas através de sua ação no metabolismo energético incidindo diretamente no desempenho físico de atletas profissionais, amadores e entusiastas (COOPER et al, 2012). Contudo, os últimos estudos sobre os efeitos da Cr no organismo têm revelado outras capacidades, indicando que esse composto pode atuar na manutenção da massa muscular, aumento da sinalização miogênica e capacidade de influenciar nos processos regenerativos musculares pós-exercício (SESTILI et al, 2016). Dessa forma, no presente estudo, nós procuramos investigar a influência da suplementação aguda com Cr nos parâmetros de sinalização miogênica após lesão muscular induzida por EE, bem como verificar a capacidade de recuperação dos animais em posterior teste de desempenho físico.

No presente estudo, o antiinflamatório ibuprofeno foi eficaz na redução dos danos teciduais causados pelo exercício excêntrico no músculo esquelético. Apesar de alguns estudos apresentarem efeitos negativos do ibuprofeno sobre a lesão muscular (VELLA et al, 2016), nossos dados estão de acordo com a eficácia desse antiinflamatório na diminuição da lesão muscular causada pelo exercício físico (LIMA et al, 2015; MORELLI et al, 2017). Diferentemente, a suplementação com Cr não foi capaz de amenizar os danos musculares causados pelo exercício excêntrico. É possível que o protocolo de exercício excêntrico aplicado em nosso estudo tenha causado lesão diretamente as fibras musculares durante o movimento de corrida (HYLDAHL e HUBAL, 2013), sendo difícil verificar uma possível proteção através de suplementação com Cr. Além disso, os poucos estudos disponíveis na literatura demonstram que a Cr apresenta discretas capacidades antiinflamatórias (KHANNA e TAHASHILDAR, 1985; NOMURA et al, 2003). Assim, nossos resultados sugerem que, apesar da Cr apresentar pequenas características antiinflamatórias, essas não são suficientes para proteger o músculo de uma lesão induzida por exercício excêntrico.

A suplementação com Cr é normalmente utilizada no esporte com objetivo de aumentar os estoques musculares de Cr e assim obter efeitos ergogênicos como melhoras no rendimento físico, aumento na produção de força, aceleração do metabolismo energético e recuperação pós-exercício (PERSKY e BRAZEAU, 2011; COOPER et al, 2012). A maior parte dos protocolos de suplementação administra 20g de Cr durante 5 dias e uma manutenção de 3-5g nos dias restantes para obter um aumento significativo nos estoques musculares de Cr (CASEY e GREENHAFF, 2000). Entretanto, poucos estudos utilizaram períodos menores de suplementação (HESPEL e DERAVE, 2007). Dessa forma, nosso objetivo foi verificar se a Cr seria capaz de apresentar efeitos positivos sobre o músculo esquelético em apenas 48h de suplementação.

Nossos resultados mostraram que 48h de suplementação não foram suficientes para alterar os níveis de Cr muscular, mesmo com níveis mais elevados de Cr plasmática no mesmo tempo de análise. Por outro lado, o antiinflamatório ibuprofeno não causou quaisquer alterações nesses parâmetros. Além disso, os animais que receberam ibuprofeno não tiveram alterados os níveis de IGF-1 após a corrida, diferentemente de estudo prévio que demonstrou que o uso de antiinflamatórios diminui os níveis de IGF-1 pós-exercício (MIKKELSEN et al; 2009). Com relação ao grupo Cr, os animais apresentaram níveis maiores de IGF-1 que os demais grupos. Considerando os estudos disponíveis na literatura, nossos resultados estão de acordo com aqueles que demonstram que a suplementação com Cr é capaz de influenciar positivamente os níveis de IGF-1 no músculo esquelético (LOUIS et al, 2004; DELDICQUE et al, 2005). Entretanto, permanece a ser elucidado como a Cr é capaz de intervir nos mecanismos associados à produção de IGF-1 (BURKE et al, 2008). O IGF-1 é produzido no fígado em decorrência das alterações nas concentrações do hormônio do Crescimento (GH). Uma vez produzido, IGF-1 pode estimular a atividade de células satélites, potencializando as etapas de regeneração muscular através de um aumento da expressão dos MRFs, como myo-D e myf-6 (SCHIAFFINO et al, 2013). Assim, com base em nossos resultados, podemos concluir que a suplementação com Cr foi eficaz em induzir um aumento nos níveis de IGF-1, efeito o qual pode ter influenciado positivamente os marcadores de sinalização miogênica.

A PGE-2 é uma prostaglandina produzida a partir das ciclooxygenases (COX) durante uma resposta inflamatória, e regula inúmeros processos de adaptação dos músculos esqueléticos ao exercício físico (TRAPPE and LIU, 2013). Alguns estudos demonstraram que em determinadas condições as PGs podem propiciar um ambiente anabólico no tecido muscular (TRAPPE et al,

2001; TRAPPE et al, 2002), muito embora sabia-se altos níveis de PGE-2 estão associados a uma diminuição nos processos de regeneração muscular (MACKEY, 2013). No presente estudo, as análises de PGE-2 pós-exercício revelaram que esse mediador inflamatório aumentou no grupo CMC em 48h. Já os animais que receberam ibuprofeno não apresentaram quaisquer alterações sobre esse marcador em relação ao grupo controle. Esses resultados confirmam estudos prévios que demonstram o papel protetor dos anti-inflamatórios na lesão muscular induzida por exercício físico (SCHOENFELD et al, 2012). Em relação ao grupo Cr, nossos dados indicam que 48h de suplementação com Cr amenizaram o aumento de PGE-2 no músculo esquelético, similar a estudos prévios (SANTOS et al, 2004; BASSIT et al, 2008). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a suplementação com Cr pode apresentar propriedades antiinflamatórias após a lesão muscular induzida por exercício excêntrico, facilitando o processo de recuperação do músculo esquelético.

Nas últimas décadas, estudos têm sugerido que a Cr pode apresentar efeitos tróficos no músculo esquelético (SESTILI et al; 2016), aumentando a síntese de proteínas, hipertrofia de miotubos, aumento na expressão de MRFs, bem como diminuição da sinalização catabólica muscular pós-exercício (WILLOUGHBY et al; 2003; LOUIS et al; 2004; DELDICQUE et al; 2007; SAREMI et al; 2010). Contudo, a maioria dos estudos realizados utilizaram protocolos crônicos de suplementação de Cr (HESPEL e DERAVE, 2007). Dessa forma, faz-se importante verificar se a suplementação aguda com Cr é capaz de influenciar marcadores de regeneração muscular após um exercício excêntrico. Nossos dados revelaram que a suplementação de Cr aumentou do conteúdo proteico de myf-6 48h após a corrida. Ao contrário, a administração de ibuprofeno não alterou os níveis dessas proteínas, discordando de dados encontrados na literatura (MARKWORTH et al; 2014). Dessa forma, o uso de ibuprofeno pós-exercício excêntrico pode não influenciar negativamente no conteúdo dessas proteínas.

Ambas proteínas Myf-6 e Myo-D são conhecidos marcadores de regeneração muscular (ZANOU e GAILLY, 2013). Após a proliferação das células satélites, ocorre a diferenciação das células precursoras miogênicas em mioblastos, fase inicial esta marcada pelo aumento da expressão dos MRFs, principalmente de Myo-D (LE GRAND e RUDNICKI, 2007). O processo de diferenciação terminal, por sua vez, é caracterizado pela fusão dos mioblastos para a formação de novos miotubos, o que ocorre concomitantemente com aumentos na expressão da proteína myf-6, necessária para a hipertrofia de novas fibras musculares (LE GRAND e RUDNICKI,

2007). Assim, nossos resultados demonstram que a suplementação com Cr pode influenciar positivamente nos processos de regeneração muscular, potenciando o processo de recuperação pós-exercício.

Uma acelerada capacidade de recuperação do tecido muscular lesionado permite ao atleta voltar aos treinos ou competições mais rapidamente, aumentando seu desempenho com o passar do tempo (CONNOLLY et al, 2003; BEMBEM e LAMONT, 2005). Nesse sentido, nós decidimos verificar se após a realização de uma sessão aguda de exercício excêntrico a suplementação com Cr seria capacidade de melhorar a recuperação dos animais e permitir um melhor desempenho físico. Nos testes de força e corrida de exaustão não houve diferença entre os grupos. Já no teste de capacidade de corrida, o grupo CMC apresentou baixo rendimento em comparação aos outros grupos. Não houve diferenças entre os grupos Cr e IBU em relação ao controle. Esses resultados sugerem que ambos compostos Cr e Ibuprofeno foram eficazes na manutenção do rendimento físico dos animais, acelerando os processos de recuperação muscular e possibilitando a manutenção do desempenho físico.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que a suplementação aguda com Cr modulou a sinalização miogênica através de um aumento nos níveis de IGF-1 e myf-6, eventos que podem estar relacionados com a manutenção do desempenho físico no teste de capacidade física. Além disso, a Cr foi capaz de amenizar o aumento dos níveis de PGE-2, apresentando resultados similares ao antiinflamatório ibuprofeno. Surpreendentemente, até os dias atuais poucos estudos verificaram os efeitos agudos da Cr pós-exercícios, assim como verificar seus efeitos antiinflamatórios no exercício físico. Assim, considerando o fato de que Cr é um composto de ocorrência natural e não apresenta efeitos colaterais (PERSKY e RAWSON, 2007), seu uso como suplemento em ambientes esportivos torne-se uma alternativa interessante aos medicamentos antiinflamatórios, uma vez que o uso constante de AINEs pode apresentar certos riscos para a saúde (VAN WIJCK Et al, 2012).

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- 1) O exercício excêntrico causou lesão muscular, como visto através de imagens histológicas do músculo sóleo. Além disso, esse resultado coincidiu com os altos níveis de PGE-2 do grupo CMC após 48h do fim do protocolo. Ambos os resultados podem ter contribuído para o baixo rendimento físico dos animais no teste de desempenho físico;
- 2) O anti-inflamatório Ibuprofeno protegeu os animais contra a lesão muscular causada por exercício excêntrico e atenuou o aumento de PGE-2, confirmando os estudos que indicam suas ações protetoras;
- 3) A suplementação com Cr não foi capaz de amenizar os danos musculares causados pelo exercício excêntrico.
- 4) Apesar do tempo de suplementação não ter alterado os níveis de Cr muscular, foi possível verificar um aumento nos níveis de IGF-1 24h após exercício excêntrico, confirmando estudos anteriores que demonstram que Cr é capaz de influenciar esse parâmetro. O mesmo não foi visto nos grupos CMC e Ibuprofeno. Em relação ao Ibuprofeno, nossos dados não coincidem com resultados de estudos anteriores que demonstram que esse anti-inflamatório é capaz de diminuir os níveis de IGF-1 pós-exercício;
- 5) Embora alguns estudos tenham demonstrado que a Cr apresenta discretas propriedades anti-inflamatórias, nossos resultados mostraram que a suplementação com esse composto foi eficaz em amenizar o aumento dos níveis de PGE-2 48h após exercício excêntrico, mantendo os níveis desse mediador inflamatório próximo aos níveis do controle e similar ao grupo Ibuprofeno;
- 6) Em relação aos marcadores de sinalização miogênica, nossos resultados mostraram que apenas a suplementação com Cr foi capaz de aumentar os níveis de Myf-6 48h pós-exercício

excêntrico, resultado diferente dos níveis de Myo-D. Dessa forma, podemos concluir que a suplementação com Cr pode ter a capacidade de influenciar na sinalização miogênica e contribuir para os processos de regeneração muscular após lesão causada por exercício excêntrico;

7) Os resultados dos marcadores de sinalização miogênica também revelaram que a utilização do anti-inflamatório Ibuprofeno pós-exercício excêntrico não alterou o conteúdo protéico de Myf-6 e Myo-D, discordando de resultados encontrado na literatura, os quais demonstraram que a utilização de AINEs pós-exercícios pode interferir nos processos naturais de adaptação do músculo esquelético ao exercício físico;

8) Ambos compostos foram efetivos em manter o rendimento físico dos animais no teste de desempenho em corrida, embora pareçam atuar por vias diferentes. Aparentemente, Cr modula processos de regeneração muscular, enquanto ibuprofeno minimiza mecanismos de lesão muscular. Diante disso, pode-se concluir que ambos compostos favorecem o desempenho físico dos animais, embora os mecanismos associados sejam distintos.

6. CONCLUSÃO FINAL

Nosso estudo demonstrou que a suplementação com Cr após exercício excêntrico foi efetiva para influenciar a sinalização miogênica através de um aumento nos níveis de IGF-1, o qual resultou em um aumento na expressão de myf-6. Além disso, Cr atenuou o aumento nos níveis de PGE-2, apresentando resultados semelhantes ao grupo ibuprofeno. Embora o ibuprofeno não tenha induzido mudanças semelhantes, ambos compostos IBU e CR preservaram a capacidade de exercício em comparação com o grupo CMC. Assim, embora o ibuprofeno tenha melhorado a capacidade de desempenho através do controle da lesão muscular, a Cr pode apresentar benefícios similares através da aceleração da regeneração muscular. Dessa forma, o consumo posterior de Cr pode ser uma abordagem farmacológica alternativa em cenários de exercícios agudos, considerando que a recuperação foi semelhante a um antiinflamatório clássico. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a suplementação aguda com Cr após o exercício excêntrico pode ter o potencial de influenciar a sinalização miogênica e melhorar o controle inflamatório, o que pode contribuir para melhorar a recuperação muscular e o desempenho físico em subseqüentes exercícios.

7. ANEXO I

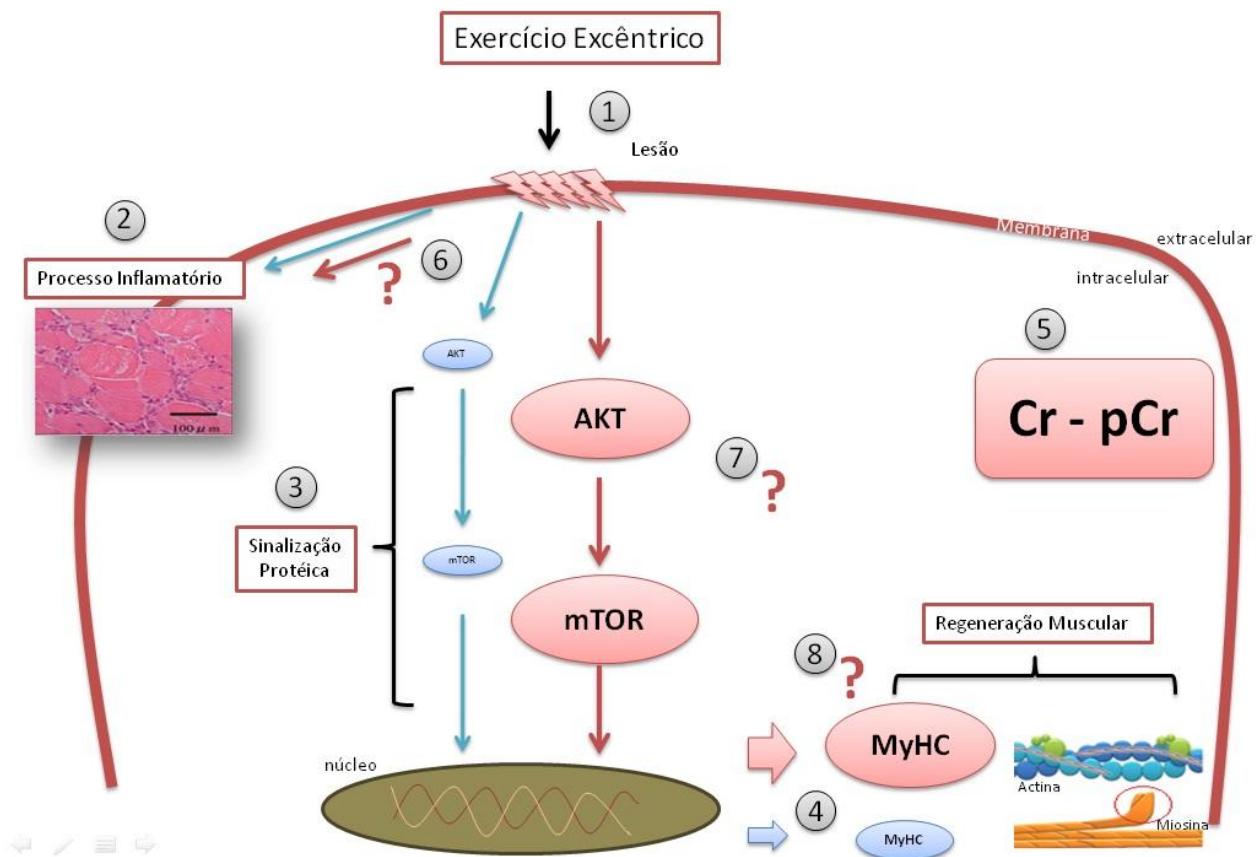
7.1 TRABALHO EM ANDAMENTO

Como discutido anteriormente, a sinalização miogênica tem seu início após um estímulo lesivo, que pode ocorrer durante uma prática esportiva ou após certos tipos de contrações, como a contração excêntrica (JÄRVINEN, 2005; RYALL et al., 2010). Em um primeiro momento, o aumento da sinalização catabólica muscular pós-exercício acaba inibindo a via de sinalização AKT/mTOR, principal via responsável por comandar os processos de regeneração muscular e induzir a hipertrofia por meio da ativação de síntese protéica (SCHIAFFINO et al, 2013). Dessa forma, a inibição momentânea da via de síntese protéica contribui para o atraso nos processos regenerativos musculares após um exercício físico (MARCOTTE et al; 2015).

Neste contexto, tem-se especulado que a Cr pode aumentar o estado de fosforilação das proteínas AKT/mTOR, agindo como um molécula co-ativadora, ampliando a sinalização miogênica e acelerando os processos de regeneração muscular e recuperação pós-exercício (GUALANO et al; 2010b). Estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado que a Cr apresenta efeitos positivos no aumento da síntese de proteínas atuando sobre a via AKT/mTOR (DELDICQUE et al; 2007). Essa ação estimula a hipertrofia de miotubos (LOUIS et al; 2004), bem como auxilia na diminuição da sinalização catabólica muscular pós-exercício (SAREMI et al; 2010). Ainda, sabe-se que a Cr pode influenciar a expressão de outros genes responsáveis pelos processos de síntese e regeneração muscular (SAFDAR et al, 2008). Mais recentemente, um estudo *in vitro* realizado por Mobley e colaboradores verificou que a Cr foi capaz de prevenir a atrofia de miotubos induzida por miostatina (MOBLEY et al, 2014).

Diante do exposto, essa memória escrita descreve parte dos objetivos primeiramente traçados para esse projeto. Neste sentido, os próximos passos serão analisar se a suplementação com Cr modula a via akt/mTOR 48h após uma sessão de exercício excêntrico. Para tanto, também será medida a concentração final de miosina de cadeia pesada (MyHC), produto final da rota (figura 1). Devido a inúmeras dificuldades ao longo do estudo, essas análises não puderam ser apresentadas na presente memória. Contudo, tais ensaios estão em processo de padronização e serão apresentados futuramente em forma de artigo científico.

MECANISMO DE LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR PÓS-EXERCÍCIO EXCÊNTRICO



Esquema 1. O exercício excêntrico causa uma lesão na membrana muscular (1), o qual gera um posterior processo inflamatório com a infiltração de leucócito ao músculo (2) (SETA AZUL). Horas/Dias após o insulto, ocorre um aumento natural na sinalização protéica, através da via AKT/mTOR (3) (SETA AZUL), resultando em um aumento na síntese de proteínas contráteis, como a Miosina de Cadeia Pesada (MyHC) e regenerando a área muscular lesada (4). Com a suplementação de Creatina após a lesão muscular causado por EE (5), espera-se que o processo inflamatório seja diminuído (6) (SETA VERMELHA) pela possível ação antiinflamatória da Cr. Além disso, espera-se que a Cr aja como uma molécula co-ativadora, ampliando a sinalização proteica da via AKT/mTOR (7) (SETA VERMELHA) e potencializando a síntese de proteínas contráteis e regeneração muscular (8).

8. REFERÊNCIAS

- ARIDA, R. M., F. A. SCORZA, N. F. DOS SANTOS, C. A. PERES AND E. A. CAVALHEIRO. Effect of Physical Exercise on Seizure Occurrence in a Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. **Epilepsy Res** **37**, no. 1 (1999): 45-52
- ARMSTRONG, R. B. Mechanisms of Exercise-Induced Delayed Onset Muscular Soreness: A Brief Review. **Med Sci Sports Exerc** **16**, no. 6 (1984): 529-38.
- ARMSTRONG, R. B., R. W. OGILVIE AND J. A. SCHWANE. Eccentric Exercise-Induced Injury to Rat Skeletal Muscle. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol** **54**, no. 1 (1983): 80-93.
- ASTORINO, T. A., A. C. MARROCCO, S. M. GROSS, D. L. JOHNSON, C. M. BRAZIL, M. E. ICENHOWER AND R. J. KNEESSI. Is Running Performance Enhanced with Creatine Serum Ingestion? **J Strength Cond Res** **19**, no. 4 (2005): 730-4.
- BALSOM, P. D., K. SODERLUND AND B. EKBLOM. Creatine in Humans with Special Reference to Creatine Supplementation. **Sports Med** **18**, no. 4 (1994): 268-80.
- BARCELOS, R. P., G. BRESCIANI, M. J. CUEVAS, S. MARTINEZ-FLOREZ, F. A. A. SOARES AND J. GONZALEZ-GALLEGO. Diclofenac Pretreatment Modulates Exercise-Induced Inflammation in Skeletal Muscle of Rats through the Tlr4/Nf-Kappab Pathway. **Appl Physiol Nutr Metab** **42**, no. 7 (2017): 757-764.
- BASSIT, R. A., R. CURI AND L. F. COSTA ROSA. Creatine Supplementation Reduces Plasma Levels of Pro-Inflammatory Cytokines and Pge2 after a Half-Ironman Competition. **Amino Acids** **35**, no. 2 (2008): 425-31.
- BASSIT, R. A., C. H. PINHEIRO, K. F. VITZEL, A. J. SPROESSER, L. R. SILVEIRA AND R. CURI. Effect of Short-Term Creatine Supplementation on Markers of Skeletal Muscle Damage after Strenuous Contractile Activity. **Eur J Appl Physiol** **108**, no. 5 (2010): 945-55.
- BENEDETTI, M. G., V. GASPARRONI, S. STECCHI, R. ZILIOLI, S. STRAUDI AND R. PIPERNO. Treadmill Exercise in Early Multiple Sclerosis: A Case Series Study. **Eur J Phys Rehabil Med** **45**, no. 1 (2009): 53-9
- BEMBEN, M. G. AND H. S. LAMONT. Creatine Supplementation and Exercise Performance: Recent Findings. **Sports Med** **35**, no. 2 (2005): 107-25.
- BOOTH, F. W., M. V. CHAKRAVARTHY, S. E. GORDON AND E. E. SPANGENBURG. Waging War on Physical Inactivity: Using Modern Molecular Ammunition against an Ancient Enemy. **J Appl Physiol** **(1985) 93**, no. 1 (2002): 3-30

- BURKE, D. G., D. G. CANDOW, P. D. CHILIBECK, L. G. MACNEIL, B. D. ROY, M. A. TARNOPOLSKY AND T. ZIEGENFUSS. Effect of Creatine Supplementation and Resistance-Exercise Training on Muscle Insulin-Like Growth Factor in Young Adults. **Int J Sport Nutr Exerc Metab** **18**, no. 4 (2008): 389-98.
- BYRD, S. K. Alterations in the Sarcoplasmic Reticulum: A Possible Link to Exercise-Induced Muscle Damage. **Med Sci Sports Exerc** **24**, no. 5 (1992): 531-6.
- CARMICHAEL, M. D., J. M. DAVIS, E. A. MURPHY, J. A. CARSON, N. VAN ROOIJEN, E. MAYER AND A. GHAFFAR. Role of Brain Macrophages on IL-1 β and Fatigue Following Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage. **Brain Behav Immun** **24**, no. 4 (2010): 564-8.
- CAROSIO, S., M. G. BERARDINELLI, M. AUCELLO AND A. MUSARO. Impact of Ageing on Muscle Cell Regeneration. **Ageing Res Rev** **10**, no. 1 (2011): 35-42.
- CASEY, A. AND P. L. GREENHAFF. Does Dietary Creatine Supplementation Play a Role in Skeletal Muscle Metabolism and Performance? **Am J Clin Nutr** **72**, no. 2 Suppl (2000): 607S-17S.
- CHARGE, S. B. AND M. A. RUDNICKI. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiol Rev** **84**, no. 1 (2004): 209-38.
- CLARKSON, P. M. AND S. P. SAYERS. Etiology of Exercise-Induced Muscle Damage. **Can J Appl Physiol** **24**, no. 3 (1999): 234-48.
- CHEVREUL, M. E. Sur la composition chimique du bouillon de viandes. **Journal de Pharmacie Science Access**, v. 21, p. 231-242, 1835.
- CLOSE, G. L., D. L. HAMILTON, A. PHILP, L. M. BURKE AND J. P. MORTON. New Strategies in Sport Nutrition to Increase Exercise Performance. **Free Radic Biol Med** **98**, (2016): 144-158.
- COLDITZ, G. A., C. C. CANNUSCIO AND A. L. FRAZIER. Physical Activity and Reduced Risk of Colon Cancer: Implications for Prevention. **Cancer Causes Control** **8**, no. 4 (1997): 649-67.
- COTMAN, C. W. AND N. C. BERCHTOLD. Exercise: A Behavioral Intervention to Enhance Brain Health and Plasticity. **Trends Neurosci** **25**, no. 6 (2002): 295-301.
- COOPER, R., F. NACLERIO, J. ALLGROVE AND A. JIMENEZ. Creatine Supplementation with Specific View to Exercise/Sports Performance: An Update. **J Int Soc Sports Nutr** **9**, no. 1 (2012): 33.
- CONNOLLY, D. A., S. P. SAYERS AND M. P. MCHUGH. Treatment and Prevention of Delayed Onset Muscle Soreness. **J Strength Cond Res** **17**, no. 1 (2003): 197-208.

CRAMERI, R. M., P. AAGAARD, K. QVORTRUP, H. LANGBERG, J. OLESEN AND M. KJAER. Myofibre Damage in Human Skeletal Muscle: Effects of Electrical Stimulation Versus Voluntary Contraction. **J Physiol** **583**, no. Pt 1 (2007): 365-80.

DE CASTRO, M. R. T., A. P. O. FERREIRA, G. L. BUSANELLO, L. R. H. DA SILVA, M. E. P. DA SILVEIRA JUNIOR, F. D. S. FIORIN, G. ARRIFANO, M. E. CRESPO-LOPEZ, R. P. BARCELOS, M. J. CUEVAS, G. BRESCIANI, J. GONZALEZ-GALLEG, M. R. FIGHERA AND L. F. F. ROYES. Previous Physical Exercise Alters the Hepatic Profile of Oxidative-Inflammatory Status and Limits the Secondary Brain Damage Induced by Severe Traumatic Brain Injury in Rats. **J Physiol**, (2017).

DELDICQUE, L., M. LOUIS, D. THEISEN, H. NIELENS, M. DEHOUX, J. P. THISSEN, M. J. RENNIE AND M. FRANCAUX. Increased Igf Mrna in Human Skeletal Muscle after Creatine Supplementation. **Med Sci Sports Exerc** **37**, no. 5 (2005): 731-6.

DELDICQUE, L., D. THEISEN, L. BERTRAND, P. HESPEL, L. HUE AND M. FRANCAUX. Creatine Enhances Differentiation of Myogenic C2c12 Cells by Activating Both P38 and Akt/Pkb Pathways. **Am J Physiol Cell Physiol** **293**, no. 4 (2007): C1263-71.

EICHELBAUM, M., M. INGELMAN-SUNDBERG AND W. E. EVANS. Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. **Annu Rev Med** **57**, (2006): 119-37.

ENOKA, R. M. Eccentric Contractions Require Unique Activation Strategies by the Nervous System. **J Appl Physiol** **(1985)** **81**, no. 6 (1996): 2339-46.

ESTON, R. AND D. PETERS. Effects of Cold Water Immersion on the Symptoms of Exercise-Induced Muscle Damage. **J Sports Sci** **17**, no. 3 (1999): 231-8.

FERNANDES TL, PEDRINELLI A, HERNANDEZ AJ. Dor na coxa e na perna. In: Nobrega A, editor. Manual de medicina do esporte. **São Paulo:Atheneu**; 2009. p. 140-1.

FIELDING, R. A., T. J. MANFREDI, W. DING, M. A. FIATARONE, W. J. EVANS AND J. G. CANNON. Acute Phase Response in Exercise. Iii. Neutrophil and Il-1 Beta Accumulation in Skeletal Muscle. **Am J Physiol** **265**, no. 1 Pt 2 (1993): R166-72.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. J. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FRIDEN, J. AND R. L. LIEBER. Eccentric Exercise-Induced Injuries to Contractile and Cytoskeletal Muscle Fibre Components. **Acta Physiol Scand** **171**, no. 3 (2001): 321-6.

GIBALA, M. J., J. P. LITTLE, M. J. MACDONALD AND J. A. HAWLEY. Physiological Adaptations to Low-Volume, High-Intensity Interval Training in Health and Disease. **J Physiol** **590**, no. 5 (2012): 1077-84.

- GISSEL, H. AND T. CLAUSEN. Excitation-Induced Ca²⁺ Influx and Skeletal Muscle Cell Damage. **Acta Physiol Scand** **171**, no. 3 (2001): 327-34.
- GLEESON, M. Immune Function in Sport and Exercise. **J Appl Physiol (1985)** **103**, no. 2 (2007): 693-9.
- GREENHAFF, P. L. Creatine supplementation: recent developments. **Br J Sports Med**, v. 30, n. 4, p. 276-277, 1996.
- GREFTE, S., A. M. KUIJPERS-JAGTMAN, R. TORENSMA AND J. W. VON DEN HOFF. Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem Cells Dev** **16**, no. 5 (2007): 857-68.
- GROUNDS, M. D. AND Z. YABLONKA-REUVENI. Molecular and Cell Biology of Skeletal Muscle Regeneration. **Mol Cell Biol Hum Dis Ser** **3**, (1993): 210-56.
- GOMES, A. C. Treinamento desportivo, estruturação e periodização. 1^a ed. Porto Alegre; Artmed, 2003.
- GUALANO, B., G. G. ARTIOLI, J. R. POORTMANS AND A. H. LANCHÁ JUNIOR. Exploring the Therapeutic Role of Creatine Supplementation. **Amino Acids** **38**, no. 1 (2010): 31-44.
- GUALANO, B., C. UGRINOWITSCH, G. G. ARTIOLI, F. B. BENATTI, F. B. SCAGLIUSI, R. C. HARRIS AND A. H. LANCHÁ, JR. Does Creatine Supplementation Improve the Plasma Lipid Profile in Healthy Male Subjects Undergoing Aerobic Training? **J Int Soc Sports Nutr** **5**, (2008): 16.
- HESPEL, P. AND W. DERAVE. Ergogenic Effects of Creatine in Sports and Rehabilitation. **Subcell Biochem** **46**, (2007): 245-59.
- HOWATSON, G. AND K. A. VAN SOMEREN. "he Prevention and Treatment of Exercise-Induced Muscle Damage. **Sports Med** **38**, no. 6 (2008): 483-503.
- HOWELL, J. N., G. CHLEBOUN AND R. CONATSER. Muscle Stiffness, Strength Loss, Swelling and Soreness Following Exercise-Induced Injury in Humans. **J Physiol** **464**, (1993): 183-96.
- HU, F. B., J. E. MANSON, M. J. STAMPFER, G. COLDITZ, S. LIU, C. G. SOLOMON AND W. C. WILLETT. Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. **N Engl J Med** **345**, no. 11 (2001): 790-7
- HU, J. P., Y. H. GUO, F. WANG, X. P. ZHAO, Q. H. ZHANG AND Q. H. SONG. Exercise Improves Cognitive Function in Aging Patients. **Int J Clin Exp Med** **7**, no. 10 (2014): 3144-9.

HULTMAN, E., K. SODERLUND, J. A. TIMMONS, G. CEDERBLAD AND P. L. GREENHAFF. "Muscle Creatine Loading in Men." **J Appl Physiol** **81**, no. 1 (1996): 232-7.

HURME T, RANTANEN J, KALIOMO H. Effects of early cryotherapy in experimental skeletal muscle injury **Scand J Med Sci Sports**. 1993;3(1):46-51.

HYLDAHL, R. D. AND M. J. HUBAL. "Lengthening Our Perspective: Morphological, Cellular, and Molecular Responses to Eccentric Exercise." **Muscle Nerve** **49**, no. 2 (2014): 155-70.

INOUE, K., Y. HANAOKA, T. NISHIJIMA, M. OKAMOTO, H. CHANG, T. SAITO AND H. SOYA. "Long-Term Mild Exercise Training Enhances Hippocampus-Dependent Memory in Rats." **Int J Sports Med** **36**, no. 4 (2015): 280-5.

IVY JL. Exercise physiology: A brief history and recommendations regarding content requirements for the kinesiology major. **Quest** **59**: 34-41, 2007.

JARVINEN, T. A., T. L. JARVINEN, M. KAARIAINEN, H. KALIMO AND M. JARVINEN. "Muscle Injuries: Biology and Treatment." **Am J Sports Med** **33**, no. 5 (2005): 745-64.

JI, E. S., Y. M. KIM, M. S. SHIN, C. J. KIM, K. S. LEE, K. KIM, J. HA AND Y. R. CHUNG. "Treadmill Exercise Enhances Spatial Learning Ability through Suppressing Hippocampal Apoptosis in Huntington's Disease Rats." **J Exerc Rehabil** **11**, no. 3 (2015): 133-9.

JI, L. L. "Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise." **Proc Soc Exp Biol Med** **222**, no. 3 (1999): 283-92

JI, L. L. "Exercise and Oxidative Stress: Role of the Cellular Antioxidant Systems." **Exerc Sport Sci Rev** **23**, (1995): 135-66.

KEHL, L. J., T. M. TREMPE AND K. M. HARGREAVES. "A New Animal Model for Assessing Mechanisms and Management of Muscle Hyperalgesia." **Pain** **85**, no. 3 (2000): 333-43.

KHANNA, N. K. AND J. TAHASHILDAR. "Anti-Inflammatory Activity of Creatine and Indomethacin Drug Mixture in Rats." **Indian J Exp Biol** **23**, no. 7 (1985): 402-3.

KIM, B. K., M. S. SHIN, C. J. KIM, S. B. BAEK, Y. C. KO AND Y. P. KIM. "Treadmill Exercise Improves Short-Term Memory by Enhancing Neurogenesis in Amyloid Beta-Induced Alzheimer Disease Rats." **J Exerc Rehabil** **10**, no. 1 (2014): 2-8.

KOHL, Z., M. KANDASAMY, B. WINNER, R. AIGNER, C. GROSS, S. COUILLARD-DESPRES, U. BOGDAHN, L. AIGNER AND J. WINKLER. "Physical Activity Fails to Rescue Hippocampal Neurogenesis Deficits in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease." **Brain Res** **1155**, (2007): 24-33.

- KRAMER, A. F., S. HAHN, N. J. COHEN, M. T. BANICH, E. MCAULEY, C. R. HARRISON, J. CHASON, E. VAKIL, L. BARDELL, R. A. BOILEAU AND A. COLCOMBE. "Ageing, Fitness and Neurocognitive Function." **Nature** **400**, no. 6743 (1999): 418-9
- KRENTZ, J. R., B. QUEST, J. P. FARTHING, D. W. QUEST AND P. D. CHILIBECK. "The Effects of Ibuprofen on Muscle Hypertrophy, Strength, and Soreness During Resistance Training." **Appl Physiol Nutr Metab** **33**, no. 3 (2008): 470-5.
- KUANG, Z., S. YAO, K. A. MCNEIL, B. E. FORBES, J. C. WALLACE AND R. S. NORTON. "Insulin-Like Growth Factor-I (Igf-I): Solution Properties and Nmr Chemical Shift Assignments near Physiological Ph." **Growth Horm IGF Res** **19**, no. 3 (2009): 226-31.
- LAURIN, D., R. VERREAULT, J. LINDSAY, K. MACPHERSON AND K. ROCKWOOD. "Physical Activity and Risk of Cognitive Impairment and Dementia in Elderly Persons." **Arch Neurol** **58**, no. 3 (2001): 498-504
- LAWLER, J. M., W. S. BARNES, G. WU, W. SONG AND S. DEMAREE. "Direct Antioxidant Properties of Creatine." **Biochem Biophys Res Commun** **290**, no. 1 (2002): 47-52.
- LE GRAND, F. AND M. A. RUDNICKI. "Skeletal Muscle Satellite Cells and Adult Myogenesis." **Curr Opin Cell Biol** **19**, no. 6 (2007): 628-33.
- LEE, D. P., W. F. FEARON AND V. F. FROELICHER. "Clinical Utility of the Exercise Ecg in Patients with Diabetes and Chest Pain." **Chest** **119**, no. 5 (2001): 1576-81.
- LEE, E. J., K. WILLIAMS, R. DAY, G. GRAHAM AND D. CHAMPION. "Stereoselective Disposition of Ibuprofen Enantiomers in Man. 1985." **Br J Clin Pharmacol** **58**, no. 7 (2004): S759-64; discussion S765-7.
- LIMA, F. D., M. S. OLIVEIRA, A. F. FURIAN, M. A. SOUZA, L. M. RAMBO, L. R. RIBEIRO, L. F. SILVA, L. T. RETAMOSO, M. S. HOFFMANN, D. V. MAGNI, L. PEREIRA, M. R. FIGHERA, C. F. MELLO AND L. F. ROYES. "Adaptation to Oxidative Challenge Induced by Chronic Physical Exercise Prevents Na⁺,K⁺-Atpase Activity Inhibition after Traumatic Brain Injury." **Brain Res** **1279**, (2009): 147-55.
- LIMA, F. D., D. N. STAMM, I. D. DELLA PACE, L. R. RIBEIRO, L. M. RAMBO, G. BRESCIANI, J. FERREIRA, M. F. ROSSATO, M. A. SILVA, M. E. PEREIRA, R. P. INEU, A. R. SANTOS, F. BOBINSKI, M. R. FIGHERA AND L. F. ROYES. "Ibuprofen Intake Increases Exercise Time to Exhaustion: A Possible Role for Preventing Exercise-Induced Fatigue." **Scand J Med Sci Sports** **26**, no. 10 (2016): 1160-70.
- LOCKE, M. "Heat Shock Protein Accumulation and Heat Shock Transcription Factor Activation in Rat Skeletal Muscle During Compensatory Hypertrophy." **Acta Physiol (Oxf)** **192**, no. 3 (2008): 403-11.

MACKEY, A. L. "Does an Nsaid a Day Keep Satellite Cells at Bay?" **J Appl Physiol (1985) 115**, no. 6 (2013): 900-8.

MALM, C. AND J. G. YU. "Exercise-Induced Muscle Damage and Inflammation: Re-Evaluation by Proteomics." **Histochem Cell Biol 138**, no. 1 (2012): 89-99.

MANSON, J. E., F. B. HU, J. W. RICH-EDWARDS, G. A. COLDITZ, M. J. STAMPFER, W. C. WILLETT, F. E. SPEIZER AND C. H. HENNEKENS. "A Prospective Study of Walking as Compared with Vigorous Exercise in the Prevention of Coronary Heart Disease in Women." **N Engl J Med 341**, no. 9 (1999): 650-8.

MARCOTTE, G. R., D. W. WEST AND K. BAAR. "The Molecular Basis for Load-Induced Skeletal Muscle Hypertrophy." **Calcif Tissue Int 96**, no. 3 (2015): 196-210.

MARKWORTH, J. F., L. D. VELLA, V. C. FIGUEIREDO AND D. CAMERON-SMITH. "Ibuprofen Treatment Blunts Early Translational Signaling Responses in Human Skeletal Muscle Following Resistance Exercise." **J Appl Physiol (1985) 117**, no. 1 (2014): 20-8.

MARUHASHI, Y., K. KITAOKA, Y. YOSHIKI, R. NAKAMURA, A. OKANO, K. NAKAMURA, T. TSUYAMA, Y. SHIMA AND K. TOMITA. "Ros Scavenging Activity and Muscle Damage Prevention in Eccentric Exercise in Rats." **J Physiol Sci 57**, no. 4 (2007): 211-6.

MAUGHAN, R; GLEESON, M; GREENHAFF, P.L. Bioquímica do exercício e treinamento. 1^a ed. São Paulo. **Editora Manole**, 2000.

MCARDLE, W. D; KATCH, F. I.; KATCH, F. Fisiologia do exercício. 4^a ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 1998.

MCCORMICK, K. M. AND E. SCHULTZ. "Role of Satellite Cells in Altering Myosin Expression During Avian Skeletal Muscle Hypertrophy." **Dev Dyn 199**, no. 1 (1994): 52-63.

MIKKELSEN, U. R., H. LANGBERG, I. C. HELMARK, D. SKOVGAARD, L. L. ANDERSEN, M. KJAER AND A. L. MACKEY. "Local Nsaid Infusion Inhibits Satellite Cell Proliferation in Human Skeletal Muscle after Eccentric Exercise." **J Appl Physiol (1985) 107**, no. 5 (2009): 1600-11.

MIYABARA, E. H., T. C. CONTE, M. T. SILVA, I. L. BAPTISTA, C. BUENO, JR., J. FIAMONCINI, R. H. LAMBERTUCCI, C. S. SERRA, P. C. BRUM, T. PITHON-CURI, R. CURI, M. S. AOKI, A. C. OLIVEIRA AND A. S. MORISCOT. "Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Is Involved in Differentiation of Regenerating Myofibers in Vivo." **Muscle Nerve 42**, no. 5 (2010): 778-87.

MORELLI, K. M., L. B. BROWN AND G. L. WARREN. "Effect of Nsaids on Recovery from Acute Skeletal Muscle Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis." **Am J Sports Med, (2017)**: 363546517697957.

- MUIR, A. R. "Further Observations on the Cellular Structure of Cardiac Muscle." **J Anat** **99**, (1965): 27-46.
- NIEMAN, D. C. "Current Perspective on Exercise Immunology." **Curr Sports Med Rep** **2**, no. 5 (2003): 239-42.
- NOMURA, A., M. ZHANG, T. SAKAMOTO, Y. ISHII, Y. MORISHIMA, M. MOCHIZUKI, T. KIMURA, Y. UCHIDA AND K. SEKIZAWA. "Anti-Inflammatory Activity of Creatine Supplementation in Endothelial Cells in Vitro." **Br J Pharmacol** **139**, no. 4 (2003): 715-20.
- OGBORN, D. I., K. J. SMITH, J. D. CRANE, A. SAFDAR, B. P. HETTINGA, R. TUPLER AND M. A. TARNOPOLSKY. "Effects of Creatine and Exercise on Skeletal Muscle of Frg1-Transgenic Mice." **Can J Neurol Sci** **39**, no. 2 (2012): 225-31.
- ORIMO, S., E. HIYAMUTA, K. ARAHATA AND H. SUGITA. "Analysis of Inflammatory Cells and Complement C3 in Bupivacaine-Induced Myonecrosis." **Muscle Nerve** **14**, no. 6 (1991): 515-20.
- PAN, J. W. AND K. TAKAHASHI. "Cerebral Energetic Effects of Creatine Supplementation in Humans." **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** **292**, no. 4 (2007): R1745-50.
- PAULSEN, G., U. R. MIKKELSEN, T. RAASTAD AND J. M. PEAKE. "Leucocytes, Cytokines and Satellite Cells: What Role Do They Play in Muscle Damage and Regeneration Following Eccentric Exercise?" **Exerc Immunol Rev** **18**, (2012): 42-97.
- PEAKE, J., K. NOSAKA AND K. SUZUKI. "Characterization of Inflammatory Responses to Eccentric Exercise in Humans." **Exerc Immunol Rev** **11**, (2005): 64-85.
- PEDERSEN, B. K. AND M. A. FEBBRAIO. "Muscles, Exercise and Obesity: Skeletal Muscle as a Secretory Organ." **Nat Rev Endocrinol** **8**, no. 8 (2012): 457-65.
- PEREIRA, B. C., J. R. PAULI, C. T. DE SOUZA, E. R. ROPELLE, D. E. CINTRA, E. C. FREITAS AND A. S. DA SILVA. "Eccentric Exercise Leads to Performance Decrease and Insulin Signaling Impairment." **Med Sci Sports Exerc** **46**, no. 4 (2014): 686-94.
- PERSKY, A. M. AND G. A. BRAZEAU. "Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate." **Pharmacol Rev** **53**, no. 2 (2001): 161-76.
- PERSKY, A. M. AND E. S. RAWSON. "Safety of Creatine Supplementation." **Subcell Biochem** **46**, (2007): 275-89.
- POWELL, K. E. AND R. S. PAFFENBARGER, JR. "Workshop on Epidemiologic and Public Health Aspects of Physical Activity and Exercise: A Summary." **Public Health Rep** **100**, no. 2 (1985): 118-26.

POWERS, S. K., L. L. JI AND C. LEEUWENBURGH. "Exercise Training-Induced Alterations in Skeletal Muscle Antioxidant Capacity: A Brief Review." **Med Sci Sports Exerc** **31**, no. 7 (1999): 987-97.

POWERS, S. K. "Edward F. Adolph Distinguished Lecture Exercise: Teaching Myocytes New Tricks." **J Appl Physiol** (1985), (2017): jap 00418 2017.

PROSKE, U. and T. J. Allen. "Damage to Skeletal Muscle from Eccentric Exercise." **Exerc Sport Sci Rev** **33**, no. 2 (2005): 98-104.

PROSKE, U. AND D. L. MORGAN. "Muscle Damage from Eccentric Exercise: Mechanism, Mechanical Signs, Adaptation and Clinical Applications." **J Physiol** **537**, no. Pt 2 (2001): 333-45.

RANDO, T. A. "Recent Advances in the Pathogenesis and Treatment of Neuromuscular Diseases." **Curr Opin Neurol** **25**, no. 5 (2012): 586-7.

RETAMOSO, L. T., M. E. JUNIOR SILVEIRA, F. D. LIMA, G. L. BUSANELLO, G. BRESCIANI, L. R. RIBEIRO, P. M. CHAGAS, C. W. NOGUEIRA, A. C. BRAGA, A. F. FURIAN, M. S. OLIVEIRA, M. R. FIGHERA AND L. F. ROYES. "Increased Xanthine Oxidase-Related Ros Production and Trpv1 Synthesis Preceding Doms Post-Eccentric Exercise in Rats." **Life Sci** **152**, (2016): 52-9.

ROSA, E. F., R. F. RIBEIRO, F. M. PEREIRA, E. FREYMULLER, J. ABOULAFIA AND V. L. NOUAILHETAS. "Vitamin C and E Supplementation Prevents Mitochondrial Damage of Ileum Myocytes Caused by Intense and Exhaustive Exercise Training." **J Appl Physiol** (1985) **107**, no. 5 (2009): 1532-8.

SAREMI, A., R. GHARAKHANLOO, S. SHARGHI, M. R. GHARAATI, B. LARIJANI AND K. OMIDFAR. "Effects of Oral Creatine and Resistance Training on Serum Myostatin and Gasp-1." **Mol Cell Endocrinol** **317**, no. 1-2 (2010): 25-30.

SERRANO, A. L., B. BAEZA-RAJA, E. PERDIGUERO, M. JARDI AND P. MUÑOZ-CANOVES. "Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy." **Cell Metab** **7**, no. 1 (2008): 33-44.

SESTILI, P., P. AMBROGINI, E. BARBIERI, S. SARTINI, C. FIMOGNARI, C. CALCARINI, A. R. DIAZ, M. GUESCINI, E. POLIDORI, F. LUCHETTI, B. CANONICO, D. LATTANZI, R. CUPPINI, S. PAPA AND V. STOCCHI. "New Insights into the Trophic and Cytoprotective Effects of Creatine in in Vitro and in Vivo Models of Cell Maturation." **Amino Acids** **48**, no. 8 (2016): 1897-911.

SESTILI, P., C. MARTINELLI, G. BRAVI, G. PICCOLI, R. CURCI, M. BATTISTELLI, E. FALCIERI, D. AGOSTINI, A. M. GIOACCHINI AND V. STOCCHI. "Creatine Supplementation Affords Cytoprotection in Oxidatively Injured Cultured Mammalian Cells Via Direct Antioxidant Activity." **Free Radic Biol Med** **40**, no. 5 (2006): 837-49.

SESTILLI, P., C. MARTINELLI, E. COLOMBO, E. BARBIERI, L. POTENZA, S. SARTINI AND C. FIMOGNARI. "Creatine as an Antioxidant." **Amino Acids** **40**, no. 5 (2011): 1385-96.

SPEISMAN, R. B., A. KUMAR, A. RANI, T. C. FOSTER AND B. K. ORMEROD. "Daily Exercise Improves Memory, Stimulates Hippocampal Neurogenesis and Modulates Immune and Neuroimmune Cytokines in Aging Rats." **Brain Behav Immun** **28**, (2013): 25-43.

SCHIAFFINO, S., K. A. DYAR, S. CICILIO, B. BLAAUW AND M. SANDRI. "Mechanisms Regulating Skeletal Muscle Growth and Atrophy." **FEBS J** **280**, no. 17 (2013): 4294-314.

SCHOENFELD, B. J. "The Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Exercise-Induced Muscle Damage: Implications for Skeletal Muscle Development." **Sports Med** **42**, no. 12 (2012): 1017-28.

STROUD, M. A., D. HOLLIMAN, D. BELL, A. L. GREEN, I. A. MACDONALD AND P. L. GREENHAFF. "Effect of Oral Creatine Supplementation on Respiratory Gas Exchange and Blood Lactate Accumulation During Steady-State Incremental Treadmill Exercise and Recovery in Man." **Clin Sci (Lond)** **87**, no. 6 (1994): 707-10.

SOUZA MA, OLIVEIRA MS, FURIAN AF, ET AL. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia.** **2009**;50(4):811-823.

SUGITA, S., Y. KAMEI, F. AKAIKE, T. SUGANAMI, S. KANAI, M. HATTORI, Y. MANABE, N. FUJII, T. TAKAI-IGARASHI, M. TADAISHI, J. OKA, H. ABURATANI, T. YAMADA, H. KATAGIRI, S. KAKEHI, Y. TAMURA, H. KUBO, K. NISHIDA, S. MIURA, O. EZAKI AND Y. OGAWA. "Increased Systemic Glucose Tolerance with Increased Muscle Glucose Uptake in Transgenic Mice Overexpressing Rxrgamma in Skeletal Muscle." **PLoS One** **6**, no. 5 (2011): e20467.

TARNOPOLSKY, M. A. "Creatine as a Therapeutic Strategy for Myopathies." **Amino Acids** **40**, no. 5 (2011): 1397-407.

TARNOPOLSKY, M. A. AND D. P. MACLENNAN. "Creatine Monohydrate Supplementation Enhances High-Intensity Exercise Performance in Males and Females." **Int J Sport Nutr Exerc Metab** **10**, no. 4 (2000): 452-63.

TIDBALL, J. G. "Inflammatory Processes in Muscle Injury and Repair." **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** **288**, no. 2 (2005): R345-53.

TIDBALL, J. G. AND M. WEHLING-HENRICKS. "Macrophages Promote Muscle Membrane Repair and Muscle Fibre Growth and Regeneration During Modified Muscle Loading in Mice in Vivo." **J Physiol** **578**, no. Pt 1 (2007): 327-36.

TIIDUS, P. M., L. BROWN, A. BRANT, D. ENNS AND P. J. BRYDEN. "Physiological, Sensory, and Functional Measures in a Model of Wrist Muscle Injury and Recovery." **Physiother Can** **60**, no. 1 (2008): 30-9.

TILLERSON, J. L., W. M. CAUDLE, M. E. REVERON AND G. W. MILLER. "Exercise Induces Behavioral Recovery and Attenuates Neurochemical Deficits in Rodent Models of Parkinson's Disease." **Neuroscience** **119**, no. 3 (2003): 899-911.

THOMAS, K. JUSTUS VON LIEBIG. **The Journal of Nutrition**, v. 7, p. 2-12, 1934

TOUCHBERRY, C. D., A. A. GUPTE, G. L. BOMHOFF, Z. A. GRAHAM, P. C. GEIGER AND P. M. GALLAGHER. "Acute Heat Stress Prior to Downhill Running May Enhance Skeletal Muscle Remodeling." **Cell Stress Chaperones** **17**, no. 6 (2012): 693-705.

TRAPPE, T. A., J. D. FLUCKEY, F. WHITE, C. P. LAMBERT AND W. J. EVANS. "Skeletal Muscle PgF(2)(Alpha) and Pge(2) in Response to Eccentric Resistance Exercise: Influence of Ibuprofen Acetaminophen." **J Clin Endocrinol Metab** **86**, no. 10 (2001): 5067-70.

TRAPPE, T. A., F. WHITE, C. P. LAMBERT, D. CESAR, M. HELLERSTEIN AND W. J. EVANS. "Effect of Ibuprofen and Acetaminophen on Postexercise Muscle Protein Synthesis." **Am J Physiol Endocrinol Metab** **282**, no. 3 (2002): E551-6.

TRAPPE, T. A. AND S. Z. LIU. "Effects of Prostaglandins and Cox-Inhibiting Drugs on Skeletal Muscle Adaptations to Exercise." **J Appl Physiol (1985)** **115**, no. 6 (2013): 909-19.

TSIVITSE, S. K., T. J. MCLOUGHLIN, J. M. PETERSON, E. MYLONA, S. J. MCGREGOR AND F. X. PIZZA. "Downhill Running in Rats: Influence on Neutrophils, Macrophages, and Myod+ Cells in Skeletal Muscle." **Eur J Appl Physiol** **90**, no. 5-6 (2003): 633-8.

VAN WIJCK, K., K. LENAERTS, A. A. VAN BIJNEN, B. BOONEN, L. J. VAN LOON, C. H. DEJONG AND W. A. BUURMAN. "Aggravation of Exercise-Induced Intestinal Injury by Ibuprofen in Athletes." **Med Sci Sports Exerc** **44**, no. 12 (2012): 2257-62.

VELLA, L., J. F. MARKWORTH, G. PAULSEN, T. RAASTAD, J. M. PEAKE, R. J. SNOW, D. CAMERON-SMITH AND A. P. RUSSELL. "Ibuprofen Ingestion Does Not Affect Markers of Post-Exercise Muscle Inflammation." **Front Physiol** **7**, (2016): 86.

WALKER, J. B. "Creatine: Biosynthesis, Regulation, and Function." **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** **50**, (1979): 177-242.

WALLIMANN, T., M. DOLDER, U. SCHLATTNER, M. EDER, T. HORNEMANN, E. O'GORMAN, A. RUCK AND D. BRDICZKA. "Some New Aspects of Creatine Kinase (Ck): Compartmentation, Structure, Function and Regulation for Cellular and Mitochondrial Bioenergetics and Physiology." **Biofactors** **8**, no. 3-4 (1998): 229-34.

WANG, H., L. A. KNAUB, D. R. JENSEN, D. YOUNG JUNG, E. G. HONG, H. J. KO, A. M. COATES, I. J. GOLDBERG, B. A. DE LA HOUSSAYE, R. C. JANSSEN, C. E. MCCURDY, S. M. RAHMAN, C. SOO CHOI, G. I. SHULMAN, J. K. KIM, J. E. FRIEDMAN AND R. H. ECKEL. "Skeletal Muscle-Specific Deletion of Lipoprotein Lipase Enhances Insulin Signaling in Skeletal Muscle but Causes Insulin Resistance in Liver and Other Tissues." **Diabetes** **58**, no. 1 (2009): 116-24.

WARREN, B. J., D. C. NIEMAN, R. G. DOTSON, C. H. ADKINS, K. A. O'DONNELL, B. L. HADDOCK AND D. E. BUTTERWORTH. "Cardiorespiratory Responses to Exercise Training in Septuagenarian Women." **Int J Sports Med** **14**, no. 2 (1993): 60-5.

WILLOUGHBY, D. S. AND J. M. ROSENE. "Effects of Oral Creatine and Resistance Training on Myogenic Regulatory Factor Expression." **Med Sci Sports Exerc** **35**, no. 6 (2003): 923-9.

WOODS, J. A., K. R. WILUND, S. A. MARTIN AND B. M. KISTLER. "Exercise, Inflammation and Aging." **Aging Dis** **3**, no. 1 (2012): 130-40.

WOZNIAK, A. C., J. KONG, E. BOCK, O. PILIPOWICZ AND J. E. ANDERSON. "Signaling Satellite-Cell Activation in Skeletal Muscle: Markers, Models, Stretch, and Potential Alternate Pathways." **Muscle Nerve** **31**, no. 3 (2005): 283-300.

YU, J. G., C. MALM AND L. E. THORNELL. "Eccentric Contractions Leading to Doms Do Not Cause Loss of Desmin nor Fibre Necrosis in Human Muscle." **Histochem Cell Biol** **118**, no. 1 (2002): 29-34.

ZANOU, N. AND P. GAILLY. "Skeletal Muscle Hypertrophy and Regeneration: Interplay between the Myogenic Regulatory Factors (Mrf's) and Insulin-Like Growth Factors (Igf's) Pathways." **Cell Mol Life Sci** **70**, no. 21 (2013): 4117-30.

WYSS, M.; SCHULZE, A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease. **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 243-260, 2002

WYSS, M.; KADDURAHAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.