

CONIC-SEMESP

13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

TÍTULO: ESTUDO DA TOXICIDADE RENAL E HEPÁTICA DE RATOS SUPLEMENTADOS COM CREATINA

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: MEDICINA

INSTITUIÇÃO: FACULDADE DE MEDICINA DE ITAJUBÁ

AUTOR(ES): LETÍCIA PEREIRA DE CASTRO

ORIENTADOR(ES): NILO CÉSAR DO VALE BARACHO

Realização:



Apoio:



“Estudo da toxicidade renal e hepática de ratos suplementados com creatina.”

RESUMO

Introdução: Atualmente, analisam-se diferentes métodos de aperfeiçoar o desempenho, complementando o efeito do treinamento, dentre estes, a suplementação com creatina. A justificativa deste consumo tem sido a evidência de que sua disponibilidade melhoraria o desempenho muscular durante atividades de curta duração e alta intensidade. Porém, em virtude da intensa utilização como suplemento nutricional, faz-se necessário uma avaliação da possível toxicidade hepática e renal que este poderia desencadear. **Objetivo:** avaliar a função hepática e renal, através da análise bioquímica após 14 dias de suplementação com creatina em ratos não submetidos à atividade física. **Materiais e Métodos:** foram utilizados 24 ratos *Wistar*, com peso entre 200 e 250g e idade entre 60 e 90 dias, sendo mantidos em gaiolas metabólicas individuais, durante os 14 dias do experimento, e divididos em 04 grupos: 1) Controle: água destilada; 2) Creatina 0,5g/Kg/dia; 3) Creatina 1g/Kg/dia; 4) Creatina 2g/Kg/dia. A diurese dos animais foi mensurada e coletada todos os dias, e também realizada a mensuração diária da ingestão alimentar e hídrica. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de soro obtidas foram armazenadas para análise bioquímica. **Resultados:** a suplementação com creatina nas doses apresentadas não produziu alterações significativas nos níveis plasmáticos de aspartatoaminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicérides, glicemia, creatinina, uréia e clearance de creatinina, comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). Ademais, demonstraram que a ingestão hídrica, diurese e a ingestão alimentar diária não sofreram alterações significativas entre os quatro grupos estudados. **Conclusão:** nas doses utilizadas a suplementação oral com creatina não induziu a nenhum tipo de efeito tóxico hepático e renal.

Palavras chave: creatina, toxicidade hepática, toxicidade renal.

INTRODUÇÃO

No início da era esportiva, a vantagem obtida pelos atletas de destaque era considerada uma barreira intransponível. Atualmente, analisa-se a busca de diferentes métodos de se aperfeiçoar o desempenho, complementando o efeito do treinamento.¹⁻³

Dados recentemente publicados sugerem que o uso de suplementos chega a atingir 46% dos atletas competitivos.⁴ No início, surgiu compostos como o pólen de abelhas, a geleia real, a

colina, seguidos pelos carboidratos, e atualmente, a creatina.^{1,46} Pesquisas realizadas estimam que 80% dos atletas participantes dos Jogos Olímpicos de Atlanta, realizados em 1996, utilizaram a creatina com finalidade ergogênica.⁷ A justificativa para tal consumo tem sido a evidência de que a disponibilidade desse composto seja uma das principais limitações para o desempenho muscular durante atividades de curta duração e alta intensidade, visto que sua depleção resulta na incapacidade de se ressintetizar adenosina trifosfato (ATP) nas quantidades necessárias.⁸⁻¹⁰

A creatina é uma amina nitrogenada denominada ácido acético metilguanidina e sua importância sobre o organismo foi inicialmente demonstrada por Hunter em 1928.⁷ Na mesma época, os pesquisadores Heitz e Pettenkoffer descobriram uma nova substância presente na urina, identificada por Liebig como creatinina, um subproduto da creatina.¹¹ A síntese de creatina é realizada no fígado, rins e pâncreas, tendo como precursores três aminoácidos distintos: arginina, glicina e metionina.¹² A estocagem ocorre, principalmente, no músculo esquelético, correspondendo a 95%, onde pode se manter na forma livre (40%) ou fosforilada (60%); ademais, a mesma também é encontrada no cérebro, fígado, rins e testículos, com correspondência de 5% do total.^{13,14} Além da síntese de creatina no organismo (creatina endógena) a alimentação fornece cerca de 1 grama de creatina/dia, principalmente através do consumo de produtos de origem animal, tais como carnes bovinas e peixes.^{15,16} O requerimento diário médio é de 2 g/dia, sendo 1 grama proveniente da dieta e 1 grama da produção endógena.¹⁷⁻¹⁹

O mecanismo de ação da creatina baseia-se em efeitos que provocam melhoria no metabolismo energético muscular, na qual a creatina fosforilada possui a capacidade de ressintetizar ATP, a partir da adenosina difosfato, aumentando seus depósitos em 6-8 vezes.¹⁹⁻²¹ Outro efeito benéfico da suplementação de creatina é o aumento do tamanho das fibras musculares, bem como da massa magra corporal, visto que há um aumento na síntese de proteínas e uma redução de seu catabolismo.^{14,22,23}

A diminuição dos níveis teciduais de creatina tem sido associada a uma série de doenças, razão pela qual os efeitos de sua suplementação vêm sendo estudados.^{24,25} A título de exemplificar tal conduta, trabalhos sobre seu potencial antioxidante vem sendo desenvolvidos, visto que com a maior disponibilidade de ATP, obtidos a partir da fosfocreatina, menor será a produção de hipoxantina, associada à redução paralela de seu catabolismo em xantina e urato, resultando em menor produção de espécies reativas de oxigênio na fibra muscular.²⁶⁻²⁸

Nesse contexto, observa-se que os níveis fisiológicos de creatina apresentam efeitos benéficos ao organismo^{8,29}. Porém, em virtude da intensa utilização da mesma como suplemento nutricional, faz-se necessário a realização de uma criteriosa avaliação da possível

toxicidade sobre o metabolismo e morfologia hepática, bem como à função renal que tal suplementação poderia desencadear, visto que seu efeito toxicológico ainda apresenta-se controverso pela literatura científica.³⁰ Estudos demonstraram que a suplementação com creatina não causaram danos à função renal e hepática em ratos.^{31,32} Entretanto, alguns trabalhos experimentais e clínicos têm associado à sua suplementação à alguns efeitos colaterais, como o aparecimento de um quadro de hepatite, e efeitos prejudiciais no ritmo de filtração glomerular, bem como no fluxo renal plasmático.^{33,34}

Considerando tais divergências sobre o efeito toxicológico da suplementação de creatina no metabolismo hepático e renal, através dos estudos realizados, é necessário o desenvolvimento de novas pesquisas com a finalidade de comprovar cientificamente a efetiva fisiopatologia de sua suplementação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do experimento, foram utilizados 24 ratos *Wistar*. Os animais tinham peso entre 200 e 250g com idade entre 60 e 90 dias, todos provenientes do biotério da FMIt. O estudo foi realizado na sala de experimentação animal do Biotério e no Laboratório de Bioquímica da FMIt, obedecendo a Lei Federal 11.794 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Tratamento e dosagens

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais e submetidos a ciclo claro-escuro de 12 horas, durante os 14 dias do experimento, e tiveram livre acesso à água e a ração para animais de laboratório.³²

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 04 grupos de 06 ratos (n=06). Os ratos receberam os tratamentos descritos abaixo, em dose única diária por via oral (gavagem), no período da tarde, durante os quatorze dias:

- Grupo 01 (controle – n = 6) - água destilada – VO (gavagem);
- Grupo 02 (n = 6) - creatina micronizada diluída em água (15 ml) – 0,5g/kg/dia – VO (gavagem)³²;
- Grupo 03 (n = 6) – creatina micronizada diluída em água (15 ml) - 1g/kg/dia – VO (gavagem);
- Grupo 04 (n = 6) – creatina micronizada diluída em água (15 ml) - 2g/kg/dia – VO (gavagem).

Cabe ressaltar que o suplemento utilizado será a creatina micronizada HPLC, Probiótica[®].³²

A urina dos animais foi mensurada todos os dias, durante todo o período experimental. Foram utilizadas provetas graduadas para mensuração do volume urinário de 24 horas. Em seguida as amostras de urina do 14^a dia do experimento foram coletadas e centrifugadas em centrífuga clínica (Excelsa, Fanen) a 2000rpm durante 5 minutos e o sobrenadante obtido foi guardado em tubos fechados em congelador (-4°C), para análises laboratoriais.

Ao término do experimento, respeitando-se um período de jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com Ketamina (50mg/Kg) / Xylazina (25mg/Kg), por via intramuscular (IM), e submetidos à punção intracardíaca aspirativa para eutanásia e coleta de amostras. O sangue colhido foi centrifugado em centrífuga clínica (Excelsa, Fanen) a 2000rpm durante 10 minutos e o soro obtido (+/- 2mL/rato) foi guardado em tubos fechados em congelador (-4°C), para análises laboratoriais.

As amostras de soro armazenadas foram utilizadas para determinação dos seguintes parâmetros bioquímicos, utilizando espectrofotômetro (Quimis Q-108DRD): aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicérides, glicemia de jejum, creatinina, uréia e clearance de creatinina. Para a determinação das concentrações foram utilizados os Kits da marca Labtest.

Para análise estatística, utilizou-se o programa BioEstat, versão 5.0. O teste *t* de Student foi utilizado entre duas populações independentes, para a comparação dos grupos em cada momento, com o cálculo da estatística *p*. Os dados obtidos também foram submetidos ao teste ANOVA, para verificação de discordância entre os quatro grupos. Nos casos de *p* menor que 0,05, a estatística foi considerada significativa.³⁵

RESULTADOS

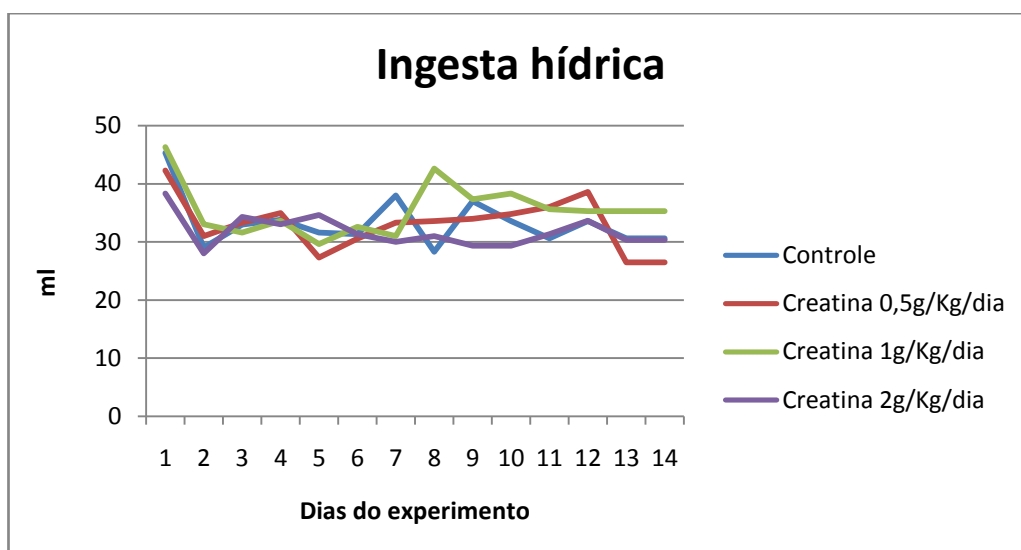
A suplementação com creatina nas doses 0,5g/kg/dia; 1g/kg/dia e 2g/kg/dia não produziram alterações significativas nas dosagens laboratoriais de glicemia, creatinina, colesterol total, triglicérides, HDLc, LDLc, VLDLc, AST, ALT, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, uréia e clearance de creatinina, comparado ao grupo controle, nos teste *t* de Student e ANOVA. (Tabela 1).

A análise da ingestão hídrica, durante os quatorze dias de experimento, não demonstrou alterações significativas diárias ($p= 0,1195$) entre os quatro grupos estudados, através do teste *t* de Student e ANOVA. (Gráfico 1).

Tabela 1. Níveis plasmáticos dos parâmetros avaliados para o grupo Controle e os grupos Creatina. Resultados expressos como média e desvio padrão.

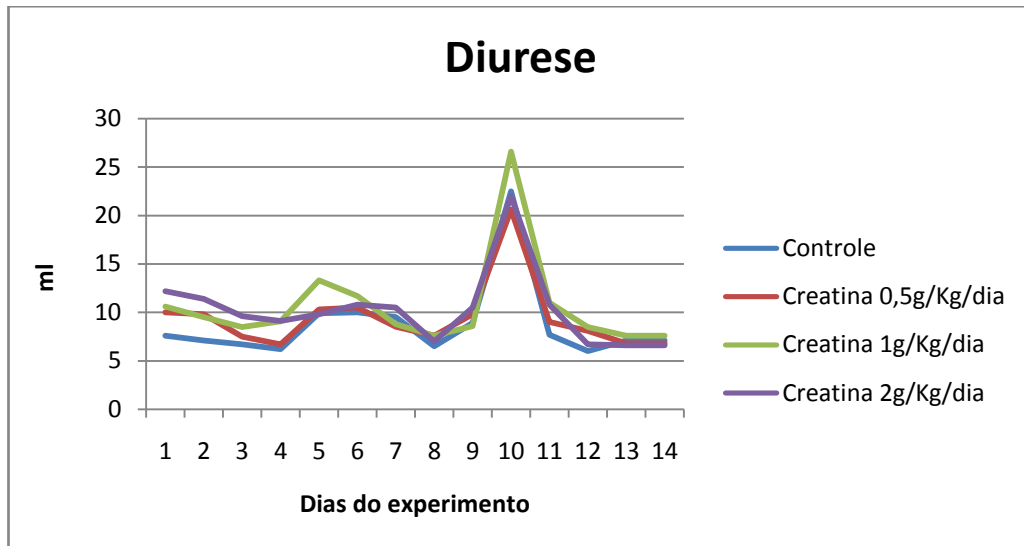
PARÂMETROS AVALIADOS	CONTROLE	CREATINA 0,5g/kg/dia	CREATINA 1g/kg/dia	CREATINA 2g/kg/dia
Glicemia (mg/dl)	185,33±29,89	197,33±33,45	190,00±21,03	181,66±26,69
Creatinina (mg/dl)	0,28±0,14	0,24±0,16	0,26±0,12	0,31±0,10
Colesterol total (mg/dl)	59,50±18,11	53,33±8,42	54,16±15,76	40,16±6,41
Triglicérides (mg/dl)	43,16±13,32	41,50±10,98	39,00±15,77	35,00±7,02
HDLc (mg/dl)	13,83±7,73	10,83±4,14	12,00±5,16	8,33±4,27
LDLc (mg/dl)	37,03±12,18	34,20±11,00	34,30±11,79	24,83±9,17
VLDLc (mg/dl)	8,63±2,66	8,30±2,20	7,80±3,15	7,00±1,40
AST (U/L)	111,16±31,80	153,50±84,20	144,00±96,03	177,33±91,29
ALT (U/L)	13,16±4,34	19,16±6,91	25,83±31,99	22,16±11,57
Fosfatase Alcalina(U/L)	155,83±71,40	219,33±68,04	185,50±66,11	165,50±32,49
Proteínas totais (g/dl)	6,01±0,74	6,81±0,51	6,41±0,53	6,63±0,39
Albumina (g/dl)	3,55±0,18	3,80±0,19	3,80±0,32	3,76±0,33
Uréia (mg/dl)	8,55±4,21	7,10±4,92	8,05±3,49	9,45±3,09
Clearance de creatinina (ml/min)	0,39±0,42	0,62±0,78	0,51±0,47	0,23±0,10

Gráfico 1. Alteração temporal da ingesta hídrica entre os grupos, durante os quatorze dias do experimento.



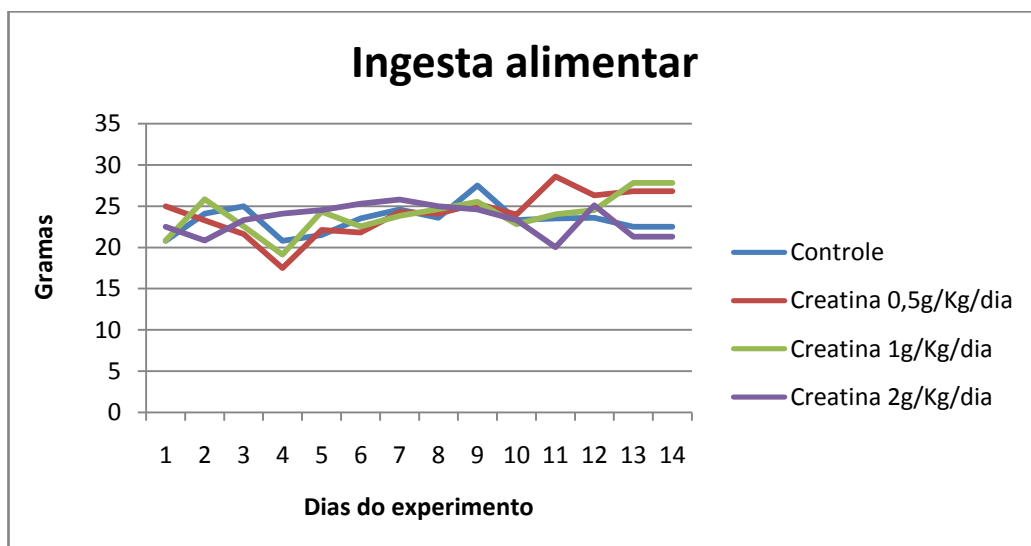
A análise da diurese, durante os quatorze dias de experimento, não demonstrou alterações significativas diárias ($p= 0,6381$) entre os quatro grupos estudados, através do teste t de Student e ANOVA. (Gráfico 2).

Gráfico 2. Alteração temporal da diurese entre os grupos, durante os quatorze dias do experimento.



A análise da ingestão de ração, durante os quatorze dias de experimento, não demonstrou alterações significativas diárias ($p= 0,7161$) entre os quatro grupos estudados, através do teste t de Student e ANOVA. (Gráfico 3).

Gráfico 3. Alteração temporal da ingestão alimentar entre os grupos, durante os quatorze dias do experimento.



DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a suplementação com creatina nas doses apresentadas não produziu alterações significativas nos níveis plasmáticos de aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicérides, glicemia, creatinina, uréia, bem como no clearance de creatinina, comparado ao grupo controle. Ademais, demonstrou que a ingesta hídrica, diurese e a ingesta alimentar diária, durante os quatorze dias de experimento, não sofreram alterações significativas entre os quatro grupos estudados.

Estes resultados obtidos estão de acordo com a escassa literatura e dados experimentais sobre o assunto. Segundo Vieira *et al.*⁽³²⁾, a análise histológica e bioquímica (níveis de aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamitranferase (GGT), proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicérides) não revelou nenhuma alteração hepática significativa em ratos suplementados com creatina na dose de 0,5 g/kg/dia durante os quatorze dias de experimento. Entretanto, tal estudo analisou a possível hepatotoxicidade utilizando apenas uma única dose de suplementação; ademais, foram observados apenas parâmetros hepáticos, não sendo analisada a possível toxicidade renal, como analisada no presente estudo.

Outros estudos encontrados na literatura científica também avaliam a toxicidade hepática e renal de ratos suplementados com creatina. No entanto, as metodologias utilizadas nos referidos estudos são distintas daquela apresentada neste. Por exemplo, Taeset *al.*⁽³¹⁾ investigaram o efeito da suplementação de creatina quando da doença renal pré-existente. Para tanto, utilizaram ratos com insuficiência renal induzida pela remoção cirúrgica de 2/3 do tecido renal. Os autores concluíram que tal suplementação não causa danos à função renal, mesmo havendo doença renal pré-existente. Por outro lado, Edmundset *al.*⁽³⁶⁾ investigaram o efeito da creatina na função renal utilizando ratos Han:SpragueDawley (SPRD-cy), modelo aceito de doença renal policística. Neste caso, a creatina provocou a progressão da doença renal policística, já que os ratos tiveram valores maiores de peso renal e conteúdo de fluido renal. Da mesma forma, Tamopolskyet *al.*⁽³³⁾ avaliaram a função hepática de ratos transgênicos suplementados com creatina, evidenciando ao final do experimento que o suplemento utilizado desenvolveu um quadro de hepatite nos animais. No entanto, não existem trabalhos na literatura que demonstrem claramente o potencial nefro e hepatotóxico da suplementação com creatina em ratos com a função renal e hepática íntegra, como no presente estudo.

CONCLUSÃO

Em suma, verificou-se que a suplementação com creatina nas doses de 0,5g/kg/dia; 1g/kg/dia e 2g/kg/dia, por 14 dias, não alterou de forma significativa os níveis plasmáticos de aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicérides, glicemia, creatinina, uréia, bem como no clearance de creatinina, comparado ao grupo controle. Portanto, o presente estudo, demonstrou que nas doses utilizadas a suplementação oral com creatina não induziu a nenhum tipo de efeito tóxico sobre o fígado e rim. Entretanto, estudos sobre os efeitos hepáticos e renais da suplementação com creatina em animais submetidos a treinamento físico também são necessários, tendo em vista que, apesar das várias aplicações clínicas da creatina, a maior parte de seu uso está associada à prática esportiva.

REFERÊNCIAS

- 1- Mujika I, Padilla S. Creatine supplementation as an ergogenic aid for sports performance in highly trained athletes: A critical review. *Int J Sports Nut*. 1997;18:491-496.
- 2- Williams MH. Ergogenic and ergolytic substances. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24:S344 - S 348.
- 3- Williams MH. Nutritional ergogenics in athletics. *J Sports Sci* 1995;13 (Special Issue): S63-S74.
- 4- Maughan RJ. Nutritional ergogenic aids and exercise performance. *Nut Res Rev* 1999;12:255-280.
- 5- Rossi L, Tirapegui J. Aminoácidos: bases atuais para a suplementação na atividade física. *Rev.Bras.CienFam* 2000;36:37-51.
- 6- Gomes M, Tirapegui J. Relação de alguns suplementos nutricionais e desempenho físico. *Arch LatinoamerNutr* 2001; 51: 317-329.
- 7- Branch JD, Kreider RB, Williams MH. *Creatina*. 1 ed. Editora Manole. São Paulo, 2000.
- 8- Williams MH, Branch JD. Creatine supplementation and exercise performance : an update. *J Am Coll Nutr* 1998;17:216-34.
- 9- Greenhaf PL. Creatine and its application as an ergogenic aid. *Int J Sports Nut* 1995; 5: S101-S110.
- 10- Brannon TA, Adams GR, Conniff CL, Baldwin KM. Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *MedSci Sports Exerc* 1997; 29: 489-495.
- 11- Pritchard NR, Kalra PA. Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. *Lancet* 351: 1252–1253, 1998.

- 12- Feldman EB. Creatine: a dietary supplement and ergogenic aid. *Nutr Rev* 1999; 57: 45-50.
- 13- Mendes RR, Tirapegui J. Creatina: o suplemento nutricional para a atividade física –Conceitos atuais. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. vol.52 nº2 Caracas jun. 2002.
- 14- Persky AM, Brazeau GA. *Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate*. Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, Florida.
- 15- Engelhardt M, Neumann G, Berbalk A, Reuter I. Creatine supplementation in endurance sports. *Med Sci Sports Exercise* 1998;30:1123-1129.
- 16- Greenhaf PL., Bodin K., Soderlund K, Hultman. Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. *Am J Physiol* 1994; 266: E725-30.
- 17- Calfee R, Fadale P. Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. *Pediatrics*. 2006;117:e577-89.
- 18- Maughan RJ, King DS, Lea T. Dietary supplements. *J Sports Sci*. 2004;22:95-113.
- 19- Alves C, Lima RVB . Uso de suplementos alimentares por adolescentes. *Jornal de Pediatria*. vol.85 nº 4 Porto Alegre Aug. 2009.
- 20- Ahrendt DM. Ergogenic aids: counseling the athlete. *Am Fam Physician*. 2001;63:913-22.
- 21- Preen D, Dawson B, Goodman C, Lawrence S, Beilby J, Ching S. Effect of creatine loading on long-term sprint exercise performance and metabolism. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:814-21.
- 22- Balsom PD, Söderlund K, Ekblom B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med* 18:268–280.
- 23- Gualano B, Acquesta FM, Ugrinowitsch C, Tricoli V , Serrão JC; Junior AHL. Efeitos da suplementação de creatina sobre força e hipertrofia muscular: atualizações. *Rev. Bras. Med Esporte*. vol.16 nº 3 Niterói May 2010.
- 24- Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Ferrante KL, Bogdanov MB, Kaddurah-Daouk R, et al. Increases in cortical glutamate concentrations in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice are attenuated by creatine supplementation. *Journal of Neurochemistry*, 2001, 77, 383-390.
- 25- Prass K, Royl G, Lindauer U, Freyer D, Megow D, Dimagl U, et al. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Mar; 27(3): 452-459.
- 26- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006; 97(6): 1634-58.
- 27- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006; 141(2):312-22.

- 28- McConell GK, Shinewell J, Stephens TJ, Stathis CG, Canny BJ, Snow RJ. Creatine supplementation reduces muscle inosine monophosphate during endurance exercise in humans. *MedSci Sports Exerc.* 2005; 37(12):2054-61.
- 29- Junior TPS; Pereira B. Creatina: auxílio ergogênico com potencial antioxidante? *Rev. Nutr.* vol.21 nº 3 Campinas May 2008.
- 30- Gualano B, Ugrinowitsch C, Seguro AC, Junior AHL. A suplementação de creatina prejudica a função renal? *Rev. Bras. Med. Esporte.* vol.14 nº 1 Niterói Jan. 2008.
- 31- Taes YE, Delanghe JR, Wuyls B, van de Voorde J, Lameire NH. Creatine supplementation does not affect kidney function in an animal model with pre-existing renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 258-64.
- 32- Vieira RP, França RF, Carvalho CRF, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Martins RABL. Efeitos da suplementação oral com creatina sobre o metabolismo e a morfologia hepática em ratos. *Rev. Bras. Med. Esporte.* vol.14 nº1 Niterói Jan. 2008.
- 33- Tamopolsky MA, Bourgeois JM, Snow R, Keys S, Roy BD, Kwiecien JM, et al. Histological assessment of intermediate- and long-term creatinemonohydrate supplementation in mice and rats. *Am J Physiol. Regul.Integr. Comp Physiol.* 2003 Oct; 285(4): R762-769.
- 34- Ferreira LG, De Toledo Bergamaschi C, Lazaretti-Castro M, Heilberg IP. Effects of creatine supplementation on body composition and renal function in rats. *MedSci Sports Exerc* 2005; 37: 1525-9.
- 35- Arango HG. *Bioestatística: teórica e computacional: testes paramétricos.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2005. p.268-9.
- 36- Edmunds JW, Jayapalan S, DiMarco NM, Saboorian MH and Aukema HM. Creatine supplementation increases renal disease progression in Han:SPRD-cy rats. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 73-8.