

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

RENATO APARECIDO DE SOUZA

ANÁLISE DO TECIDO ÓSSEO SADIO E OSTEOPORÓTICO POR MEIO DA
ESPECTROSCOPIA RAMAN: UM ESTUDO *EX VIVO* EM MODELO ANIMAL

São José dos Campos, SP

2009

Renato Aparecido de Souza

ANÁLISE DO TECIDO ÓSSEO SADIO E OSTEOPORÓTICO POR MEIO DA
ESPECTROSCOPIA RAMAN: UM ESTUDO *EX VIVO* EM MODELO ANIMAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ribeiro

São José dos Campos, SP

2009

S 718 a

Souza, Renato Aparecido de

Análise do tecido ósseo sadio e osteoporótico por meio da Espectroscopia Raman: um estudo *ex vivo* em modelo animal / Renato Aparecido de Souza . Orientador: Prof. Dr. Wellington Ribeiro . -- São José dos Campos, 2009.

1 disco laser: color

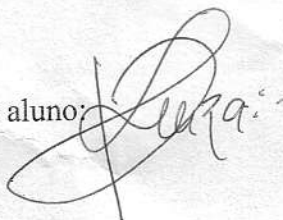
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade Vale do Paraíba, 2009.

1. Ossos 2. Osteoporose 3. Análise Espectral Raman I. Ribeiro, Wellington, Orient. II Título

CDU:62:61

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos a reprodução total ou parcial dessa tese, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data: 27 de Novembro de 2009

RENATO APARECIDO DE SOUZA

**“ANÁLISE DO TECIDO ÓSSEO SADIO E OSTEOPORÓTICO POR MEIO DA
ESPECTROSCOPIA RAMAN: UM ESTUDO *EX VIVO* EM MODELO ANIMAL”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **JOSÉ CARLOS COGO** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **WELLINGTON RIBEIRO** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **RODRIGO ALEXIS LAZO OSORIO** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **IVAN PIÇARRO** (UNIFESP) _____

Prof. Dr. **ANICLETO POLI** (UESC) _____

Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretora do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 27 de novembro de 2009.

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial:

A meus pais, José Aparecido Vicente e Marina Conceição de Souza, por suas histórias de sucesso na educação de seus filhos, diante de todas as adversidades.

A minha amada esposa, Gabriela Loiola Camargo, que esteve presente ao longo de toda jornada, sempre me apoiando, incentivando e compreendendo toda renúncia necessária.

A meu querido afilhado, João Rafael Loiola Camargo, motivo de orgulho, entusiasmo e paixão pela vida.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom inexorável da vida, por iluminar todos os meus passos e permitir o relacionamento harmonioso com as pessoas que devo toda gratidão:

Prof. Dr. Wellington Ribeiro, pela orientação neste trabalho. Minha mais profunda admiração ao exemplo de profissionalismo e competência. Agradeço por sua paciência, total compreensão, humildade e maestria em permitir meu crescimento acadêmico.

Prof. Dr. Rodrigo Lazo Osório, por todas as sublimes informações prestadas.

Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior, por me conceber a valorização de uma técnica até então desconhecida por mim: a Espectroscopia Raman.

Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado e Prof. Dr. Julio Cezar de Melo Castilho, ambos da UNESP (São José dos Campos/SP), pela cooperação estabelecida. Exemplos de humildade e dedicação ao ensino e pesquisa.

Prof. Dr. Airton Abrahão Martin por permitir “trânsito livre” ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional (IP&D) e retratar minhas solicitações com muito exímio.

Prof. Dr. Newton Soares da Silva pelo auxílio administrativo enquanto Coordenador do Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica.

Bibliotecária Rúbia Gravito de Carvalho Gomes pela paciência e compromisso com a formatação final deste trabalho.

Secretárias do IP&D, Dona Ivone e Dona Neuza por sempre me auxiliar com muita alegria quando requisitadas.

Colegas do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), pelo apoio e acolhida durante um tumultuado momento do doutorado.

Prof. MSc. Adriano Prado Simão, chefe do departamento de Fisioterapia da UFVJM, que não mediu esforços para favorecer todas as liberações necessárias.

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos, professor responsável pela disciplina Química Analítica Quantitativa do departamento de Farmácia da UFVJM, por todos os auxílios prestados.

Colegas dos diversos laboratórios do IP&D: Antônio Carlos Prianti, Humberto Lameira, Susane Machado, Fabiano Fernandes, Hélio Gouvêa, Diego Jerônimo, Maira Tosato, Murilo Xavier, Erika Ferrari, Débora e José Leonardo.

Ao meu irmão Marco Túlio de Souza por todo apoio técnico necessário. Toda minha gratidão por ter agregado seus conhecimentos médicos a este trabalho.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram e permitiram a conclusão deste trabalho. Definitivamente palavras não expressariam todo o meu apreço por vocês.

“A humildade em reconhecer nossas limitações intelectuais nos engrandece na mesma proporção em que a prepotência e a busca pelo saber auto-pessoal reduzem o ser humano à ínfima capacidade animal de pensar”.

Renato Aparecido de Souza

Análise do tecido ósseo sadio e osteoporótico por meio da Espectroscopia Raman: um estudo *ex vivo* em modelo animal

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar através da Espectroscopia Raman, os componentes mineral e orgânico do tecido ósseo sadio e osteoporótico em modelo animal. Além disso, verificar a influência exercida pelo estresse físico (natação) e suplementação de creatina sobre esse tecido. Para tanto foram realizados IV estudos. O estudo I caracterizou as bandas espectrais do tecido ósseo sadio por meio da Espectroscopia Raman dispersiva. Foi utilizado um único osso fêmur sadio de camundongo fêmea e as principais bandas Raman ajustadas em 862, 958, 1070, 1270, 1326, 1447 e 1668 cm^{-1} foram adequadamente identificadas e correlacionadas com os constituintes minerais e orgânicos do tecido ósseo. O estudo II avaliou através da Espectroscopia Raman dispersiva a influência de diferentes intensidades de natação (40% e 80% da carga máxima) sobre a composição óssea mineral (fosfato: 960 cm^{-1} e carbonato: 1170 cm^{-1}) e orgânica (colágeno: 1660 cm^{-1}) de fêmures sadios de camundongos fêmeas. Os resultados desse estudo indicaram que a alta intensidade de natação pode ser deletéria para o tecido ósseo. O estudo III investigou através da Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman) o modelo de osteoporose induzida por ovariectomia para caracterizar o conteúdo mineral e orgânico de diferentes sítios ósseos: colo femoral, diáfise femoral, metáfise proximal tibial, diáfise tibial e vértebra lombar. Os resultados deste estudo demonstraram o sucesso da espectroscopia FT-Raman em monitorar as alterações ósseas imposta pela ovariectomia. O estudo IV verificou a influência da suplementação de creatina sobre as regiões cortical e trabecular ósseas de ratas osteoporóticas usando a espectroscopia FT-Raman. Neste estudo, os resultados demonstraram que a creatina pode interferir positivamente sobre o conteúdo mineral do osso trabecular. Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que a Espectroscopia Raman é capaz de caracterizar adequadamente os componentes mineral e orgânico do tecido ósseo sadio e osteoporótico em modelo animal.

Palavras-chave: Ossos, Osteoporose, Análise Espectral Raman, Suplementação de Creatina, Natação

Analyze of healthy and osteoporotic bone tissue by Raman Spectroscopy: an *ex vivo* study in animal model

Abstract

The aim of this study was to characterize by Raman spectroscopy, the mineral and organic components of healthy and osteoporotic bone tissue in an animal model. In addition, verify the influence of physical stress (swimming) and creatine supplementation on bone. For both IV studies were performed. The study I characterized the spectral bands of healthy bone tissue by Dispersive Raman spectroscopy. We used a single femur bone of female mice and the main Raman bands set at 862, 958, 1070, 1270, 1326, 1447 and 1668 cm^{-1} have been adequately identified and correlated with the organic and mineral components of bone tissue. Study II evaluated by dispersive Raman spectroscopy the influence of different intensity swimming (40% and 80% of maximum) on bone mineral composition (phosphate: 960 cm^{-1} and carbonate: 1170 cm^{-1}) and organic (collagen: 1660 cm^{-1}) of healthy femurs of female mice. The results indicated that high intensity swimming can be deleterious to bone tissue. Study III investigated by Raman spectroscopy with Fourier transform (FT-Raman) a model of osteoporosis induced by ovariectomy to characterize the organic and mineral content of different skeletal sites: femoral neck, femoral midshaft, proximal tibial metaphysis, tibial midshaft and lumbar vertebrae. The results of this study demonstrated the success of the FT-Raman spectroscopy to monitor bone changes imposed by ovariectomy. Study IV assessed the influence of creatine supplementation on cortical and trabecular regions of bone in osteoporotic rats using FT-Raman spectroscopy. In this study, the results showed that creatine may positively affect on the mineral content of trabecular bone. According the results, it was concluded that the Raman spectroscopy is able to characterize adequately the mineral and organic components of healthy and osteoporotic bone tissue in an animal model.

Keywords: Bones, Osteoporosis, Raman Spectral Analyze, Creatine Supplementation, Swimming

Lista de ilustrações

Figura 1. Representação esquemática da apatita óssea.	21
Figura 2. A morfologia da apatita óssea	22
Figura 3. As três fases do remodelamento ósseo	24
Figura 4. O sistema RANK / RANKL / OPG	25
Figura 5. Mecanismos de regulação da massa óssea em função do estrogênio	28
Figura 6. Tipos de espalhamento da luz	32
Figura 7. Diagrama em Blocos de dois Espectrômetros Raman	34
Figura 8. Espectros Raman de tecido ósseo	36

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação da Qualidade Óssea de acordo a OMS	30
Tabela 2. Sistemas Raman Dispersivo e com Transformada de Fourier (FT-Raman)	35

Lista de siglas

OMS: Organização Mundial de Saúde
DMO: Densidade Mineral Óssea
DEXA: Absorciometria de Raios-X de Dupla Energia
ER: Espectroscopia Raman
Cr: Creatina
ATP: Adenosina Trifosfato
CP: Creatina Fosfato
ADP: Adenosina Difosfato
CK: Creatina Quinase
HA: Hidroxiapatita
BMU: do inglês “Bone Metabolic Units” (Unidade Básica Multicelular)
NCPs: do inglês “Non-Collagenous Proteins” (Proteínas não Colágenas)
RANK: Receptor Ativado do fator nuclear – Kappa β
RANKL: Ligante para o Receptor Ativado do fator nuclear – Kappa β
OPG: Osteoprotegerina
M-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
IGF-: Fator de Crescimento Insulínico-1
TGF- β : Fator de Crescimento Transformador beta
PGE₂: Prostaglandina E₂
FSH: Hormônio Folículo Estimulante
OVX: Rata ovariectomizada
pQCT: Tomografia Computadorizada Periférica
microCT: Tomografia Microcomputadorizada de Alta Resolução
CMO: Conteúdo Mineral Ósseo
DOM: Densidade Óptica Mineral
FT-Raman: Espectroscopia Raman com transformada de Fourier.
Ti:safira: Laser de Titânio:safira
CCD: Dispositivo de Carga Acoplada
Nd:YAG: Laser de Neodímio: Yttrium-Alumínio-Garnet

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 O Tecido Ósseo	20
3.2 A Osteoporose	26
3.2.1 Espectroscopia Vibracional Raman como técnica de análise óssea	30
3.2.2 Creatina como agente terapêutico em potencial	37
4 CONTEXTUALIZAÇÃO DOS ESTUDOS	39
4.1 Estudo I	39
4.2 Estudo II	42
4.3 Estudo III	45
4.4 Estudo IV	48
4.5 Outros estudos	51
5 CONCLUSÃO	52
Referências	53
Anexo A: Cartas de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa	60
Apêndice A: Artigo publicado na Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 12, n. 6, p. 361-365, 2006.	63
Apêndice B: Artigo publicado no Fitness & Performance Journal, v. 7, n. 5, p. 332-337, 2008.	68
Apêndice C: Artigo publicado na Revista Conscientiae Saúde, v. 8, n. 2, p. 177-182, 2009.	75
Apêndice D: Artigo publicado na Revista Spectroscopy, v. 23, p. 217-226, 2009.	78
Apêndice E: Artigo aceito no Journal of Sports Science and Medicine.	89
Apêndice F: Artigo submetido à Revista Brasileira de Educação Física e Esporte	100
Apêndice G: Artigo submetido à Revista Cancer Detection and Prevention	123

1 INTRODUÇÃO

Derivado de células mesenquimais do tecido conjuntivo, o tecido ósseo é traduzido por sua natureza metabolicamente ativa, sendo constituído por matriz extracelular mineralizada (matriz óssea) e por três tipos celulares: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (LAFITA, 2003). A matriz óssea é constituída por conteúdo mineral e elementos orgânicos. O conteúdo mineral corresponde aproximadamente 60 a 70% da matriz óssea, sendo constituído por fosfato de cálcio carbonatado, comumente descrito por apatita óssea (CARDEN; MORRIS, 2000). O restante da matriz óssea é representado pelo conteúdo orgânico (30-40%) constituído principalmente por colágeno do tipo I (85-90%) o qual desempenha primariamente uma função estrutural.

Por ser um tecido multifuncional, o tecido ósseo é responsivo a uma variedade de estímulos e as atividades celulares do tecido ósseo normal são sincronizadas através de comunicação intracelular, regulação hormonal e estímulos mecânicos, especialmente representados pelo exercício físico (LEMURA; DUVILLARD, 2006). Desta forma, o tecido ósseo sofre continuamente dois processos dinâmicos e interdependentes, denominados respectivamente desenvolvimento (controle do crescimento e morfologia óssea) e remodelamento ósseos. O momento de maior desenvolvimento ósseo parece acontecer na terceira década de vida, aonde se chega ao máximo de mineralização. A partir daí se inicia uma perda gradual e variável da massa óssea, a qual é influenciada pela presença de distúrbios metabólicos, uso de substâncias tóxicas e especialmente hábitos de vida relacionados à ingestão de cálcio e prática de exercícios físicos (LAFITA, 2003).

O principal distúrbio osteometabólico relacionado com a redução da massa óssea é a osteoporose influenciada pela inadequada concentração do hormônio estrógeno (CHAPPARD *et al.*, 2003). De acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 200 milhões de pessoas no mundo estejam sofrendo com as conseqüências da fragilidade óssea imposta pela osteoporose (LIN; LANE, 2004). Além disso, 1/3 das mulheres brancas acima dos 65 anos são portadoras de osteoporose e cerca de 50% das mulheres com mais de 75 anos venham a sofrer alguma fratura osteoporótica (GALI, 2001). De origem multifatorial e caracterizada pela deteriorização da microarquitetura e densidade mineral óssea (DMO), a osteoporose ocasiona fragilidade mecânica e conseqüente predisposição a fraturas, em especial às mulheres após a menopausa (FAZZALARI, 2008; GARDNER *et al.*, 2006). No

Brasil, a população propensa a desenvolver osteoporose aumentou de 7,5 milhões, em 1980 para 15 milhões no ano 2000, chegando a acometer 35% a 52% das mulheres com mais de cinquenta anos e uma proporção de 19% a 39% dos homens. Vinte entre cada cem mulheres são portadoras de doenças osteoporóticas, com 4 milhões e 400 mil casos, e um gasto de mais de 1 bilhão e 300 milhões de reais/ano (CARVALHO et al., 2004).

A técnica de absorciometria de Raios-X de dupla energia (DEXA) é considerada o padrão-ouro de avaliação da DMO e diagnóstico de osteoporose pela OMS. Contudo, essa técnica não é capaz de prever a qualidade óssea total, pelo fato de que a absorção de Raios-X se dá exclusivamente pela fase mineral (cristais de hidroxiapatita). Nessa técnica, a fase orgânica principalmente representada pelo colágeno tipo I, permanece essencialmente invisível. Atualmente, é reconhecido que a resistência à fratura óssea é criticamente dependente de ambas as fases, com fortes indícios de que o colágeno ósseo sofre alterações na osteoporose (DRAPER et al., 2005). Considerando que a osteoporose é uma importante questão de saúde pública mundial, tornam-se necessários estudos que promovam maiores entendimentos acerca de novas estratégias terapêuticas e diagnósticas evidenciando também a fase orgânica.

A espectroscopia Raman (ER) é uma técnica de espectroscopia vibracional usada para determinação de estrutura molecular e para a identificação e quantificação de materiais. Essa ferramenta óptica permite analisar não destrutivamente amostras biológicas oferecendo informação rápida e precisa acerca da composição bioquímica (SILVEIRA Jr. et al., 2003). Uma análise cuidadosa das posições, intensidades e larguras das bandas no espectro Raman permite caracterizar a “impressão digital” da estrutura molecular estudada (SMITH; REHMAN, 1995). Recentemente, a ER tem sido aceita como um instrumento viável para o estudo da mineralização óssea (LOPES et al., 2007; DRAPER et al., 2005) e diversos estudos foram conduzidos para melhor elucidar a análise do tecido ósseo com a ER (GOODYEAR et al., 2009; SHEN et al., 2009; CARDEN; MORRIS, 2000; MCCREADIE et al., 2006; AKKUS et al., 2004; BOHIC et al., 2000 SMITH; REHMAN, 1995). Segundo esses trabalhos, a composição química do tecido ósseo poderia ser avaliada pela razão entre as áreas de determinadas bandas do espectro Raman. Por exemplo, usando ossos de cadáveres femininos, Mccreadie et al. (2006) observaram maior razão mineral/matriz em osso trabecular de mulheres que tinham sofrido fraturas quando comparado com a mesma região óssea de mulheres sem fratura. Goodyear et al. (2009) encontraram maiores valores para essa mesma razão (mineral/matriz) em osso cortical quando comparado com osso trabecular em ratos.

Além disso, uma avaliação da variação na intensidade dos picos Raman poderia indicar a incorporação mineral e orgânica bem como o grau de mineralização óssea (CARDEN; MORRIS, 2000).

Já foram desenvolvidos vários tratamentos objetivando a prevenção da perda óssea, incluindo reposição de estrogênios, compostos bisfosfanados, programas de atividade física e intervenções nutricionais (DRAKE et al., 2008). Uma possível intervenção nutricional que tem sido especulada como potencialmente benéfica a osteoporose é a suplementação com Creatina (Cr). A Cr, uma amina nitrogenada, é um constituinte nutricional encontrado naturalmente em alimentos de origem animal e sintetizado pelo próprio organismo humano a partir dos aminoácidos arginina, glicina e metionina (MCCALL; PERSKY, 2007; BEMBEM; LAMONT, 2005). A pesquisa relacionada com a suplementação de Cr tem observado especialmente os efeitos dessa substância sobre o tecido muscular estriado esquelético e desempenho físico (ANTOLIC et al., 2007). Alguns dos efeitos dessa relação incluem a melhora da potência muscular (TARNOPOLSKY; MACLENNAN, 2000), incremento da massa isenta de gordura (MIMC et al., 2000), melhora da resistência muscular em indivíduos saudáveis (IZQUIERDO et al., 2002) e em pacientes com uma variedade de distúrbios neuromusculares (TARNOPOLSKY; MARTIN, 1999).

A Cr é um composto energético utilizado predominantemente por tecidos com alta demanda energética através da resíntese de ATP (adenosina trifosfato) a partir da doação do grupo Fosfato da Creatina Fosfato (CP) para a adenosina difosfato (ADP). Essa conversão é dependente da ação da enzima Creatina Quinase (CK) (MCCALL; PERSKY, 2007; BEMBEM; LAMONT, 2005). Tem sido demonstrado que a atividade da CK é também necessária para o adequado remodelamento ósseo (FUNANAGE et al., 1992). O desenvolvimento e reparo do tecido ósseo são processos energético-dependentes e podem ser influenciados especialmente pela disponibilidade nutricional, sobrecarga mecânica e drogas (RODAN; MARTIN, 2000). Gerber et al. (2005), demonstraram que a suplementação de Cr poderia ser usada como ferramenta clínica para estimulação do crescimento celular, diferenciação e mineralização durante o reparo ósseo *in vivo*.

A respeito do possível benefício da suplementação de Cr sobre o metabolismo ósseo, poucos são os estudos que investigam essa relação. Louis et al. (2003) observaram em pacientes com distrofia muscular de Duchenne e Becher, incremento da DMO e redução de um marcador bioquímico ósseo que indica osteoclastogênese após a suplementação com Cr. Utilizando modelo animal, Antolic et al. (2007) identificaram que ratos suplementados com

Cr apresentaram maior DMO lombar e maiores valores de carga mecânica femoral no momento de falha em ensaio biomecânico, em comparação com ratos que recebiam uma dieta controle.

Contudo, até o presente momento, a literatura não apresenta nenhum resultado da suplementação de Cr sobre a qualidade do tecido ósseo osteoporótico e tão pouco utiliza como instrumento de análise dessa interação a ER. Nesse sentido, justificam-se estudos que possam melhor esclarecer esse fenômeno a luz de uma ferramenta de análise que seja capaz de apresentar toda a natureza constitucional do tecido ósseo: a Espectroscopia Raman.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi caracterizar por meio da Espectroscopia Raman, os componentes mineral e orgânico do tecido ósseo sadio e osteoporótico em modelo animal.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as bandas espectrais do tecido ósseo sadio (fêmur de camundongo) por meio da Espectroscopia Raman dispersiva;
- Avaliar por meio da Espectroscopia Raman dispersiva a influência de diferentes intensidades de natção sobre a composição óssea mineral e orgânica de femores de camundongos;
- Investigar o modelo de osteoporose induzida por ovariectomia em ratas através da Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier para caracterizar o conteúdo mineral e orgânico de diferentes sítios ósseos: colo femoral, diáfise femoral, metáfise proximal tibial, diáfise tibial e vértebra lombar;
- Verificar a influência da suplementação de creatina sobre as regiões ósseas cortical (diáfise femoral) e trabecular (terceira vértebra lombar) de ratas osteoporóticas usando a espectroscopia Raman com Transformada de Fourier;
- Correlacionar os achados obtidos pela Espectroscopia Raman com os achados obtidos por outra técnica de análise óssea: a Densitometria Óptica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Tecido Ósseo

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, sendo, portanto fundamental para proteção de órgãos vitais, como os contidos no crânio, canal vertebral e tórax. Na evolução dos tecidos de sustentação, o osso ocupa uma importante posição representando a solução biológica à necessidade de um material sólido de construção para o esqueleto de todos os animais superiores (CADORE; BRETANO; KRUEL., 2005). Sua estrutura morfológica é diretamente responsável pela sustentação do tecido muscular estriado esquelético, conferindo-lhe um importante sistema de alavancas que amplia as forças geradas durante a contração muscular. Além disso, por ser esse tecido um adequado local de armazenamento de cálcio e fosfato, pode-se considerar os ossos como fundamentais para o controle homeostático desses íons corporais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Macroscopicamente, os ossos podem ser caracterizados em tecido ósseo esponjoso e tecido ósseo compacto. O osso esponjoso está especialmente localizado nas extremidades ósseas dos ossos longos (epífises) (por exemplo, fêmur e tíbia), profundamente ao tecido ósseo compacto, e centralmente nos ossos curtos (por exemplo, coluna vertebral). Caracteriza-se por ser bastante poroso e muito vascularizado. Minúsculas espículas, denominadas trabéculas, dão ao osso esponjoso uma aparência semelhante a uma treliça que propicia a capacidade de absorver grandes forças com o mínimo de peso constitucional. Já o osso compacto constitui a porção externa óssea principalmente da região central dos ossos longos (diáfise), sendo muito duro e denso (SEEMAN, 2008).

Derivado de células mesenquimais do tecido conjuntivo, o tecido ósseo é traduzido por sua natureza metabolicamente ativa, sendo constituído por matriz extracelular mineralizada (matriz óssea) e pelos seguintes tipos celulares: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteoprogenitoras ou de revestimento ósseo (LAFITA, 2003).

A matriz óssea é constituída por elementos inorgânicos (conteúdo mineral) e orgânicos, conferindo respectivamente ao osso as características de rigidez e flexibilidade. Interessantemente, após processos de descalcificação, os ossos mantêm sua forma intacta, porém tornam-se tão flexíveis quanto os tendões. Por outro lado, a destruição da porção

orgânica, também deixa o osso intacto, porém extremamente quebradiço (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O conteúdo mineral corresponde aproximadamente 60 a 70% da matriz óssea, sendo constituído por fosfato de cálcio carbonatado, comumente descrito por apatita óssea (CARDEN; MORRIS, 2000). Estudos de difração de Raios X mostraram que o cálcio e o fósforo formam estruturas nanocristalinas não estequiométricas semelhantes à hidroxiapatita (HA): $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (CUKROWSKI et al., 2007). A exata estrutura da apatita óssea não é completamente definida devido a intensa substituição na estrutura cristalina dos sítios catiônicos de cálcio (por exemplo, Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Pb^{2+}) e dos sítios aniônicos do fosfato (por exemplo, F^- , Cl^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-}) (RUPPEL; BURR; MILLER, 2006) (Figura 1).

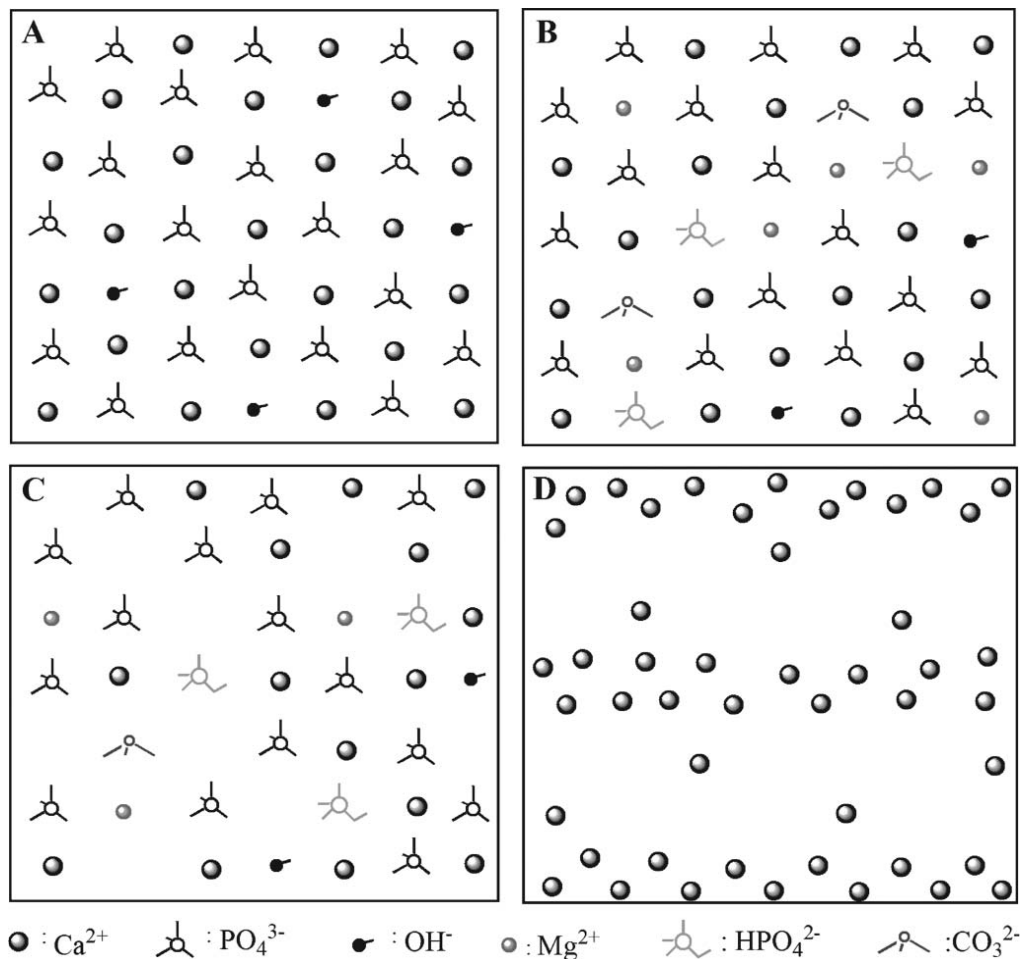


Figura 1. Representação esquemática da apatita óssea. **A.** A hidroxiapatita sintética [HA ; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] é representada pela razão estequiométrica dos íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} , e OH^- . **B.** Substituições por outros íons (p.ex: Mg^{2+} e HPO_4^{2-}) é da natureza fisiológica da apatita óssea. **C.** A formação cristalina não estequiométrica cria imperfeições na estrutura da apatita óssea. **D.** Organização em larga escala (10 nm) dos canais iônicos

Fonte: Zhang, et al. (2007).

Essas substituições podem afetar as propriedades químicas e físicas do osso, tais como solubilidade, densidade, dureza e morfologia de crescimento (WOPENKA; PASTERIS, 2005). Tem sido descrito um modelo com quatro compartimentos para descrever a apatita óssea. Do exterior para o interior configura-se: (1) uma solução aquosa facilmente separável do conteúdo mineral; (2) uma capa de hidratação constituída por íons polarizados que se ligam ao cristal facilitando a renovação iônica entre o cristal e o líquido intersticial; (3) a superfície do cristal; e (4) o interior do cristal (BOIVIN; MEUNIER, 2003). A figura 2 representa a morfologia da apatita óssea, a qual possui comprimento (l) (20-80 nm) maior que largura (w) (1-3 nm) e espessura (t) (2-5 nm). Devido a imperfeição e o tamanho reduzido (quatro vezes menor) da apatita óssea em relação os cristais de apatita de ocorrência natural, a apatita óssea é possui menor cristalinidade sendo mais reativa e solúvel, o que facilita a renovação química. Em outras palavras, um cristal mais perfeito seria mais difícil de ser reabsorvido, e assim o reparo da matriz óssea seria retardado (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001).

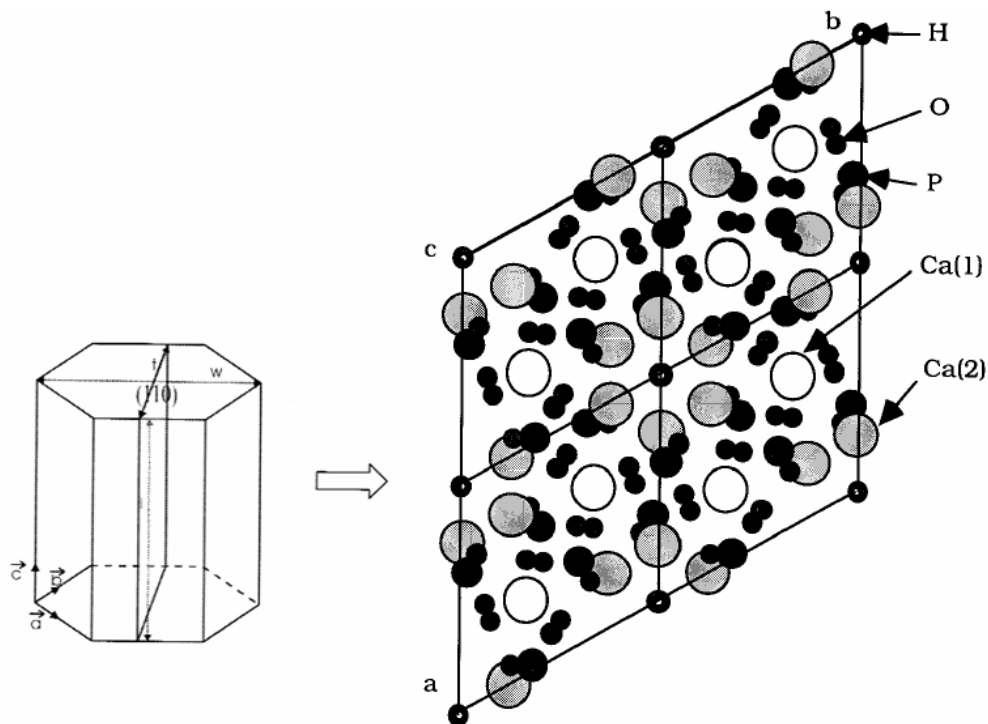


Figura 2. A morfologia hexagonal de uma célula unitária da apatita óssea. As dimensões da estrutura cristalina são definidas como vetores a , b , c . O comprimento (l) do cristal é paralelo ao vetor c . A largura (w) do cristal é paralela ao vetor b . A espessura do cristal é paralela ao vetor a . Imagem a direita obtida projetada em função do plano cristalino (c). Notar duas configurações distintas de associação do cálcio (Ca)

Fonte: Rohanizadeh et al. (2000); Traina e Laperche (1999).

O restante da matriz óssea é representado pelo conteúdo orgânico (30-40%) constituído principalmente por colágeno do tipo I (85-90%) que desempenha primariamente uma função estrutural, por pequena quantidade de proteínas não colágenas (NCPs) e água (BOIVIN; MEUNIER, 2003). As NCPs não possuem claramente uma função definida e são distinguidas principalmente em: osteocalcina, osteonectina, osteopontina e sialoproteína óssea (ROACH, 1994). Funções em potencial dessas proteínas têm sido baseadas em suas propriedades bioquímicas de ativação e interação com fatores de crescimento ósseo, citocinas e moléculas de adesão (MACDONALD; GOWEN, 1993). Com exceção da osteocalcina, nenhuma NCP é específica para o tecido ósseo e sua concentração sérica reflete síntese óssea (SZULC; DELMAS, 2008). Proteínas tais como osteonectina são capazes de promover ligações com a apatita óssea, particularmente na presença do colágeno, o que sugeriria alguma participação na mineralização da matriz (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001). Além disso, tem sido observado que outros tecidos ricos em colágeno tipo I, mas que não contêm NCPs, normalmente não se calcificam, o que corrobora o envolvimento dessas proteínas com o processo de remodelamento ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são funcionalmente as células do tecido ósseo que promovem a síntese do conteúdo orgânico da matriz óssea e regulam sua mineralização (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001). À medida que a matriz óssea é recém sintetizada pelos osteoblastos, essas células ficam envoltas pela matriz neoformada e passam a ser chamadas osteócitos. Embora osteócitos possuam pequena atividade sintética, são essenciais para manter a viabilidade do tecido ósseo e reabsorver a matriz e os minerais do osso pela osteólise osteocítica, processo especialmente importante para manter constantes os níveis de cálcio extracelulares. Já os osteoclastos são células móveis, gigantes e multinucleadas que apresentam atividade fagocitária e possuem como principal função a reabsorção óssea. Esse último tipo celular secreta para a matriz óssea, prótons H^+ e collagenases que digerem a matriz orgânica e dissolvem os cristais de sais de cálcio (OCARINO; SERAKIDES, 2006).

Por ser um tecido multifuncional, o tecido ósseo é responsivo a uma variedade de estímulos e as atividades celulares do tecido ósseo normal são sincronizadas através de comunicação intracelular, regulação hormonal e estímulos mecânicos (LEMURA; DUVILLARD, 2006). Desta forma, o tecido ósseo adulto sofre continuamente um processo denominado remodelamento ósseo. O remodelamento ósseo é o resultado da interação da atividade reabsortiva dos osteoclastos contraposta à síntese óssea desempenhada pelos osteoblastos (JILKA, 2003). A reabsorção e síntese ósseas são frequentemente discutidas

como processos independentes, mas na realidade estão intimamente associadas temporalmente no interior de estruturas anatômicas denominadas Unidade Básica Multicelular (BMU). Uma BMU completamente desenvolvida é constituída por um grupo de osteoclastos anteriormente, um grupo de osteoblastos posteriormente, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo associado. Determinado pela clássica seqüência ARF (Ativação-Reabsorção-Formação), o remodelamento ósseo é regulado por uma complexa relação entre as células osteoclásticas (de reabsorção) e osteoblásticas (de síntese) integrando o sistema RANK / RANKL / OPG, o qual ocorre na BMU. A figura 3 ilustra as três fases do remodelamento ósseo em uma BMU. Durante a fase inicial, existe o recrutamento de precursores osteoclásticos, diferenciação e ativação de osteoclastos e como consequência reabsorção óssea. A fase de transição é caracterizada por inibição da reabsorção óssea, apoptose de osteoclastos e recrutamento de osteoblastos. Por fim, a superfície óssea reabsorvida é preparada para deposição de novo osso que ocorrerá na fase terminal do remodelamento (MATSUO; IRIE, 2008). Em adultos jovens, cada BMU possui vida média de 6 a 9 meses, tempo de vida dos osteoclastos de 2 semanas e dos osteoblastos de 3 meses. Essas características estão associadas a uma velocidade de reabsorção de 25 $\mu\text{m}/\text{dia}$ em cada unidade, de forma que, anualmente 10% de todo esqueleto é remodelado (MANOLAGAS, 2000).

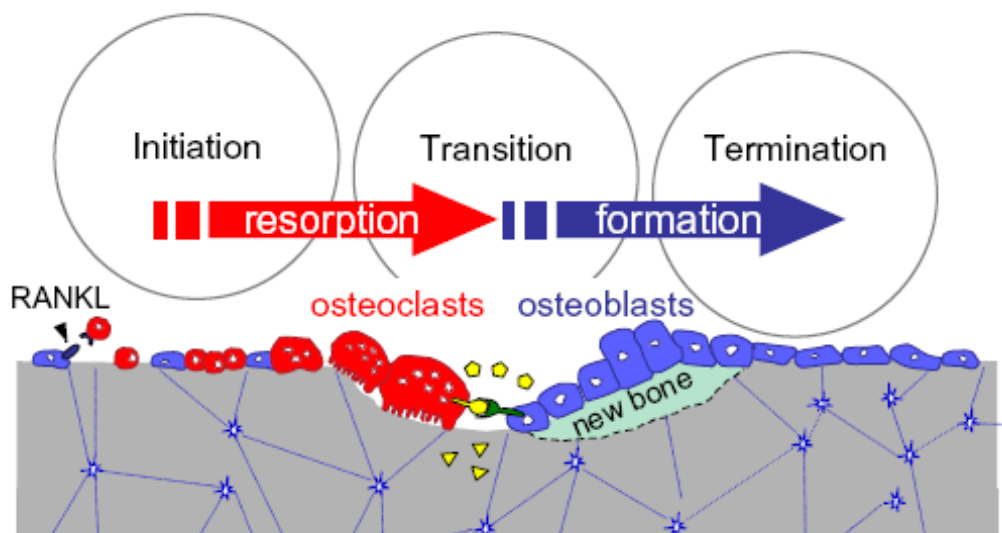


Figura 3. As três fases do remodelamento ósseo
Fonte: Matsuo e Irie, (2008)

O sistema RANK / RANKL / OPG é assim denominado por ser constituído pelo Receptor Ativado do fator nuclear – Kappa β (RANK), seu ligante (RANKL) e um receptor solúvel denominado osteoprotegerina (OPG) (Figura 4). O RANK é expresso na superfície dos osteoclastos. O RANKL é expresso na superfície dos osteoblastos e faz ligação com seu receptor (RANK) presente nas células osteoclásticas, impulsionando sinais de diferenciação e ativação em precursores osteoclásticos, promovendo assim a reabsorção óssea. No entanto, para a osteoclastogênese também é necessário o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF). A Osteoprotegrina (OPG) é um fator que ocorre naturalmente e que antagoniza os efeitos de RANKL, assim preservando a integridade óssea. Além disso, tem sido sugerido que a rede interativa de citocinas, hormônios de reabsorção óssea e anti-reabsorção e sobrecarga mecânica convergem direta e ou indiretamente no sistema RANK / RANKL / OPG. Portanto, a proporção entre RANKL e OPG (RANKL / OPG) é determinante para regular a atividade de remodelamento ósseo (CHAPPARD et al., 2003).

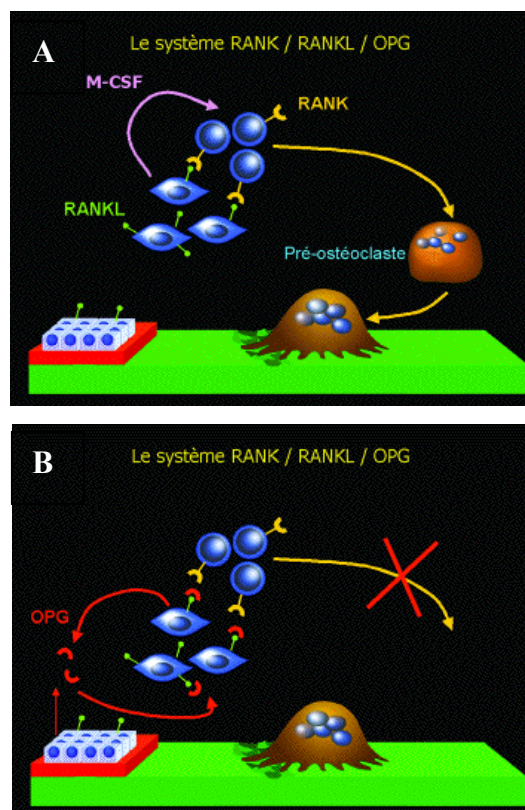


Figura 4. O sistema RANK / RANKL / OPG. Em A: células osteoblásticas expressam a proteína transmembrana RANKL e sintetizam a citocina M-CSF. Os precursores osteoclastos expressam o receptor RANK. O acoplamento RANK / RANKL ativa a via osteoclástica favorecendo a reabsorção óssea. Em B: os osteoblastos e células do estroma do tecido ósseo sintetizam osteoprotegrina (OPG) que impedem o acoplamento RANK / RANKL inibindo a ativação osteoclástica e preservando a matriz óssea

Fonte: Chappard et al. (2003).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre a síntese e reabsorção ósseas, porém em vigência do principal distúrbio osteometabólico, a osteoporose, ocorre desequilíbrio entre estes dois processos em detrimento da síntese óssea. Sob essa condição anormal, a redução da massa óssea pode representar insuficiência de formação da matriz protéica na qual é depositado o cálcio, especialmente por deficiência dos hormônios sexuais femininos. Neste caso, a população de osteoclastos fica mais ativa, criando grandes lacunas de reabsorção. Em seguida, ocorre uma alteração no balanço da seqüência ARF aumentando a perda de continuidade e finalmente, existe uma falha do grupo de osteoblastos para produzir osso novo (MANOLAGAS, 2000).

3.2 A Osteoporose

O momento de maior desenvolvimento ósseo parece acontecer na terceira década de vida, aonde se chega ao máximo de mineralização óssea. A partir daí se inicia uma perda gradual da massa óssea que é variável dependendo da presença de distúrbios metabólicos, uso de substâncias tóxicas e especialmente hábitos de vida relacionados à ingestão de cálcio e prática de exercícios físicos (LAFITA, 2003). O principal resultado negativo da redução da massa óssea é a osteoporose, uma doença osteometabólica caracterizada por redução da DMO e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, o que resulta em fragilidade do osso e maior risco de fraturas (SUTCLIFFE, 2008).

A osteoporose representa mundialmente um importante problema de saúde coletiva, sendo estimado que aproximadamente 200 milhões de pessoas no mundo estejam sofrendo com esta doença (RUSSO, 2001). Embora a osteoporose possa acometer pessoas do sexo masculino, as mulheres apresentam a maior prevalência (até 80% dos casos são do sexo feminino) (MUDD; FORNETTI; PIVARNIK 2007). Tem sido discutida a relação da deficiência dos hormônios sexuais femininos, em especial o estrogênio, na gênese da osteoporose. Essa apresentação clínica da osteoporose é classificada como primária do tipo I, a qual também é conhecida por tipo pós-menopausa. Nesse caso, existe rápida perda óssea tanto em osso cortical (aumento da porosidade), mas especialmente em osso trabecular (afilamento, perfuração e perda da conectividade das trabéculas) de mulheres recentemente menopausadas (GALI, 2001).

O entendimento acerca de todos os mecanismos fisiopatológicos acerca da osteoporose do tipo pós-menopausa ainda é obscuro. É fato que a menopausa promove redução na DMO e acelera o metabolismo das células envolvidas com o remodelamento ósseo (SYED; KHOSLA, 2005). Além disso, o tratamento desses pacientes com estrogênios restabelece a massa óssea normal (WU et al., 2001). Esses aspectos sugerem que os estrogênios exercem um efeito protetor ao tecido ósseo através de efeitos via ativação de receptores específicos (FITZPATRICK, 2006). Estudos *in vitro* demonstraram que os estrogênios alteram a velocidade de crescimento ósseo, secreção de citocinas por células do sistema imune e a síntese de fatores anabólicos que atuam sobre o esqueleto, tais como o IGF-1 (Fator de Crescimento Insulínico-1) e suas proteínas de ligação, as quais seriam responsáveis pela ativação do TGF- β (Fator de Crescimento Transformador beta), que promove a diminuição da reabsorção óssea. Além disso, os estrogênios inibem a atividade da PGE₂ (Prostaglandina E₂), a qual em contato com receptores E₂ androgênios muito distribuídos pelas células ósseas controlam em até 70% da reabsorção óssea (PACIFICI, 2007; WEITZMANN; PACIFICI, 2006; RYAN et al., 2005). Outro fator correlacionado com a redução da massa óssea durante a menopausa envolve o seguinte mecanismo: como tentativa de restabelecer os níveis de normalidade de estrogênio, quando do decréscimo desse hormônio durante a menopausa, a glândula hipófise anterior através de *feedback* negativo aumenta a secreção do Hormônio Folículo Estimulante (FSH). Tem sido hipotetizado que o FSH atua diretamente sobre o controle da massa óssea aumentando a osteoclastogênese induzida pelo aumento de células osteoblásticas que sintetizam a citocina M-CSF e expressam em suas membranas RANKL (SUN et al., 2006) (Figura 5).

A compreensão da patogênese da osteoporose, assim como a pesquisa de novos agentes terapêuticos e técnicas diagnósticas, traz a necessidade do estabelecimento de modelos experimentais que desenvolvam uma condição semelhante, principalmente a da pós menopausa (TURNER, 2001; TURNER et al., 2001). Nesse sentido, a maioria dos modelos animais utilizados baseia-se na realização da ovariectomia (processo cirúrgico onde se retira bilateralmente os ovários), uma vez que os hormônios ovarianos (especialmente os estrogênios) afetam direta ou indiretamente o remodelamento ósseo. Dentre os inúmeros animais utilizados como modelo experimental, a rata ovariectomizada (OVX) tem sido amplamente aprovada e utilizada, pois, como a mulher após menopausa, desenvolve osteoporose (JEE; YAO, 2001).

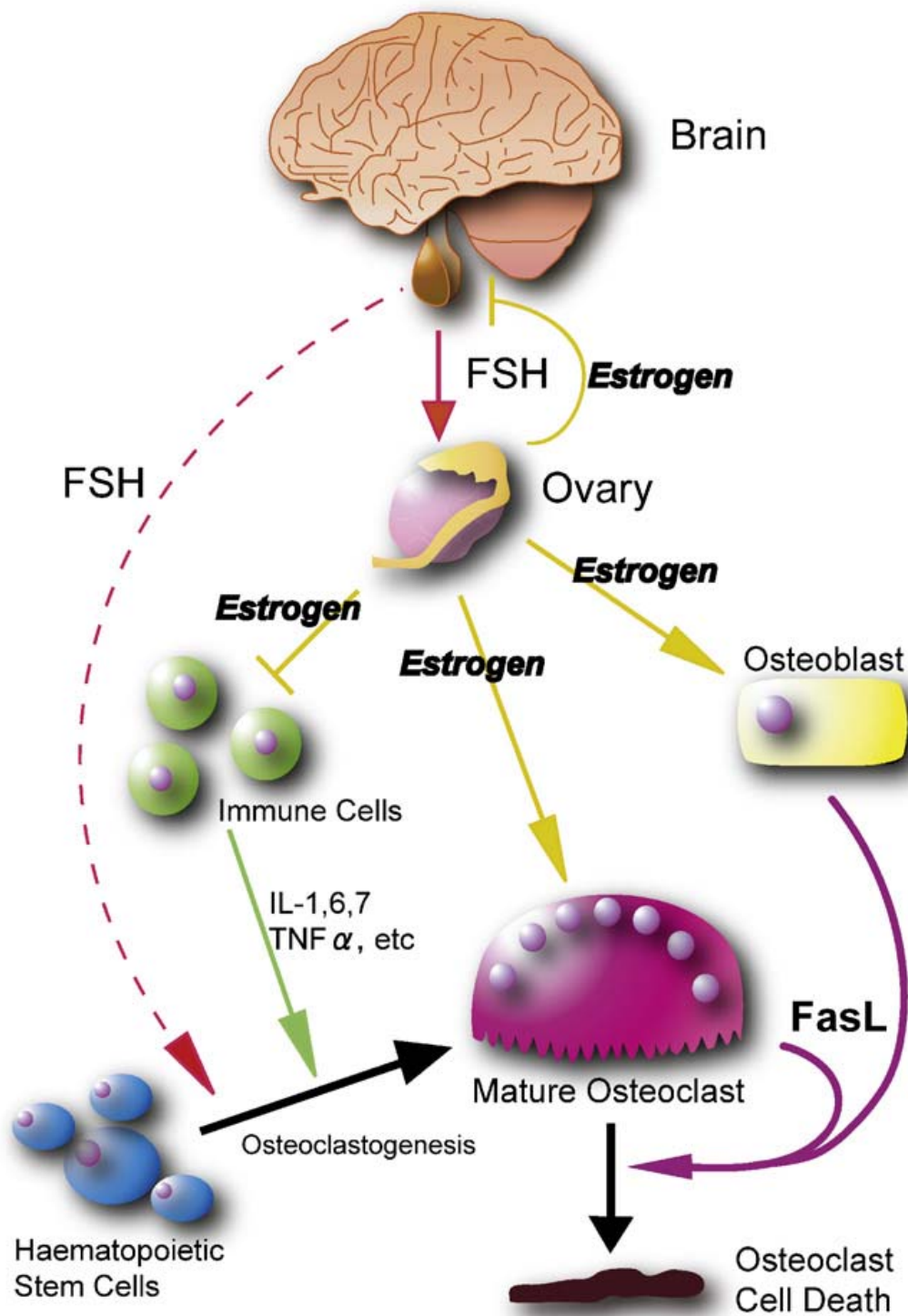


Figura.5. Mecanismos de regulação da massa óssea em função do estrogênio (IMAI et al., 2008). O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) secretado pela hipófise anterior estimula a secreção de estrogênio ovariano. Os estrogênios inibem a produção de citocinas inflamatórias produzidas por células do sistema imune envolvidas com a osteoclastogênese (WEITZMANN; PACIFICI, 2006). Os estrogênios aumentam a expressão de receptores de membrana para a proteína FasL em osteoblastos (KRUM et al., 2008) e osteoclastos (NAKAMURA et al., 2007), a qual está envolvida com indução de apoptose. Por outro lado, o FSH, cuja secreção é negativamente controlada pelos estrogênios, pode acelerar a diferenciação de osteoclastos a partir de células osteoprogenitoras (SUN et al., 2006).

Devido suas similaridades fisiopatológicas com a doença humana (a rata OVX apresenta redução da DMO, pobreza microarquitetural, e aumento da taxa de remodelamento ósseo: reabsorção excedendo a síntese), a rata OVX é um modelo de indução de osteoporose adequado, validado e considerado dentro do campo de investigação do tecido ósseo, uma das mais esperadas e confiáveis respostas biológicas (TURNER, 2001; TURNER et al., 2001; JEE; YAO, 2001; KALU, 1991).

É importante ressaltar que em ratas OVX, estudos que mensuraram a DMO como variável de redução da massa óssea, detectaram um significativo decréscimo no conteúdo mineral, aproximadamente após 3 meses da ovariectomia (PAJAMÄKI et al., 2008; KALU, 1991). Entretanto, nem todos os ossos exibem tal decréscimo neste período e nem todos os sítios ósseos apresentam redução da massa óssea com a mesma taxa de reabsorção (JEE; YAO, 2001). Por exemplo, uma significativa perda óssea trabecular ocorrida no colo femoral, metáfise proximal da tíbia e coluna lombar aconteceram respectivamente após 30, 14 e 60 dias da ovariectomia (WRONSKI; CINTRON; DANN, 1998). De forma diferente, a ovariectomia induz aumento da cavidade medular diafisária em ossos corticais. Essa alteração ocorre lentamente uma vez que é promovida em função de crescimento ósseo periosteal e incremento da reabsorção óssea na região endosteal. Como resultado dessas mudanças, a diáfise femoral de ratas OVX não demonstrou redução da DMO mesmo após 540 dias da cirurgia (KIMMEL; WRONSKI, 1990).

Os estudos envolvendo o estudo da osteoporose utilizando ratas OVX normalmente utilizam a DEXA como instrumento de análise da DMO, uma vez que atualmente a OMS considera essa técnica o padrão-ouro de avaliação. Essa ferramenta trata-se de método não invasivo com mínima dose de radiação, cujo princípio de funcionamento baseia-se no fato de que, quando uma fonte de raios X é colocada ao lado de um objeto, o raio refletido no lado oposto desse objeto reflete sua espessura, densidade e composição química. Assim, a dupla emissão de raios X pela fonte de energia permite quantificar os locais do esqueleto circundados por grande quantidade de tecidos moles, estimados pela diferença de atenuação entre o osso e o tecido mole (ANITELI; FLORINDO; PEREIRA, 2006). A partir desse exame, a qualidade óssea observada pela DMO é diagnosticada através de índices específicos (Índice T) de acordo com valores de variação do desvio-padrão relacionados com a média da população de adultos jovens (Tabela 1). Cada desvio padrão é igual a 10% a mais ou a menos da massa óssea considerada normal (NICHOLS et al., 2007). Contudo, essa técnica não é capaz de prever a qualidade óssea total, pelo fato de que a absorção de Raios-X se dá

exclusivamente pela fase mineral (cristais de hidroxiapatita). Nessa técnica, a fase orgânica principalmente representada pelo colágeno tipo I, permanece obscura. Contudo, é reconhecido que a resistência à fratura óssea é criticamente dependente de ambas as fases, com fortes indícios de que o colágeno ósseo sofre alterações na osteoporose (DRAPER et al., 2005).

Tabela 1. Classificação da Qualidade Óssea de acordo a OMS

Classificação	Desvio-Padrão (DP)
Osso Saudável	0
Osteopenia	-1 a 2,5
Osteoporose	<2,5

Nesse sentido e considerando que a osteoporose é uma importante questão de saúde pública mundial, torna-se necessário a aplicação de ferramentas analíticas que permitam uma investigação de toda natureza do tecido ósseo (fases mineral e orgânica) com intuito de potencializar o entendimento acerca dessa doença, tanto no seu aspecto fisiopatológico quanto seu aspecto diagnóstico.

3.2.1 Espectroscopia Vibracional Raman como técnica de análise óssea

Células e tecidos são constituídos de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, vitaminas e outros componentes, os quais formam o complexo molecular com uma estrutura extremamente intrincada. Todas as doenças, sem exceção, são causadas por mudanças na bioquímica celular e/ou dos tecidos. O corrente desafio da medicina moderna é o de encontrar uma técnica analítica que investigue essas alterações por métodos não-invasivos e não-destrutivos. Poucos métodos analíticos satisfazem esses requerimentos e são sensíveis o suficiente para revelar detalhes de composição e de estrutura. É fundamental o uso de técnicas adequadas que permitam revelar informações precisas acerca da natureza tecidual para monitorar a evolução da doença, otimizar estratégias terapêuticas e avaliar a eficácia de um determinado tratamento (MOREIRA et al., 2008; MANOHARAN; WANG; FELD, 1996).

De acordo com o contexto do presente estudo, existe uma vasta literatura acerca das técnicas de análise do tecido ósseo de ratas OVX: além do uso da DEXA, o uso de tomografia

computadorizada periférica (pQCT), tomografia microcomputadorizada de alta resolução (microCT) e avaliação radiográfica para monitorar a DMO, conteúdo mineral ósseo (CMO) e Densidade Óptica Mineral (DOM) (PAJAMÄKI et al., 2008; SHENG et al., 2007; SAKAKURA et al., 2006; BRAUN et al., 1996); Técnicas histomorfométricas permitem uma avaliação bidimensional da massa e arquitetura ósseas, e possibilitam a detecção de moléculas celulares específicas quando associadas com técnicas de imunohistoquímica (TAKAYAMA et al., 2008; LESCLOUS et al., 2004); Uso de marcadores bioquímicos para analisar a homeostase mineral e orgânica (REGINSTER et al., 2008; EASTELL; HANNON, 2008); Uso de ensaios biomecânicos para monitorar força, resistência e fadiga do osso (FUCHS; ALLEN; CONDON, 2008; BAUSS et al., 2002). Por fim, estudos *in vitro* são utilizados para verificar a capacidade proliferativa e constitucional de células ósseas (HAQUE et al., 2005).

Recentemente, técnicas de espectroscopia vibracional têm sido empregadas com sucesso ao monitorar as propriedades do tecido ósseo (LOPES et al., 2007; DRAPER et al., 2005). Dentre essas técnicas, destaca-se a Espectroscopia Raman (ER) (GOODYEAR et al., 2009; SHEN et al., 2009; CARDEN; MORRIS, 2000; MCCREADIE et al., 2006; AKKUS; ADAR; SCHAFFLER, 2004; BOHIC et al., 2000 SMITH; REHMAN, 1995). Conceitualmente a espectroscopia pode ser definida como uma técnica que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, tendo como objetivo conhecer os níveis de energia de átomos e moléculas (SALA, 1996). No caso da ER, adiciona-se ao conceito da espectroscopia o efeito Raman. O efeito Raman está relacionado à mudança de frequência de uma luz incidente espalhada pela matéria.

Em 1928, o físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman descobriu que o comprimento de onda visível de uma pequena fração da radiação espalhada por certas moléculas difere daquele do feixe incidente e, ainda mais, que os deslocamentos de comprimento de onda dependem da estrutura química das moléculas responsáveis pelo espalhamento. Considerando a importância de tal descoberta e a exploração sistemática desse fenômeno, C.V. Raman recebeu o Prêmio Nobel de Física em 1931 (LEWIS; EDWARDS; 2001).

Quando a luz interage com uma determinada molécula ou substância ela pode ser absorvida ou espalhada. Grande parte da luz espalhada pode ter a mesma frequência que a luz incidente (espalhamento *Rayleigh*, elástico. A interação, entretanto, pode ser inelástica (espalhamento Raman), a qual leva a matéria para um nível de energia excitado, o que resulta em uma perda de energia do fóton, e este é espalhado com frequências menores que a

incidente. Estas frequências Raman são conhecidas como linhas *Stokes*. Se o sólido está em um estado excitado, a colisão com um fóton pode causar uma perda de energia e o sólido sofrer uma transição para um estado de energia mais baixa. Neste caso, as frequências Raman são conhecidas como *Anti-Stokes* (LEWIS; EDWARDS; 2001). A figura 6 ilustra esquematicamente um espectro típico da luz espalhada elasticamente e inelasticamente.

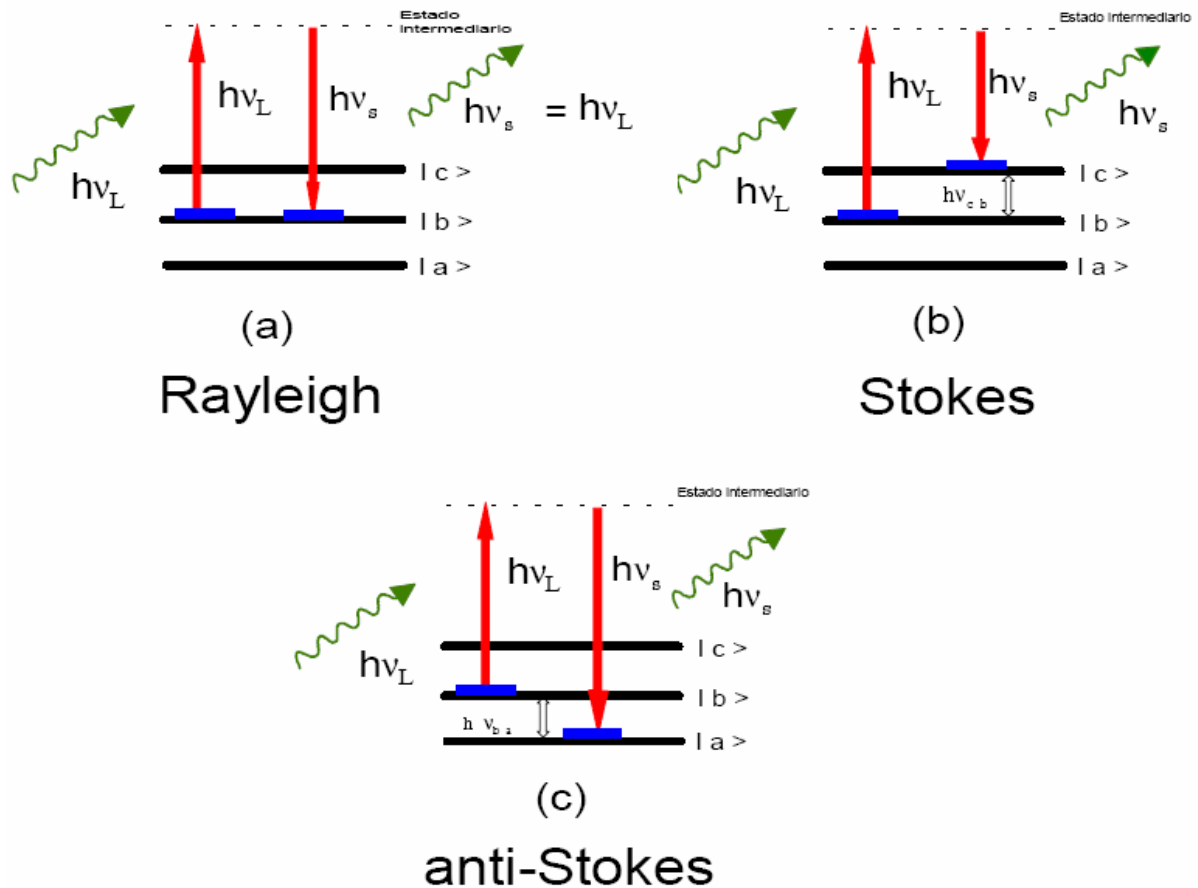


Figura 6. Tipos de espalhamento da luz. a) Espalhamento Rayleigh e espalhamento Raman: (b) Stokes e (c) Anti-Stokes. No processo de espalhamento, um fóton de energia é destruído ($h\nu_L$) e simultaneamente um fóton espalhado de energia é criado ($h\nu_s$).

A luz Raman espalhada pode ser coletada por um espectrômetro, onde sua intensidade é mostrada em função de sua mudança de frequência (deslocamento Raman). Visto que cada amostra molecular possui seu próprio conjunto vibracional molecular, o espectro Raman de uma amostra em particular consistirá de uma série de picos, cada um deslocado em função da frequência vibracional característica daquela molécula, fornecendo assim a identificação para a molécula que está sendo estudada (MOREIRA et al., 2008). Neste sentido, Manoharam, Wang e Feld (1996) considera o espectro como uma impressão digital da molécula analisada.

Com relação à instrumentação para a ER, atualmente os sistemas de aquisição dos espectros Raman consistem de três componentes: uma fonte laser, um sistema de iluminação da amostra e um espectrômetro apropriado. Os lasers são utilizados devido suas altas intensidades de excitação produzir espalhamento Raman com intensidade suficiente para ser medido com uma relação ruído razoável. Como a intensidade do espalhamento Raman varia com a quarta potência da frequência, os lasers que emitem nas regiões espectrais do visível geram uma maior intensidade do sinal Raman. Por outro lado, a radiação com fontes laser infravermelho próximo têm duas grandes vantagens sobre os lasers de comprimento de onda no espectro visível: a primeira é que podem ser operadas com potências muito maiores (até 50 W) sem causar fotodecomposição da amostra; a segunda é que não são energéticos o suficiente para popular um número significativo de estados excitados eletrônicos que produzem fluorescência, excitando apenas os níveis vibracionais, daí caracterizando a ER como sendo uma técnica de espectroscopia vibracional (SKOOG, 2002). O sistema de iluminação da amostra inclui espelhos, filtros de interferência, filtros de rejeição e eventual uso de fibras ópticas (LIMA et al., 2008). Por fim, os espectrômetros podem ser considerados apropriados utilizando basicamente duas configurações: Espectrômetro Raman dispersivo com dispositivo de carga acoplada (CCD) e Espectrômetro Raman com transformada de Fourier (FT-Raman).

A figura 7 ilustra dois diagramas em blocos dos sistemas Raman utilizados no presente estudo. Com relação ao Espectrômetro Dispersivo, um laser diodo um laser de argônio de 5W é usado para bombear um laser de estado sólido de Titânio:safira (Ti:safira). O laser de argônio foi instalado e alinhado de maneira a fornecer a máxima potência. O laser de Ti:safira foi instalado e alinhado de maneira a fornecer a máxima ação laser nos comprimentos de onda 830nm. O sinal Raman espalhado na amostra é coletado a 90 graus utilizando-se filtros de rejeição do tipo *notch* e focalizados na entrada da fenda do espectrógrafo. Os filtros *notch* eliminam a luz *Rayleigh* espalhada e transmitem o sinal Raman para o espectrógrafo para dispersão. A luz dispersada pelo espectrógrafo é detectada por um CCD refrigerado por nitrogênio líquido. O comprimento de onda de excitação do laser de Ti:safira passa por um filtro holográfico “passa-faixa”, eliminando a luz indesejada, transmitindo somente o comprimento de onda desejado. Então, o laser de excitação é focalizado na amostra após passar pela óptica de dispersão (SOUZA et al., 2003). Com relação ao Espectrômetro com Transformada de Fourier, o sistema óptico do equipamento usado foi projetado para iluminar a amostra com a radiação laser Nd:YAG, coletando o máximo possível de radiação espalhada

pela amostra, filtrando-a para que somente a resultante do deslocamento Raman passe. Essa radiação se desloca para o interferômetro, onde é produzido um interferograma, que, a seguir, é processado matematicamente por uma transformada de Fourier. Em seguida, esse sinal é enviado para o detector de Germânio refrigerado por nitrogênio líquido. O laser envia sua radiação para a amostra, e esta emite a radiação Raman que lhe é característica. A amostra se transforma em um emissor de radiação. A radiação laser da fonte, por outro lado, não se desloca além do compartimento da amostra (SANTANNA; SANTOS; SOARES, 2009).

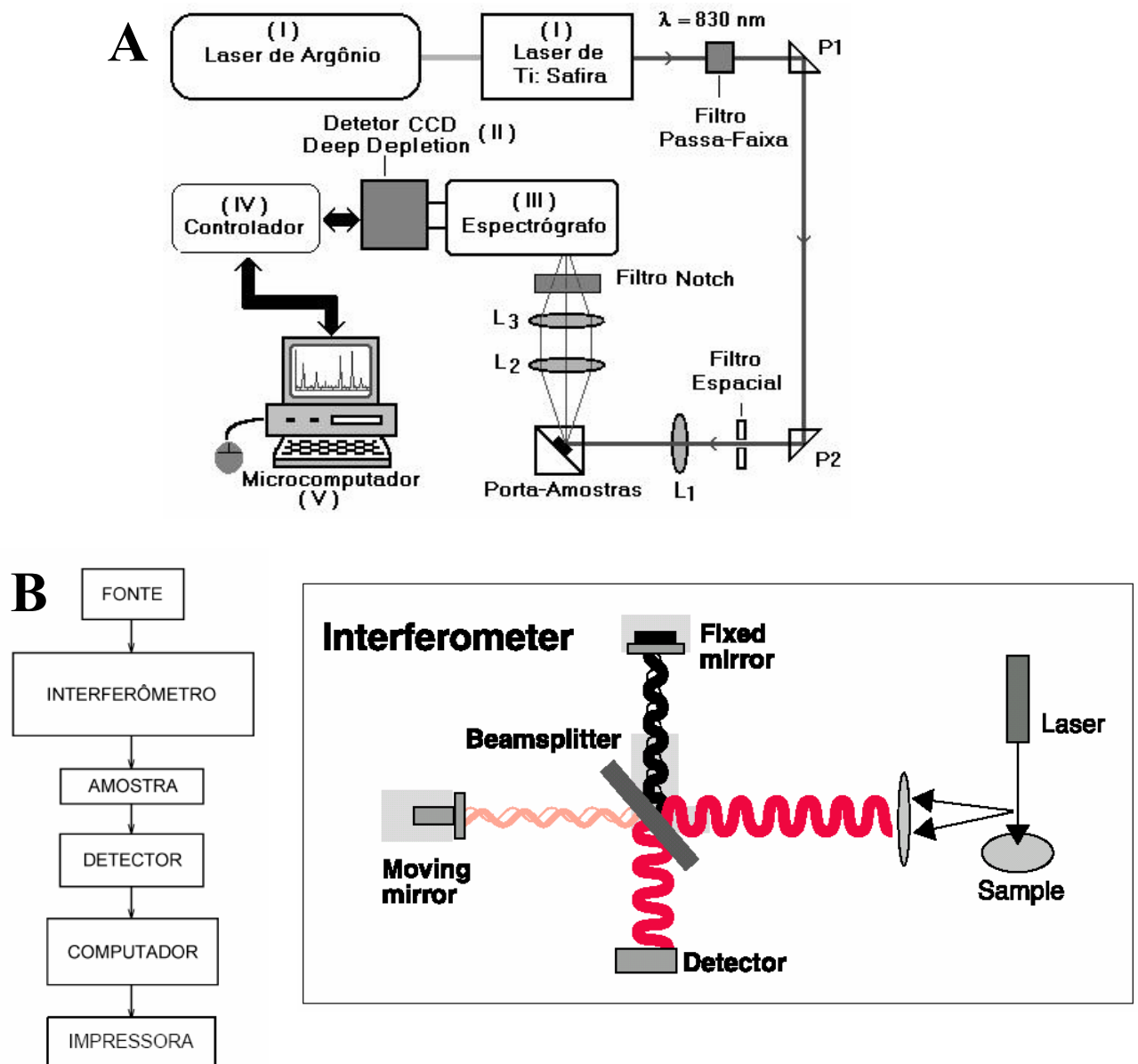


Figura 7. Diagrama em Blocos de dois Espectrômetros Raman. Em A, Espectrômetro Raman dispersivo com Dispositivo de Célula Acoplada (CCD); Em B, Espectrômetro Raman com Transformada de Fourier.

Na tabela 2 são apresentadas as principais diferenças dos espectrômetros Raman dispersivo e com Transformada de Fourier.

Tabela 2. Sistemas Raman Dispersivo e com Transformada de Fourier (FT-Raman)

Características	Raman Dispersivo	FT-Raman
Comprimento de onda Laser (λ)	Laser de Diodo/Ti: Sapphire $\lambda \leq 830$ nm Maior eficiência Raman	Nd:YAG $\lambda > 1000$ nm Menor eficiência Raman
Transdutores	Dispositivo de Carga Acoplada (CCD)	Focondutor de Germânio
Tratamento para aquisição do Espectro	Grades para dispersão da luz (difração)	Interferômetro com Transformada de Fourier
Resolução	Depende de n linhas nas grades	Alta resolução
Aspectos do Espectro	Pode existir Fluorescência Baixo tempo para aquisição dos dados	Livre de Fluorescência Alto tempo de Aquisição dos dados

Independentemente do sistema Raman utilizado, o espectro Raman característico revela no eixo das ordenadas a intensidade Raman e no eixo das abscissas o deslocamento Raman, o qual traduz a natureza vibracional da molécula e é freqüentemente medido em comprimento de onda (cm^{-1}), uma unidade conveniente para relacionar a mudança de freqüência da luz espalhada em relação à freqüência da luz incidente. De acordo com a literatura, o espectro Raman típico do tecido ósseo deve apresentar picos característicos em aproximadamente (\sim) 431, 589, 959, 1006, 1071, 1268, 1453, e 1668 cm^{-1} (CARDEN; MORRIS, 2000). O pico de maior intensidade está centrado em ~ 959 cm^{-1} , correspondendo a vibração de alongamento simétrico do fosfato (\square_1 : PO_4^{3-}) e representa o principal marcador de conteúdo mineral ósseo. Também são evidenciadas outras variações do pico de fosfato, tais como: modo \square_2 de dobramento simétrico centrado em ~ 431 cm^{-1} , modo \square_4 de dobramento simétrico em ~ 589 cm^{-1} , e modo \square_3 de alongamento assimétrico centrado em ~ 1044 cm^{-1} (SAUER et al., 1994). O pico encontrado em ~ 1006 cm^{-1} está relacionado com o modo vibracional \square_1 de fosfato orgânico que se manifesta especialmente em regiões de baixa mineralização (BOHIC et al., 2000). O pico centrado em ~ 1071 cm^{-1} está relacionado com o modo vibracional \square_1 do carbonato (CO_3^{2-}) e indica a extensão de incorporação desse íon molecular na estrutura cristalina da apatita óssea (substituição do tipo B). Os picos Raman relacionados com o conteúdo orgânico representam os modos vibracionais da Amida III

($\sim 1268 \text{ cm}^{-1}$), Amida I ($\sim 1668 \text{ cm}^{-1}$), os quais se relacionam constitucionalmente com o colágeno tipo I e o pico centrado em $\sim 1453 \text{ cm}^{-1}$ que representa o modo vibracional da molécula CH_2 que está presente em ambas proteínas colágenas e não colágenas (CARDEN; MORRIS, 2000). A figura 8 ilustra o espectro Raman de osso sadio e osteoporótico obtidos pela Espectroscopia Raman dispersiva e com Transformada de Fourier de todos os picos previamente discutidos.

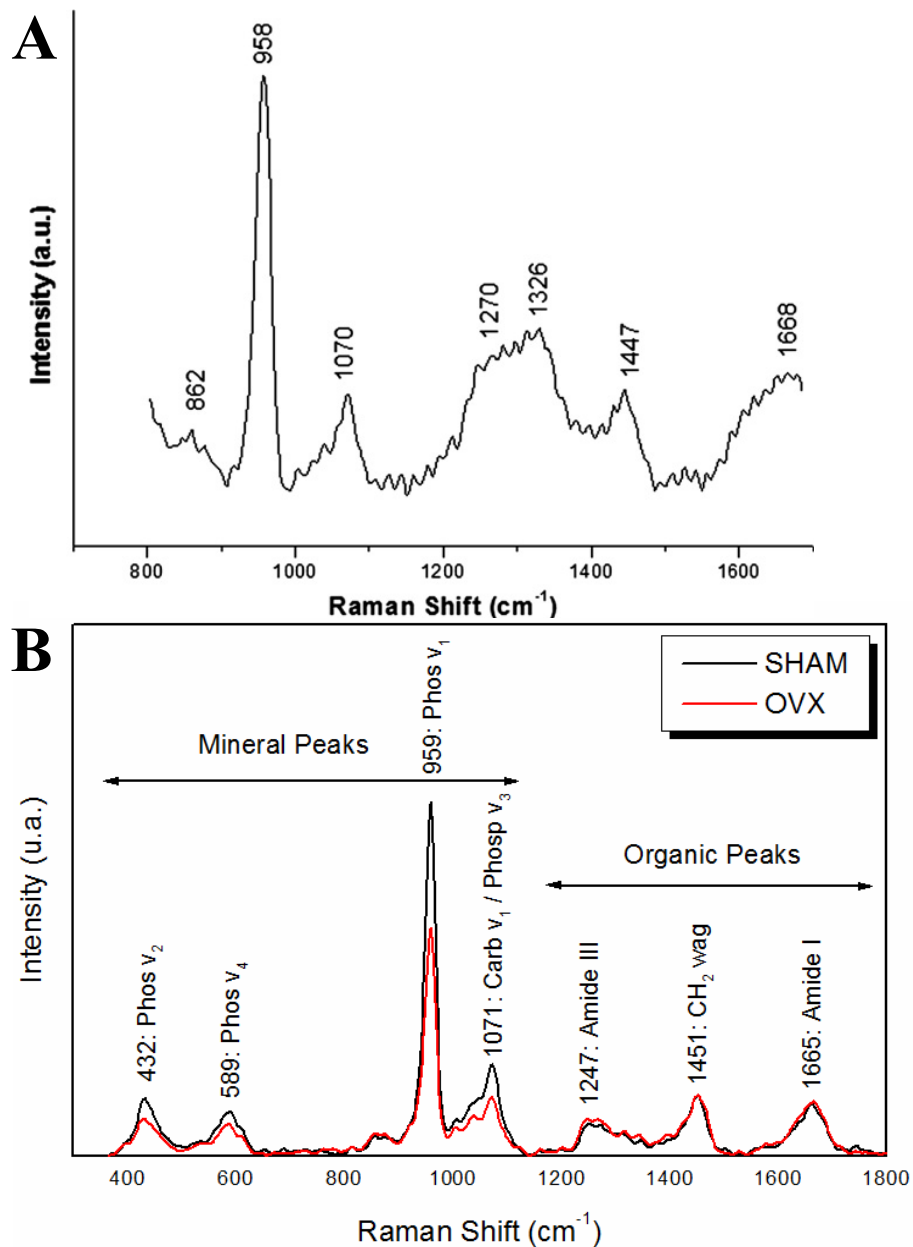


Figura 8. Espectros Raman de tecido ósseo. Em A, Espectrômetro Raman dispersivo com Dispositivo de Célula Acoplada (CCD); Em B, Espectrômetro Raman com Transformada de Fourier. Notar maior ruído do sinal Raman em A.

Nesse sentido, o uso de sistemas que utilizem a espectroscopia Raman está emergindo como método poderoso para diagnóstico de doenças (por exemplo, a osteoporose) especialmente pelo fato de permitirem uma análise não destrutiva da amostra avaliando-a em seu nível molecular (MOREIRA et al., 2008). Da mesma forma, aliado ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e monitoramento da osteoporose, o estudo de novas estratégias terapêuticas também é justificado.

A principal forma de tratamento da osteoporose é a prevenção. No entanto, uma vez diagnosticada essa doença, são adotadas medidas terapêuticas que em sua maioria atuam na reabsorção óssea, como anti-reabsortivos. Por exemplo, tratamento com reposição hormonal de calcitona, estrogênio e uso de bisfosfonatos. Além disso, a DMO também é influenciada pela ingestão de cálcio, vitamina D, prática de atividade física e uso de suplementos em potencial como a creatina.

3.2.2 Creatina como agente terapêutico em potencial

A respeito do desenvolvimento e reparo ósseo, as células desse tecido requerem alta demanda energética para sobreviverem, proliferarem, diferenciarem e sintetizarem a matriz mineralizada (GERBER et al., 2005). O substrato energético é fornecido pela glicólise e fosforilação oxidativa. Adicionalmente, nos últimos anos evidências sugerem que o sistema ATP-CP também desempenha um importante papel na regulação energética do tecido ósseo. Na verdade, a presença de isoformas da enzima CK no tecido ósseo corrobora essa hipótese (WALLIMANN; HEMMER, 1994). Além disso, foi observado que os estímulos capazes de induzir o desenvolvimento da massa óssea (por exemplo, IGF-1 e hormônio paratireoideano) também resultam em aumento da atividade da enzima CK (SOMJEN; KAYE 1994; SOMJEN et al. 1985).

Considerando que a creatina (Cr) é o principal substrato para o sistema ATP-CP de fornecimento de energia celular, justifica-se estudos que possam avaliar a possível participação da suplementação deste composto sobre o tecido ósseo. Alguns estudos envolvendo pacientes com distrofia muscular tratados com corticoterapia (terapia que pode ter como efeito colateral redução da massa óssea) apresentam evidências preliminares que a suplementação de Cr pode ser benéfica a massa óssea desses pacientes. Por exemplo, o estudo

de Louis et al. (2003) com pacientes jovens portadores de distrofia de Duchenne e suplementados com Cr demonstrou incremento da DMO (+3%) e redução da reabsorção óssea (-30%). Chilibeck et al. (2005) investigou os efeitos da suplementação de Cr combinada com o treinamento físico sobre a DMO de pessoas idosas. Esses autores demonstraram que os idosos que receberam a terapia combinada apresentaram superior DMO em relação o grupo placebo e que recebeu somente o treinamento físico. Candow et al. (2008) demonstraram que a suplementação de Cr reduz a degradação protéica muscular e a reabsorção óssea em pessoas idosas submetidas ao treinamento físico. Esses achados nos permitem concluir que a suplementação de Cr exerce um efeito aditivo ao treinamento físico sobre o tecido ósseo. Atualmente, tem sido discutido se a Cr exerce seus efeitos sobre o metabolismo ósseo através de (a) uma ação direta através do sistema bioenergético ATP-CP (GERBER et al. 2005) ou (b) um efeito indireto através do aumento da massa muscular e consequentemente indução de maior tensão óssea nos sítios de inserção desses músculos (CHILIBECK et al. 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que a Cr exerce efeitos estimulatórios sobre a diferenciação, atividade metabólica e mineralização de células de linhagem osteoblástica (GERBER et al. 2005). Claramente, esses achados não podem ser atribuídos ao ganho de massa muscular induzida pela suplementação de Cr. Na verdade, esse estudo corrobora o papel da Cr sobre a bioenergética óssea, possivelmente elevando a razão CP/Cr e preservando a função e ultraestrutura mitocondrial (WALLIMANN; HEMMER, 1994).

Contudo, surpreendentemente até o presente momento, não foram encontrados estudos testando a eficácia de Cr sobre a osteoporose, principal consequência doentia da reduzida massa óssea. Do mesmo modo, é pertinente especular se a suplementação de Cr poderia ser usada como agente terapêutico em potencial no tratamento da osteoporose.

4 CONTEXTUALIZAÇÃO DOS ESTUDOS

4.1 Estudo I

De acordo com o contexto apresentado anteriormente, foram realizados cinco estudos sempre utilizando como técnica de análise da qualidade óssea a ER. Todos os procedimentos adotados nos estudos estavam de acordo com os princípios de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIVAP (Anexo A: 106/CEP/2007 e A37/CEP/2008). O Estudo I intitulado “**Raman spectroscopy study for measurement of bone compounds**” foi um estudo piloto para comprovar a hipótese de que as características espectrais do tecido ósseo poderiam ser mensuradas objetivamente por meio da ER dispersiva. Foi utilizado um único osso fêmur sadio de camundongo fêmea e as principais bandas Raman ajustadas em 862, 958, 1070, 1270, 1326, 1447 e 1668 cm^{-1} foram adequadamente identificadas e correlacionadas com os constituintes minerais e orgânicos do tecido ósseo. Esse estudo foi apresentado no XXIII Congresso Brasileiro de Anatomia realizado nos dias 18 a 23 de outubro de 2008 em Belém/PA e seu *abstract* foi publicado no periódico BRAZILIAN JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCES, 2008, vol. 25, no. 1-4, p. 255.

BRAZILIAN JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCES, 2008, vol. 25, no. 1-4, p. 255.

Morphological Techniques

Raman spectroscopy study for measurement of bone compounds

Souza, RA.^{1,3}, Souza, MT.², Silva, FF.³, Silva, MASR.³ Ribeiro W³ and Silveira Jr., L.³

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

²Universidade do Vale do Sapucaí

³Universidade do Vale do Paraíba

The Dual X ray Absorptometry (DXA) technique, although the current gold standard screening modality, is not able to predict bone strength fully. Bone is a composite material, and X ray techniques rely on absorption only from the mineral phase (carbonated apatite); the organic phase (primarily collagen I) remains essentially invisible, yet resistance to fracture in bone is known to be critically dependent on both its phases, with strong evidence that the collagen in bone undergoes changes in osteoporosis. There is a clear need for an enhanced noninvasive technology that, in addition to measuring the properties of the bone mineral phase, safely measures bone collagen quality. The Raman spectroscopy is an optical tool, which could permit less invasive and nondestructive analysis of biological samples, allowing one to get precise information on biochemical composition. Raman spectroscopy has been accepted by many as a viable tool for the study of bone mineralization. The aim of this study, therefore, was to test the hypothesis that spectral features of both the mineral and organic phases of bone specimen with known differences in material properties can be measured objectively through the Raman spectroscopy technique. It was used only a femur bone of mouse. For Raman measurements an $\lambda = 830$ nm Ti: Sapphire laser pumped by Argon laser provided near-infrared excitation. A spectrograph with spectral resolution of about 8 cm^{-1} dispersed the Raman scattered light from the sample and a liquid-nitrogen cooled deep depletion CCD detected the Raman spectra. The system was controlled by a microcomputer, which stored and processed the data. The laser power used at the sample was of 80 mW, spectral acquisition time 100 seconds. Three points were measured in proximal epiphysis of the femur. The mean value of the intensity of the peak (958 cm^{-1}) was determined by the

average of the peaks in this region. This intensity is related to the concentration of CHA on the bone. The data were analyzed by the MatLab5.1 software for calibration and background subtraction of the spectra. The Raman spectrum of bone shows prominent vibrational bands related to tissue composition. The tissue main Raman bands at 862, 958, 1070, 1270, 1326, 1447 and 1668 cm^{-1} . The 1668 cm^{-1} band and the ones at 1270 and 1326 cm^{-1} are attributed to amide I and amide III stretching modes, the ones at 958 and 1070 cm^{-1} are attributed to phosphate and carbonate hydroxyapatite, respectively. The band at 862 cm^{-1} can be attributed to the vibration bands of C–C and C–C–H stretch of collagen and lipid. The band at 1447 cm^{-1} is attributed to the bending and stretching modes of CH groups of lipids and proteins. The spectral features of both the mineral and organic phases of bone specimen with known differences in material properties can be measured objectively through the Raman spectroscopy technique.

4.2 Estudo II

O estudo II foi intitulado “**Effects of different swimming exercise intensities on bone tissue composition in mice: a Raman spectroscopy quantitative study**”. Nesse estudo a ER dispersiva foi utilizada para quantificar os efeitos de diferentes intensidades de natação sobre a composição mineral (fosfato: 960 cm^{-1} e carbonato: 1170 cm^{-1}) e orgânica (colágeno: 1660 cm^{-1}) de fêmures sadios de camundongos fêmeas. Os resultados desse estudo indicaram que a alta intensidade de natação pode ser deletéria para o tecido ósseo. Esse estudo foi submetido ao periódico *PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT* e até o presente momento não se tem nenhum parecer dos revisores.

PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT

Effects of different swimming exercise intensities on bone tissue composition in mice: a Raman spectroscopy quantitative study

Fabiano Fernandes da Silva¹, **Renato Aparecido de Souza¹**, Marcos Tadeu Tavares Pacheco¹, Wellington Ribeiro¹, Marcos Augusto Souza Rodrigues da Silva¹, Humberto Miranda¹, Fabiana Silva Pires¹, Miguel Angel Castillo Salgado², Julio Cezar de Melo Castilho³, Landulfo Silveira Jr.¹

¹Laboratory of Biomolecular Spectroscopy, Institute of Research and Development (IP&D), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi, Urbanova, 2911, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil.

²Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Av. Eng. Francisco José Longo, 777, Jardim São Dimas, 122450-000, São José dos Campos, SP, Brazil.

³Departamento de Radiologia, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Av. Eng. Francisco José Longo, 777, Jardim São Dimas, 122450-000, São José dos Campos, SP, Brazil

Corresponding author: Landulfo Silveira Jr., Laboratory of Biomolecular Spectroscopy, Institute of Research and Development (IP&D), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi, Urbanova, 2911, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil, landulfo@univap.br
Tel.: +55 12 3947-1124.

Abstract

Raman spectroscopy was used to quantify the effects of different swimming intensities on femoral bone composition of minerals phosphate (960 cm^{-1}) and carbonate (1170 cm^{-1}) apatites and collagen matrix (1660 cm^{-1}) in an animal model. Eighteen Swiss Webster female mice were divided in three groups ($n = 6$ per group) of sedentary (SED), swimming with an intensity of 40% (PT-40) and to 80% (PT-80) of the maximum load, with training duration of

six weeks. Results evidenced that mineral concentrations in both PT-40 and PT-80 groups were lower than the SED group. Intense swimming may be deleterious for bone mineral.

Keywords: Raman spectroscopy, bone mineralization, physical activity, bone quality.

4.3 Estudo III

O estudo III foi intitulado “**Fourier-transform Raman spectroscopy study of the ovariectomized rat model of osteoporosis**” e teve como objetivo investigar o modelo de osteoporose induzida por ovariectomia para caracterizar o conteúdo mineral e orgânico de diferentes sítios ósseos: colo femoral, diáfise femoral, metáfise proximal tibial, diáfise tibial e vértebra lombar. Os resultados deste estudo foram fundamentais para verificar o sucesso da espectroscopia FT-Raman em monitorar as alterações ósseas imposta pela ovariectomia e favorecer a definição dos protocolos de análise dos estudos que se sucederam. Esse artigo foi submetido ao periódico THE OPEN BONE JOURNAL e até o presente momento não se tem nenhum parecer dos revisores.

THE OPEN BONE JOURNAL

Fourier-transform Raman spectroscopy study of the ovariectomized rat model of osteoporosis

Renato Aparecido de Souza^{*,1,2}, Diego Pereira Jerônimo², Hélio Andrade Gouvêa², Murilo Xavier², Marco Túlio de Souza³, Humberto Miranda², Maira Gaspar Tosato⁴, Airtton Abrahão Martin⁴, Wellington Ribeiro²

¹ *Department of Physical Therapy, Vales do Jequitinhonha e Mucuri Federal University, UFVJM, Rua da Glória, 187, 39100-000, Diamantina, Minas Gerais, Brazil*

² *Laboratory of Physiology and Pharmacodynamics, Institute of Research and Development, IP&D, Vale do Paraíba University, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil*

³ *Faculty of Medicine, Vale do Sapucaí University, UNIVAS, Av. Pref. Tuany Toledo, 470, 37500-000, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brazil*

⁴ *Laboratory of Biomedical Vibrational Spectroscopy, Institute of Research and Development, IP&D, Vale do Paraíba University, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil*

Running title: Analyze of osteoporosis by FT-Raman

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Physiology and Pharmacodynamics, Institute of Research and Development, IP&D, Vale do Paraíba University, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil, Fax: +55-12-3947-1149; E-mail: tatosouza2004@yahoo.com.br

NO CONFLICT OF INTEREST.

Abstract

The ovariectomized rat model of osteoporosis was studied using FT-Raman spectroscopy on the surface of site-specific bones. Twelve, 3 month old female Wistar rats (230 ± 10 g) were divided into two groups ($n = 6$ per group), one group was: ovariectomized (OVX) and the

other sham-operated (SHAM). The rats were sacrificed to collect samples twelve weeks after the surgical operation. The right femur and tibia as well as the third lumbar vertebra were harvested and subjected to FT-Raman analyze on the following bones sites: femoral neck (FN), femoral mid-shaft (FS), proximal tibial metaphysis (PTM), tibial mid-shaft (TS), and lumbar vertebral body (LVB). Analysis of individual Raman peaks showed site-dependent variations in the bone: the ovariectomy induced lower mineral content (959 cm^{-1}) in trabecular bone sites (FN, PTM and LVB) and higher matrix content (1265 and 1665 cm^{-1}) in cortical bone sites (FS and TS). In addition, a lower mineral to matrix ratio and a higher carbonate/phosphate were observed on OVX group, which indicated a change in bone chemical content and some degree of remodeling specially in the trabecular bone sites. These data support the hypothesis that ovariectomized adult rats are an excellent model for postmenopausal osteoporosis, and the FT-Raman spectroscopy can be used to evaluate the bone alterations induced by this experimental model.

4.4 Estudo IV

O Estudo IV foi intitulado “**Influence of Creatine supplementation on cortical and trabecular bone in the ovariectomized rat model: FT-Raman spectroscopy study**” e verificou a influência da suplementação de Cr sobre as regiões cortical e trabecular ósseas de ratas osteoporóticas usando a espectroscopia FT-Raman. Os resultados deste estudo demonstraram que a creatina pode interferir positivamente sobre o conteúdo mineral do osso trabecular. Esse artigo foi submetido ao periódico THE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS e até o presente momento não se tem nenhum parecer dos revisores.

THE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS

Influence of Creatine supplementation on cortical and trabecular bone in the ovariectomized rat model: FT-Raman spectroscopy study

Renato Aparecido de Souza^{1,2}, Humberto Miranda², Hélio Andrade Gouv  a², Diego Pereira Jer nimo², Murilo Xavier², Marco Túlio de Souza³, Maira Gaspar Tosato⁴, Julio Cezar de Melo Castilho⁵, Airton Abrahão Martin⁴, Rodrigo Alexis Lazo Osorio², Wellington Ribeiro²

¹Department of Physical Therapy, Vales do Jequitinhonha e Mucuri Federal University, UFVJM, Rua da Glória, 187, 39100-000, Diamantina, Minas Gerais, Brazil

²Laboratory of Physiology and Pharmacodynamics, Institute of Research and Development, IP&D, Vale do Paraíba University, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

³Faculty of Medicine, Vale do Sapucaí University, UNIVAS, Av. Pref. Tuany Toledo, 470, 37500-000, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brazil

⁴Laboratory of Biomedical Vibrational Spectroscopy, Institute of Research and Development, IP&D, Vale do Paraíba University, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

⁵Departamento de Radiologia, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Av. Eng. Francisco José Longo, 777, Jardim São Dimas, 122450-000, São José dos Campos, SP, Brazil

Corresponding author:

Address: Laboratory of Physiology and Pharmacodynamics, Institute of Research and Development, IP&D, Vale do Paraíba University, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Tel.: +55 12 3947-1106.

E-mail address: gton@univap.br

Abstract

The influence of Creatine (Cr) supplementation on cortical and trabecular bone from ovariectomized rat was studied using FT-Raman spectroscopy. Twenty one female Wistar rats aged 3 months were divided into three groups (n = 7 per group): ovariectomized (OVX), ovariectomized treated with creatine (CRE) and sham-operated (SHAM). The Cr supplementation ($300 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$) was given during 8 weeks starting 12 weeks after ovariectomy. FT-Raman spectroscopy was performed on right femoral mid-shaft (cortical bone) and third lumbar vertebral body (trabecular bone). The results demonstrated that the mineral content (959 cm^{-1}) on trabecular bone was higher in CRE group than OVX group ($p < 0.05$). Results suggest that the chemical composition of bone tissue may be positively influenced by Cr supplementation after ovariectomy.

Keywords: FT-Raman spectroscopy; ovariectomy; bone; osteoporosis

4.5 Outros estudos

É importante ressaltar que durante a realização desses estudos, outros trabalhos também foram desenvolvidos e permitiram maior fundamentação teórica e prática da ER e suplementação de Cr. Os estudos apresentados nos Apêndices B, C, D e E já foram publicados nos respectivos periódicos: REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA DO ESPORTE, FITNESS & PERFORMANCE JOURNAL, CONSCIENTIAE SAÚDE e SPECTROSCOPY. Além desses, os estudos apresentados no Anexo F refere-se a um artigo recentemente aceito no JOURNAL OF SPORTS SCIENCE AND MEDICINE e os anexos G e H estão aguardando o parecer dos revisores dos periódicos REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE e CANCER DETECTION AND PREVENTION, respectivamente.

5 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais adotadas nos estudos apresentados, os resultados obtidos nos permitem concluir que:

A Espectroscopia Raman (Dispersiva e com Transformada de Fourier) é capaz de caracterizar adequadamente os componentes mineral e orgânico do tecido ósseo sadio e osteoporótico em modelo animal;

O protocolo de treinamento com natação a 40% e 80% da carga máxima reduziu o conteúdo mineral de ossos sadios, indicando que dependendo da intensidade do nado pode haver prejuízo para o tecido ósseo;

A suplementação de creatina influencia positivamente o tecido ósseo osteoporótico;

O principal marcador do conteúdo mineral obtido pela Espectroscopia Raman (banda centrada em aproximadamente 959cm^{-1}) possui alta correlação com os resultados obtidos por Densitometria Óptica.

REFERÊNCIAS

- AKKUS, O.; ADAR, F.; SCHAFFLER, M.B. Age-related changes in physico-chemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone**, v.34, p.443-453, 2004.
- ANITELI, T.M.; FLORINDO, A.A.; PEREIRA, R.M.R. Desenvolvimento de equação para estimativa da gordura corporal de mulheres idosas com osteoporose e osteopenia através da espessura de dobras cutâneas tendo como referência absorciometria por dupla emissão de raios X. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.12, n.6, p.366-370, 2006.
- ANTOLIC, A. et al. Creatine monohydrate increases bone mineral density in young Sprague-Dawley rats. **Med Sci Sports Exerc.**, v.39, n.5, p.816-820. 2007.
- BAUSS, F. et al. Effects of treatment with ibandronate on bone mass, architecture, biomechanical properties, and bone concentration of ibandronate in ovariectomized aged rats. **J. Rheumatol.**, v. 29, p.2200-2208, 2002.
- BEMBEN, M.G.; LAMONT, H.S. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. **Sports Med.**, v.35, n.2, p.107-125, 2005.
- BOHIC, S. et al. Characterization of the trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. **Bone**, v.26, p. 393-396, 2000.
- BOIVIN, G.; MEUNIER, P.J. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. **Osteoporosis Int.**, v. 14, n.3, p.19-24, 2003.
- BRAUN, M.J. et al. Changes in biomechanical properties of rat femora induced by ovariectomy as analyzed by pQCT. **Osteoporos Int.**, v., p.194, 1996.
- CADORE, E.L.; BRENTANO, M.A.; KRUEL, L.F.M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 11, n. 6, p. 373-379, 2005.
- CANDOW, D.G.; LITTLE, J.P.; CHILIBECK, P.D.; ABEYSEKARA, S.; ZELLO, G.A.; KAZACHKOV, M.; CORNISH, S.M.; YU, P.H. Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. **Med. Sci. Sports Exerc.**, (Epub ahead of print), 2008.
- CARDEN, A.; MORRIS, M.D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). **J. Biomed. Opt.**, v.5, n.3, p. 259-268, 2000.
- CARVALHO, C.M.R.G.; FONSECA, C.C.C.; PEDROSA, J.I. Educação para a saúde em osteoporose com idosos de um programa universitário: repercussões. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n.3, p. 719-726, 2004.
- CHAPPARD, D et al. Pathophysiologie des métastases osseuses. **Prog. Urologie**, v. 13, supp. 1, p.9-17, 2003.
- CHILIBECK, P.D. et al. Creatine monohydrate and resistance training increase bone mineral content and density in older men. **J. Nutr. Health Aging**, v.9, p. 352-353, 2005.

- CUKROWSKI, I. et al. Modeling and spectroscopic studies of bisphosphonate-bone interactions. The Raman, NMR and crystallographic investigations of Ca-HEDP complexes. **Bone**, v. 41, n. 4, p. 668-678, 2007.
- DRAPER, E.R. et al. Novel assessment of bone using time-resolved transcutaneous Raman spectroscopy. **J. Bone Miner. Res.**, v.20, n.11, p.1968-1972, 2005.
- DRAKE, M.T.; CLARKE, B.L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin Proc.**, v.83, n.9, p.1032-1045, 2008.
- EASTELL, R.; HANNON, R.A. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. **Proc Nutr Soc.**, v. 67, p.157-162, 2008.
- FAZZALARI, N.L. Bone remodeling: A review of the bone microenvironment perspective for fragility fracture (osteoporosis) of the hip. **Semin Cell Dev Biol.**, v.19, n.5, p. 467-472, 2008.
- FITZPATRICK, L.A. Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 50, n.4, 705-719, 2006.
- FUNANAGE, V.L. et al. Creatine kinase activity is required for mineral deposition and matrix synthesis in endochondral growth cartilage. **Bone Miner.**, v.17, p.228-236, 1992.
- FUCHS, R.K.; ALLEN, M.R.; CONDON, K.W. Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats. **Osteoporos Int.**, v.19: p.1815-1817, 2008.
- GALI, J.C. Osteoporose. **Acta ortop. bras.**, v. 9, n. 2, p. 3-12, 2001.
- GARDNER, M.J.; DEMETRAKOPOULOS, D.; SHINDLE, M.K.; GRIFFITH, M.H.; LANE, J.M. Osteoporosis and skeletal fractures. **HSS J.**, v.2, n.1, p. 62-69, 2006.
- GERBER, I. et al. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. **Eur Cell Mater.**, v.10, p.8-22, 2005.
- GOODYEAR, S.R. et al. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 black 6 mice using Raman spectroscopy. **Bone**, v. 44, p. 899-907, 2009.
- HAQUE, T.; ULUDAG, H.; ZERNICKE, R.F.; WINN, S.R.; SEBALD, W. Bone marrow cells from normal and ovariectomized rats respond differently to basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein 2 treatment in vitro. **Tissue Eng.**, v. 11, p.634-44, 2005.
- IMAI, Y. et al. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. **Mol. Cell. Endocrinol.**, Disponível em: DOI 10.1016/j.mce.2008.08.015
- IZQUIERDO, M.; IBAÑEZ, J.; GONZÁLEZ-BADILLO, J.J.; GOROSTIAGA, E.M. effects of creatine supplementation on muscle power, endurance, and sprint performance. **Med Sci Sports Exerc.**, v.34, n. 2, p.332-43. 2002.
- JILKA, R.L. Biology of the Basic Multicellular Unit and the pathophysiology of osteoporosis. **Med. Pediatr. Oncol.**, v. 41, p. 182-185, 2003.

JEE, W.S.S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **J. Musculoskel. Neuron. Interact.**, v. 1, p. 193-207, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 136-150.

KALU, D.N. The ovariectomized rat as a model of postmenopausal osteopenia. **Bone Miner.**, v.15, p. 175-91, 1991.

KIMMEL, D.B.; WRONSKI, T.J. Non-destructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. **Calcif. Tissue Int.**, v. 46, p.101-110, 1990.

KRUM, S.A. et al. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. **EMBO J.**, v. 27, p.535–545, 2008.

LAFITA, J. Fisiología y Fisiopatología Ósea. **An. Sist. Sanit. Navar.**, v. 26, n. 3, p. 7-15, 2003.

LEMURA, L.M.; DUVILLARD, S.P.V. Osteoporose. In: _____. **Fisiologia do Exercício Clínico. Aplicações e Princípios Fisiológicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 409-423.

LESCLOUS, P. et al. . Histamine participates in the early phase of trabecular bone loss in ovariectomized rats. **Bone**, v.34, p.91-99, 2004.

LEWIS, I.R.; EDWARDS, H.G.M. **Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line**. New York: Marcel Dekker, 2001. p.1054.

LIMA, C.J. et al. Optical fiber catheter with distal end bending mechanism control for Raman biospectroscopy. **Instrumentation Science & Technology**, v. 36, p. 43-55, 2008.

LIN, J.T.; LANE, J.M. Osteoporosis: a review. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 425, p. 126–134, 2004.

LOPES, C.B. et al. The effect of the association of NIR laser therapy BMPs, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with wire osteosynthesis: Raman spectroscopy study. **J Photochem Photobiol B.**, v. 89, n. 2-3, p.125-130, 2007.

LOUIS, M. .et al. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. **Muscle Nerve**, v.27, n.5, p.604-610, 2003.

MACDONALD, B.R.; GOWEN, M. The cell biology of bone. **Baillieres Clin Rheumatol**. v. 7, n.3, p.421-443, 1993.

MANOHARAN, R.; WANG, Y.; FELD, M.S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 52, p.215-249, 1996.

MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v.21, p. 115-137, 2000.

MATSUO K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.473, n.2, p.201-209, 2008.

MCCALL, W.; PERSKY, A.M. Pharmacokinetics of creatine. **Subcell Biochem.**, v. 46, p.261-273, 2007.

MCCREADIE, B.R. et al. Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. **Bone**, v.39, p.1190-1195, 2006.

MIMC, S.; MACDONALD, J.R.; MCKENZIE, S.; TARNOPOLSKY, M.A. Acute creatine loading increases fat-free mass, but does not affect blood pressure, plasma creatinine, or CK activity in men and women. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.32, p.291-296, 2000.

MOREIRA, L.M. et al. Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis. **Spectroscopy (Ottawa)**, v. 22, p. 1-19, 2008.

MUDD, L.M.; FORNETTI, W.; PIVARNIK, J.M. Bone Mineral Density in Collegiate Female Athletes: Comparisons Among Sports. **J. Athl. Train.**, v. 42, n.3, p. 403-408, 2007.

NAKAMURA, T. et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell.**, v. 130, p. 811-823, 2007.

NICHOLS, J.F. et al. Bone mineral density in female high school athletes: interactions of menstrual function and type of mechanical loading. **Bone**. v. 41, n.3, p. 371-377, 2007.

OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 12, n.3, p.164-168, 2006.

PACIFICI, R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. **Cell Immunol.**, v. 252, p. 68-80, 2007.

PAJAMÄKI, I. et al. Skeletal effects of estrogen and mechanical loading are structurally distinct. **Bone**, v.43, p.748-757, 2008.

RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, v. 289, p.1508-1514, 2000.

ROHANIZADEH, R et al. Ultrastructural Properties of Bone Mineral of Control and Tiludronate-Treated Osteoporotic Rat. **Calcif Tissue Int.** v. 67, p. 330-336, 2000.

ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? the possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. **Cell Biology International**. v. 18, n.6, 1994, 617-628, 1994.

RUPPEL, M.E.; BURR, D.B.; MILLER, L.M. Chemical makeup of microdamaged bone differs from undamaged bone. **Bone**, v. 39, n. 2, p.318-324, 2006.

RUSSO, L.A.T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, n.4, p. 401-406, 2001.

RYAN, M.R. et al. An IL-7-dependent rebound in thymic T cell output contributes to the bone loss induced by estrogen deficiency. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 16735–16740, 2005.

SAKAKURA, C.E. et al. Radiographic assessment of bone density around integrated titanium implants after ovariectomy in rats. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 2, p. 134-138, 2006.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no infravermelho**. São Paulo: Editora da Unesp, 1996.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Espectroscopia Raman. In: _____. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. São Paulo: Artmed, 2002. p. 386-398.

REGINSTER, J.Y. et al. Role of biochemical markers of bone turnover as prognostic indicator of successful osteoporosis therapy. **Bone**, v.42, p.832-836, 2008.

SANTANNA, G.R.; SANTOS, E.A.P.; SOARES, L.E.S.; Dental enamel irradiated with infrared diode laser and photo absorbing cream: part 1- FT-Raman study. **Photomed Laser Surg.**, v.27, p.499-507, 2009.

SAUER, G.R. et al. Fourier transform raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. **Calcif. tissue Int.**, v.54, p. 414-420, 1994.

SEEMAN E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, n.1, p.1-8, 2008.

SHEN, J. et al. A longitudinal Raman microspectroscopic study of osteoporosis induced by spinal cord injury. **Osteoporos. Int.**, Publicado 13 de maio de 2009 (online); Disponível como DOI 10.1007/s00198-009-0949-3.

SHENG, Z.F. et al. Regionally specific compensation for bone loss in the tibial trabeculae of estrogen-deficient rats. **Acta Radiol.**, v. 48, p.531-539, 2007.

SILVEIRA JR. L.; SATHAIAH, S.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; CHAVANTES, M. C.; PASQUALUCCI, C. A. Near-infrared Raman spectroscopy of human coronary arteries: histopathological classification based on Mahalanobis distance. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 21, n. 4, p. 203-208, 2003.

SMITH, R.; REHMAN, I. Fourier transform Raman spectroscopic studies of human bone. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.5, p.775-778, 1995.

SOMJEN, D.; KAYE, A.M. Stimulation by insulin-like growth factor-I of creatine kinase activity in skeletal-derived cells and tissues of male and female rats. **J. Endocrinol.**, v. 143, p. 251-259, 1994.

SOMJEN, D.; KAYE, A.M.; RODAN, G.A; BINDERMAN, I. Regulation of creatine kinase activity in rat osteogenic sarcoma cell clones by parathyroid hormone, prostaglandin E2, and vitamin D metabolites. **Calcif. Tissue Int.**, v. 37, p. 635-638, 1985.

SOMMERFELDT, D.W.; RUBIN, C.T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **Eur Spine J.**, v.10, Suplemento 2, S86-95, 2001.

- SOUZA, F.B.; PACHECO, M.T.T.; SILVEIRA JR., L.; VILLAYERDE, A.B.; MARTINS, R.A.B.L. Intramuscular lactic acid assessment through Raman spectrography: new perspectives in sports medicine. **Rev. Bras Med. Esporte**, v. 9, n. 6, p. 388-395, 2003.
- SUN, L. et al. FSH directly regulates bone mass. **Cell**, v. 125, p. 247–260, 2006.
- SUTCLIFFE, A. Osteoporosis: an overview of the organisation of services to deliver secondary prevention measures to older people with fragility fractures. **Curr. Orthopaedics**, v. 22, n. 5, p.315-321, 2008.
- SYED, F.; KHOSLA, S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.328, n.3, p. 688–696, 2005.
- SZULC, P.; DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. **Osteoporos Int.**, v.19, n.12, p.1683-1704, 2008.
- TAKAYAMA, B. et al. An immunohistochemical study of the antinociceptive effect of calcitonin in ovariectomized rats. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 15, p. 164, 2008.
- TARNOPOLSKY, M.A.; MACLENNAN, D.P. Creatine monohydrate supplementation enhances high-intensity exercise performance in males and females. **Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.**, v.10, p.452-463, 2000.
- TARNOPOLSKY, M.A.; MARTIN, J. Creatine monohydrate increases strength in patients with neuromuscular disease. **Neurology**, v.52, p.854-857, 1999.
- TRAINA, S.J.; LAPERCHE, V. Contaminant bioavailability in soils, sediments, and aquatic environments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 3365–3371, 1999.
- TURNER A.S. Animal models of osteoporosis - necessity and limitations. **Eur. Cell. Mater.**, v. 22, p. 66-81, 2001.
- TURNER, R.T. et al. Animal models for osteoporosis. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 2, n.1, p.117-27, 2001.
- WALLIMANN, T.; HEMMER, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. **Mol. Cell Biochem.**, v. 133, p. 193-220, 1994.
- WEITZMANN, M.N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p.1186–1194, 2006.
- WOPENKA, B.; PASTERIS, J.D. A mineralogical perspective on the apatite in bone. **Mater. Sci. Eng. C. Biomim. Supramol. Syst.**, v. 25, n. 2, p.131-143, 2005.
- WRONSKI, T.J.; CINTRON, M.; DANN, L.M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int.**, v.42, p.179-183, 1988.
- WU, J. et al. Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 16, n. 10, p. 1829–1836, 2001.

ZHANG, S.; GANGAL, G.; ULUDAG, H. Magic bullets' for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents. **Chem. Soc. Rev.**, v.36, p.507–531, 2007.

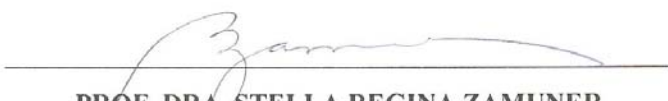
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º **A106/CEP/2007**, sobre “*A participação da atividade física nos mecanismos neurobiológicos relacionados à farmacodependência*” sob a responsabilidade de Prof. Dr. **Wellington Ribeiro** foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 18 de dezembro de 2007.


PROF. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A37/CEP/2008, sobre *"Influência da Suplementação de creatina sobre a qualidade óssea de ratas osteopênicas: Um estudo Ruman"*, sob a responsabilidade do MSc. *Renato Aparecido de Souza*, foi *aprovado* por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 19 de novembro de 2008.


PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap

Apêndice A: Artigo publicado
Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 12, n. 6, p. 361-365, 2006.



Influência da suplementação aguda e crônica de creatina sobre as concentrações sanguíneas de glicose e lactato de ratos Wistar*

Renato Aparecido Souza, Roberto Mussoline dos Santos, Rodrigo Aléxis Lazo Osório, José Carlos Cogo, Antônio Carlos Guimarães Prianti Júnior, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins¹ e Wellington Ribeiro

RESUMO

Estudos recentes sugerem que a suplementação de creatina pode interferir com a captação de glicose e a produção de lactato durante a atividade física. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação aguda (5g.kg^{-1} durante uma semana) e crônica (1g.kg^{-1} durante oito semanas) de creatina sobre as concentrações sanguíneas de glicose e lactato de ratos sedentários e exercitados (natação a 80% da carga máxima tolerada). Setenta e dois ratos Wistar machos ($240 \pm 10\text{g}$) foram utilizados e divididos igualmente em quatro grupos experimentais ($n = 18$): CON – ratos sedentários não suplementados; NAT – ratos exercitados não suplementados; CRE – ratos sedentários e suplementados; CRE + NAT – ratos exercitados e suplementados. As amostras sanguíneas foram obtidas antes e após o teste de determinação da carga máxima realizado semanalmente durante todo o experimento. Antes do teste de carga máxima, com exceção do grupo CRE-NAT (3-5 semanas), que apresentou concentrações plasmáticas de glicose inferiores em relação aos demais grupos, todos os outros resultados foram semelhantes entre os grupos experimentais. Após o teste de carga máxima todos os grupos experimentais apresentaram redução das concentrações plasmáticas de glicose e aumento das concentrações plasmáticas de lactato. Contudo, em relação à glicose, esta redução foi significativamente ($p < 0,05$) pronunciada nos grupos CRE (1-4 semanas) e CRE + NAT (1-8 semanas) e, em relação ao lactato, o aumento foi significativamente ($p < 0,05$) menor nos grupos CRE (1-2 semanas) e CRE + NAT (1-8 semanas). Os achados deste estudo sugerem que o regime adotado de suplementação influenciou o perfil metabólico glicêmico, minimizou o acúmulo de lactato e potencializou a máxima carga suportada nos animais suplementados.

ABSTRACT

Influence of the short and long term supplementation of creatine on the plasmatic concentrations of glucose and lactate in Wistar rats

Recent studies suggest that the creatine supplementation can interfere with glucose uptake and lactate production during the physical activity. The aim of this study was to investigate the effects of the short-term (5g.kg^{-1} for 1 week) and long-term (1g.kg^{-1} for 8 weeks) creatine supplementation on the plasmatic concentrations of glucose and lactate of sedentary and exercised (swimming to 80% of the tolerated maximum load) rats. Seventy two

Palavras-chave: Suplementação de creatina. Recursos ergogênicos. Bioenergética. Ratos.

Keywords: Creatine supplementation. Ergogenic aid. Bioenergetic. Rats.

Palabras-clave: Suplementación de creatina. Recursos ergogénicos. Bioenergética. Ratones.

male Wistar rats ($240 \pm 10\text{g}$) were used and divided equally in 4 experimental groups ($n = 18$): CON – sedentary rats without supplementation; NAT – exercised rats without supplementation; CRE – sedentary rats with supplementation; CRE + NAT – exercised rats with supplementation. The blood samples were obtained weekly before and after the maximum load test. Before the maximum load test, except for the group CRE-NAT (3-5 weeks), that presented lower level of plasma glucose concentration in relation to the other groups, all the other results were similar among the experimental groups. After the maximum load test, all of the experimental groups presented reduction of the plasma glucose concentration and increase of the plasma lactate concentration. However, in relation to the glucose, this reduction was significantly ($p < 0.05$) pronounced in the groups CRE (1-4 weeks) and CRE + NAT (1-8 weeks), and in relation to the lactate, the increase was significantly ($p < 0.05$) smaller in the groups CRE (1-2 weeks) and CRE + NAT (1-8 weeks). The findings of this study suggest that the adopted regime of supplementation influenced the metabolic glycemic profile, minimized the lactate accumulation and increased the maximum load supported in the animals supplemented.

RESUMEN

Influencia de la suplementación aguda y crónica de creatina sobre las concentraciones sanguíneas de glicosis y lactato en ratones Wistar

Estudios recientes sugieren que la suplementación de creatina puede interferir con la captación de glicosis y la producción de lactato durante la actividad física. El objetivo de este estudio ha sido el de investigar los efectos de la suplementación aguda (5g.kg^{-1} durante 1 semana) y crónica (1g.kg^{-1} durante 8 semanas) de creatina sobre las concentraciones sanguíneas de glicosis y lactato en ratones sedentarios y ejercitados (natación a 80% de carga máxima tolerada). Setenta y dos ratones Wistar machos ($240 \pm 10\text{g}$) fueron utilizados y divididos igualmente en 4 grupos experimentales ($n = 18$): CON – ratones sedentarios no suplementados; NAT – ratones ejercitados no suplementados; CRE – ratones sedentarios y suplementados; CRE + NAT – ratones ejercitados e suplementados. Las muestras sanguíneas se obtuvieron antes y después del test de determinación de carga máxima realizado semanalmente durante todo el experimento. Antes del test de carga máxima, con excepción del grupo CRE-NAT (3-5 semanas) que presentó concentraciones plasmáticas de glicosis inferiores en relación a los demás grupos, los demás resultados fueron semejantes entre los grupos experimentales. Después del test de carga máxima todos los grupos experimentales presentaron reducción en las concentraciones plasmáticas de glicosis y aumento en

* Universidade do Vale do Paraíba – Univap, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica. Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova – 12244-400 – São José dos Campos, SP.

1. Universidade de São Paulo – USP – Instituto de Ciências Biomédicas I. Recebido em 24/11/05. Versão final recebida em 9/6/06. Aceito em 11/6/06.

Endereço para correspondência: Renato Aparecido de Souza, Rua João Nunes de Oliveira Jr., 140 – FOCH – 37550-000 – Pouso Alegre, MG. E-mail: tatosouza2004@yahoo.com.br

las concentraciones plasmáticas de lactato. A pesar de esto, con respecto a la glicosis, esta reducción fue significativamente ($p < 0.05$) pronunciada en los grupos CRE (1-4 semanas) y CRE + NAT (1-8 semanas) y con respecto al lactato, el aumento fue significativamente ($p < 0.05$) menor en los grupos CRE (1-2 semanas) y CRE + NAT (1-8 semanas). Los resultados encontrados sugieren que el régimen adoptado de suplementación influyó el perfil metabólico glicémico, minimizó el acumulo de lactato y potenció la máxima carga suportada en los animales suplementados.

INTRODUÇÃO

A suplementação de creatina (Cr) tem sido amplamente adotada, especialmente por atletas, como estratégia nutricional que visa potencializar o rendimento físico⁽¹⁻²⁾. Os possíveis benefícios ergogênicos da suplementação de Cr estão relacionados ao seu papel bioquímico e fisiológico sobre a bioenergética do tecido muscular esquelético⁽³⁻⁴⁾. Diversos mecanismos foram propostos para demonstrar o envolvimento da suplementação de Cr com o desempenho físico melhorado⁽⁵⁾, dentre eles: aumento dos níveis de creatina fosfato (CP), servindo como tampão imediato do uso de adenosina trifosfato (ATP) durante o exercício; aumento dos níveis de Cr em repouso para aumentar a taxa de ressíntese da própria CP durante e após o exercício; redução da acidez muscular, uma vez que a CP atua consumindo um H^+ no processo de ressíntese de ATP; aumento da atividade da citrato sintase (CS), um marcador da capacidade oxidativa, potencializando exercícios aeróbicos; aumento da capacidade de treinamento; e aumento da massa muscular, por ser a Cr uma substância osmoticamente ativa.

O perfil metabólico e o estado energético das células musculares são alterados de acordo com mudanças no grau de atividade e na oferta de substratos energéticos que essas células apresentam. Alguns estudos revelam que a suplementação de Cr interfere com o metabolismo periférico da glicose⁽⁶⁻⁷⁾. Neste aspecto, são reportadas taxas aumentadas de secreção insulínica⁽⁸⁾, maior expressão de receptores GLUT-4⁽⁹⁾ e aumento na concentração intramuscular de glicogênio⁽¹⁰⁾, após a suplementação. Acredita-se que por seu efeito hipoglicemiante a suplementação de Cr poderia ser benéfica para o tratamento de pacientes com diabetes tipo II⁽⁸⁾.

Atualmente, o lactato sanguíneo é utilizado como importante verificador das condições bioenergéticas do músculo esquelético⁽¹¹⁻¹²⁾. Pelo fato de a suplementação de Cr incrementar o metabolismo anaeróbico alático através da obtenção de energia pelo sistema ATP-CP, o acúmulo de lactato responsável pelo fenômeno da fadiga muscular poderia ser retardado⁽¹³⁾. Esta característica poderia beneficiar exercícios de longa duração. No entanto, são escassas na literatura pesquisas a respeito dos efeitos da suplementação de Cr sobre marcadores bioquímicos em atividades físicas de longa duração. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho físico aeróbico e a resposta metabólica periférica de glicose e lactato de ratos submetidos à suplementação aguda e crônica de creatina.

MÉTODOS

Modelo experimental – Foram utilizados 72 ratos ($240 \pm 10g$) machos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos jovens (10-12 semanas de idade), obtidos da fazenda Bem-te-vi (Paulínia/SP). Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno no biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba com temperatura ($22-25^{\circ}C$), umidade relativa (40-60%) e fotoperíodo (ciclo de 12 horas claro-escuro) controlados. Além disto, todos os animais tiveram acesso à ração peletizada (*Labcil*®) e água *ad libitum*, ou seja, não houve restrição alimentar em nenhum momento do estudo.

O estudo teve duração de oito semanas e os animais foram divididos igualmente em quatro grupos experimentais ($n = 18$): sedentário (CON): ratos sedentários não suplementados; exercitado (NAT): ratos exercitados não suplementados. Creatina sedentário (CRE): ratos sedentários e suplementados; creatina exercitado (CRE + NAT): ratos exercitados e suplementados.

Todos os procedimentos adotados neste estudo estavam de acordo com os princípios de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo Cobeia (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UniVap (Protocolo nº L022-2005-CEP).

Protocolo de atividade física – Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação à natação (30 minutos diários sem carga, durante cinco dias consecutivos) para reduzir fatores ligados ao estresse promovido pela atividade do nado⁽¹¹⁾. Durante este período a creatina não foi administrada. Após a adaptação, os animais foram individualmente submetidos ao teste de carga máxima (TCM)⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. Foram colocadas células de carga, correspondendo a 0%, 1%, 2%, 3%, etc. da massa corporal total do animal até sua exaustão, atingindo a carga máxima tolerada. A exaustão foi determinada pela incapacidade de o animal manter-se abaixo da superfície da água por aproximadamente oito segundos⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. Este teste permitiu o ajuste da carga de trabalho para o treinamento físico a 80% da carga máxima.

O treinamento físico a 80% da carga máxima foi realizado em grupos de seis animais devido à promoção de exercício mais vigoroso quando comparado com o nado individual⁽¹¹⁾. Este treinamento ocorreu cinco vezes por semana com sessões diárias de 30 minutos e somente nos grupos experimentais NAT e CRE + NAT. Foram utilizados coletes contendo pesos de chumbo e posicionados junto ao tórax de cada animal de modo confortável^(11,14-15). Ao final de cada semana experimental, novo TCM foi realizado para possíveis reajustes da carga de treinamento. O protocolo de natação foi realizado em um tanque de amianto com capacidade para 250 litros de água, mantidos à temperatura de $35 \pm 2^{\circ}C$ ⁽¹⁴⁾.

Suplementação de creatina – A suplementação foi realizada por meio de uma sonda oro-esofágica (1mm de diâmetro; 3cm de comprimento) adaptada a uma seringa de 3ml, tendo a água como veículo de infusão. Este procedimento ocorreu diariamente após o período de adaptação ao nado duas horas antes do treinamento físico. Foi instituída durante a primeira semana do experimento (*loading phase*) a dose de 5g de Cr/kg de massa corporal do animal e, após a primeira semana (fase de manutenção), a dose de 1g de Cr/kg de massa corporal do animal para todos os animais suplementados (CRE e CRE + NAT)^(5,9,16).

Para facilitar a absorção do suplemento e minimizar qualquer risco de contaminação do produto foi utilizada creatina micronizada (*Integral Médica*®), grau padrão cromatográfico.

Análises de glicose e lactato – As amostras sanguíneas (~25µl) foram obtidas através de punção da extremidade caudal de cada animal e colocadas em tiras-teste para a quantificação de glicose (*Blood Glucose Sensor Electrode – Medisense*®) e lactato (*BM-Lactate*®). Em seguida estas tiras-teste contendo as amostras foram introduzidas imediatamente nos analisadores portáteis *Medi-Sense – Q.I.D. Precision*® e *Accutrend® Lactate* para determinação das concentrações de glicose e lactato, respectivamente. Este procedimento foi realizado antes e após os testes de carga máxima.

Análise estatística – Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) 4 x 4 para medidas repetidas entre os grupos experimentais nos diferentes períodos experimentais. O teste *post hoc* de Tukey, para comparações múltiplas, foi empregado para a identificação das diferenças específicas nas variáveis em que os valores de F encontrados foram superiores ao critério de significância estatística estabelecido ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Massa corporal total

Na figura 1 está representada a média da massa corporal total (g) dos animais ao final da primeira, quarta e oitava semanas. Após a primeira semana observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de massa corporal quando comparamos os grupos CRE-1 (294 ± 10) e CRE + NAT-1 (292 ± 13) versus os grupos CON-1 (273 ± 11) e NAT-1 (270 ± 12). Semelhante aumento foi obtido após a quarta semana ao compararmos os grupos CRE-4 (361 ± 13) e CRE + NAT-4 (352 ± 10) versus os grupos CON-4 (327 ± 12) e NAT-4 (330 ± 13). Novamente, ao final da oitava semana, observamos que a média da massa corporal dos animais nos grupos suplementados (CRE-8: 455 ± 13 e CRE + NAT-8: 440 ± 12) foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) em relação os grupos não suplementados (CON-8: 410 ± 12 e NAT-8: 402 ± 11).

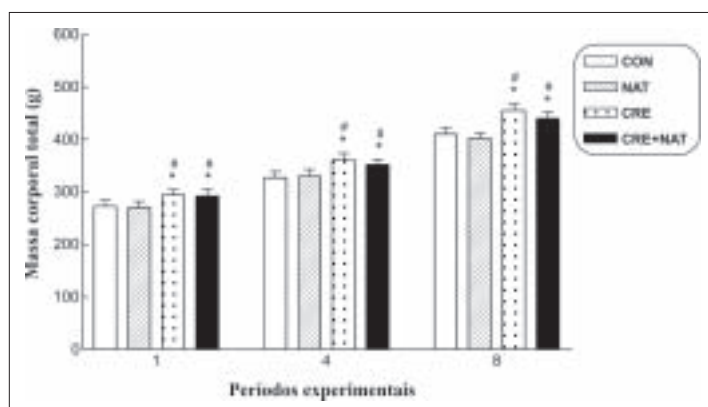


Figura 1 – Massa corporal total. Resultados expressos como média \pm desvio-padrão, $n = 18$ por grupo experimental, * $p < 0,05$ versus CON; # $p < 0,05$ versus NAT (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

Carga máxima tolerada

Como pode ser observado na tabela 1, o teste de carga máxima revelou que desde a primeira semana os animais do grupo CRE + NAT toleraram significativamente mais carga que os animais dos outros grupos experimentais. Embora os achados do grupo CRE sejam superiores aos dos grupos não suplementados (CON e NAT), estes valores não se mostraram significativamente diferentes ($p > 0,05$). Além disso, a partir da quinta semana, os animais do grupo NAT suportaram mais carga que os animais dos grupos CON e CRE.

TABELA 1
Carga máxima tolerada

	Grupos experimentais			
	CON	NAT	CRE	CRE + NAT
Após adaptação (g)	$10,5 \pm 2,1$	$10,3 \pm 1,9$	$10,8 \pm 2,6$	$10,2 \pm 1,5$
1ª semana (g)	$10,9 \pm 2,3$	$10,8 \pm 1,9$	$11,7 \pm 2,1$	$14,6 \pm 2,0^{\#}$
2ª semana (g)	$11,7 \pm 2,1$	$11,8 \pm 1,7$	$12,6 \pm 2,4$	$15,6 \pm 1,9^{\#}$
3ª semana (g)	$12,6 \pm 1,8$	$12,4 \pm 2,3$	$13,5 \pm 1,7$	$16,6 \pm 2,4^{\#}$
4ª semana (g)	$13,4 \pm 2,4$	$13,2 \pm 2,5$	$14,4 \pm 1,9$	$17,5 \pm 2,3^{\#}$
5ª semana (g)	$14,1 \pm 1,9$	$17,4 \pm 1,5$	$15,4 \pm 1,7$	$22,4 \pm 1,7^{\#}$
6ª semana (g)	$14,8 \pm 2,1$	$18,1 \pm 1,9^{\dagger}$	$16,3 \pm 2,3$	$23,7 \pm 1,9^{\#}$
7ª semana (g)	$15,8 \pm 2,2$	$22,9 \pm 1,7^*$	$17,3 \pm 1,6$	$29,0 \pm 2,1^{\#}$
8ª semana (g)	$16,4 \pm 1,9$	$24,1 \pm 2,1^*$	$18,2 \pm 1,9$	$35,2 \pm 2,4^{\#}$

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão, $n = 18$ por grupo experimental, * $p < 0,05$ versus CON, NAT e CRE; $^{\dagger} p < 0,05$ versus CON; * $p < 0,05$ versus CON e CRE (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

Glicose

A tabela 2 apresenta os valores médios das concentrações plasmáticas de glicose pré e após o teste de carga máxima. Antes do teste de carga máxima foi observada semelhança entre os resultados, com exceção do grupo CRE + NAT na terceira, quarta e quinta semanas. Contudo, todos os resultados encontrados nos animais do grupo CRE + NAT após o teste de carga máxima se mostraram diferentes significativamente dos grupos CON e NAT. Além disso, a partir da quinta semana experimental, os resultados do grupo CRE + NAT também foram estatisticamente superiores aos encontrados no grupo CRE.

TABELA 2
Glicose pré e pós-teste de carga máxima

	Grupos experimentais			
	CON	NAT	CRE	CRE + NAT
Após adaptação				
Glicose pré-teste (mg/dl)	93 ± 3	95 ± 5	91 ± 6	92 ± 4
Glicose pós-teste (mg/dl)	77 ± 4	79 ± 3	76 ± 3	80 ± 5
1ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	89 ± 3	89 ± 4	85 ± 2	85 ± 3
Glicose pós-teste (mg/dl)	77 ± 4	76 ± 2	$68 \pm 4^{\#}$	$67 \pm 5^{\#}$
2ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	88 ± 2	90 ± 5	89 ± 4	85 ± 3
Glicose pós-teste (mg/dl)	80 ± 4	82 ± 3	$73 \pm 5^{\#}$	$71 \pm 2^{\#}$
3ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	92 ± 3	91 ± 3	88 ± 3	$75 \pm 4^{\#}$
Glicose pós-teste (mg/dl)	90 ± 5	86 ± 4	$70 \pm 2^{\#}$	$68 \pm 3^{\#}$
4ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	95 ± 6	95 ± 4	90 ± 4	$80 \pm 2^{\#}$
Glicose pós-teste (mg/dl)	88 ± 3	86 ± 4	$74 \pm 5^{\#}$	$71 \pm 5^{\#}$
5ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	97 ± 4	93 ± 4	93 ± 3	$85 \pm 2^{\#}$
Glicose pós-teste (mg/dl)	85 ± 5	80 ± 3	79 ± 4	$68 \pm 6^{\#}$
6ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	94 ± 5	93 ± 6	89 ± 4	89 ± 5
Glicose pós-teste (mg/dl)	85 ± 3	79 ± 3	79 ± 4	$70 \pm 2^{\#}$
7ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	89 ± 3	90 ± 5	91 ± 4	89 ± 3
Glicose pós-teste (mg/dl)	82 ± 2	81 ± 3	80 ± 2	$72 \pm 2^{\#}$
8ª semana				
Glicose pré-teste (mg/dl)	92 ± 4	94 ± 3	92 ± 5	90 ± 3
Glicose pós-teste (mg/dl)	85 ± 3	90 ± 3	83 ± 4	$74 \pm 5^{\#}$

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão, $n = 18$ por grupo experimental, * $p < 0,05$ versus outros resultados da mesma linha (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

Já o grupo CRE apresentou valores diferentes ($p < 0,05$) em relação aos grupos não suplementados, apenas nas quatro primeiras semanas de estudo. Neste período, os valores obtidos pós-teste no grupo CRE foram semelhantes aos obtidos no grupo CRE + NAT.

Lactato

Na tabela 3 estão demonstrados os valores médios das concentrações plasmáticas de lactato, pré e após o teste de carga máxima. Foi observado que após as duas primeiras semanas experimentais, os grupos suplementados CRE e CRE + NAT apresentaram valores significativamente inferiores de lactato após o teste de carga máxima em relação aos grupos não suplementados. Após este período, os resultados encontrados nos animais do grupo CRE + NAT, após o teste de carga máxima, foram inferiores também em relação ao grupo CRE. Além disso, a partir da sexta semana, o grupo NAT apresentou, após o teste de carga máxima, resultados que diferiram significativamente dos resultados obtidos nos grupos CON e CRE.

TABELA 3
Lactato pré e pós-teste de carga máxima

	Grupos experimentais			
	CON	NAT	CRE	CRE + NAT
Após adaptação				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,5 ± 0,9	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,6
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,0 ± 0,5	7,9 ± 0,6	8,1 ± 0,5	8,2 ± 0,8
1ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,8 ± 0,9	2,6 ± 0,7	2,4 ± 0,9	2,6 ± 1,0
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,0 ± 0,8	8,2 ± 0,6	6,8 ± 0,8 [#]	6,4 ± 0,7 [#]
2ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,5 ± 0,8	2,4 ± 1,0	2,3 ± 0,7	2,0 ± 0,9
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,2 ± 0,9	8,1 ± 0,8	7,1 ± 0,6 [#]	6,8 ± 0,8 [#]
3ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,8 ± 0,9	3,1 ± 0,7	2,6 ± 0,9	2,1 ± 0,8
Lactato pós-teste (mmol/l)	7,7 ± 0,7	7,9 ± 0,8	7,3 ± 0,7	6,5 ± 1,0 [#]
4ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,5 ± 0,7	3,0 ± 0,6	2,6 ± 0,5	2,4 ± 0,7
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,5 ± 0,8	8,0 ± 0,9	7,9 ± 0,8	6,4 ± 0,7 [#]
5ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,7 ± 1,0	2,8 ± 0,7	2,5 ± 1,0	2,5 ± 0,6
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,3 ± 0,6	7,9 ± 0,8	8,3 ± 0,6	6,8 ± 0,9 [#]
6ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,7 ± 0,9	3,0 ± 0,7	2,6 ± 0,7	2,7 ± 0,9
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,5 ± 0,7	7,7 ± 0,9*	8,7 ± 0,6	6,3 ± 0,9 [#]
7ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	2,5 ± 0,8	2,7 ± 0,8	2,4 ± 0,6	2,7 ± 0,8
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,4 ± 0,9	7,0 ± 0,8*	8,3 ± 0,8	5,7 ± 1,0 [#]
8ª semana				
Lactato pré-teste (mmol/l)	3,1 ± 0,7	3,0 ± 0,7	2,8 ± 0,9	2,6 ± 0,6
Lactato pós-teste (mmol/l)	8,5 ± 0,7	6,9 ± 0,6*	8,4 ± 0,9	5,7 ± 1,0 [#]

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão, n = 18 por grupo experimental, [#] p < 0,05 versus outros resultados da mesma linha; * p < 0,05 versus CON e CRE (ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

DISCUSSÃO

Os estudos em humanos envolvendo a suplementação de Cr são usualmente divididos em duas fases: (1) fase inicial com a suplementação de doses elevadas de Cr (20 a 30g/dia) durante 5 a 7 dias (fase de carregamento), substituída logo em seguida, (2) pela fase de manutenção, com doses de Cr reduzidas a 1/5 da dose inicial (4 a 6g/dia), durante várias semanas⁽¹⁾. No entanto, como utilizamos ratos neste estudo e a taxa do metabolismo basal, conversão e assimilação de compostos orgânicos é bem mais intensa nestes animais, houve a necessidade de extrapolação das doses de Cr para a real atividade e necessidade metabólica da população estudada. A escolha do regime adotado para a dosagem da suplementação de Cr neste estudo foi feita a partir dos trabalhos realizados em ratos^(5,9,16). Estes estudos observaram que as doses de 5g e 1g de Cr por cada quilograma de massa corporal do animal promoveram efeitos ergogênicos associados a incrementos intramusculares de Cr, equivalentes aos encontrados em humanos nas fases de carregamento e de manutenção, respectivamente.

A literatura apresenta inúmeros trabalhos relacionados ao potencial efeito da Cr sobre o metabolismo anaeróbico, justamente pela característica bioenergética deste composto^(1-3,5). No entanto, poucos estudos discutem os efeitos da suplementação de Cr sobre a resistência metabólica aeróbica. Neste estudo, o interesse foi avaliar justamente o aspecto aeróbico, já que é pouco compreendido. Assim, a carga de trabalho para o treinamento físico foi ajustada individualmente a 80% da suportada durante o teste de carga máxima. Nesta faixa de treinamento, os animais realizariam uma atividade física predominantemente aeróbica⁽¹⁷⁾. Mudanças adaptativas associadas ao treinamento aeróbico podem ser ob-

servadas por alterações em dimensão e em número de mitocôndrias de células musculares, as quais favorecem a produção de ATP aerobicamente e beneficiam exercícios de longa duração⁽¹⁸⁾. Em nosso estudo, pela avaliação da carga máxima tolerada, observamos que mudanças significativas relacionadas ao treinamento (grupo NAT) aconteceram a partir da sexta semana experimental. Além disto, observamos que a suplementação de Cr associada à atividade física poderia beneficiar o desempenho aeróbico já a partir da primeira semana desta associação. Estes achados admitem a possibilidade de a Cr ser ergogênica também em atividades aeróbicas, como já relatado na literatura^(5,13). No entanto, parece haver a necessidade de interação da atividade física com a suplementação de Cr para ganhos mais efetivos no desempenho⁽¹⁻²⁾.

Em adição ao papel de tampão energético anaeróbico gerado pela suplementação de Cr, tem sido proposto que a Cr e a CP atuam como moléculas mensageiras entre as mitocôndrias e os sítios subcelulares de produção e hidrólise de ATP e desta forma possam auxiliar atividades aeróbicas⁽³⁻⁴⁾. No sítio mitocondrial, a ATP sintetizada entra no espaço intermembranoso mitocondrial, onde uma parte é utilizada pela Mi-CQ (creatina quinase mitocondrial) para a formação de ADP e CP. A ADP resultante está, então, favoravelmente situada para ser transportada por uma translocase ao interior da matriz mitocondrial na troca pela ATP da matriz. A CP formada, ao contrário da ADP, difunde-se até a banda M miofibrilar, onde serve localmente para repor ATP, tendo a MM-CQ (creatina quinase miofibrilar) como agente catalisador. A Cr resultante retorna ao espaço intermembranoso mitocondrial para continuar o ciclo⁽³⁻⁴⁾. O aumento do *pool* de Cr, gerado por sua suplementação, favoreceria a perpetuação deste ciclo de formação de ATP e explicaria o melhor rendimento e tolerância à carga nos animais suplementados.

Uma outra possível fundamentação para a suplementação de Cr em exercícios aeróbicos está relacionada com o auxílio da Cr em tamponar as elevações de ADP⁽¹⁹⁾. Relata-se que elevações consideráveis da ADP exercem um efeito inibitório sobre as ATPases celulares, resultando em redução no ciclo de acoplamento das pontes cruzadas dos filamentos musculares⁽¹⁹⁾. Nos sarcômeros em que grandes quantidades de ATP são hidrolisadas, a refoforilação imediata do ADP pela MM-CQ, quando da suplementação, mantém uma baixa concentração de ADP evitando a inativação de miosinas ATPases e não bloqueando a geração de ATP rapidamente^(3-4,19).

Com a ocorrência da hidrólise de ATP durante a contração muscular, são liberados prótons (H⁺). Tem-se sugerido que o aumento dos íons hidrogênio (e diminuição concomitante do pH) durante o exercício intenso contribui para a fadiga. A ressíntese de ATP pela CP acontece consumindo um H⁺. Conseqüentemente, aumentar a capacidade celular de refoforilar imediatamente o ADP e tamponar o H⁺ pode servir para incrementar o rendimento físico de longa duração. Novamente, a suplementação de Cr poderia contribuir neste processo⁽²⁰⁾.

Alguns autores observaram que a suplementação de Cr pode modificar a utilização e formação de substratos energéticos, como a glicose e o lactato, e possivelmente melhorar o desempenho físico durante exercícios prolongados que utilizem preferencialmente o metabolismo aeróbico^(1-2,5,20). Desconhecemos estudos que observem a utilização de glicose concomitantemente à geração de lactato durante atividade física de alta intensidade em populações suplementadas com creatina, um composto que interfere diretamente sobre o metabolismo energético muscular. Em um estudo recente, a influência da suplementação de Cr sobre o metabolismo da glicose e a formação de lactato foi caracterizada detalhadamente⁽²¹⁾. Foi observado que a suplementação de Cr incrementou a expressão do receptor de Cr (CT-1) e dos receptores da glicose (GLUT-4). Com isto, o conteúdo intramuscular de glicogênio e de Cr foi aumentado. Por um mecanismo ainda desconhecido as altas concentrações celulares de Cr e CP atenuaram a ativi-

dade da lactato desidrogenase (LDH), diminuindo a formação de lactato. Além disto, a glicose armazenada sob a forma de glicogênio foi utilizada preferencialmente via glicólise aeróbica (oxidação mitocondrial), haja vista que a atividade da citrato sintase (CS), um marcador da capacidade aeróbica, estava aumentada.

Em nosso estudo também observamos que a suplementação de Cr interferiu com a resposta periférica de glicose e lactato. No entanto, reconhecemos que podemos inferir somente sobre a ocorrência de alterações de formação de lactato e consumo de glicose sem concluirmos como de fato isto ocorreu. Com relação à glicose, observamos redução dos níveis plasmáticos deste nutriente após o teste de carga máxima em todos os grupos experimentais. A literatura reporta que durante atividade física de longa duração e alta intensidade a glicose plasmática contribui substancialmente como substrato energético e assim sua concentração sanguínea pode ser reduzida⁽²²⁾. No entanto, somente os animais do grupo CRE + NAT apresentaram significativas reduções da glicose plasmática após o teste de carga máxima durante todo o estudo. Atribuímos este achado ao fato de a suplementação de Cr poder estimular a secreção de insulina^(8,22) e aumentar a expressão de receptores GLUT-4^(9,22), ambos efeitos hipoglicemiantes. É interessante notar que os animais que foram apenas suplementados (CRE) apresentaram menores concentrações de glicose após o teste de carga máxima até a quarta semana de estudo. Tem sido proposto que a suplementação de Cr a longo prazo pode induzir o mecanismo de *down regulation* para os receptores CT-1 de Cr⁽²³⁾; isto poderia impedir o influxo adicional deste composto para as células musculares e explicar a ausência de redução significativa da glicose plasmática, a partir da quinta semana experimental. Por outro lado, a própria atividade física, fator não presente neste gru-

po (CRE), poderia estimular a expressão dos receptores GLUT-4 e contribuir para os efeitos hipoglicemiantes⁽²⁴⁾. No entanto, como o grupo NAT não apresentou alterações hipoglicêmicas, esta justificativa deve ser melhor compreendida através de estudos futuros que avaliem intensidade e frequência de atividade física diferentes, pois isoladamente não promoveu a queda nas concentrações de glicose após o teste de carga máxima.

O acúmulo de lactato sanguíneo tem sido descrito como um dos fatores responsáveis pelo fenômeno da fadiga muscular e, desta forma, limitador do rendimento físico de longa duração⁽²⁵⁾. Na análise das concentrações plasmáticas de lactato observamos que a suplementação de Cr associada ao exercício físico reduziu o acúmulo de lactato. A suplementação de Cr incrementa o sistema de obtenção de energia dos fosfagênios e diminui a necessidade da utilização de glicólise anaeróbica, a qual gera lactato⁽¹⁻³⁾. Além disto, como descrito anteriormente, parece haver uma inibição da LDH que desviaria a oxidação da glicose para o metabolismo aeróbico⁽²¹⁾. Este fato associado ao incremento do ciclo de renovação de ATP pelas mitocôndrias após a suplementação de Cr justifica uma menor utilização da glicólise anaeróbica e, como consequência, menor produção de lactato^(3,4).

Assim, concluímos que a suplementação de Cr associada ao exercício físico regular de longa duração e intensidade poderia (1) beneficiar o rendimento de atividades físicas predominantemente aeróbicas; (2) reduzir o acúmulo de lactato sanguíneo retardando o aparecimento da fadiga muscular e favorecendo a recuperação após o esforço físico.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

- Bemben MG, Lamont HS. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Med.* 2005;35:107-25.
- Kreider RB. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Mol Cell Biochem.* 2003;244:89-94.
- Greenhaff PL. The nutritional biochemistry of creatine. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 1997;11:610-8.
- Walker JB. Creatine: biosynthesis, regulation and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1979;50:177-242.
- Brannon TA, Adams GR, Gonniff CL, Baldwin KM. Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29:489-95.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BD, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci.* 2000;15:4389-97.
- Robinson TM, Sewell DA, Hultman E, Greenhaff PL. Role of submaximal exercise in promoting creatine and glycogen accumulation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1999;87:598-604.
- Gempel K, Brdizycska D, Kaddurah-Daouk R, Wallimann T, Kaufhold P, Gerbitz KD. The creatine analog cyclocreatine increases insulin secretion in INS-1 cells via K⁺ channel independent mechanism. *Diabetologia.* 1996;39:31-7.
- Op'T Eijnde B, Urso B, Richter EA, Greenhaff PL, Hespel P. Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT-4 protein content after immobilization. *Diabetes.* 2001;50:18-23.
- Young JC, Young RE. The effect of creatine supplementation on glucose uptake in rat skeletal muscle. *Life Sci.* 2002;71:1731-7.
- Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:1389-94.
- Brooks GA. Intra- and extracellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32:790-9.
- Stroud MA, Holliman D, Bell D, Green AL, Macdonald I, Greenhaff PL. 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 (Colch).* 1994;87:707-10.
- Osorio RA, Silveira VL, Maldjian S, Morales A, Christofani JS, Russo AK, et al. Swimming of pregnant rats at different water temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003;135:605-11.
- Osorio RA, Christofani JS, D'Almeida V, Russo AK, Picarro IC. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol.* 2003;135:89-95.
- Tarnopolsky MA, Bourgeois JM, Snow R, Keys S, Roy BD, Kwieceen JM, et al. Histological assessment of intermediate and long-term creatine monohydrate supplementation in mice and rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:762-9.
- Sampaio-Barros MM, Farias-Silva E, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. *Stress.* 2003;6:127-32.
- Bizeau ME, Willis WT, Hazel JR. Differential responses to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J Appl Physiol.* 1998;85:1279-84.
- McMillnen J, Donovan CM, Messer JI, Willis WT. Energetic driving forces are maintained in resting rat skeletal muscle after dietary creatine supplementation. *J Appl Physiol.* 2001;90:62-6.
- Vandenbergue K, Goris M, Van Hecke P, Van Leemputte M, Van Gerven L, Hespel P. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *J Appl Physiol.* 1997;83:2055-63.
- Ceddia RB, Sweeney G. Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *J Physiol.* 2004;555:409-21.
- Rooney K, Bryson J, Phuyal J, Denyer G, Caterson I, Thompson C. Creatine supplementation alters insulin secretion and glucose homeostasis in vivo. *Metabolism.* 2002;51:518-22.
- Guerrero-Ontiveros ML, Wallimann T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 1998;184:427-37.
- Kraniou GN, Cameron-Smith D, Hargreaves M. Effect of short-term training on GLUT-4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle. *Exp Physiol.* 2004;89:559-63.
- Khanna GL, Manna I. Supplementary effect of carbohydrate-electrolyte drink on sports performance, lactate removal & cardiovascular response of athletes. *Indian J Med Res.* 2005;121:665-9.

Apêndice B : Artigo publicado

Fitness & Performance Journal, v.7, n. 5, p. 332-337, 2008.

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE CREATINA SOBRE A GLICEMIA E CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO ATRAVÉS DE UM TESTE SUBMÁXIMO EM CICLOERGÔMETRO

Everton Rodrigues de Paula¹ rodrigueszoz@yahoo.com.br

Gabriela Loiola Camargo^{2,3} gabysloiola@bol.com.br

Renato Aparecido de Souza⁴ renato.souza@ufvjm.edu.br

doi:10.3900/fpj.7.5.332.p

Paula ER, Camargo GL, Souza RA. Influência da suplementação aguda de creatina sobre a glicemia e consumo máximo de oxigênio através de um teste submáximo em cicloergômetro. Fit Perf J. 2008 set-out;7(5):332-7.

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi verificar a influência da suplementação de creatina sobre a glicemia, consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) e massa corporal total após um teste submáximo em cicloergômetro. **Materiais e Métodos:** Participaram deste estudo 10 indivíduos saudáveis e fisicamente ativos. Inicialmente foi estimado o $VO_{2máx}$ (protocolo de Astrand & Ryhming em cicloergômetro) e quantificada a massa corporal total e a variabilidade glicêmica em situação pré-suplementação ($n=10$). Após esse procedimento, dois grupos foram aleatoriamente constituídos: um com indivíduos suplementados com creatina (Cr) durante 5 dias consecutivos; e outro com indivíduos que receberam substância placebo. Após o regime de suplementação os grupos foram novamente avaliados. Os resultados obtidos foram tratados pelo teste de análise de variância ANOVA (fator glicose x fator suplementação x fator $VO_{2máx}$ x fator massa corporal). **Resultados:** Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as situações experimentais (pré-suplementação, pós-suplementação com Cr e pós-suplementação com placebo) em todas as variáveis analisadas. **Discussão:** Concluiu-se que a suplementação aguda de Cr não interfere no aumento da massa corporal total, o $VO_{2máx}$ e a glicemia plasmática.

PALAVRAS-CHAVE

Creatina, Glicemia, Consumo de Oxigênio.

¹ Universidade do Vale do Sapucaí - Univas - Pouso Alegre - Brasil

² GANEP - Nutrição Humana - São Paulo - Brasil

³ Universidade Federal de Lavras - Lavras - Brasil

⁴ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM - Diamantina - Brasil

INFLUENCE OF ACUTE CREATINE SUPPLEMENTATION ON GLYCEMIA AND MAXIMUM OXYGEN CONSUMPTION THROUGH A SUBMAXIMAL CYCLOERGOMETER TEST

ABSTRACT

Introduction: The objective of this study was to evaluate the influence of creatine supplementation on blood glucose, maximum oxygen consumption (VO_{2max}) and total body mass after a submaximal cycloergometer test. **Materials and Methods:** Participated of this study 10 healthy and physically active subjects. Initially it was estimated the VO_{2max} (Astrand & Ryhming cycloergometer protocol) and quantified the total body mass and glucose variability situation in pre-supplementation ($n=10$). After this procedure, two groups were random formed: one group with individuals supplemented with creatine (Cr) and other group with individuals who received placebo substance. After the regime of supplementation the groups were re-evaluated. The results were processed by the analysis of variance (ANOVA) (glucose factor vs. factor supplementation vs. factor VO_{2max} vs. factor body mass). **Results:** There were no statistically significant differences between the situations experimental (pre-supplementation, post-Cr supplementation and post-supplementation with placebo) in all variables. **Discussion:** It was concluded that the acute Cr supplementation not interfere with increased total body mass, the VO_{2max} and plasma glucose.

KEYWORDS

Creatine, Blood Glucose, Oxygen Consumption.

INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN AGUDA DE CREATINA EN LA GLICEMIA Y CONSUMO MÁXIMO DE OXÍGENO A TRAVÉS DE UN SUBMAXIMAL PRUEBA EN CICLOERGÓMETRO

RESUMEN

Introducción: El objetivo de este estudio era evaluar la influencia de suplementación de creatina en glicemia, el consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) y el total de masa corporal después de una prueba en cicloergómetro. **Materiales y Métodos:** Participarán de este estudio 10 sujetos sanos y físicamente activos. Inicialmente se estimó el VO_{2max} (prueba de Astrand & Ryhming en cicloergómetro), y se cuantifica el total de masa corporal y la variabilidad de glucosa en situación previa a la suplementación ($n=10$). Después de este procedimiento, dos grupos se formaron al azar: un grupo con los individuos complementado con creatina (Cr) y otro grupo con los individuos que recibieron placebo sustancia. Después de que el régimen de la administración de suplementos de los grupos fueron re-evaluados. Los resultados fueron procesados por el análisis de varianza (ANOVA) (factor de glucosa vs. factor de suplementación vs. factor VO_{2max} vs. factor de masa corporal). **Resultados:** No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las situaciones experimentales (pre-suplementación, después de la administración de suplementos de creatina y después de la suplementación con placebo) en todas las variables. **Discusión:** Se concluyó que la adición de Cr aguda no interferir con el aumento de la masa corporal total, el VO_{2max} y glucosa en plasma.

PALABRAS-CLAVE

Creatina, Glucosa de la Sangre, Consumo de Oxígeno.

INTRODUÇÃO

A creatina (Cr) é uma amina nitrogenada que se encontra naturalmente nos alimentos de origem animal e pode ser sintetizada endogenamente a partir de certos aminoácidos. Nos seres humanos, o ciclo de síntese endógena tem início nos rins, através de uma reação que envolve dois aminoácidos: arginina e glicina. Essa operação catalisada pela enzima arginina-glicina amidinotransferase (AGAT) ocorre apenas nesse órgão. Posteriormente, a Cr completa sua síntese no fígado, pela adição de um grupo metil fornecido a partir do aminoácido metionina (S-adenosilmetionina), uma reação catalisada pela guanidinoacetato metiltransferase (GAMT)¹.

A Cr obtida pela alimentação e/ou sintetizada organicamente é então distribuída para os diversos tecidos do

organismo através do sangue². Cerca de 95% de toda Cr orgânica está armazenada na musculatura esquelética. Dessa quantidade, cerca de 60%-70% liga-se ao fosfato, formando a creatina fosfato (CP), enquanto os 30%-40% restantes permanecem como Cr livre. Os 5% restantes do total de Cr são encontrados em diferentes tecidos corpóreos, incluindo o coração, o cérebro, os pulmões, os testículos, o fígado e os rins³.

A creatina é uma substância fundamental para o adequado funcionamento dos componentes energéticos do metabolismo, especialmente aqueles relacionados com as fontes de obtenção de energia anaeróbica⁴. Dessa forma, a Cr é considerada a substância mais vendida no mundo como possível recurso ergogênico, especialmente por atletas que participam de atividades de alta intensidade

e curta duração⁵. Diversos mecanismos foram propostos para demonstrar o envolvimento da suplementação de Cr com o desempenho físico melhorado, dentre eles: (1) o aumento dos níveis de CP disponível em repouso, servindo como tampão imediato do uso de adenosina trifosfato (ATP) durante o exercício; (2) o aumento dos níveis de Cr em repouso para aumentar a taxa de ressíntese da própria CP, durante e após o exercício. Ou seja, a CP serve como um tampão temporário de energia durante os períodos de intensa atividade celular, quando o consumo de ATP excede sua síntese⁵.

De fato, durante décadas, as pesquisas buscavam exclusivamente compreender a interação da Cr com o desempenho físico humano⁶. Contudo, com a recente identificação, purificação e clonagem de diversas enzimas e receptores envolvidos no metabolismo da Cr, uma ampla variedade de investigações terapêuticas deste nutriente está sendo realizada⁷. Atualmente, tem sido discutida a utilização da Cr terapeuticamente em diversos distúrbios do metabolismo energético. Assim, pacientes com distrofia muscular, esclerose múltipla, doença de Huntington e até mesmo alguns cânceres poderiam ser beneficiados com aumento de força muscular frente à suplementação de Cr⁸.

Além dessas possibilidades terapêuticas, o metabolismo da glicose parece ser alterado com a suplementação de Cr^{4,9,10,11}. Nesse sentido, o principal distúrbio relacionado ao metabolismo da glicose, o diabetes *mellitus*, poderia ser beneficiado com estudos que melhor elucidassem a suplementação da Cr como possível estratégia de tratamento⁴. Recentes estudos têm demonstrado que a suplementação de Cr pode interferir com a homeostasia glicêmica ao facilitar a captação de glicose sanguínea pelo incremento da expressão do receptor CT-1 e dos receptores da glicose (GLUT-4)⁹ e ao aumentar o conteúdo de glicogênio muscular¹⁰. Além disso, a suplementação de Cr melhorou a tolerância à glicose em indivíduos saudáveis sem alterar a sensibilidade à insulina¹¹. Diante desse contexto, este trabalho objetivou verificar os efeitos da suplementação aguda de Cr (20g.dia⁻¹ durante 5 dias) sobre a glicemia e a aptidão cardiorrespiratória de indivíduos saudáveis e não-sedentários, durante um teste submáximo em cicloergômetro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação do estudo

Este estudo obedeceu às normas de realização de experimentos envolvendo seres humanos segundo a resolução específica do Conselho Nacional de Saúde (nº 196/96). Com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade do Vale do Sapucaí, conforme protocolo número 88/07.

Amostra

Este estudo obedeceu às normas de realização de experimentos envolvendo seres humanos segundo a resolução específica do Conselho Nacional de Saúde (nº. 196/96) e obteve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade do Vale do Sapucaí, conforme protocolo nº. 88/07.

Participaram deste estudo 10 indivíduos do sexo masculino com idade entre 19 anos e 39 anos, envolvidos em programas de treinamento resistido. Esses indivíduos foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: (01) Grupo Creatina (n=5) - indivíduos suplementados com Cr; e (02) Grupo Placebo (n=5) - indivíduos que receberam substância placebo. No entanto, a situação pré-suplementação também foi considerada como grupo experimental e foi composta por toda a amostra (n=10). Essa sistematização dos grupos ainda foi acompanhada por um desenvolvimento experimental do tipo duplo-cego, ou seja, nem os pesquisadores nem os voluntários teriam o conhecimento de quais substâncias seriam oferecidas até o encerramento do estudo.

O estudo aconteceu no Laboratório de Aptidão Física e Performance Humana (LAFIPE) pertencente ao curso Educação Física da Universidade do Vale do Sapucaí (Univas).

Crítérios experimentais

Os voluntários interessados em participar do estudo foram submetidos ao seguinte protocolo de triagem:

- Aplicação do Questionário PAR-Q¹²: Foram aceitos neste estudo somente os voluntários que responderam “não” em todas as questões desse questionário.
- Realização de Avaliação Antropométrica¹³: Foi avaliada a massa corporal total pela balança da marca Filizolla® e altura através de estadiômetro Filizolla®. Somente os voluntários que apresentaram valores com desvio padrão máximo de 5% para cada variável foram selecionados.
- Os voluntários deveriam estar incluídos a pelo menos seis meses em programas sistematizados de exercícios físicos comprovados pelo profissional de Educação Física envolvido na prescrição desses exercícios.

Esses critérios tiveram como objetivo homogeneizar a amostra a ser estudada e selecionar indivíduos não-sedentários e saudáveis para serem submetidos aos testes experimentais. Após essa triagem, os voluntários que se adequaram aos critérios experimentais (n=10) assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que, dentre outros aspectos, mostrou claramente que os mesmos não receberiam nenhum tipo de auxílio financeiro e que não seriam penalizados de forma alguma por desistência e/ou desobediência aos protocolos experimentais. A

Tabela 1 apresenta a rotina experimental adotada para este estudo após a seleção dos voluntários:

Avaliação glicêmica

A coleta sanguínea para obtenção das concentrações sanguíneas de glicose aconteceu sempre em cinco momentos distintos, em função do teste de esforço submáximo de estimativa do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx}}$): (1) pré-teste; (2) 5min após o teste; (3) 10min após o teste; (4) 20min após o teste; e (5) 30min após o teste. Foram obtidos, aproximadamente, 5mL de sangue proveniente do dedo indicador dos voluntários por lancetas descartáveis e estéreis. Logo em seguida essa amostra foi aplicada em fitas reativas para dosagem de glicose e analisada utilizando-se o equipamento *Optium*® (Abbott Diagnostic, Alameda, EUA)¹⁴.

Estimativa do $VO_{2\text{máx}}$

Para estimar o $VO_{2\text{máx}}$ foi utilizado o teste submáximo de Astrand & Ryhming¹². Nesse teste, o voluntário realizou uma sessão de exercício submáximo de 6min em cicloergômetro (Monark®). O trabalho no cicloergômetro foi de 150W com frequência de pedalagem de 50 rpm.

Suplementação de creatina

A suplementação de creatina (X-one®: Nutrition Technology, Napa Valley, CA, EUA) obedeceu ao seguinte regime de dosagem: 20g.dia⁻¹ durante cinco dias consecutivos. A suplementação do placebo obedeceu ao mesmo regime de dosagem. Os produtos

(creatina e placebo) foram devidamente colocados em 50 recipientes idênticos, contendo cada um a dose diária (cinco potes para cada voluntário, para cinco dias). É importante ressaltar que, com exceção do técnico do laboratório que manipulou e sorteou quais potes cada voluntário receberia, nem os voluntários nem os pesquisadores souberam qual substância foi administrada (creatina ou placebo) até a conclusão do estudo.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm desvio padrão e analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) (fator glicose x fator suplementação x fator $VO_{2\text{máx}}$ x fator massa corporal) (software *GraphPAD*). O nível mínimo de significância adotado no presente estudo foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

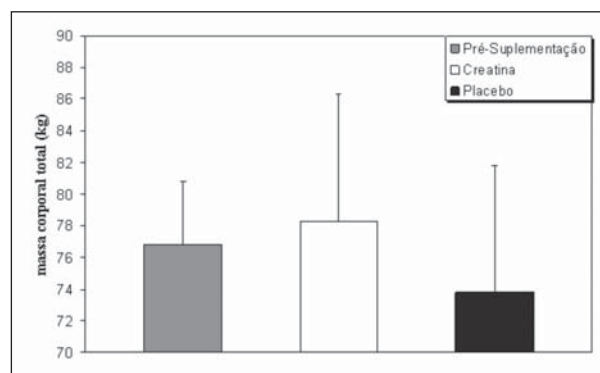
Análise da massa corporal total

A Figura 1 demonstra o comportamento da massa corporal total nas fases pré-suplementação e pós-suplementação de Cr e placebo. Embora a suplementação de Cr tenha promovido um aumento da massa corporal total ($78,3 \pm 5,85\text{kg}$) comparado com os valores encontrados na situação pré-suplementação ($76,82 \pm 5,93\text{kg}$) e placebo ($73,8 \pm 8,72\text{kg}$), esses valores não se revelaram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Rotina Experimental

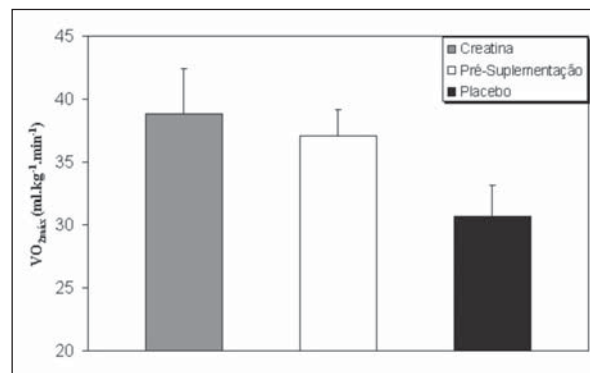
etapas	procedimentos
01	teste de estimativa do consumo máximo de oxigênio
02	avaliação glicêmica pós-teste de estimativa do consumo máximo de oxigênio
03	suplementação de creatina e/ou placebo após 24h da etapa 02
04	repetição das etapas 01 e 02 após 24h da etapa 03

Figura 1 - Massa corporal total



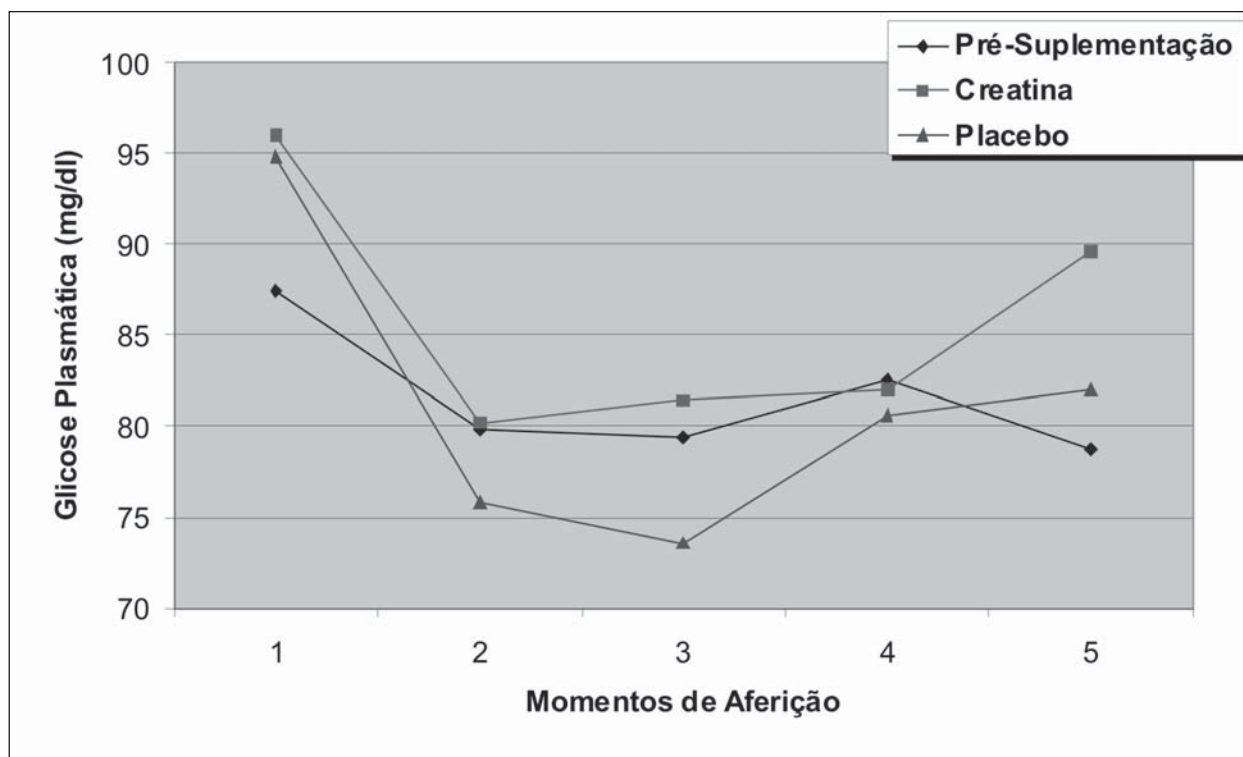
ANOVA: pré-suplementação vs. creatina vs. placebo; sem diferença estatística $p > 0,05$

Figura 2 - Consumo máximo de oxigênio



ANOVA: Pré-suplementação vs. creatina vs. placebo; sem diferença estatística $p > 0,05$

Figura 3 - Variabilidade glicêmica. momentos de aferição: (1): pré-teste de exaustão; (2): 5min após; (3): 10min após; (4): 20min após; (5): 30min após



ANOVA: pré-suplementação vs. creatina vs. placebo; sem diferença estatística $p > 0,05$

Análise do $VO_{2máx}$

A Figura 2 apresenta o comportamento do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) nas fases pré-suplementação ($37,12 \pm 4,5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e pós-suplementação de creatina ($38,86 \pm 8,67 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e placebo ($30,64 \pm 8,29 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Esses resultados mostraram-se sem diferença estatística ($p > 0,05$).

Análise dos momentos glicêmicos

A Figura 3 demonstra o comportamento dos momentos glicêmicos nas fases pré-suplementação e pós-suplementação de creatina e placebo. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) ao comparar os valores plasmáticos de glicose entre os grupos experimentais, em todos os momentos analisados. Contudo, conforme apresentado na Figura 3, o teste submáximo reduziu as concentrações de glicose plasmática e o período de recuperação elevou gradativamente essa mesma variável, especialmente nos indivíduos suplementados.

DISCUSSÃO

A suplementação de Cr afeta a homeostase da glicose e os níveis de insulina. Já foi demonstrado *in vitro* que a Cr afeta o metabolismo dos carboidratos ao estimular

diretamente a secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas^{15,16}. Esse fato foi comprovado *in vivo* em trabalho estudando a suplementação de creatina em ratos, para observar os efeitos no transporte e estoque de glicose no músculo esquelético em longo prazo, mostrando elevada secreção de insulina e alteração na homeostase da glicose após oito semanas de suplementação, quando comparados com os controles. Isso demonstrou que existe relação entre os efeitos da suplementação prolongada de creatina e sua atuação no metabolismo da glicose, com aumento da secreção pancreática de insulina concomitante com estado de hiperglicemia. Em estudo prévio⁴, observou-se que os valores glicêmicos sofreram alterações significativas sobre a aplicação de um teste de carga máxima de desempenho físico aquático. Esse achado foi atribuído ao fato de que a suplementação de Cr poderia estimular a secreção de insulina e aumentar a expressão de receptores GLUT-4, ambos efeitos hipoglicemiantes. Por outro lado, a hipersecreção de insulina não foi observada com o uso de 5g de Cr ou depois de três dias de suplementação de Cr em humanos¹⁷. Nesse estudo, a suplementação aguda não interferiu sobre os aspectos analisados: comportamento da glicemia, $VO_{2máx}$ e a massa corporal total em um teste submáximo no cicloergômetro.

Com relação à glicose, observou-se redução dos níveis plasmáticos deste nutriente após o teste de carga

máxima em todos os momentos experimentais e o período de recuperação elevou gradativamente essa mesma variável, especialmente nos indivíduos suplementados. A literatura reporta que durante atividade física de alta intensidade a glicose plasmática contribui substancialmente como substrato energético, e assim sua concentração sanguínea pode ser reduzida⁴. É interessante notar que, mesmo que essa diferença não tenha sido significativamente evidente, o grupo suplementado com Cr teve uma queda da glicemia inferior ao grupo placebo em todos os momentos de aferição (Figura 3). Além disso, a recuperação da glicemia foi levemente superior na fase pós-suplementação com Cr se comparada na fase pré-suplementação e pós-suplementação placebo (Figura 3). Esses dados sugerem que a recuperação da glicemia poderia tornar-se mais rápida, favorecendo o início de uma outra atividade física futura.

A suplementação de Cr poderia significar uma vantagem para alguns atletas. O fato de este composto poder aumentar o peso corporal tem sido considerado². No entanto, embora a massa corporal tenha sido superior nos indivíduos que fizeram o uso da Cr, essa diferença não foi significativa. Tal fato poderia ser justificado especialmente pelo fato de que a amostra estudada era fisicamente ativa (média de oito meses de treinamento), o que dificulta ganhos musculares adicionais. Além disso, cinco dias provavelmente não são suficientes para promover qualquer ganho de massa corporal.

Embora a Cr não seja considerada como uma fonte energética primária durante os exercícios submáximos, tem sido relatada uma relação inversa entre a intensidade do exercício e o nível de CP nos músculos exercitados. Em indivíduos submetidos a exercícios de bicicleta em uma intensidade entre 60% e 70% do $\dot{V}O_{2\text{máx}}$ durante 80min, demonstrou-se uma diminuição dos níveis de CP para aproximadamente 40% dos valores iniciais². Assim, parece que estas quantidades diminuem até mesmo durante o exercício submáximo, mas os estoques musculares não são consumidos no mesmo grau como em um exercício de alta intensidade. Foi feita a hipótese de que, com a suplementação de Cr, os indivíduos suportariam melhor o teste submáximo no cicloergômetro e aumentariam seu $\dot{V}O_{2\text{máx}}$. No entanto, a suplementação aguda não afetou dessa forma o comportamento do $\dot{V}O_{2\text{máx}}$ na amostra estudada.

Mesmo que as respostas encontradas nesse estudo não tenham sido positivas em relação às hipóteses propostas pela pesquisa, é imprescindível que novas discussões sejam apresentadas sobre esse assunto, em decorrência de sua importância, tanto na área esportiva como no controle patológico. Nesse caso, torna-se necessário especialmente a observação dos efeitos da suplementação crônica de Cr.

Nesse sentido e de acordo com as condições experimentais adotadas neste estudo, conclui-se que a suplementação aguda de Cr não interfere no aumento da massa corporal total, do $\dot{V}O_{2\text{máx}}$ e da glicemia plasmática. Porém, é importante ressaltar que o comportamento da glicemia em relação à reposição dos estoques plasmáticos melhorou sua recuperação com a suplementação de Cr, logo após o teste submáximo no cicloergômetro.

REFERÊNCIAS

1. Persky AM, Brazeau GA. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):161-76.
2. Peralta J, Amancio OMS. A creatina como suplemento ergogênico para atletas. *Rev Nutr.* 2002;15(1):83-93.
3. Ipsiroglu SO, Stromberger C, Ilas J, Höger H, Mühl, A, Ipsiroglu-Stockler S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. *Life Sci.* 2001;69(15):1805-15.
4. Souza RA, Santos RM, Osório RAL, Cogo JC, Prianti-Júnior ACG, Martins RABL, *et al.* Influência da suplementação aguda e crônica de creatina sobre as concentrações sanguíneas de glicose e lactato de ratos Wistar. *Rev Bras Med Esporte.* 2006;12(6):361-5.
5. Bembem MG, Lamont HS. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Med.* 2005;35(2):107-25.
6. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1107-213.
7. Guerrero-Ontiveros ML, Wallimann T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 1998;184(1-2):427-37.
8. Pearlman JP, Fielding PA. Creatine monohydrate as a therapeutic aid in muscular dystrophy. *Nutr Rev.* 2006;64:80-8.
9. Ceddia RB, Sweeney G. Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *J. Physiol.* 2004;555(2):409-21.
10. Op't Eijnde B, Jijakli H, Hespel P, Malaisse WJ. Creatine supplementation increases soleus muscle content and lowers the insulinogenic index in a animal model of inherited type 2 diabetes. *Int J Mol Med.* 2006;17(6):1077-84.
11. Gualano B, Novae RB, Artioli GC, Freire TO, Coelho DF, Scagliusi FB, *et al.* Effects of creatine supplementation on glucose tolerance and insulin sensitivity in sedentary healthy males undergoing aerobic training. *Amino Acids.* 2008;34(2):245-50.
12. American College of Sports Medicine. Manual do ACSM para avaliação da aptidão física relacionada à saúde. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
13. Costa RF. Composição corporal: teoria e prática da avaliação. São Paulo: Manole; 2001.
14. Sales RP, Mine CEC, Franco AD. Efeitos da suplementação aguda de aspartato de arginina na fadiga muscular em voluntários treinados. *Rev Bras Med Esporte.* 2005;11(6):347-51.
15. Alsever RN, Georg RH, Sussman KE. Stimulation of insulin secretion by guanidinoacetic acid and other guanidine derivatives. *Endocrinology.* 1970;86(2):332-6.
16. Marco J, Calle C, Hedo JA, Villanueva ML. Glucagon-releasing activity of guanidine compounds in mouse pancreatic islets. *FEBS Lett.* 1976;64(1):52-4.
17. Green AL, Simpson EJ, Littlewood JJ, Macdonald IA, Greenhaff PL. Carbohydrate ingestion augments creatine retention during creatine feeding humans. *Acta Physiol Scand.* 1996;158:195-202.

Recebido: 25/07/2008 – Aceito: 08/10/2008

Influência da suplementação de creatina sobre a massa muscular de ratos

Renato Aparecido de Souza¹, Humberto Miranda¹, Rodrigo Alexis Lazo Osorio¹,
Belmiro Salles², Roberto Simão³, Wellington Ribeiro¹

¹Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D) - Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP – São José dos Campos/SP, Brasil.

²Laboratório de Pesquisa em Microcirculação (Departamento de Ciências Fisiológicas), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

³Escola de Educação Física e Desportos – Universidade Federal do Rio de Janeiro (EEFD/UFRJ), Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

Endereço para correspondência:

Renato Aparecido de Souza. Rua João Nunes de Oliveira Jr., 140. FOCH. Pouso Alegre/MG, Brasil. e-mail: tatosouza2004@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação aguda (5g kg^{-1} durante 1 semana) e crônica (1g kg^{-1} durante 8 semanas) de creatina sobre a adaptação ponderal de músculos tibial anterior e sóleo de ratos sedentários e exercitados (natação a 80% da carga máxima tolerada). 72 ratos Wistar machos ($250 \pm 11\text{g}$) foram divididos em 4 grupos: ratos sedentários não suplementados (CON; $n = 18$); ratos exercitados não suplementados (NAT; $n = 18$); ratos sedentários e suplementados (CRE; $n = 18$); ratos exercitados e suplementados (CRE+NAT; $n = 18$). Ao final da primeira, quarta e oitava semanas seis animais de cada grupo foram sacrificados. Foram obtidos os seguintes resultados ($p < 0.05$): maior média de massa absoluta do músculo tibial anterior no CRE e CRE+NAT; maior média de massa absoluta e relativa do músculo sóleo no CRE+NAT em relação aos demais grupos após quatro e oito semanas. Estes achados sugerem que a suplementação de creatina ocasiona adaptações ponderais positivas no

tecido muscular esquelético de ratos independentemente da realização do exercício físico.

Descritores: suplementação de creatina, músculo esquelético, ratos

Determination of sucrose concentration in lemon-type soft drinks by dispersive Raman spectroscopy

Landulfo Silveira Jr., Leonardo Marmo Moreira *, Viviane G.B. Conceição,
Heliodora L. Casalechi, Ingrid S. Muñoz, Fabiano Fernandes da Silva,
Marcos Augusto S.R. Silva, Renato Aparecido de Souza and Marcos Tadeu T. Pacheco
Group of Biomedical Engineering, Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO, São Paulo, SP, Brazil

Abstract. The objective of this study was to quantify the sucrose amount in commercial lemon-type soft drinks through dispersive Raman spectroscopy, comparing the amount listed in the nutritional table of each product to the predicted by a least-square model, in order to obtain a method for quality assurance applied to soft drinks. A dispersive Raman spectrometer was employed using 830 nm laser and imaging spectrograph coupled to a CCD camera, and a total of 48 samples from four brands of lemon-type soft drinks were analyzed. A calibration curve using sucrose from refined sugar (sugarcane) diluted in spring water was elaborated in the range between 0 and 15.0 g/100 ml, and a quantification model based on Partial Least Squares (PLS) regression was developed to correlate the Raman spectra and the amount of sucrose in each dilution. Then, the sucrose in each soft drink sample was predicted employing the calibration curve. The mean error of calibration for the PLS method was 0.30 g/100 ml (3.0%). Results indicated that soft drinks samples have predicted sugar content ranging from 8.1 to 10.9 g/100 ml, with an error of the predicted value compared to the nutritional table ranged from 1.1% to 5.5%. Therefore, Raman spectroscopy in association with PLS regression was an effective method for quantifying the sucrose, with small prediction error. Thus, the present work allows to infer auspicious possibilities of Raman spectroscopy application in the quantification of relevant nutritional facts in beverages.

Keywords: Sucrose quantification, soft drinks, industrialized food, Raman spectroscopy, PLS

1. Introduction

The lemon-type soft drink was introduced in the Brazilian market in 1912. Since then, several similar products were available to the consumer because of the success of lemon-flavor in the soft drink segment. Basic ingredients found in this type of drink are artificially gasified filtered or spring water, sucrose, natural lemon juice (2.5% on average), natural flavored, acidifier and conservator [1]. Accordingly to the manufacturers, these soft drinks do not contain significant amounts of protein, fat, dietary fiber or other vitamins or minerals.

The sucrose is the common type of sugar used as sweetener for soft drinks and is a basic conservant for most industrialized non-dietetic foods. It comes mainly from sugarcane that may contain from

*Corresponding author: Leonardo Marmo Moreira, Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO, Núcleo do Parque Tecnológico de São José dos Campos, Rod. Pres. Dutra, km 138, São José dos Campos, SP 12247-004, Brazil. Tel.: +55 12 3905 4648, ext. 209; E-mail: leonardomarmo@gmail.com.

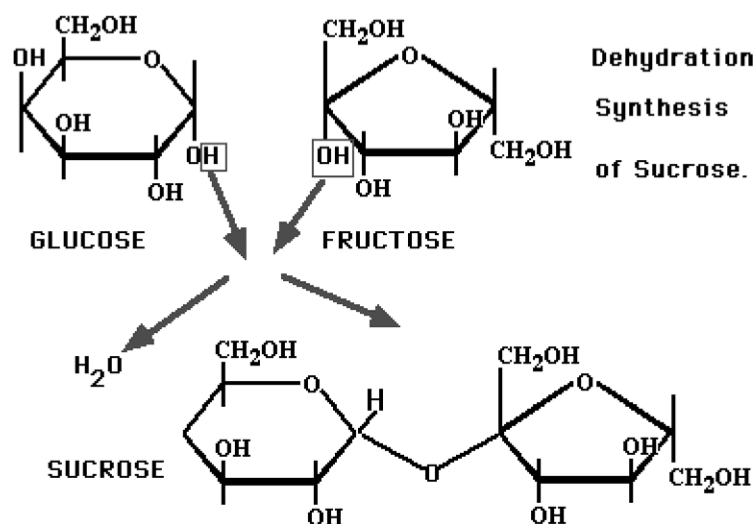


Fig. 1. Diagram showing the synthesis of sucrose from glucose and fructose, and their respective chemical structures.

14% to 24% v/v of sucrose. Structurally, the sucrose is a disaccharide constituted by the union of the monosaccharides glucose and fructose, connected through their anomeric carbons. Figure 1 shows the chemical structures of glucose, fructose and sucrose. In Brazil, the commercial sugar is commonly available in a refined form (containing, at least, 98% of sucrose) or in crystals (containing, at least, 99% of sucrose) [2].

Sugar is largely employed in industrialized food in order to control the acidification during food processing, aiming to conserve and to change the acid taste of natural foods as milk and fruits [3]. The addition of excessive quantity of sugar transforms the food in a calorie bomb with eventual pathogenic effect [4]. The increase in the consumption of calories from carbohydrates has been positively correlated with the alarming rise of the “metabolic syndrome” [4,5]. Simple carbohydrates influence the glycemic index (GI). The high GI stimulates lipogenesis, resulting in an increased size of adipocytes, while diets with low GI inhibit this response [6]. Recently, it was shown that the overload of fructose in the diet of male mice during two months, despite of no induced changes in blood glucose and insulin baseline, resulted in impaired glucose tolerance [7]. With the regular, non-diet/light soft drinks, this biochemical phenomenon is not different as function of the high amount of sugar added and its highly consumed by general population [3,8] and dangerously by the ingestion in childhood and adolescent, which could cause increased obesity risk in adulthood [9]. It was also demonstrated that highest concentration of carbohydrates in the diet, especially in its simplest form, constitutes a substantial risk factor for the development of obesity and diabetes [8].

According to data from Brazilian Ministry of Health, there was a considerable increase in the consumption per capita of soft drinks (400%) in 2000, when compared to the consumption in 1970 [10]. This fact shows the trends in changing eating habits, which is associated to a significant substitution of natural food by industrialized one (“fast food”), which is rich in sugar and fat [11].

The determination of sucrose content is a routine activity in the soft drink industry, which uses relatively laborious techniques. Conventional methods, such as gravimetric, titulometric and spectrophotometric techniques, together with the HPLC with refraction index detector have been widely employed in industries [12]. It is interesting to note that the called classic methods, such as gravimetric and titulometric methodologies, are still applied in spite of the tedious character of these procedures. Furthermore,

these methods require great quantity of reagents, implying that, in a determined interval of time, these analytical procedures represent a very higher cost to the factories as compared with some spectroscopic alternatives, which are less time consuming [13].

Several authors proposed optical techniques such as Raman spectroscopy for quality control [14–17]. Raman spectroscopy is a light-scattering phenomenon in which a laser photon of well-defined energy is scattered by a molecule or crystal. Usually, this scattering is mediated by vibrational transitions done by bonded atoms [18,19]. Raman technique presents advantages over classical approaches due to the fact that little or no sample preparation is needed, one could perform a non destructive analysis of samples, rapidness in collecting a Raman spectrum, and results can be obtained in real time and the potential for the identification of molecular groups present in the sample spectrum [19]. By analyzing the spectral information obtained through Raman spectroscopy, several aspects related to the physico-chemical properties of the samples can be evaluated like, for example, the chemical structure characterization [19] and thermal stability of bonds [20], among others. Raman spectroscopy can also propitiate quantitative determinations of the chemical components of the sample, depending of the characteristics of its compounds [14,15]. In fact, Raman spectroscopy could provide a “fingerprint” of a specific substance, favoring the analysis of this respective compound presented in several kinds of samples [19].

In this way, Raman spectroscopy could become a standard technique for food quality control, identifying the Raman bands of selected compounds of nutritional interest for the consumers. This analysis would be fast and precise, optimizing evaluations focused on the determination of food nutritional content [14,21,22]. In fact, with appropriate excitation wavelength (infrared, 785 and 830 nm) and post-processing routines, the emitted intrinsic fluorescence from organic samples could be minimized and the Raman bands evidenced with high signal to noise ratio [19].

Up to date, Raman spectroscopy has been applied in the determination of concentration of commercially available medicines, aiming identification and quantification of active ingredients [17,23,24], identification of biochemicals presented in biological samples [20,25], quality control in edible oils [26,27] and honey [13] among others. These procedures could be done in a noninvasive way, with minimal or no sample preparation and in real time, being that the use of dispersive Raman spectroscopy with near-infrared excitation in the soft drink quality control could bring easiness of identifying the sweetener added in the products, as well as its precise quantification [18,28].

In this context, Raman spectroscopy has been used for *in situ* differentiation between sucrose and lactose as well as analyzing the amorphous and crystalline phases of sucrose [18]. Furthermore, this tool has been employed to the identification and quantification of sugars in various foods and drinks, such as chewing gums, yogurts, soft drinks and honey [3,28–30].

Water is an ideal solvent for Raman spectroscopy. Indeed, Raman spectroscopy constitutes a vibrational technique that presents a weak water scattering due to the Raman selection rules, causing no significant interference in the spectrum in the fingerprint ($400\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) range [19]. As consequence, measurements in aqueous environments become more attractive, which is very interesting for identification of diseases in biological samples [19,25,31] and quality control in beverages [32].

Quantitative information could be obtained from the whole Raman spectra by applying chemometrics or multivariate calibration. For systems where the light scattering vary linearly with concentration, and a few variables are responsible for the spectral variations, Partial Least Squares (PLS) is most frequently used [33–35]. PLS algorithm is based on Principal Component Analysis (PCA), which extracts the most important variables from the dataset, correlating these variables with the concentration of first principal components, which represent the largest variations in the sample spectra [33]. PLS has been employed in quantitative analysis of Raman spectra of cereal-based foods [21], calculating the total dietary fiber,

fat, protein, and sugar and of alcoholic beverages [32], calculating the amount of ethanol, in this case presenting better results than classical techniques (gas chromatography). Thus, quality control could be achieved by collecting the Raman spectra at line and developing a quantitative calibration curve by using a multivariate technique.

The objective of this study is to evaluate the feasibility of dispersive Raman spectroscopy to calculate the sucrose content in 48 samples of four brands of commercial lemon-type soft drinks. Firstly, it was developed a calibration curve with different amounts of sucrose diluted in spring water employing the multivariate regression PLS technique. Furthermore, the PLS is applied to the Raman spectra of soft drinks samples in order to correlate the diluted sucrose with the amount of carbohydrate listed in the nutrition table label of products. It is shown the potential of near-infrared, dispersive Raman spectroscopy applied to the quality assurance in the soft drink industry.

2. Material and methods

The lemon-type soft drink was chosen due to absence of dyes, which could provoke to strong fluorescence and cover the Raman bands from sucrose and reduces the light absorption.

In order to develop a calibration curve aiming the quantification of sugar added to lemon-type soft drinks, it was prepared a sequence of seriate dilutions of refined sugar from sugarcane (brand: União) in spring water (brand: Minalba) with a semi-analytical balance (Gehaka® Model BG-400). A total of 15 dilutions, from 1.0 to 15.0 g/100 ml, were prepared, covering the range of sucrose presented in most lemon-type soft drinks (about 10.0 g/100 ml). Each sucrose solution was prepared as follows: sugar was weighed in the semi-analytical balance and transferred to a volumetric flask of 100 ml, completed with the water to the exact volume and homogenized. It was not necessary to heat the solutions, due to the high solubility of sucrose in water [36].

A total of 48 samples from four brands of lemon-type soft drinks were bought in local markets (12 cans of each brand) with different manufacturing date, being that the amount of carbohydrate (sucrose) presented at the nutritional table of each product was recorded. Then, the prepared solutions of sucrose as well as the soft drinks samples were placed in a 1 mm thickness, 3 ml volume quartz cuvette due to low fluorescence background provided for such material and underwent dispersive Raman spectroscopy, using a Raman spectrometer (Fig. 2). The Raman spectrometer is composed of a semiconductor laser diode (Micro Laser Systems Inc., Model L4830S, CA, USA), with output power of about 100 mW and wavelength of 830 nm for sample excitation. The laser beam was directed to the sample with the aid of a prism and the beam was focused onto the sample using a lens ($f = 26$ mm). The scattered signal from the sample was coupled to the spectrograph (Chromex, Model 250IS, MA, USA) by a set of lenses ($f = 100$ mm). The spectrograph has a notch filter at 830 nm in the entrance slit (Spectral Iridian Technologies, model PN – ZX 000080, ON, Canada) to reject the scattered light from the laser. The spectral resolution was approximately 8 cm^{-1} using a slit of about $150\text{ }\mu\text{m}$ [37]. The signal dispersed by the spectrograph was detected by a 1024×256 , N_2 cooled CCD camera (Princeton Instruments, model LN/CCD-1024-EHR1, NJ, USA), connected to a controller (Princeton Instruments, model ST130, NJ, USA) and a PC for the acquisition and storage of spectra. The spectral collection time was set to 50 s and the experiment was done at the same experimental conditions.

The procedures for calibration and pre-processing of all spectra were performed as follows. For the calibration of the Raman wavenumber, the known Raman peaks of naphthalene were identified and correlated by a third-order polynomial with each pixel peak position. In order to remove the fluorescence

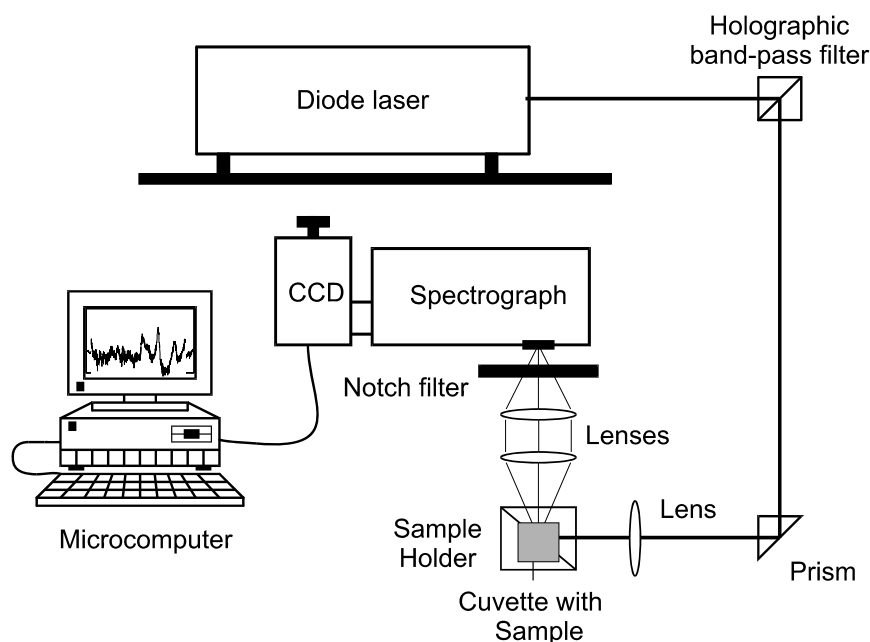


Fig. 2. Schematic diagram of dispersive Raman spectrometer. Laser power: 100 mW, wavelength: 830 nm, resolution: 8 cm^{-1} .

background, a third-order polynomial equation was applied in the intensities of each spectrum and then subtracted from gross spectrum, remaining the high frequency Raman bands. This procedure is a relevant pre-requisite to the development of the analyses, since organic samples present fluorescence, even with near-infrared excitation. The calibration and background removal was done using a lab-made routine under Matlab 4.2.

With the previous knowledge of the solutions concentrations and the correspondent Raman spectra, a multivariate calibration model was established using the PLS. The Raman spectra were considered as independent variables, while the concentrations were analyzed as dependent variables. For developing the PLS calibration model, the function *pls* (Matlab 4.2 PLS toolbox) was applied, considering the first two latent variables, since the first latent variable in the PLS method is the mean spectrum, and there are only a few variables (the sucrose) that account for differences in the samples solutions. Details of the PLS calibration model can be found elsewhere [34,35].

Using the same spectra of the calibration model, the PLS predicted the concentrations of the calibration dataset, which were obtained through the Matlab function *plspred*. Then, it was plotted the concentration predicted by PLS versus the values of known concentrations and it was calculated the standard error of calibration (SEC), or the model ability to predict the concentrations. The model was then applied to the spectra of soft drinks, using the known spectra and concentrations of sucrose in water, and the predicted concentrations were correlated to the amount found in the nutritional table.

3. Results and discussion

Figure 3 shows the spectrum of sucrose solution in spring water with concentration of 15.0 g/100 ml. The spectrum presents its principal bands at 824, 1052, 1119 and 1445 cm^{-1} , which have been reported

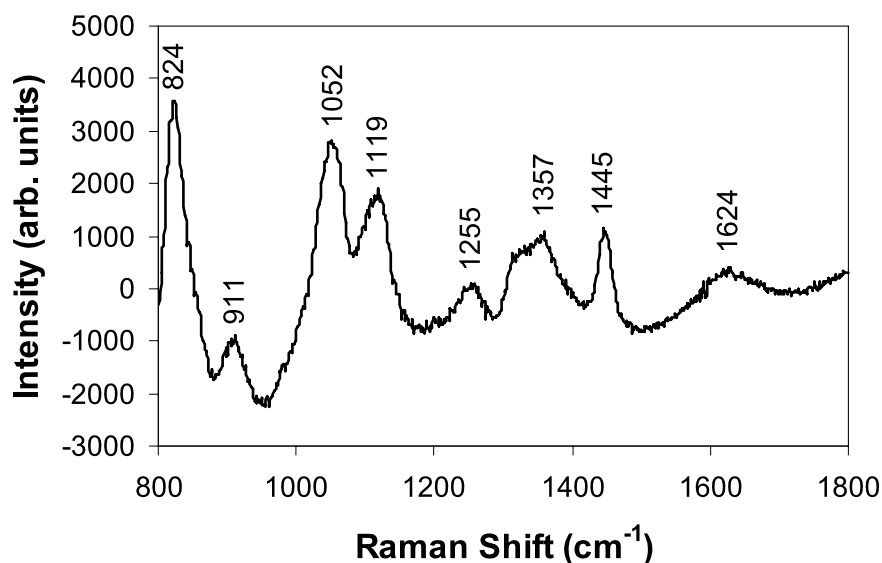


Fig. 3. Dispersive Raman spectrum of sucrose solution obtained from solubilization of refined sugar in water with concentration of 15.0 g/100 ml. Laser power: 100 mW, excitation wavelength: 830 nm, resolution: 8 cm^{-1} .

Table 1
Raman bands and vibrational group assignment for sucrose molecule

Band (cm^{-1})	Group	Band assignment
824	1,3,5 tri substituted benzene	CH out-of-plane deformation
911	CH=CH ₂	CH ₂ out-of-plane wagging
1052	CH ₂ -O-H	C-O stretching
1119	C-O-H	C-O stretching
1255	C-O-C	C-O-C antisymmetric stretching
1445	CH ₂	CH ₂ scissoring vibration

in the literature [3,18]. Table 1 presents the Raman bands identified in the spectra and the respective functional groups associated to these peaks, which have been assigned to several vibrational modes of the sucrose molecule. Raman bands of diluted sucrose samples were found in the same positions as the highly concentrated ones, despite the lower intensities as function of the respective concentrations (not shown). Since Raman scattering spectrum shows bands related to the vibrational frequencies of each bond in the sucrose molecule, there is a correlation between the intensity of each band and the final sample concentration. Therefore, a correlation between the concentration and the Raman intensity can be performed with significant precision. The Raman band at 1624 cm^{-1} can be attributed to the quartz cuvette used to hold the solutions [38].

Figure 4 presents the mean Raman spectra of four brands of lemon-type soft drinks. It was found a similarity between the spectra of all brands. The main Raman bands that appear in the spectra are characteristic peaks of sucrose, indicating the use of the same sweetener for all samples, with a small difference in the overall Raman bands intensities, evidencing a small difference in the quantity of sucrose of each brand.

By comparing the spectra of sucrose and the soft drinks, one observes that the sucrose is the main Raman scatterer, while other ingredients, such as the acidifier, the natural juice and the natural flavor

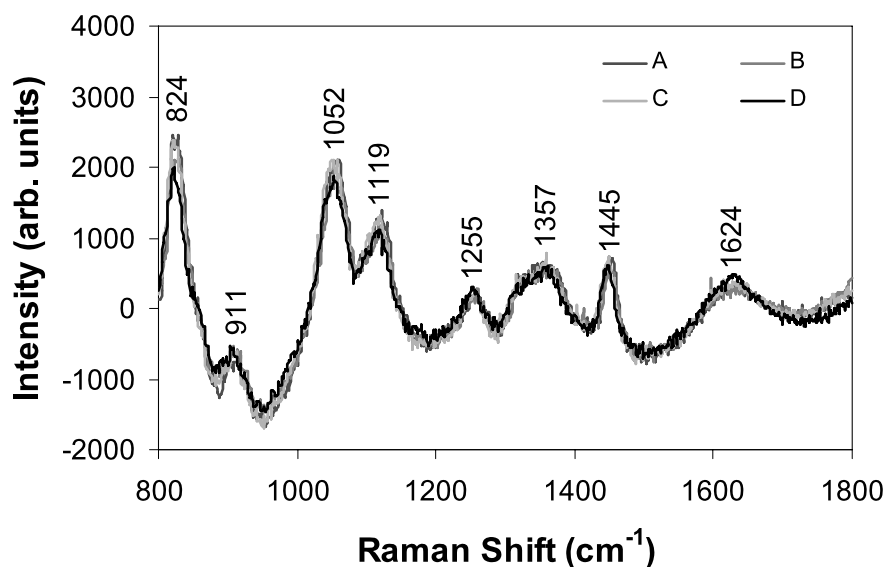


Fig. 4. Mean Raman spectra of lemon-type soft drinks from four different brands (mean calculated using 12 samples of each brand). Laser power: 100 mW, excitation wavelength: 830 nm, resolution: 8 cm^{-1} .

that are present in the soft drink do not show an important Raman scattering. According to the British Pharmacopoeia, the intensity of Raman bands is directly proportional to the concentration of the components that are responsible by the sample scattering, implying that the spectral peak can be used to quantify the main ingredients [36].

In these experiments, it was used the PLS as a multivariate method for concentration prediction. Multivariate methods have demonstrated substantial advantages over standard, one variable tool. Indeed, PLS is a method which makes possible the inclusion of new variables, which are found to be correlated to the change in the concentrations, such as band shifts and others new bands that present concentration-dependent behavior [36]. This is not the case of the sucrose, although the multivariate model is robust and could address this possible problem.

The calibration curve constructed with the concentrations of sucrose (g/ml), which was obtained by the PLS, was plotted and can be seen in Fig. 5. The standard error of calibration (SEC) measures the error of the PLS model in predicting new concentrations. Possible errors in the calibration curve could be attributed to flaws in the preparation of the dilutions employed in the calibration process and the spectral shot noise is peculiar to the dispersive Raman instruments. In the curve of real concentration versus predicted concentration, it was possible to calculate the SEC, which was 0.30 g/100 ml.

The calibration model using the sucrose dilutions was then applied in the Raman spectra of soft drinks using two latent variables (function *pls_pred*), and the predicted concentration of the sucrose presented in each sample was calculated. Table 2 shows the soft drinks sucrose concentration predicted by the PLS and the concentration displayed in each nutritional table. The error of the predicted concentration versus displayed concentration is also shown in Table 2. Only one sample (brand 1) showed an error above the SEC value (5.2% or 0.6 g/100 ml), with the predicted sucrose value being lower than the one informed by the Nutritional Table.

Chemometric techniques, such as PLS, have been important in the quantitative analysis of compounds present in complex samples [29,33]. These molecules, mainly organic ones, can be encountered in the samples as aggregates or submitted to several chemical interactions. Such chemical interactions can

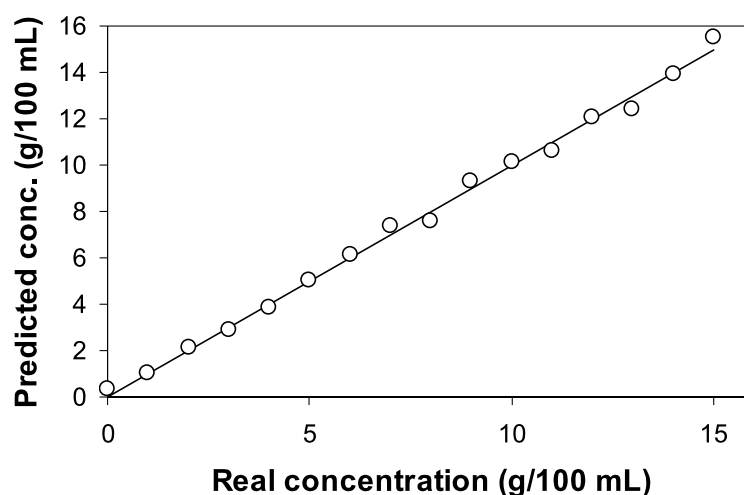


Fig. 5. Plot of the real concentration of sucrose dissolved in water versus predicted concentrations calculated by the PLS model applied to Raman spectra of soft drinks using two latent variables.

Table 2

Values of carbohydrates informed in the nutritional table compared to the sucrose concentration (mean – M and standard deviation – SD) provided by the PLS model

Lemon-type soft drink	Informed concentration from Nutritional Table (g/100 ml)	Predicted concentration M \pm SD (g/100 ml)	Error (%) [*]
Brand A	11.5	10.9 \pm 0.15	5.5
Brand B	9.5	9.4 \pm 0.10	1.1
Brand C	10.5	10.1 \pm 0.16	3.8
Brand D	8.0	8.15 \pm 0.11	1.9

^{*}Error between the carbohydrate amount from nutritional table and the mean predicted concentration.

increase the width of bands and change the band positions, decreasing significantly the resolution capability of the technique. In this context, it is possible to mention, for instance, the processed food, in which specific bands can overlap, being quite difficult to separate these variables from the spectrum without a robust and reliable technique. Therefore, a chemometric tool like PLS would help processing the information obtained from spectrographs and multichannel detectors, where various information are recorded in a single spectrum. In fact, PLS is an effective chemometric tool when handling with noisy signals, allowing calibration even in the presence of interferences [35].

The correct quantification of food composition is important for diet purposes and, in case of quality control in industries, the advantages of using Raman spectroscopy at the production line, the amount of a specific compound could be determined in real time in line [15]. Moreover, this resource would also be useful by government institutions such as FDA or the equivalent food and drugs quality control government organism of countries for monitoring the consumed products.

4. Conclusions

In this study, it was verified the potential of dispersive Raman spectroscopy applied to soft drink quality control for evaluating the nutritional specifications listed on the nutritional table of products, aiming the quality assurance and monitoring. Furthermore, this technique associated with the chemometric method PLS showed to be effective in quantifying the sucrose in lemon-type soft drinks. By developing a calibration curve using the Raman spectra of known concentrations of sucrose dissolved in water one could evaluate the sucrose amount with a low prediction error. The results indicate that the quantity of sucrose in the beverages analyzed meets the values set on the nutritional tables.

Acknowledgement

V.G.B. Conceição thanks Master fellowship from CAPES/PROSUP (Ministry of Education, Brazil).

References

- [1] M. Fisberg, O.M.S. Amancio and A.M.P. Lottenberg, Soft drinks consumption and the human health, *Pediatr. Mod.* **38** (2002), 1–12.
- [2] Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Gerência-Geral Alimentos, Resolução CNNPA nº 12, de 24/07/1978, available at: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf.
- [3] M. Mathlouthi, C. Luu, A.M. Meffroy-Biget and D.V. Luu, Laser-Raman study of solute-solvent interactions in aqueous solutions of D-fructose, D-glucose, and sucrose, *Carbohydr. Res.* **81** (1980), 203–212.
- [4] H. Basciano, L. Federico and K. Adeli, Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia, *Nutr. Metab.* **2** (2005), 1–14.
- [5] W.C. Willett, Dietary fat plays a major role in obesity, *Obes. Rev.* **3** (2002), 59–68.
- [6] K.L. Morris and M.B. Zemel, Glycemic index, cardiovascular disease, and obesity, *Nutr. Rev.* **57** (1999), 273–276.
- [7] T.S. Cunha, V. Faraha, J. Paulini, M. Pazzine, K.M. Elased, F.K. Marcondes, M.C. Irigoyen, K. De Angelis, L.D. Mirkin and M. Morris, Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance, *Regul. Pept.* **139** (2007), 1–4.
- [8] M. Fisberg, C.R.S. Bandeira, E.A. Bonilha, G. Halpern and M.D. Hirschbruch, Hábitos alimentares na adolescência, *Pediatr. Mod.* **36** (2000), 724–734.
- [9] C.R.M. Frazier, P. Mason, X. Zhuang and J.A. Beeler, Sucrose exposure in early life alters adult motivation and weight gain, *PLoS ONE* **3** (2008), 3221.
- [10] Ministério da Saúde, Secretaria de Assistência à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação da Política de Alimentação e Nutrição. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), 2002/2003, available at: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=28219.
- [11] C.P. Mendonça and L.A. dos Anjos, Dietary and physical activity factors as determinants of the increase in overweight/obesity in Brazil, *Cad. Saúde Pública* **20** (2004), 698–709.
- [12] R.N. Silva, V.N. Monteiro, J.X. Alcanfor, E.M. Assis and E.R. Asquieri, Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel, *Ciência Tecnol. Alime.* **23** (2003), 337–341.
- [13] N. Ghosh, Y. Verma, S.K. Majumder and P.K. Gupta, A fluorescence spectroscopic study of honey and cane sugar syrup, *Food Sci. Technol. Res.* **11** (2005), 59–62.
- [14] S. Keller, T. Löchte, B. Dippel and B. Schrader, Quality control of food with near-infrared-excited Raman spectroscopy, *Fresenius J. Anal. Chem.* **346** (1993), 863–867.
- [15] F. Adar, R. Geiger and J. Noonan, Raman spectroscopy for process/quality control, *J. Appl. Spectrosc. Rev.* **32** (1997), 45–101.
- [16] M.A. Strehle, P. Rösch, M. Baranska, H. Schulz and J. Popp, On the way to a quality control of the essential oil of fennel by means of Raman spectroscopy, *Biopolymers* **77** (2005), 44–52.
- [17] T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens, G. Van der Weken, F. Verpoort, G. Vergote and J.P. Remon, Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis, *Trends Analyt. Chem.* **21** (2002), 869–877.
- [18] A. Celedon and J.M. Aguilera, Applications of microprobe Raman spectroscopy in food science, *Food Sci. Technol. Int.* **8** (2002), 101–108.

- [19] E.B. Hanlon, R. Manoharan, T.W. Koo, K.E. Shafer, J.T. Motz, M. Fitzmaurice, J.R. Kramer, I. Itzkan, R.R. Dasari and M.S. Feld, Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy, *Phys. Med. Biol.* **45** (2000), R1–R59.
- [20] P. Carmona, M. Molina and A. Rodríguez-Casado, Raman study of the thermal behaviour and conformational stability of basic pancreatic trypsin inhibitor, *Eur. Biophys. J.* **32** (2003), 137–143.
- [21] M. Sohn, D.S. Himmelsbach, S.E. Kays, D.D. Archibald and F.E. Barton, NIR-FT/Raman spectroscopy for nutritional classification of cereal foods, *Cereal Chem.* **82** (2005), 660–665.
- [22] P.D.A. Pudney, T.M. Hancewicz and D.G. Cunningham, The use of confocal Raman spectroscopy to characterise the microstructure of complex biomaterials: foods, *Spectroscopy* **16** (2002), 217–225.
- [23] M. Hwang, S. Cho, H. Chung and Y. Woo, Nondestructive determination of the ambroxol content in tablets by Raman spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38** (2005), 210–215.
- [24] C. Eliasson, N.A. Macleod, L.C. Jayes, F.C. Clarke, S.V. Hammond, M.R. Smith and P. Matousek, Non-invasive quantitative assessment of the content of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47** (2008), 221–229.
- [25] L.M. Moreira, L. Silveira Jr., F.V. Santos, J.P. Lyon, R. Rocha, R.A. Zângaro, A.B. Villaverde and M.T.T. Pacheco, Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis, *Spectroscopy* **22** (2008), 1–19.
- [26] H. Schulz and M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* **43** (2007), 13–25.
- [27] V. Baeten and R. Aparicio, Edible oils and fats authentication by Fourier transform Raman spectrometry, *Biotechnol. Agron. Soc.* **4** (2000), 196–203.
- [28] R.J. Yatka, M.J. Grenberg, M.T. Bunkzec, R.L. Whistler and M.A. Reed, *U.S. Patent Institute* **5** (1998), 800–848.
- [29] M.A. Morgano, C. Moriya and M.M.C. Ferreira, Determinação quantitativa do teor de sacarose em açúcar por espectroscopia FT-IR/ATR e regressão PLS, *Braz. J. Food Technol.* **6** (2003), 77–83.
- [30] R. Goodacre, B.S. Radovic and E. Anklam, Progress toward the rapid nondestructive assessment of the floral origin of European honey using dispersive Raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **56** (2002), 521–527.
- [31] C. Krafft and V. Sergo, Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues, *Spectroscopy* **20** (2006), 195–218.
- [32] L.S. Mendes, F.C.C. Oliveira, P.A.Z. Suarez and J.C. Rubim, Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries, *Anal. Chim. Acta* **493** (2003), 219–231.
- [33] Y.Z. Liang and O.M. Kvalheim, Robust methods for multivariate analysis – a tutorial review, *Chemometr. Intell. Lab.* **32** (1996), 1–10.
- [34] M.M.C. Ferreira, A.M. Antunes, M.S. Melgo and P.L.O. Volpe, Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial, *Quím. Nova* **22** (1999), 724–731.
- [35] A.P. Cunha, V.P. Cunha, L. Silveira Jr. and A.A. Martin, Calibration model of methylmetacrylate concentration in aqueous solution using ultraviolet absorption spectroscopy, *Quím. Nova* **26** (2003), 850–854.
- [36] British Pharmacopeia (on line) v.I & II. (2008). Monographs: Medicinal and pharmaceutical substances sucrose, available at: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/ixbin/bp.cgi?r=bsz9BHr0Vlf&id=6017&n=16&a=display>.
- [37] J.C. Lázaro, M.T.T. Pacheco, K.C. Rodrigues, C.J. Lima, L.M. Moreira, A.B. Villaverde and L. Silveira Jr., Optimizing the Raman signal for characterizing organic samples: The effect of slit aperture and exposure time, *Spectroscopy* **23** (2009), 71–80.
- [38] J. Saade, M.T.T. Pacheco, M.R. Rodrigues and L. Silveira Jr., Identification of hepatitis C in human blood serum by near-infrared Raman spectroscopy, *Spectroscopy* **22** (2008), 387–395.

Apêndice E: Artigo aceito
Journal of Sports Science and Medicine (2009) 8, 672-681.

Research article

Effects of high-dose creatine supplementation on kidney and liver responses in sedentary and exercised rats

Renato A. Souza^{1,2}✉, Humberto Miranda¹, Murilo Xavier^{1,2}, Rodrigo A. Lazo-Osorio¹, Hélio A. Gouvea¹, José C. Cogo¹, Rodolfo P. Vieira³ and Wellington Ribeiro¹

¹ Laboratory of Physiology and Pharmacodynamic, Institute of Research and Development, University of Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, Brazil, ² Department of Physical Therapy, University of Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brazil, ³ COPD & Asthma Research Group (CARG), Department of Pneumology, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany, and Department of Pathology (LIM 05), School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

Abstract

This study evaluated the effects of high-dose of short-term creatine supplementation ($5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ to 1 week) and long-term creatine supplementation ($1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ to 4-8 weeks) on kidney and liver structure and function of sedentary and exercised Wistar rats (Exercise sessions consisted of swimming at 80% of maximal work load supported during 5 days per week with daily sessions of 60 minutes throughout the duration of the supplementation). Seventy-two animals ($245 \pm 5\text{g}$) were divided into four groups ($n = 18$): control diet Sedentary (SED), Creatine diet Sedentary (CRE), control diet Exercised (EXE), and Creatine diet Exercised (EXECRE). Histological and blood biochemical studies were performed after one, four, and eight weeks of creatine supplementation and exercise ($n = 6$). No differences were found when comparing SED, EXE and EXECRE groups for kidney and liver structure and function at one, four and eight weeks. However, the CRE group showed higher levels of creatinine (1.1 ± 0.2 vs. $0.4 \pm 0.1\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$; $p < 0.05$), and urea (37 ± 3 vs. $19 \pm 1\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$; $p < 0.05$) when compared with all others groups at four and eight weeks. At eight weeks, the CRE group presented increased levels of ALT (41 ± 7 vs. $23 \pm 7\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$; $p < 0.05$), AST (89 ± 6 vs. $62 \pm 5\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$; $p < 0.05$), GGT (8.0 ± 0.9 vs. $3.9 \pm 1.0\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$; $p < 0.05$), and AP (125 ± 10 vs. $69 \pm 9\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$; $p < 0.05$) also when compared with all others groups. Moreover, the CRE group demonstrated some structural alterations indicating renal and hepatic damage at four and eight weeks, respectively. These results suggest that long-term creatine supplementation (up to 4-8 weeks) may adversely affect kidney and liver structure and function of sedentary but not of exercised rats.

Key words: Creatine monohydrate, hepatic metabolism, kidney metabolism, swimming training, sports supplements, toxicology.

Introduction

Creatine (Cr) is an organic compound synthesized mainly in the liver and kidneys from the amino acids glycine, arginine and methionine (Walker, 1979). Cr plays an important role in rapid energy provision during muscle contraction involving the transfer of N-phosphoryl group from phosphorylcreatine (PCr) to ADP to regenerate ATP through a reversible reaction catalyzed by phosphorylcreatine kinase (PCK) (Walker, 1979). Its biochemical (Greenhaff, 1997), physiological (Greenhaff, 1997), ergogenic (Bemben and Lamont, 2005) and therapeutic (Gualano et al., 2009; Vieira et al., 2007) roles have been extensively investigated. In the last 20 years, Cr has become a very popular dietary supplement (Bird, 2003;

Maughan et al., 2004) but despite its widespread use, there is little evidence concerning possible side effects (Bizzarini and De Angelis, 2004; Poortmans et al., 2005).

Studies have found that Cr supplementation can increase skeletal muscle and brain total Cr and PCr concentrations, with an even greater degree of increase seen in organs with low baseline creatine content such as kidney and liver (Ipsiroglu et al., 2001) but the possible side effects of Cr supplementation, such as renal dysfunction, and hepatotoxicity are still inconclusive (Bizzarini and De Angelis, 2004). Because urea, which is one of the metabolic products of creatine metabolism, is involved in the conversion of toxic compounds such as methylamina and formaldehyde, Cr supplementation can also be expected to influence this conversion (Poortmans et al., 2005). There has been some concern regarding the potential for Cr supplementation toxicity based on two anecdotal human case reports (Pritchard and Kalra, 1998; Thorsteinsdottir, et al. 2006). However, in humans, most of the studies that have examined the potential for toxicity of Cr supplementation have not found evidence of side effects when consumed at "recommended" doses (Kreider et al., 2003; Mayhew et al., 2002; Mihic et al., 2000; Poortmans and Francaux, 1999; Poortmans et al., 1997; Robinson et al., 2000; Terjung et al., 2000; Waldron et al., 2002). In animals, the effects of Cr supplementation on renal and hepatic structure and function have not been well established. Whereas some studies did not report any alteration in renal and hepatic function after Cr supplementation (Taes et al., 2003; Tarnopolsky et al., 2003), others have observed that it can speed up renal and hepatic disease progression (Edmunds et al., 2001; Ferreira et al., 2005; Tarnopolsky et al., 2003).

Vieira et al. (2007) demonstrated that Cr supplementation exacerbates all cardinal features of asthma in mice with chronic allergic airway inflammation, which suggests potential side effects for asthmatic individuals. However, the same authors recently demonstrated that these pulmonary side effects are completely abolished when Cr supplementation in animals with chronic allergic airway inflammation is followed by aerobic exercise, suggesting that the exercise could block the possible side effects of Cr supplementation (Vieira et al., 2008b).

Since supraphysiological doses of Cr supplementation could facilitate the demonstration its potential for side effects at the tissue level, in this study we have used

histopathological and enzymatic analyses to clarify the possible protector effect of exercise during high-dose Cr supplementation. In general, renal diseases are characterized by the occurrence of morphological lesions at any degree of magnification and also by any biochemical abnormality (Gregory, 2003), although a severe renal disease can be present without clinical signs or laboratorial alterations that indicate renal insufficiency (Gregory, 2003). Therefore, plasma levels of urea and creatinine are classical markers of renal function because they represent a simple marker of glomerular filtration (Ghosh and Sil, 2007). Liver diseases have presented a broad variability in several human and animal studies, as well as in the criteria used to categorize the severity of hepatotoxicity (Nunez, 2006). Plasma levels of hepatic enzymes, such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (AP) are considered valuable for detecting toxic effects on the liver (Boada et al., 1999).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of supraphysiological doses of loading and maintenance phase protocol of Cr supplementation on the renal and hepatic structure and function in sedentary and exercised Wistar rats.

Methods

All animal care was in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by Animal Research Ethics Committee of the University of Vale do Paraíba (L022-2005-CEP).

Experimental design

Seventy-two male Wistar rats (245 ± 5 g) were housed individually (22 ± 3 °C, relative humidity $60 \pm 10\%$, 12h/12h light/darkness); food and water was available *ad libitum*. The study was performed for 8 weeks and the animals were divided into four groups ($n = 18$): control diet Sedentary (SED), Creatine diet Sedentary (CRE), control diet Exercised (EXE), and Creatine diet Exercised (EXECRE). To verify the effects of supraphysiological doses of Cr loading and maintenance supplementation periods, six animals in each group were euthanized by an intracardial injection of pentobarbital sodium at the end of 1, 4, and 8 weeks.

Swimming training

All the animals were submitted to a swimming adaptation period (30 daily minutes without load, during five consecutive days) in order to decrease factors related to the stress promoted by the swimming activity (Osorio et al., 2003a; 2003b). During this period, the Cr was not administered. After adaptation, the animals were individually submitted to the maximum load test (MLT) (Guerrero-Ontiveros and Wallimann, 1998; Ipsiroglu et al., 2001). Load cells (lead fish sinkers) were increased at 3 min intervals by weights corresponding to 1, 2, 3%, etc. of the rat's mass. The load cells were attached to the tail of the animal until the maximal work load was reached, which was determined at the moment when the animal became exhausted (unable to surface after approximately 8-10s).

This test allowed the working load adjustment for the physical training at 80% of the maximal load. The physical training at 80% of the maximal load was performed in groups of six animals due to the more vigorous exercise promotion when compared to the individual swimming (Osorio et al., 2003a; 2003b). Such training occurred five times a week with training daily sessions of 60 minutes throughout the duration of the supplementation and only in the EXE and EXECRE experimental groups. The swimming protocol was performed in an asbestos tank with 250 liters of water kept at 31 ± 1 °C temperature.

Creatine supplementation

Cr supplementation began one day after the swimming adaptation. The animals received the Cr supplementation by gavage (Micronized Creatine, Integral Médica®, Embu-Guaçu, SP, Brazil). at a dose of $5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ to 1 week (loading phase) and $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ to 4-8 weeks after loading phase (maintenance phase). Doses were given in the afternoon and corresponded 30 min prior to exercise.

In addition, considering that a dose daily of 300mg of creatine per kilogram of body weight is routinely used in other animal studies (Brannon et al., 1997; Gagnon et al., 2002; McGuire et al., 2002; Young and Young, 2007) and is equivalent to the customary loading dose of $20\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ in a 70 kg person which produces maximal effects in 5 days, the Cr supplementation regimen adopted in the present study must be considered supraphysiological.

Enzymatic measurements

Forty-eight hours after the last training session and creatine administration, animals were anesthetized with ketamine ($70\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and xylazine ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The abdominal cavity was opened and blood samples (5ml) were collected from the inferior cava vein into plastic syringes carefully avoiding the formation of bubbles. After centrifugation at 1000 rpm for 10 minutes, the plasma was collected and biochemical analysis for renal function (Urea and Creatinine), and hepatic function (Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST), Gamma Glutamyltransferase (GGT), Alkaline Phosphatase (AP), Albumin and Total Bilirubin, were measured spectrophotometrically following the manufacturer's manual (Hitachi®, Model U-2001) using commercial kits (Laborlab, Guarulhos, SP, Brazil) (Gregory, 2003, Vieira et al., 2008a).

Histological procedures

After blood collection, the right kidney and right hepatic lobe were rapidly removed and fixed in formalin solution (10%) for 24 hours and submitted to histological routine. The 5µm slides were stained with Hematoxyline/Eosine and photographed at 400x magnification, with a digital camera (Nikon, CoolPix) attached to an optical microscope (Nikon, Eclipse E200). For kidneys we analysed the structure of Bowman capsules, glomerular capillaries, intra-capsular spaces, renal tubules, as well as the presence of leukocytes, red cells and edema formation. For liver, we analysed the centrality of nucleus, number of hepatocytes with binucleation, congestion of central vein, leukocytes infiltration, number of kupffer cells and swell-

ing lumen by the blood cells and congestion of sinusoids (Vieira et al., 2008a).

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM. Two way variance analysis (ANOVA) 4 x 3 (group x time) was used for repeated measurements among the experimental groups in the different experimental periods. The Tukey post hoc test was applied for the identification of the specific differences in the variables. The level of significance was set at $p < 0.05$. The statistical analysis was conducted using the software SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Effects of creatine supplementation during loading phase

Figure 1 shows the plasma levels of renal (creatinine, urea) and hepatic function (ALT, AST, GGT, AP, Albumin and Total Bilirubin) markers after 1 week of Cr sup-

plementation. No harmful effects of Cr loading supplementation ($5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ for 1 week) on renal and hepatic function markers were observed during this phase. Only AST presented higher values in the exercised groups (EXE and EXECE) when compared with the sedentary groups (SED and CRE) (Figure 1D; $p < 0.05$). Additionally, renal and hepatic histological evaluation did not show any alterations for all groups.

Effects of creatine supplementation during maintenance phase

Cr supplementation during maintenance phase ($1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ for 4 and 8 weeks after loading phase) led to increased levels of renal function markers (creatinine and urea) (Figures 2A and B and 3A and B, respectively). However, these results were evident only in CRE group when compared with all others groups ($p < 0.05$).

After the fourth week of supplementation, the animals of CRE group had renal corpuscles with outlines of

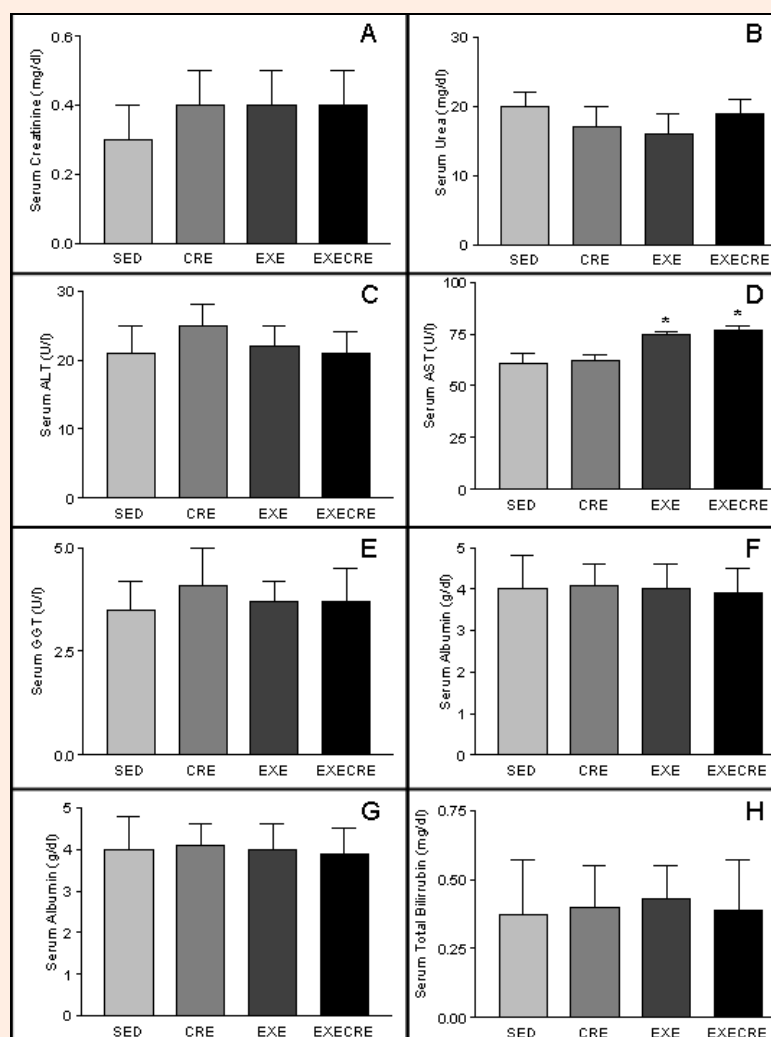


Figure 1. Plasma levels of renal and hepatic markers after 1 week creatine supplementation. Experimental Groups: Normal diet Sedentary (SED), Creatine diet Sedentary (CRESED), Normal diet Exercised (EXE), Creatine diet Exercised (CREEXE). Panels A and B (renal markers): creatinine and urea, respectively; panels C,D,E,F,G and H (hepatic markers): alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), albumin and total bilirubin, respectively. * $p < 0.05$ when compared with all groups.

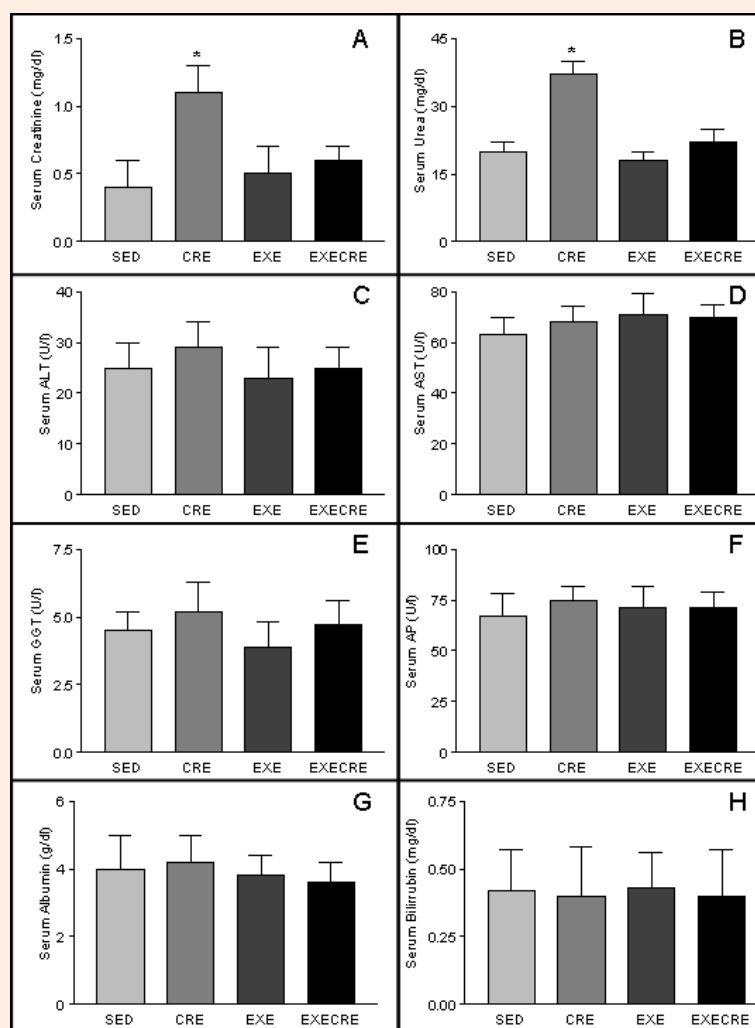


Figure 2. Plasma levels of renal and hepatic markers after 4 weeks creatine supplementation. Experimental Groups: Normal diet Sedentary (SED), Creatine diet Sedentary (CreSED), Normal diet Exercised (EXE), Creatine diet Exercised (CreEXE). Panels A and B (renal markers): creatinine and urea, respectively; panels C,D,E,F,G and H (hepatic markers): alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), albumin and total bilirubin, respectively. * $p < 0.05$ when compared with all groups.

difficult delimitation and irregular Bowman's capsules, glomeruli dilations, and no preserved intra-capsular spaces. Renal tubules exhibited cellular morphologic regularity (cuboid epithelium), but indefinite tubular space (Figure 4).

Four weeks of creatine supplementation resulted in no changes of hepatic markers (ALT, AST, GGT, and AP) when compared with all other groups (Figure 2C, D, E and F, respectively; $p > 0.05$), also no changes were observed in liver morphology. However, after 8 weeks of creatine supplementation, the values of ALT, AST, GGT, and AP were significantly higher in the CRE group when compared with the values of all others experimental groups ($p < 0.05$) (Figure 3C, D, E and F, respectively). These functional alterations were accompanied by some histological alterations, like congestion of the central vein, some polymorphonuclear inflammatory cells infiltrate, sinusoids walls showing numerous Kupffer cells with swelling lumen by the blood cells (Figure 5). In contrast, albumin and total bilirubin levels did not present

significant alterations during the entire experiment ($p > 0.05$).

Discussion

The key findings from the present study was the demonstration, for the first time, that (a) four weeks of supraphysiological doses of Cr supplementation resulted in increased creatinine and urea levels and renal tissue damage in non trained rats and (b) eight weeks of supraphysiological doses of Cr supplementation produced increased levels of AST, ALT, GGT and AP and hepatic tissue damage in non trained rats. These results suggest that side effects of supraphysiological doses of Cr supplementation on the kidney and liver are time dependent. This study also demonstrated that these possible renal and hepatic side effects are not present in Cr supplemented groups submitted to swimming training (EXECRE), suggesting that the exercise could to block the side effects of high-dose Cr supplementation.

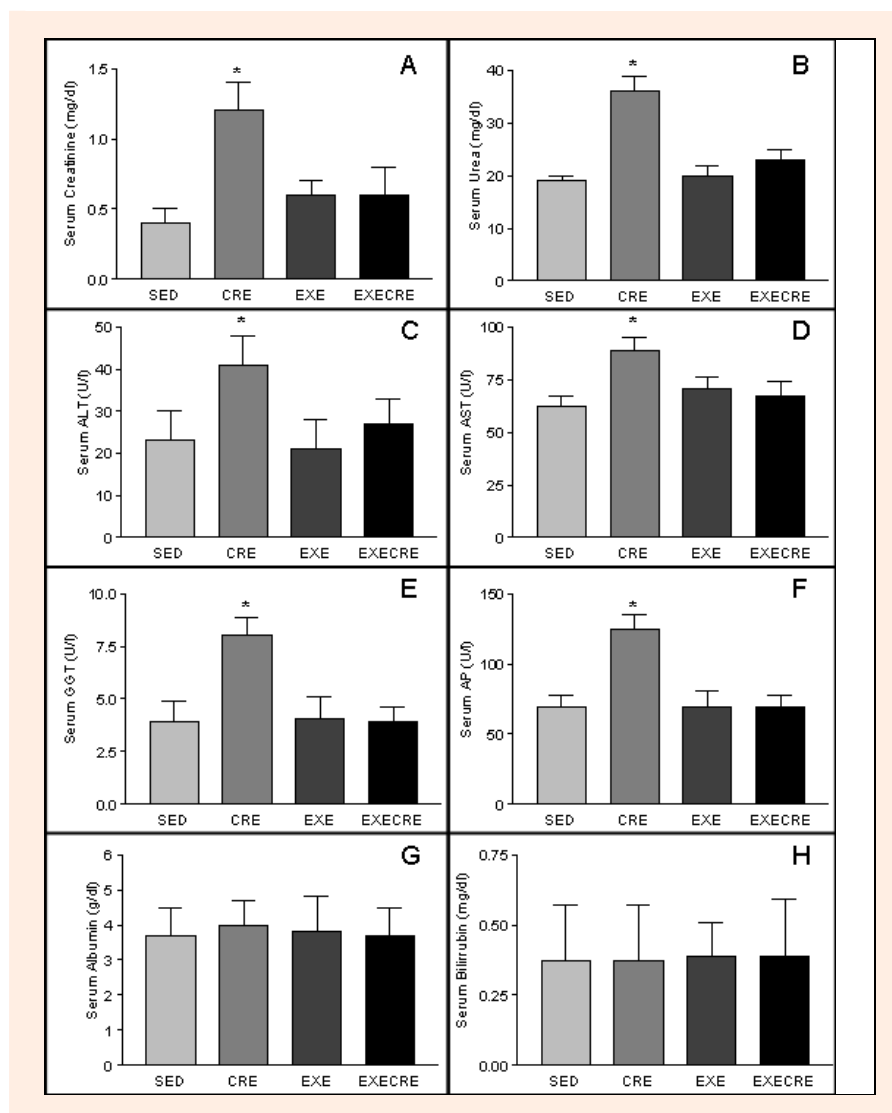


Figure 3. Plasma levels of renal and hepatic markers after 8 weeks creatine supplementation. **Experimental Groups:** Normal diet Sedentary (SED), Creatine diet Sedentary (CRESED), Normal diet Exercised (EXE), Creatine diet Exercised (CREEXE). **Panels A and B (renal markers):** creatinine and urea, respectively; **panels C,D,E,F,G and H (hepatic markers):** alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), albumin and total bilirubin, respectively. * $p < 0.05$ when compared with all groups.

Oral Cr supplementation in humans and rats has been proven to increase physical performance (Bemben and Lamont, 2005; Kreider, 2003) and some studies have demonstrated benefits in certain pathological conditions (Bender et al., 2005; Jeong et al., 2000). So, the Cr supplementation has become popular among athletes due to a performance-enhancing potential. However, as an available and legal product, it can be easily purchased in nutrition stores or supermarkets, and the potential effect on muscle mass enhancement among untrained and/or among non-healthy people may represent a major concern, because its side effects have not been well established.

The clinical trials studies conducted with Cr using healthy adults are usually divided in two phases: (a) initial phase with supplementation of high Cr doses (20 to 30 g daily) during 5 to 7 days (Loading Phase), immediately followed by (b) a maintenance phase, with small Cr doses, 1/5 of the initial dose (4 to 6 g daily), for several weeks (Bemben and Lamont, 2005; Bird, 2003; Shao and Hathcock, 2006). Using this Cr supplementation protocol,

the literature reviews have maintained that there is no conclusive evidence to support the notion that both short- and long-term Cr use may adversely affect kidney and liver function in healthy individuals (Farquhar and Zambanski, 2002; Groeneveld et al., 2005; Kreider et al., 2003; Mayhew et al., 2002; Mihic et al., 2000; Pline and Smith, 2005; Poortmans and Francaux, 1999; 2000; Poortmans et al., 1997; Robinson et al., 2000; Terjung et al., 2000; Waldron et al., 2002; Yoshizumi and Tsourounis, 2004). With respect to the potential side effects of Cr supplementation, kidney damage was based on anecdotal human case reports only when associated with use of high dose Cr or renal disease (Ghosh and Sil, 2007; Koshy et al., 1999; Pritchard and Kalra, 1998; Thorsteinsdottir, et al. 2006).

Nonetheless, since rats were used in this study and the basal metabolism rate, conversion and assimilation of organic combinations are much more intense in these animals, an extrapolation of Cr doses was necessary to facilitate demonstration its potential for side effects on

organs that are involved in its metabolism. The choice of the adopted regimen for the Cr supplementation dosage in this study was considered supraphysiological when compared with other animal studies (Brannon et al., 1997; Gagnon et al., 2002; McGuire et al., 2002; Young and Young, 2007).

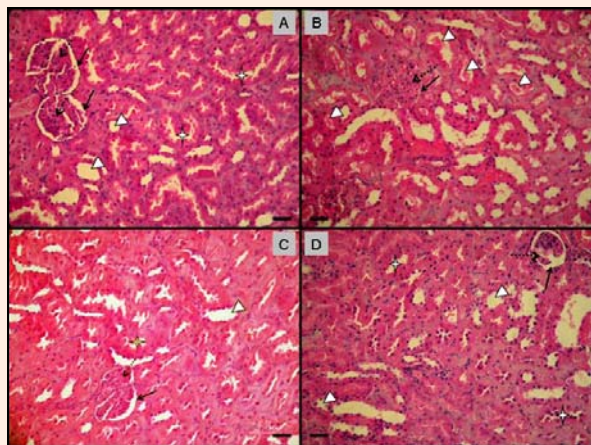


Figure 4. Representative photomicrographs of kidney from Normal diet Sedentary (SED), Creatine diet Sedentary (CRESED), Normal diet Exercised (EXE), Creatine diet Exercised (CREEXE) groups after 4 weeks of supplementation. Magnification 400x. Scale bar = 25µm. The SED group (panel A) had renal corpuscles with a thin contour and well defined Bowman capsules (continuous arrows). Glomerular capillary (dotted arrow) were not congested and had intra-capsular spaces preserved. Renal tubules showed preserved cellular morphology (cuboid epithelium) and distinct lumen, plus proximal tubule convoluted (stars). In CRESED group (panel B), possible renal damage morphology was verified: renal corpuscles with outline of difficult delimitation and irregularity of the Bowman's Capsule (continuous arrow), dilation of capillary glomeruli (dotted arrow) and intra-capsular space not preserved. Renal Tubules exhibited cellular morphologic regularity (cuboid epithelium), but indefinite space tubular (arrowheads). Panels A, C and D, show kidney (cortex part) with preserved renal morphology: Renal corpuscles with very defined outline and regularity of the Bowman's Capsule (continuous arrow), no dilation of glomeruli capillary (dotted arrow) and intra-capsular space preserved. Renal Tubules exhibited cellular morphologic regularity (cuboid epithelium), and definite tubular space (arrowheads).

In the present study we demonstrated that in non trained rats Cr supplementation (CRE group) increased the levels of urea and creatinine, both markers of renal toxicity, at four and eight weeks (Figure 2A-B and 3A-B, respectively). Histological analysis of kidneys of CRE group showed: cortical area with the presence of indefinite renal corpuscles and difficult delimitation of the Bowman's capsule, congestion of glomeruli capillary, and intra-capsular and tubular spaces not preserved, which indicated tissue damage (Figure 4B). In addition, the same experimental group (CRE) also demonstrated after eight weeks of Cr supplementation increase of AST, ALT, GGT and AP plasma levels of (Figures 3C-F, respectively), and possible hepatic damage morphology was verified: congested central vein with some polymorphonuclear in the peripheral position, walls of the sinusoids showed numerous Kupffer cells and with swelling lumen by the blood cells (Figure 5B). These findings that supraphysiological doses of creatine may negatively impact hepatic and renal function are evidence that the low-

est recommended doses of creatine should be followed for the most efficacious and safe outcomes. It is important to explicit that more is not always better (Schilling et al., 2001).

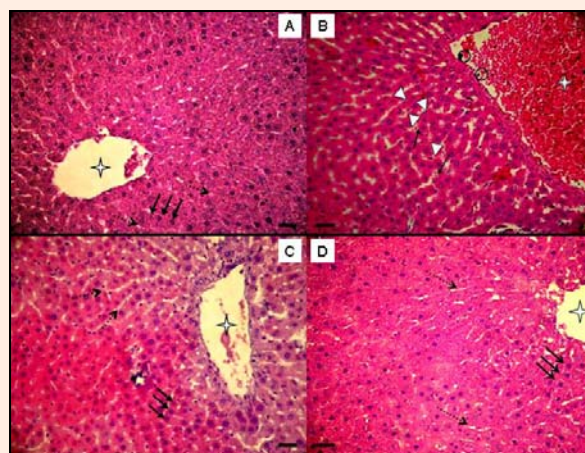


Figure 5. Representative photomicrographs of liver from Normal diet Sedentary (SED), Creatine diet Sedentary (CRESED), Normal diet Exercised (EXE), Creatine diet Exercised (CREEXE) groups after 8 weeks of supplementation. Magnification 400x. Scale bar = 25µm. The SED group (panel A) had a central vein which was uncongested (star), normal hepatocytes (continuous arrows), and slight capillary sinusoids (dotted arrows). The hepatocytes show standard morphology with a big and centralized nucleus. In CRE group (panel B) possible hepatic damage morphology was verified: congested central vein (star) and with some polymorphonuclear in the peripheral position (circular delimitations), walls of the sinusoids showed numerous Kupffer cells (arrowheads) and with swelling lumen by the blood cells (star). The EXE group (panel C) showed hepatocytes (continuous arrows) distributed throughout interconnected plates from the central vein (star) and separated by slight capillary sinusoids (dotted arrows). The EXECRE group (panel D) had preserved hepatic morphology: central vein with no congested (star), hepatocytes (dotted arrows) correctly arranged in trabeculae running radially from the central vein and separated by thin sinusoids (continuous arrows). They were regular and contained a large spheroid nucleus.

As part of possible toxic mechanisms of Cr supplementation, we could consider the Cr accumulation into the tissue, which has low metabolic capacity to convert Cr into creatinine and is enzymatically capable of accomplishing the methylation processes, contributing to the formation of cytotoxic substances, such as formaldehyde and methylamine (Clayton et al., 2004; Yu and Deng, 2000). Additionally, long-term Cr supplementation stimulates down-regulation of Cr receptors (CT-1) in skeletal muscles, blocking any additional storage of this nutrient (Guerrero-Ontiveros and Wallimann, 1998). Greenhaff (1997) demonstrated that muscular Cr capitation is independently saturated after the loading phase, with or without exercise. Therefore, long-term Cr supplementation results in increased Cr concentrations in other organs that present very low basal Cr storage, such as kidneys and liver (Ipsiroglu et al., 2001), which favor the conversion to cytotoxic compounds. In the present study, the sedentary animals may have reached their maximum capacity of intramuscular Cr storage, and excessive Cr may have been capitated by renal and hepatic tissue causing some lesion. These findings could justify the elevation of plasma levels of tissue enzymes enzymatic observed in

the CRE group.

It is important also to note that some enzymatic results could also represent a false-positive renal and hepatic toxicity. Since Cr is a substrate for creatinine synthesis, the elevations of creatinine levels observed in the CRE group at four and eight weeks of supplementation could represent simply the result of high-dose supplementation (Poortmans et al., 1997; Yoshizumi and Tsourounis, 2004). Contrary, a recent study does not indicate creatinine elevation after Cr supplementation (Poortmans et al., 2005). Focusing on the endogenous synthesis of Cr, the arginine, one of the precursory synthesized amino acids, also served as precursor for urea production. The Cr supplementation could supply an additional source of arginine to increase urea production (Deshmukh et al., 1991; Ööpik et al., 1996). In addition, in exercised (EXE) and exercised plus Cr supplemented group (EXECRE) after 1 week, we observed an increased level of AST when compared to the Control groups (Figure 1C). These results could be attributed to muscular alterations and not for Cr supplementation, because other studies demonstrate that physical exercise in initial periods of adaptation can generate muscular damage, characterized by plasmatic AST elevation (Peake et al., 2005; Van Der Meulen et al., 1991). However, our results were not attributed to false-positive because use high-dose Cr supplementation affected only the CRE group and it were reinforced by histological findings.

Although many studies on creatine using animal models have been published, few have specifically focused on safety and toxicity and there is evidence that Cr supplementation at doses analogous than those used in humans do not cause adverse effects in most animals under normal conditions (Shao and Hathcock, 2006). For example, Taes et al. (2003) have indicated no deleterious effect in sedentary and in pre-existing renal failure rats. In contrast, Edmunds et al. (2001) and Ferreira et al. (2005) demonstrated creatine-induced deleterious effects in rats with cystic kidney disease and in sedentary animals, respectively. Tarnopolsky et al. (2003) showed significant hepatic inflammatory lesions in mice associated with Cr supplementation, and no negative effect of Cr on liver histology in the Sprague-Dawley rats after intermediate-term or long-term supplementation. These conflicting data may be related to differences in the protocol, species, and tissues analyzed.

In recent years, it has been investigated the reduction of possible side effects of Cr supplementation when associated to physical exercise (Ferreira et al., 2005; Vieira et al., 2008b). Interestingly, although we have used a supraphysiological doses, the renal and hepatic damage were not observed in animals that were Cr supplemented and submitted to swimming training (EXECRE). Researchers suggest that Cr and PCr diffuse between mitochondrial production sites and muscle utilisation sites (Greenhaff, 1997; Walker, 1979). This diffusion process was named as the 'phosphorylcreatine shuttle' and involves 3 areas: (i) a peripheral terminus located at the utilisation site, which in the case of muscle is the myosin heads; (ii) an energy generating terminus which is located at the mitochondria; and (iii) a transversible space between the areas of production and utilisation (Volek and

Kraemer, 1996). Although we have no measured the Cr intramuscular it is possible speculate that exercise training could protect against kidney and liver alterations, by increasing Cr consumption by skeletal muscles during swimming, resulting in a decreased Cr accumulation in the kidneys and liver. These results corroborate previous studies which demonstrated that "recommended" doses of Cr supplementation in healthy and active animals did not change the organs function (Ferreira et al., 2005; Vieira et al., 2008b).

Overall, the results of the current study showed that instituting swimming at 80% of the maximal load, five times a week with training daily sessions of 60 minutes may result in a significantly lower side effect of high-dose Cr supplemented for the animal model examined. However, it should be noted that the findings of the current study are not applicable to a Cr supplementation at "recommended" doses.

Conclusion

The results of the current study add to the growing body of knowledge regarding acute and chronic effects of Cr supplementation on renal and hepatic function using an animal model. Therefore, we conclude that physical activity can avoid the development of kidney and liver side effects of long-term supraphysiological doses of Cr supplementation. However, further studies are necessary to clarify the metabolism of long-term Cr supplementation, as well as the possible side effects in organs such as kidneys and liver, and their health consequences, especially in sedentary populations that could to necessity to use this compound.

Acknowledgment

Study conducted at Institute of Research and Development, Vale do Paraiba University (UNIVAP), São José dos Campos, SP – (BRAZIL).

References

- Bemben, M.G. and Lamont, H.S. (2005) Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Medicine* **35**, 107-125.
- Bender, A., Auer, D.P., Merl, T., Reilmann, R., Saemann, P., Yassouridis, A., Bender, J., Weindl, A., Dose, M., Gasser, T. and Klopstock, T. (2005) Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. *Journal of Neurology* **252**, 36-41.
- Bird, S.P. (2003) Creatine supplementation and exercise performance: a brief review. *Journal of Sports Science & Medicine* **2**(4), 123-132.
- Bizzarini, E. and De Angelis, L. (2004) Is the use of oral creatine supplementation safe? *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* **44**, 411-416.
- Boada, L.D., Zumbado, M., Torres, S., Lopez, A., Diaz-Chico, B.N., Cabrera, J.J. and Luzardo, O.P. (1999) Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats. *Archives of Toxicology* **73**, 465-472.
- Brannon, T.A., Adams, G.R., Gonniff, C.L. and Baldwin, K.M. (1997) Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **29**, 489-495.
- Clayton, T.A., Lindon, J.C., Everett, J.R., Charuel, C., Hanton, G., Le Net, J.L., Provost, J.P. and Nicholson, J.K. (2004) Hepatoxin-induced hypercreatinemia and hypercreatinuria: their relationship to one another, to liver damage and to weakened nutritional status. *Archives of Toxicology* **78**, 86-96.

- Deshmukh, D.R., Meert, K., Sarnaik, A.P., Marescau, B. and De Deyn, P.P. (1991) Guanidino compound metabolism in arginine-free diet induced hyperammonemia. *Enzyme* **45**, 128-136.
- Edmunds, J.W., Jayapalan, S., Dimarco, N.M., Saboorian, M.H. and Aukema, H.M. (2001) Creatine supplementation increases renal disease progression in Han:SPRD-cy rats. *American Journal of Kidney Diseases* **37**, 73-78.
- Farquhar, W.B. and Zambarski, E.J. (2002) Effects of creatine use on the athlete's kidney. *Current Sports Medicine Reports* **1**, 103-106.
- Ferreira, L.G., De Toledo Bergamaschi, C., Lazaretti-Castro, M. and Heilberg, I.P. (2005) Effects of creatine supplementation on body composition and renal function in rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **37**(9), 1525-1529.
- Gagnon, M., Maguire, M., MacDermott, M. and Bradford, A. (2002). Effects of creatine loading and depletion on rat skeletal muscle contraction. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology* **29**, 885-890.
- Ghosh, A. and Sil, P.C. (2007) Anti-oxidative effect of a protein from *Cajanus indicus* L against acetaminophen-induced hepatonephro toxicity. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 1039-1049.
- Greenhaff, P.L. (1997) The nutritional biochemistry of creatine. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **11**, 610-618.
- Gregory, C.R. (2003) Urinary system. In: *Duncan & Prasse's Veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. Eds: Latimer, K.S., Mahaffey, E.A. and Prasse, K.W. Philadelphia: Blackwell Publishing Company. 231-257.
- Groeneveld, G.J., Beijer, C., Veldink, J.H., Kalmijn, S., Wokke, J.H. and Van Den Berg, L.H. (2005) Few adverse effects of long-term creatine supplementation in a placebo-controlled trial. *International Journal of Sports Medicine* **26**, 307-313.
- Gualano, B., Artioli, G.G., Poortmans, J.R. and Lancha Junior, A.H. (2009) Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids* Mar 1. [Epub ahead of print].
- Guerrero-Ontiveros, M.L. and Wallimann, T. (1998) Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: Down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry* **184**, 427-437.
- Ipsiroglu, S.O., Stromberger, C., Ilas, J., Höger, H., Mühl, A. and Ipsiroglu-Stockler, S. (2001) Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. *Life Sciences* **69**, 1805-1815.
- Jeong, K.S., Park, S.J., Lee, C.S., Kim, T.W., Kim, S.H., Ryu, S.Y., Williams, B.H., Veech, R.I. and Lee, Y.S. (2000) Effects of cyclocreatine in rat hepatocarcinogenesis model. *Anticancer Research* **20**, 1627-1633.
- Koshy, K.M., Griswold, E. and Schneeberger, E.E. (1999) Interstitial nephritis in a patient taking creatine. *The New England Journal of Medicine* **340**, 814-815.
- Kreider, R.B. (2003) Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Molecular and Cellular Biochemistry* **244**, 89-94.
- Kreider, R.B., Melton, C., Rasmussen, C.J., Greenwood, M., Lancaster, S., Cantler, E.C., Milnor, P. and Almada, A.L. (2003) Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **244**, 95-104.
- Maughan, R.J., King, D.S. and Lea, T. (2004) Dietary supplements. *Journal of Sports Sciences* **22**, 95-113.
- Mayhew, D.L., Mayhew, J.L. and Ware, J.S. (2002) Effects of long-term creatine supplementation on liver and kidney functions in American college football players. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* **12**, 453-460.
- McGuire, M., Bradford, A. and MacDermott, M. (2002). Contractile properties of the diaphragm in creatine-fed rats. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology* **29**, 782-783.
- Mihic, S., Macdonald, J.R., McKenzie, S. and Tarnopolsky, M.A. (2000) Acute creatine loading increases fat-free mass, but does not affect blood pressure, plasma creatinine, or CK activity in men and women. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **32**, 291-296.
- Nunez, M. (2006) Hepatotoxicity of antiretrovirals: incidence, mechanisms and management. *Journal of Hepatology* **44**, 132-139.
- Ööpik, V., Timpmann, S., Medijainem, L. and Aleksejeva, T. (1996) Effect of creatine administration on blood urea level and post-exercise glycogen repletion in liver and skeletal muscle in rats. *Annals of Nutrition & Metabolism* **40**, 359-363.
- Osorio, R.A., Christofani, J.S., D'almeida, V.K. and Picarro, I.C. (2003a) Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative Pharmacology and Toxicology* **135**, 89-95.
- Osorio, R.A., Silveira, V.L., Maldjian, S., Morales, A., Christofani, J.S., Russo, A.K., Silva, A.C. and Picarro, I.C. (2003b) Swimming of pregnant rats at different water temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **135**, 605-611.
- Peake, J., Nosaka, K. and Suzuki, K. (2005) Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exercise Immunology Review* **11**, 64-85.
- Pline, K.A. and Smith, C.L. (2005) The effect of creatine intake on renal function. *The Annals of Pharmacotherapy* **39**, 1093-1096.
- Poortmans, J.R. and Francaux, M. (1999) Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **31**, 1108-1110.
- Poortmans, J.R. and Francaux, M. (2000) Adverse effects of creatine supplementation: fact or Fiction? *Sports Medicine* **30**, 155-170.
- Poortmans, J.R., Auquier, H., Renaut, V., Durussel, A., Saugy, M. and Brissot, G.R. (1997) Effect of short-term creatine supplementation on renal responses in men. *European Journal of Applied Physiology* **76**, 566-567.
- Poortmans, J.R., Kumps, A., Duez, P., Fofonka, A., Carpentier, A. and Francaux, M. (2005) Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **37**, 1717-1720.
- Pritchard, N.R. and Kaira, P.A. (1998) Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. *Lancet* **352**, 1252-1253.
- Robinson, T.M., Sewell, D.A., Casey, A., Steenge, G. and Greenhaff, P.L. (2000) Dietary creatine supplementation does not affect some haematological indices, or indices of muscle damage and hepatic and renal function. *British Journal of Sports Medicine* **34**, 284-288.
- Schilling, B.K., Stone, M.H., Utter, A., Kearney, J.T., Johnson, M., Coglianese, R., Smith, L., O'bryant, H.S., Fry, A.C., Starks, M., Keith, R. and Stone, M.E. (2001). Creatine supplementation and health variables: a retrospective study. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **33**, 183-188.
- Shao, A., Hathcock, J.N. (2006). Risk assessment for creatine monohydrate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **45**, 242-251.
- Taes, Y.E., Delanghe, J.R., Wuyts, B., Van De Voorde, J. and Lameire, N.H. (2003) Creatine supplementation does not affect kidney function in an animal model with pre-existing renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**(2), 258-264.
- Tarnopolsky, M.A., Bourgeois, J.M., Snow, R., Keys, S., Roy, B.D., Kwieci, J.M. and Turnbull, J. (2003) Histological assessment of intermediate and long-term creatine monohydrate supplementation in mice and rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **285**, 762-769.
- Terjung, R.L., Clarkson, P., Eichner, E.R., Greenhaff, P.L., Hespel, P.J., Israel, R.G., Kraemer, W.J., Meyer, R.A., Spriet, L.L., Tarnopolsky, M.A., Wagenmakers, A.J. and Williams, M.H. (2000) American College of Sports Medicine roundtable. The physiological and health effects of oral creatine supplementation. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **32**, 706-717.
- Thorsteinsdottir, B., Grande, J.P. and Garovic, V.D. (2006) Acute renal failure in a young weight lifter taking multiple food supplements, including creatine monohydrate. *Journal of Renal Nutrition* **16**(4), 341-345.
- Van Der Meulen J.H., Kuipers, H. and Drukker, J. (1991) Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *Journal of Applied Physiology* **71**, 999-1004.
- Vieira, R.P., Duarte, A.C., Claudino, R.C., Perini, A., Santos, A.B., Moriya, H.T., Arantes-Costa, F.M., Martins, M.A., Carvalho, C.R. and Dolhnikoff, M. (2007) Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **37**, 660-667.
- Vieira, R.P., França, R.F., Damaceno-Rodrigues, N.R., Dolhnikoff, M., Caldini, E.G., Carvalho, C.R. and Ribeiro, W. (2008a) Dose-dependent hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **40**, 842-847.

- Vieira, R.P., Duarte AC, Santos AB, Medeiros MC, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. (2008b) Exercise reduces effects of creatine on lung. *International Journal of Sports Medicine* **30**, 684-690.
- Volek, J.S. and Kraemer, W.J. (1996) Creatine supplementation: its effect on human muscular performance and body composition. *Journal of Strength & Conditioning Research* **10**, 200-210.
- Waldron, J.E., Pendlay, G.W., Kilgore, T.G., Haff, G.G. and Reeve, J.S. (2002) Concurrent creatine monohydrate supplementation and resistance training does not affect markers of hepatic function in trained weightlifters. *Journal of Exercise Physiology Online* **5**, 1-11.
- Walker, J.B. (1979) Creatine Biosynthesis, regulation and function. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **50**, 117-242.
- Yoshizumi, W.M. and Tsourounis, C. (2004) Effects of creatine supplementation on renal function. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* **4**, 1-7.
- Young, R.E. and Young, J.C. (2007). The effect of creatine supplementation on mass and performance of rat skeletal muscle. *Life Sciences* **81**, 710-716.
- Yu, P.H. and Deng, Y. (2000) Potential cytotoxic effect of chronic administration of creatine, a nutrition supplement to augment athletic performance. *Medical Hypotheses* **54**, 726-728.

Key points

- Creatine supplementation is an established ergogenic aid in sports and is now claimed to have therapeutical applications in a variety of diseases.
- Although acknowledged, this nutritional supplement is rarely monitored precisely about their possible side effects.
- Previous studies indicated that short-term creatine supplementation associate with the physical exercise may be safe, but the effect of long-term creatine supplementation is still unknown.
- There is a need for further research to elucidate the controversial points refers to renal and hepatic function after creatine supplementation.
- The results of the current study indicate that supra-physiological long-term creatine supplementation (up to 4-8 weeks) may adversely affect kidney and liver structure and function of sedentary but not of exercised rats.

AUTHORS BIOGRAPHY



Renato Aparecido de SOUZA

Employment

Assistant Professor
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)
Departamento de Fisioterapia
Diamantina/MG, Brasil

Degrees

PT, MSc, PhD

Research interests

Skeletal muscle investigations, ergogenic aids.

E-mail: tatosouza2004@yahoo.com.br



Humberto MIRANDA

Employment

Universidade do Vale do Paraíba. Institute of Research and Development. São Paulo.

Degrees

MSc, PhD

Research interests

Resistance training and Skeletal Muscle investigations

E-mail: humbertomiranda01@gmail.com



Murilo XAVIER

Employment

Universidade do Vale do Paraíba. Institute of Research and Development. São Paulo.

Degree

PT, MSc

Research interests

Low Level Laser Therapy, Skeletal Muscle investigations

E-mail: xaviermurilo@hotmail.com



Rodrigo A. LAZO-OSORIO

Universidade do Vale do Paraíba. Institute of Research and Development. São Paulo.

Degree

PT, MSc, PhD

Research interests

Cardiovascular rehabilitation, Skeletal Muscle investigations

E-mail: ralo@univap.br



Hélio A. GOUVÊA

Employment

Universidade do Vale do Paraíba. Institute of Research and Development. São Paulo.

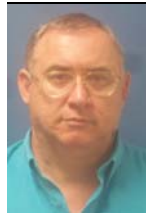
Degree

MSc

Research interests

Resistance training and behavioral sensitization to drugs investigations

E-mail: hhgouvea@yahoo.com.br



José C. COGO

Employment

Universidade do Vale do Paraíba. Institute of Research and Development. São Paulo.

Degrees

MSc, PhD

Research interests

Skeletal Muscle investigations, snake venom studies

E-mail: cogo@univap.br

**Rodolfo P. VIEIRA****Employment**

Albert-Ludwigs University of Freiburg. COPD and Asthma Research Group. Freiburg, Germany. Department of Pathology (LIM 05), School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Degrees

MSc, PhD, PD

Research interests

Interaction between exercise and ergogenic aids in pathological situations.

E-mail: rodrelena@yahoo.com.br

**Wellington RIBEIRO****Employment**

Universidade do Vale do Paraíba. Institute of Research and Development. São Paulo.

Degrees

MSc, PhD

Research interests

Pharmacological investigations, ergogenic aids

E-mail: gton@univap.br

✉ Renato Aparecido de Souza

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, CEP 12220-000, São José dos Campos, SP, Brasil

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE CREATINA
SOBRE MARCADORES ENZIMÁTICOS DE DANO MUSCULAR DE RATOS
SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS COM NATAÇÃO**

Renato Aparecido de Souza^{1,2}

Humberto Miranda¹

Murilo Xavier¹

Rodrigo Aléxis Lazo Osório¹

Belmiro Freitas de Salles³

Roberto Simão⁴

Wellington Ribeiro¹

1. Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D) - Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP – BRASIL.

2. Departamento de Fisioterapia – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

3. Laboratório de Pesquisa em Microcirculação (Departamento de Ciências Fisiológicas) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ.

4. Escola de Educação Física e Desportos – Universidade Federal do Rio de Janeiro (EEFD/UFRJ).

Endereço para correspondência:

Renato Aparecido de Souza. Rua João Nunes de Oliveira Jr. 140, FOCH. Pouso Alegre/MG. 37550-000. e-mail: tatosouza2004@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação aguda ($5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ durante 1 semana) e crônica ($1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ durante 4 e 8 semanas) de creatina (Cr) sobre as concentrações plasmáticas de Creatina Quinase (CQ), Lactato Desidrogenase (LDH) e Aspartato Aminotransferase (AST), de ratos sedentários e exercitados (natação a 80% da carga máxima tolerada). Setenta e dois ratos Wistar machos ($250 \pm 10\text{g}$) foram utilizados e divididos igualmente em 4 grupos: ratos sedentários não suplementados (CON; $n = 18$); ratos exercitados não suplementados (NAT; $n = 18$); ratos sedentários e suplementados (CRE; $n = 18$); ratos exercitados e suplementados (CRE+NAT; $n = 18$). Ao final da primeira, quarta e oitava semanas, seis animais de cada grupo foram sacrificados. Os resultados demonstraram: (1) ao final da primeira semana elevação plasmática de CQ, LDH e AST nos grupos NAT-1 e CRE+NAT-1 em relação aos grupos CON-1 e CRE-1; (2) ao final da quarta semana valores superiores para CQ e LDH somente no grupo NAT-4; e (3) ao final da oitava semana, somente os valores de AST do grupo CRE-8 diferiram dos demais. Estes achados sugerem que a suplementação de Cr pode influenciar positivamente a resposta de marcadores enzimáticos indiretos de dano muscular em ratos exercitados com natação após 4 semanas de suplementação.

Unitermos: recurso ergogênico, dano muscular, estresse oxidativo

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of the short-term ($5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 1 week) and long-term ($1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 4 and 8 weeks) creatine supplementation on the Creatine Kinase (CK), Lactate Dehydrogenase (LDH) and Aspartate Aminotransferase (AST) plasmatic concentrations of sedentary and exercised (swimming to 80% of the tolerated maximum load) rats. Seventy two Wistar males rats ($250 \pm 10\text{g}$) were equally divided in 4 groups: sedentary rats without supplementation (CON; $n = 18$); exercised rats without supplementation (NAT; $n = 18$); sedentary rats with supplementation (CRE; $n = 18$); exercised rats with supplementation (CRE+NAT; $n = 18$). At the end of the first, fourth and eighth weeks six animals of each group were sacrificed. The results demonstrated: (1) at the end of the first week was observed a improvement of CK, LDH and AST in NAT-1 and CRE+NAT-1 groups *vs.* CON-1 and CRE-1 groups; (2) to the end of the fourth week higher values of CQ and LDH only NAT-4 group; and (3) to the end of the eighth week only AST from CRE-8 group differed from other groups. These findings suggest that the Cr supplementation can positively influence the indirect enzymatic markers of muscle damage on swimming exercised rats after 4 weeks of creatine supplementation.

Uniterms: ergogenic resource, muscular damage, oxidative stress

1 INTRODUÇÃO

2
3 A extensão do dano muscular decorrente do exercício depende da intensidade e
4 duração do esforço físico, da prévia condição das fibras musculares e especialmente do
5 tipo de contração realizada (HIROSE, NOSAKA, NEWTON, LAVEDER, KANO,
6 PEAKE e SUZUKI, 2004). É observado que atividades físicas envolvendo contrações
7 excêntricas, como as geradas pelo treinamento de força de alta intensidade são as
8 maiores responsáveis pelos danos musculares exercício-induzidos (YU, MALM e
9 THORNELL, 2002; MACINTYRE, SORICHTER, MAIR, BERG e MCKENZIE,
10 2001). Nos exercícios de característica predominantemente aeróbia, o dano muscular
11 também pode ocorrer, contudo, associado a outros fatores, como o estresse oxidativo
12 (POWERS e JACKSON, 2008; NIESS e SIMON, 2007). Contudo, após a lesão
13 muscular ocorrem mudanças ultra-estruturais sobre a sarcolema que desencadeiam uma
14 série de eventos independentemente de o dano muscular ser de etiologia mecânica ou
15 metabólica: ativação de células inflamatórias, alteração da homeostase de cálcio,
16 isquemia e reperfusão, liberação de conteúdo enzimático para o líquido extracelular e
17 ativação de células satélites (GOLDFARB, BLOOMER e MCKENZIE, 2005;
18 WILLOUGHBY, ROSENE e MYERS, 2003; HESSEL, HABERLAND, MULLER,
19 LERCHE e SCHIMKE, 2000). Além disso, a literatura descreve que as lesões
20 musculares diminuem o desempenho físico, e dessa forma, estratégias medicamentosas
21 e nutricionais devem ser investigadas quanto à possibilidade de interferirem
22 positivamente sobre esse aspecto (BEMBEN e LAMONT, 2005).

23 Nesse sentido, a suplementação de creatina (Cr) tem sido investigada em estudos
24 com propósitos ergogênicos e terapêuticos (GUALANO, ARTIOLI, POORTMANS e
25 LANCHÁ JUNIOR, 2009; BEMBEN e LAMONT, 2005; BENDER, AUER, MERL,
26 REILMANN, SAEMANN, YASSOURIDIS, BENDER, WEINDL, DOSE, GASSER e
27 KLOPSTOCK, 2005). A Cr é uma amina nitrogenada encontrada naturalmente nos
28 alimentos de origem animal e sintetizada endogenamente a partir dos aminoácidos
29 arginina, glicina e metionina (PERSKY e BRAZEAU, 2001). Cerca de 95% de toda Cr
30 orgânica está armazenada na musculatura estriada esquelética, especialmente sob a
31 forma de fosforilcreatina (PCr), o qual serve como tampão imediato de Adenosina
32 Trifosfato (ATP) durante o exercício (GREENHAFF, 1997; WALKER, 1979).
33 Consequentemente, as pesquisas envolvendo esse suplemento focam primariamente seu
34 papel bioquímico e fisiológico na bioenergética do tecido muscular. Diversos

mecanismos foram propostos para justificar seus aspectos ergogênicos: aumento da disponibilidade e resíntese de PCr, aumento do tamponamento de íons hidrogênio (H^+) reduzindo a acidez muscular, redução do acúmulo de lactato, aumento da atividade da enzima Citrato Sintase (CS), um marcador da capacidade oxidativa e aumento da massa muscular (SOUZA, SANTOS, OSORIO, COGO, PRIANTI JÚNIOR, MARTINS e RIBEIRO, 2006; BRANNON, ADAMS, GONNIFF, e BALDWIN, 1997). Entretanto, com a identificação de que o aumento dos níveis de PCr promovidos pela suplementação de Cr exerce um efeito cardioprotetor ao reduzir a extensão do infarto do miocárdio (SAKS e STRUMIA, 1993), foi despertado o interesse de pesquisadores em analisar se a Cr exerceria efeito semelhante sobre o tecido muscular estriado esquelético submetido ao estresse físico.

Por conta dessas propriedades, a suplementação de Cr poderia exercer um efeito protetor sobre o tecido muscular estriado esquelético submetido ao estresse promovido pelo exercício físico (RAWSON, GUNN e CLARKSON, 2001). Esses autores investigaram os efeitos da suplementação de Cr sobre o dano muscular exercício-induzido em humanos, mensurando produção de força e concentração de proteínas musculares séricas: Creatina Quinase (CQ), Lactato desidrogenase (LDH) e Aspartato Aminotransferase (AST). Após o treinamento muscular, foi observado lesão de natureza mecânica com consequente redução da força e aumento da concentração sérica protéica, sem diferença entre os atletas que recebiam placebo ou suplementação de Cr. Em modelo animal, WARREN, FENNESSY e MILLARD-STAFFORD (2000) também não encontraram melhora na perda de força muscular associada a suplementação de Cr após o dano muscular exercício-induzido. Ao contrário dos resultados encontrados por RAWSON, GUNN e CLARKSON (2001) e WARREN, FENNESSY e MILLARD-STAFFORD (2000), SANTOS, BASSIT, CAPERUTO e COSTA ROSA (2004) concluíram que a suplementação de Cr reduziu o dano muscular e a resposta inflamatória através da observação de que a Cr atenua o incremento pós-exercício de CQ, prostaglandina E_2 , fator de necrose tumoral α e LDH em maratonistas após 30 km de corrida. Assim, a suplementação de Cr parece não interferir diretamente sobre as lesões musculares de etiologia mecânica, mas poderia beneficiar o desempenho físico e minimizar as lesões musculares, especialmente em atividades exaustivas (BEMBEN e LAMONT, 2005).

Conforme SASTRE, ASENSI, GASCÓ, PALLARDÓ e VIÑA (1992), o exercício físico promove lesões de natureza oxidativa somente quando é

significativamente estressante e exaustivo. Com intuito de melhor compreender esse fenômeno, tem sido observado em ratos que a natação é um adequado modelo para induzir mudanças nos marcadores de estresse oxidativo e consequentemente de dano muscular (KARANTH e JEEVARATNAM, 2005; KARANTH, KUMAR e JEEVARATNAM, 2004). Contudo, ainda são pouco conhecidos os efeitos da suplementação de Cr e de sua associação com o estresse físico imposto pela natação (GALLO, GORDON, SYROTUIK, SHU, TYREMAN, MACLEAN, KENWELL e PUTMAN, 2006). Além disso, embora a literatura relacione o possível efeito protetor da suplementação de Cr em atividades exaustivas como a maratona, faltam estudos que esclareçam a resposta de marcadores indiretos de lesão muscular em sessões de exercícios de natação. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação de Cr sobre marcadores enzimáticos de dano muscular em ratos sedentários e exercitados com natação, tanto em caráter agudo, como crônico.

MÉTODOS

Amostra

Foram utilizados 72 ratos (250 ± 10 g) machos Wistar (*Rattus Norvegicus*), adultos jovens (10-12 semanas de idade), obtidos da fazenda Bem-te-vi (Paulínia/SP). Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno no biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba com temperatura (22-25°C), umidade relativa (40-60%) e fotoperíodo (ciclo de 12 horas claro-escuro) controlados. Além disto, todos os animais tiveram acesso à ração peletizada e água *ad libitum*. O estudo teve duração de oito semanas, os animais foram divididos igualmente em 4 grupos experimentais: ratos sedentários não suplementados (CON; n = 18); ratos exercitados não suplementados (NAT; n = 18); ratos sedentários e suplementados (CRE; n = 18); ratos exercitados e suplementados (CRE+NAT; n = 18). Todos os procedimentos adotados neste estudo estavam de acordo com os princípios de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIVAP (Protocolo nº L022-2005-CEP).

Procedimentos

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação à natação (30 minutos diários sem carga, durante cinco dias consecutivos) para reduzir fatores ligados ao estresse promovido pela atividade do nado (VOLTARELLI, GOBATTO e MELLO, 2002). Durante este período a creatina não foi administrada. Após a adaptação, os animais foram individualmente submetidos ao teste de carga máxima (TCM) (OSORIO, SILVEIRA, MALDJIAN, MORALES, CHRISTOFANI e RUSSO 2003a; OSORIO, CHRISTOFANI, D'ALMEIDA, RUSSO e PICARRO, 2003b). O TCM é caracterizado pela introdução de células de carga (placas de cobre) correspondendo a 0%, 1%, 2%, 3%, etc. da massa corporal total do animal, colocadas a cada 3 minutos, em uma tira elástica posicionada junto ao tórax do animal até sua exaustão. A exaustão foi determinada pela incapacidade do animal manter-se sob a superfície da água por oito segundos (OSORIO, SILVEIRA, MALDJIAN, MORALES, CHRISTOFANI e RUSSO 2003a; OSORIO, CHRISTOFANI, D'ALMEIDA, RUSSO e PICARRO, 2003b). Quando da exaustão, o TCM encerrava-se e as placas de cobre encontradas na tira elástica do animal eram pesadas para verificação da carga máxima tolerada. Esse procedimento permitiu o ajuste da carga de trabalho para o treinamento físico a 80% da carga máxima.

O treinamento físico a 80% da carga máxima foi realizado em grupos de seis animais devido à promoção de exercício mais vigoroso quando comparado ao nado individual (VOLTARELLI, GOBATTO e MELLO, 2002). Foi demonstrado previamente que essa intensidade de exercício promove significativo aumento de lactato sanguíneo indicando importante estresse físico (SOUZA, SANTOS, OSORIO, COGO, PRIANTI JÚNIOR, MARTINS e RIBEIRO, 2006). Este treinamento ocorreu cinco vezes por semana com sessões diárias de treinamento de 30 minutos somente nos grupos experimentais NAT e CRE+NAT. Foram utilizados coletes contendo pesos de chumbo e posicionados junto ao tórax de cada animal (VOLTARELLI, GOBATTO e MELLO, 2002; OSORIO, SILVEIRA, MALDJIAN, MORALES, CHRISTOFANI e RUSSO 2003a; OSORIO, CHRISTOFANI, D'ALMEIDA, RUSSO e PICARRO, 2003b). Ao final de cada semana experimental, novo TCM foi realizado para possíveis reajustes da carga de treinamento. O protocolo de natação foi realizado em um tanque de amianto com capacidade para 250 litros de água, mantidos a temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (OSORIO, SILVEIRA, MALDJIAN, MORALES, CHRISTOFANI e RUSSO 2003a).

A suplementação foi realizada por meio de uma sonda oro-esofágica (1mm de diâmetro; 3cm de comprimento) adaptada a uma seringa de 3 ml, tendo a água como veículo de infusão (*gavage*). Este procedimento ocorreu diariamente após o período de adaptação ao nado duas horas antes do treinamento físico. Foi instituída durante a primeira semana do experimento (*loading phase*) a dose de 5g de Cr/kg de massa corporal do animal e, após a primeira semana (fase de manutenção), a dose de 1g de Cr/kg de massa corporal do animal para todos os animais suplementados (CRE e CRE+NAT). Esse regime de dosagem é equivalente ao utilizado por humanos para promover efeitos ergogênicos associados com aumento do conteúdo intramuscular de Cr. (TARNOPOLSKY, BOURGEOIS, SNOW, KEYS, ROY e KWIEEEN, 2003; BRANNON, ADAMS, GONNIFF e BALDWIN, 1997). Além disso, em estudo prévio foi observado aperfeiçoamento do metabolismo de glicose e lactato após esse regime de suplementação (SOUZA, SANTOS, OSORIO, COGO, PRIANTI JÚNIOR, MARTINS e RIBEIRO, 2006). Os animais dos grupos CON e NAT também foram submetidos ao estresse da *gavage*, contudo, sem a suplementação de Cr. Para facilitar a absorção do suplemento e minimizar qualquer risco de contaminação do produto foi utilizada creatina micronizada com pureza assegurada.

Os quatro grupos experimentais (CON, NAT, CRE e CRE+NAT) foram constituídos inicialmente de 18 animais cada um. Contudo o modelo experimental exigiu a subdivisão dos grupos experimentais em 3 subgrupos (cada um com 6 animais), e de acordo com o período do estudo analisado (após 1, 4 e 8 semanas). Após o período de estudo instituído para cada grupo experimental, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. O sacrifício foi realizado após dois dias da última sessão de treinamento, para atenuar os efeitos agudos do exercício (NAKAO, OOKAWARA, KIZAKI, OH-ISHI, MIYAZAKI, HAGA, SATO, JI, e OHNO, 2000). Foi adotado como anestésico o etoxietano, pois promove ação depressora no Sistema Nervoso Central sem provocar qualquer disfunção tecidual. Os animais foram sacrificados através de administração de Cloreto de Potássio (KCl) 20% intracardíaco, ainda sob efeito anestésico, e após a realização dos procedimentos experimentais listados a seguir.

Alcançada a indução anestésica, as amostras sanguíneas (3ml) foram coletadas da veia cava inferior dos animais com seringas de 5ml, utilizando agulhas de calibre 25x7mm, após afastamento prévio das vísceras anteriores ao vaso. O sangue coletado foi colocado em tubos de ensaio sem a presença de anticoagulantes e centrifugado a 3000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C em centrífuga (Excelsa II[®] – Mod. 206BL). Em

seguida, separadas as amostras plasmáticas do sangue de cada animal, essas foram conduzidas para as determinações bioquímicas específicas através de kits comerciais (Laborlab[®]), por meio de um espectrofotômetro (Hitachi[®] – Modelo U-2001). Foram realizados os testes de determinação plasmática das enzimas Creatina Quinase (CQ), Lactato Desidrogenase (LDH) e Aspartato Aminotransferase (AST).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) 4 x 4 para medidas repetidas entre os grupos experimentais nos diferentes períodos experimentais. O teste *post hoc* de Tukey, para comparações múltiplas, foi empregado para a identificação das diferenças específicas nas variáveis em que os valores de F encontrados foram superiores ao critério de significância estatística estabelecido ($p < 0,05$).

RESULTADOS

As figuras 1, 2 e 3 revelam os valores médios e desvio-padrão das concentrações plasmáticas de Creatina Quinase (CQ), Lactato Desidrogenase (LDH) e Aspartato Aminotransferase (AST), respectivamente. Após a primeira semana de estudo, observamos um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de CQ, LDH e AST quando comparamos os grupos NAT-1 e CRE+NAT-1 *versus* os grupos CON-1 e CRE-1. Ao final da quarta semana experimental observamos que os animais do grupo NAT-4 apresentaram valor médio de CQ e LDH superior ($p < 0,05$) em relação os demais grupos (CON-4, CRE-4 e CRE+NAT-4). Com relação à análise plasmática de AST ao final da quarta semana, embora os grupos NAT-4 e CRE+NAT-4 tenham apresentado maiores valores em relação os grupos CON-4 e CRE-4, essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). No último período experimental, com exceção dos achados para AST no grupo CRE-8 em relação os demais grupos (CON-8, CRE-8 e CRE+NAT-8), não encontramos diferenças significativas de CQ e LDH entre os grupos experimentais.

INSERIR FIGURAS 1, 2, e 3

DISCUSSÃO

1 É estabelecido que o exercício físico de longa duração e intensidade pode gerar
2 dano muscular induzido por hipóxia (estresse oxidativo) com conseqüente elevação
3 plasmática das enzimas AST, LDH e CQ (ENDO, NAKAJIMA, SAKAMOTO e
4 KOMIYAMA, 2005; COUDREUSE, DUPONT e NICOL, 2004; CHEUNG, HUME e
5 MAXWELL, 2003; LIEBER e FRIDEN, 2002). Além disso, tem sido descrito alta
6 correlação entre aumento da permeabilidade da sarcolema com conseqüente liberação
7 de enzimas musculares, em função da realização de exercícios físicos desabituais
8 (BRANCACCIO, MAFFULLI E LIMONGELLI, 2007). No presente estudo, após a
9 primeira semana foi observado significativo aumento das enzimas analisadas nos grupos
10 que praticavam a natação (NAT-1 e CRE+NAT-1).

11 A natação *per si* representa um importante agente causador de estresse quando
12 imposta a ratos (VOLTARELLI, GOBATTO e MELLO, 2002). Considerando a
13 associação desse fato com o protocolo de treinamento de alta intensidade adotado (80%
14 da carga máxima, durante 30 minutos diários), fica justificado porque após a primeira
15 semana experimental, somente nos grupos exercitados as enzimas CQ, LDH e AST
16 estavam significativamente aumentadas. Ou seja, é provável que o estresse promovido
17 pela própria atividade física tenha sido o responsável por esse fenômeno.

18 Conforme descrito por KOMULAINEN, TAKALA e VIHKO (1995), a
19 atividade sérica da enzima CQ pode aumentar sem concomitantemente lesão muscular
20 após um protocolo de natação e que o dano muscular pode ocorrer sem um aumento
21 significativo desse mesmo marcador após um protocolo em esteira utilizando ratos
22 como modelo animal. Por outro lado, CHEN, SERFASS e APPLE (2000) concluíram
23 que a natação prolongada e de forma intensa acarreta maior perda das frações de CQ
24 muscular e mitocondrial tanto em fibras musculares vermelhas quanto brancas. Nesse
25 sentido, fica claro a variabilidade na medida dessa enzima CQ, e este marcador indireto
26 de dano muscular, não é evidentemente o mais representativo para analisar esse
27 fenômeno. Contudo, é importante ressaltar que no presente estudo outras duas enzimas
28 de ocorrência preferencial no tecido muscular estriado esquelético (AST e LDH)
29 também estavam aumentadas após a primeira semana nos grupos exercitados,
30 reforçando a provável lesão muscular induzida pela natação.

31 Ao observar que o grupo CRE+NAT-1 apresentou resultados semelhantes aos
32 encontrados pelo grupo NAT-1 é possível descartar um possível efeito agudo protetor
33 da suplementação da Cr sobre o tecido muscular estriado esquelético submetido ao
34 estresse do nado. Embora RAWSON, CONTI e MILES (2007) e RAWSON, GUNN e

CLARKSON (2001) tenham utilizado um modelo de lesão muscular diferente do presente estudo (exercícios excêntricos), esses autores ao analisarem as concentrações séricas de enzimas musculares também não observaram redução do dano muscular após a suplementação aguda de Cr (5 dias de suplementação).

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado um potencial efeito da suplementação de Cr sobre a recuperação e manutenção da integridade muscular (SANTOS, BASSIT, CAPERUTO e COSTA ROSA, 2004). Esses autores avaliaram o efeito da suplementação de Cr e de maltodextrina por cinco dias em corredores de maratona, enquanto outro grupo recebia apenas a mesma dosagem de maltodextrina. Níveis de CQ e LDH foram analisados antes e depois da corrida e comparado entre os grupos, apresentando níveis menores no grupo suplementado. Estes dados sugerem que a suplementação de Cr reduziu os danos celulares e inflamatórios após uma corrida intensa. MENEZES, SOBREIRA, NEDER, RODRIGUES-JÚNIOR e MARTINEZ (2007), investigaram 44 ratos divididos em 4 grupos submetidos à exercício na esteira durante 18 dias. No primeiro grupo era utilizado placebo; no grupo 2, creatina; no grupo 3, dexametasona; e no grupo 4, dexametasona e creatina. A dexametasona é um medicamento com ação anti-inflamatória, porém um de seus efeitos colaterais é a miopatia. Nesse estudo foi verificado que a suplementação de Cr atenuava os efeitos das doses de dexametasona, sugerindo que a Cr pode desempenhar um papel na profilaxia ou tratamento de miopatia induzida por esta droga.

No presente estudo foi observado que após a quarta semana experimental somente o grupo NAT-4 continuou apresentando valores enzimáticos significativamente superiores de LDH e CQ. É importante destacar que os animais do grupo CRE+NAT-4 apresentaram redução nos valores plasmáticos dos marcadores indiretos do dano muscular, sugerindo interferência da suplementação de Cr sobre esse fenômeno. É provável que o protocolo de natação instituído neste estudo durante 4 semanas tenha sido suficientemente intenso para gerar lesão muscular associada ao estresse oxidativo (SOUZA, SANTOS, OSORIO, COGO, PRIANTI JÚNIOR, MARTINS e RIBEIRO, 2006). Neste contexto, tem sido descrito três possíveis mecanismos de prevenção ou redução do dano muscular associados com a suplementação de Cr: estabilização de membranas celulares, homeostase energética mitocondrial e redução de lesões oxidativas (PERSKY e BRAZEAU, 2001). Devido sua natureza anfipática, a Cr é capaz de vincular as porções polares fosfolipídicas à membrana muscular, estabilizando a bicamada lipídica da sarcolema, reduzindo a fluidez, tornando-a mais ordenada e

diminuindo sua permeabilidade (SAKS e STRUMIA, 1993). A homeostase energética mitocondrial é fundamental para impedir a ativação da degradação de purinas para fornecer adenosina monofosfato (AMP) através do ciclo de Lowenstein. As principais conseqüências da ativação dessa via são a produção paralela de amônia, hipoxantina, xantina, urato e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL, 2006). BELLINGER, BOLD, WILSON, NOAKES e MYBURGH (2000) demonstraram que a suplementação de Cr previamente ao exercício intenso resultou em queda, tanto na produção de amônia como na de hipoxantina. Esses autores hipotetizaram que o aumento nos estoques intracelulares de Cr pelo treinamento físico, ou seu consumo adicional previamente à realização do exercício intenso, possa servir como antioxidante indireto. WYSS e SCHULZE (2000) sugeriram que a suplementação de Cr interfere com a homeostase de cálcio intracelular favorecendo mais um possível mecanismo antioxidante indireto desse suplemento. Além disso, a suplementação de Cr parece diminuir os níveis de homocisteína (aminoácido promotor de formação de EROs, especialmente o ânion superóxido O_2^-), justificando novamente seu efeito antioxidante indireto (DEMINICE, VILHENA, PORTARI E JORDÃO, 2007).

Recentemente, autores têm sugerido e testado o potencial da Cr em agir diretamente na remoção de EROs (SESTILI, MARTINELLI, BRAVI, PICCOLI, CURCI, BATTISTELLI, FALCIERI, AGOSTINI, GIOACCHINI e STOCCHI, 2006). Esses autores observaram que a suplementação de Cr atenuou os efeitos citotóxicos causados por oxidantes em todas as células em cultura estudadas (promonócitos, células endoteliais e mioblastos. Além disso, DANGOTT, SCHULTZ e MOZDZIAK (2000) observaram que a suplementação de Cr incrementou a ativação de células satélites musculares, as quais contribuem com o processo de regeneração do tecido muscular esquelético.

Todos esses aspectos supracitados poderiam justificar porque os valores plasmáticos das enzimas CQ e LDH apresentaram reduzidos no grupo CRE+NAT-4 quando comparados ao grupo NAT-4. Ainda ao final desse período experimental, a enzima AST apresentou-se de forma semelhante entre os grupos exercitados. Para GUYOTTO e ALVES (2001) esta resposta da AST é característica de dano agudo com evolução para o restabelecimento de integridade tecidual. Na tentativa de melhor explicar esse achado também hipotetizou-se que o alto peso molecular dessa enzima comparado as enzimas CQ e LDH reduz sua capacidade de difusão de membrana dificultando sua elevação plasmática (COOKE, RYBALKA, WILLIAMS, CRIBB e

1 HAYES, 2009); e ao final da quarta semana de treinamento é possível algum grau de
2 adaptação ao nado que decline a intensidade da lesão muscular (BRANCACCIO,
3 MAFFULLI E LIMONGELLI, 2007).

4 Esse último aspecto pode ser melhor observado nos resultados obtidos após a
5 oitava semana experimental. Ambos os grupos exercitados (CRE+NAT-8 e NAT-8)
6 apresentaram valores semelhantes ($p>0,05$) em relação os grupos sedentários,
7 justificando o efeito protetor da carga de treinamento ao longo do tempo
8 (BRANCACCIO, MAFFULLI E LIMONGELLI, 2007). Novamente, como ocorreu ao
9 final da primeira semana experimental a suplementação de Cr parece não interferir
10 sobre a resposta de marcadores indiretos da lesão muscular.

11 De forma interessante, ao final da oitava semana, a concentração plasmática de
12 AST foi significativamente superior no grupo CRE-8 em relação aos demais grupos
13 experimentais. Acreditamos que como essa enzima está associada a distúrbios de outros
14 órgãos como fígado, esse achado não esteja diretamente relacionado com uma resposta
15 muscular. De fato, a análise histológica do fígado dos animais desse grupo revelou
16 indícios de lesão hepática, remetendo-nos a hipotetizar que a suplementação de Cr em
17 animais sedentários em longo prazo pode causar algum dano hepático (SOUZA, 2006).

18 Por fim, é importante ressaltar que a suplementação de Cr produz efeitos e
19 respostas distintas (biodisponibilidade, captação, efeitos ergogênicos e adversos)
20 mesmo em espécies evolutivamente bem próximas, o que não permite o extrapolamento
21 pleno dos resultados obtidos para estudos envolvendo seres humanos; os marcadores de
22 lesão muscular utilizados são enzimas com alta variabilidade plasmática sendo
23 necessário estudos adicionais que façam a aferição de outros marcadores mais sensíveis
24 da lesão muscular; é evidente a necessidade de monitorar mais precisamente o estresse
25 físico, como por exemplo através da verificação do consumo de oxigênio e
26 monitoramento de EROs. Contudo, de forma geral, ao considerarmos a metodologia
27 empregada, os resultados desse estudo nos permite sugerir que a suplementação de Cr
28 pode influenciar positivamente a resposta de marcadores enzimáticos indiretos de dano
29 muscular em ratos exercitados com natação somente após 4 semanas de suplementação.
30 Além disso, de forma aguda (1 semana) e crônica (8 semanas) não foi observado efeito
31 da suplementação de Cr sobre as enzimas analisadas.

32
33
34

REFERÊNCIAS

- BELLINGER, B.M.; BOLD, A.; WILSON, G.R.; NOAKES, T.D.; MYBURGH, K.H. Oral creatine supplementation decreases plasma markers of adenine nucleotide degradation during a 1-h cycle test. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v.170, n.3, p.217-24, 2000.
- BEMBEN, M.G.; LAMONT, H.S. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. **Sports Medicine**, Auckland, v.35, p.107-25, 2005.
- BENDER, A.; AUER, D. P.; MERL, T.; REILMANN, R.; SAEMANN, P.; YASSOURIDIS, A.; BENDER, J.; WEINDL, A.; DOSE, M.; GASSER, T.; KLOPSTOCK, T. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. **Journal of Neurology**, Berlin, v.252, p.36-41, 2005.
- BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F.M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**, London, v.81-82, n.1, p. 209-230, 2007.
- BRANNON, T.A.; ADAMS, G.R.; GONNIFF, C.L.; BALDWIN, K.M. Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.29, p.489-95, 1997.
- CHEUNG, K.; HUME, P.; MAXWELL, L. Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. **Sports Medicine**, Auckland, v.33, p.145-64, 2003.
- CHEN, Y.; SERFASS, R.C.; APPLE, F.S. Alterations in the expression and activity of creatine kinase-M and mitochondrial creatine kinase subunits in skeletal muscle following prolonged intense exercise in rats. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.81, p.114-119, 2000.
- COUDREUSE, J.M.; DUPONT, P.; NICOL, C. Delayed post effort muscle soreness. **Annales de Réadaptation et de Médecine Physique**, Amsterdam, v.47, p.290-8, 2004.
- COOKE, M.B.; RYBALKA, E.; WILLIAMS, A.D.; CRIBB, P.J.; HAYES, A. Creatine supplementation enhances muscle force recovery after eccentrically-induced muscle damage in healthy individuals. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, Woodland Park, v.6, p.13, 2009.
- DANGOTT, B.; SCHULTZ, E.; MOZDZIAK, P.E. Dietary creatine monohydrate supplementation increases satellite cell mitotic activity during compensatory hypertrophy. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.21, p.13-6, 2000.

- 1 DEMINICE, R.; VILHENA, R.; PORTARI, G.V.; JORDÃO, A.A. Suplementação de
2 creatina, homocisteína e estresse oxidativo. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.40, n.3, p.368-
3 77, 2007.
- 4 ENDOH, T.; NAKAJIMA, T.; SAKAMOTO, M.; KOMIYAMA, T. Effects of muscle
5 damage induced by eccentric exercise on muscle fatigue. **Medicine and Science in**
6 **Sports and Exercise**, Madison, v.37, p.1151-56, 2005.
- 7 GALLO, M.; GORDON, T.; SYROTUIK, D.; SHU, Y.; TYREMAN, N.; MACLEAN,
8 I.; KENWELL, Z.; PUTMAN, C.T. Effects of long-term creatine feeding and running
9 on isometric functional measures and myosin heavy chain content of rat skeletal
10 muscles. **Pflugers Archiv**, Berlin, v.452, n.6, p.744-55, 2006.
- 11 GOLDFARB, A.H.; BLOOMER, R.J.; MCKENZIE, M.J. Combined antioxidant
12 treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. **Medicine and**
13 **Science in Sports and Exercise**, Madison, v.37, n.2, p.234-9, 2005.
- 14 GREENHAFF, P.L. The nutritional biochemistry of creatine. **Journal of Nutritional**
15 **Biochemistry**, Stoneham, v.11, p.610-18, 1997.
- 16 GUALANO, B.; ARTIOLI, G.G.; POORTMANS, J.R.; LANCHA JUNIOR, A.H.
17 Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. **Amino Acids**, Wien, 2009
18 Mar 1. [Epub ahead of print].
- 19 GUYOTTO, L.C.C.; ALVES V.A.F. **Métodos Diagnósticos**: Provas de função
20 hepática. In: GUYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. Doenças do Fígado e Vias Biliares.
21 São Paulo: Atheneu, p.139-150, 2001.
- 22 HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal**
23 **of Neurochemistry**, London, v.97, n.6, p.1634-58, 2006.
- 24 HESSEL, E.; HABERLAND, A.; MULLER, M.; LERCHE, D.; SCHIMKE, I. Oxygen
25 radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running?
26 **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.1, n.2, p.145-156, 2000.
- 27 HIROSE, L.; NOSAKA, K.; NEWTON, M.; LAVEDER, A.; KANO, M.; PEAKE, J.;
28 SUZUKI, K. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the
29 elbow flexors. **Exercise Immunology Review**, Champaign, v.10, p.75-90, 2004.
- 30 KARANTH, J.; JEEVARATNAM, K. Oxidative stress and antioxidant status in rat
31 blood, liver and muscle: effect of dietary lipid, carnitine and exercise. **International**
32 **Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v.75, n.5, p.333-9, 2005.

- 1 KARANTH, J.; KUMAR, R.; JEEVARATNAM, K. Response of antioxidant system in
2 rats to dietary fat and physical activity. **Indian Journal of Physiology and**
3 **Pharmacology**, New Delhi, v.48, n.4, p.446-52, 2004.
- 4 KOMULAINEN, J.; TAKALA, T.E.; VIHKO, V. Does increased serum creatine kinase
5 activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? **International Journal of**
6 **Sports Medicine**, Stuttgart, v.16, n.3, p.150-4, 1995.
- 7 LAWLER, J.M.; POWERS, S.K. Oxidative stress, antioxidant status, and the
8 contracting diaphragm. **Canadian Journal of Applied Physiology**, Champaign, v.23,
9 n.1, p.23-55, 1998.
- 10 LIEBER, R.L.; FRIDEN, J. Morphologic and mechanical basis of delayed-onset muscle
11 soreness. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, Rosemont,
12 v.10, p.67-73, 2002.
- 13 MACINTYRE, D.L.; SORICHTER, S.; MAIR, J.; BERG, A.; MCKENZIE, D.C.
14 Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in
15 humans. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.84, p.180-86, 2001.
- 16 MENEZES, L.G.; SOBREIRA, C.; NEDER, L.; RODRIGUES-JÚNIOR, A.L.;
17 MARTINEZ, J.A. Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle
18 wasting and impairment of exercise performance in rats. **Journal of Applied**
19 **Physiology**, Bethesda, v.102, n.2, p.698-703, 2007.
- 20 NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA,
21 S.; SATO, Y.; JI, L.L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide
22 dismutase isoenzymes in mouse tissue. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.88
23 p.649-54, 2000.
- 24 NIESS, A.M.; SIMON, P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the
25 role of reactive oxygen species. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v.1, n.12, p.4826-
26 38, sep. 2007.
- 27 OSORIO, R.A.; SILVEIRA, V.L.; MALDJIAN, S.; MORALES, A.; CHRISTOFANI,
28 J.S.; RUSSO, A.K. Swimming of pregnant rats at different water temperatures.
29 **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative**
30 **Physiology**, New York, v.135, p.605-11, 2003a.
- 31 OSORIO, R.A.; CHRISTOFANI, J.S.; D'ALMEIDA, V.; RUSSO, A.K.; PICARRO,
32 I.C. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress.
33 **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Toxicology & Pharmacology**,
34 New York, v.135, p.89-95, 2003b.

- 1 PERSKY, A.M.; BRAZEAU, G.A. Clinical pharmacology of the dietary supplement
2 creatine monohydrate. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v.53, n.2, p.161-76,
3 2001.
- 4 POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular
5 mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, Bethesda,
6 v.88, n.4, p.1243-76, oct. 2008.
- 7 RAWSON, E.S.; CONTI, M.P.; MILES, M.P. Creatine supplementation does not
8 reduce muscle damage or enhance recovery from resistance exercise. **Journal of**
9 **Strength and Conditioning Research**, Champaign, v.21, n.4, p.1208-13, 2007.
- 10 RAWSON, E.S.; GUNN, B.; CLARKSON, P.M. The effects of creatine
11 supplementation on exercise-induced muscle damage. **Journal of Strength and**
12 **Conditioning Research**, Champaign, v.15, p.178-84, 2001.
- 13 SAKS, V.A.; STRUMIA, E. Phosphocreatine: molecular and cellular aspects of the
14 mechanism of cardioprotective action. **Current Therapeutic Research, Clinical and**
15 **Sxperimental**, New York, v.53, p.565–598, 1993.
- 16 SANTOS, R.V.; BASSIT, R.A.; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA, L.F. The effect of
17 creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30km
18 race. **Life Sciences**, Oxford, v.75, p.1917-24, 2004.
- 19 SASTRE, J.; ASENSI, M.; GASCÓ, E.; PALLARDÓ, F.V.; FERRERO, J.A.;
20 FURUKAWA, T.; VIÑA J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of
21 glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration. **The American**
22 **journal of physiology**, Washington, v.32, n.5, p.992–5, 1992.
- 23 SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; BRAVI, G.; PICCOLI, G.; CURCI, R.;
24 BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E.; AGOSTINI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI,
25 V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured
26 mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**,
27 New York, v.40, n.5, p.837-49, 2006.
- 28 SOUZA, Renato Aparecido. **Estudo da suplementação aguda e crônica de creatina**
29 **em ratos sedentários e exercitados – avaliação bioquímica e histomorfológica da**
30 **função hepática e renal**. 2006. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas)
31 PPGCB, UNIVAP, São José dos Campos: fevereiro, 2006.
- 32 SOUZA, R.A.; SANTOS, R.M.; OSÓRIO, R.A.; COGO, J.C.; PRIANTI JÚNIOR,
33 A.C.G.; MARTINS, R.A.B.L.; RIBEIRO, W. Influência da suplementação aguda e
34 crônica de creatina sobre as concentrações sanguíneas de glicose e lactato de ratos

- 1 Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Rio de Janeiro, v.12, n.6, p.361-5,
2 2006.
- 3 SUZUKI, K. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the
4 elbow flexors. **Exercise Immunology Review**, Champaign, v.10, p.75-90, 2004.
- 5 TARNOPOLSKY, M.A.; BOURGEOIS, J.M.; SNOW, R.; KEYS, S.; ROY, B.D.;
6 KWIEEEN, J.M, TURNBULL, J. Histological assessment of intermediate and long-
7 term creatine monohydrate supplementation in mice and rats. **American Journal of**
8 **Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.285,
9 p.762-9, 2003.
- 10 VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anerobic
11 threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and**
12 **Biological Research**, Ribeirão Preto, v.35, p.1389-94, 2002.
- 13 WALKER, J.B. Creatine: Biosynthesis, regulation and function. **Advances in**
14 **Enzymology & Related Areas of Molecular Biology**, New York, v.50, p.177-242,
15 1979.
- 16 WARREN, G.L.; FENNESSY, J.M.; MILLARD-STAFFORD, M.L. Strength loss after
17 eccentric contractions is unaffected by creatine supplementation. **Journal of Applied**
18 **Physiology**, Bethesda, v.89, p.557-62, 2000.
- 19 WILLOUGHBY, D.S.; ROSENE, J.M.; MYERS, J. Ubiquitin and HSP-72 expression
20 and apoptosis after an acute bout of eccentric exercise. **Journal of Exercise Physiology**
21 **online**, Duluth, v.6, p.96-104, 2003.
- 22 WYSS, M.; SCHULZE, A. Health implications of creatine: can oral creatine
23 supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease?
24 **Neuroscience**, Oxford, v.112, n.2, p.243-60, 2002.
- 25 YU, J.G.; MALM, C.; THORNELL, L.E. Eccentric contractions leading to DOMS do
26 not cause loss of desmin nor fibre necrosis in human muscle. **Histochemistry and Cell**
27 **Biology**, Berlin, v.118, p.29-34, 2002.

Figura 1. Creatina Quinase (CQ) plasmática. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. CON: grupos controle, NAT: grupos natação, CRE: grupos creatina, CRE+NAT: grupos creatina natação. * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* CRE; Φ *versus* CRE+ NAT.

Figura 2. Lactato Desidrogenase (LDH) plasmático. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. CON: grupos controle, NAT: grupos natação, CRE: grupos creatina, CRE+NAT: grupos creatina natação. * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* CRE; Φ *versus* CRE+ NAT.

Figura 3. Aspartato Aminotransferase (AST) plasmático. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. CON: grupos controle, NAT: grupos natação, CRE: grupos creatina, CRE+NAT: grupos creatina natação. * $p < 0,05$ *versus* CON; # $p < 0,05$ *versus* CRE; Φ *versus* CRE+ NAT; ξ *versus* NAT.

Figura 01

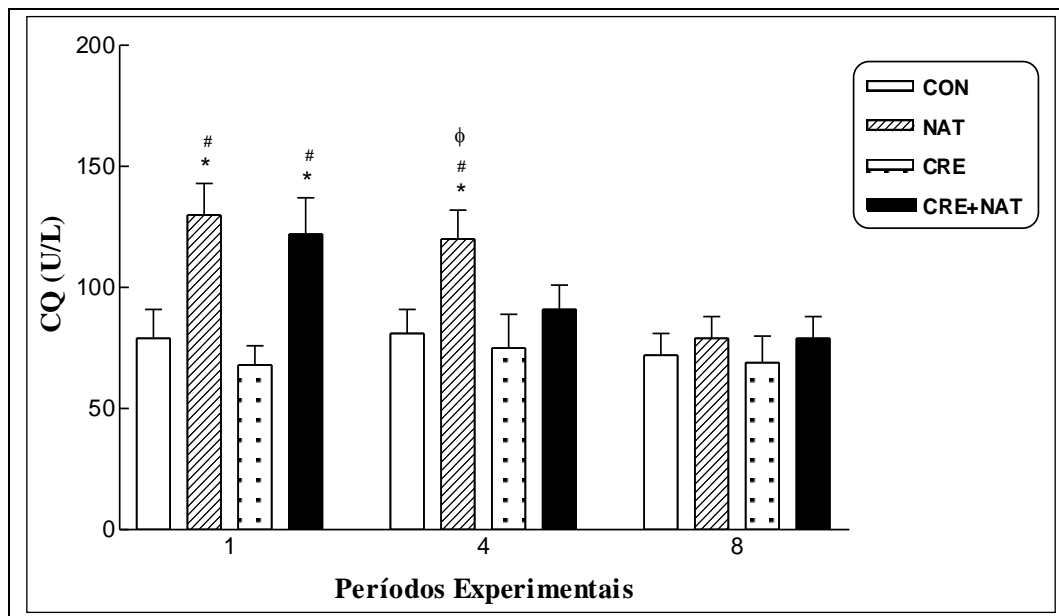
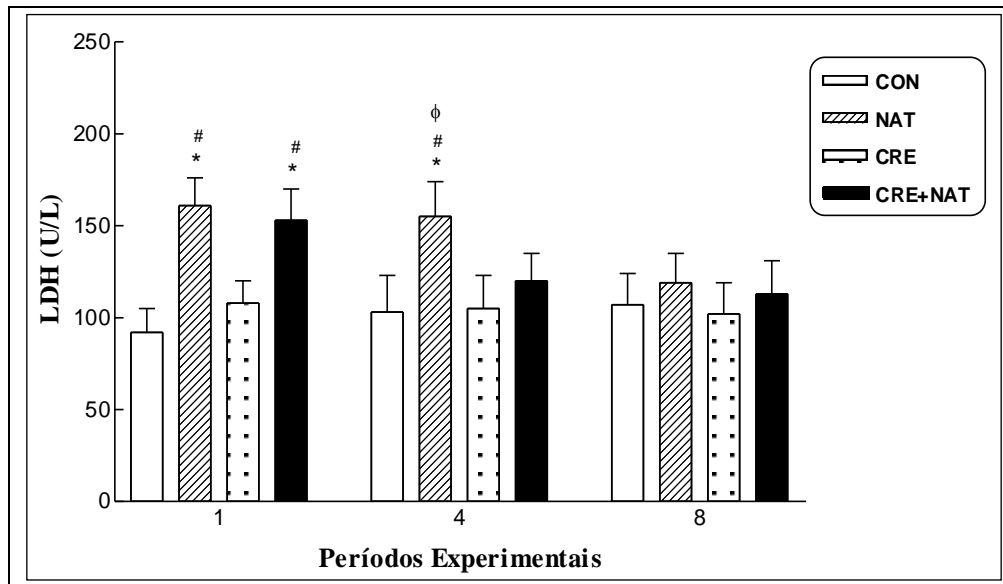
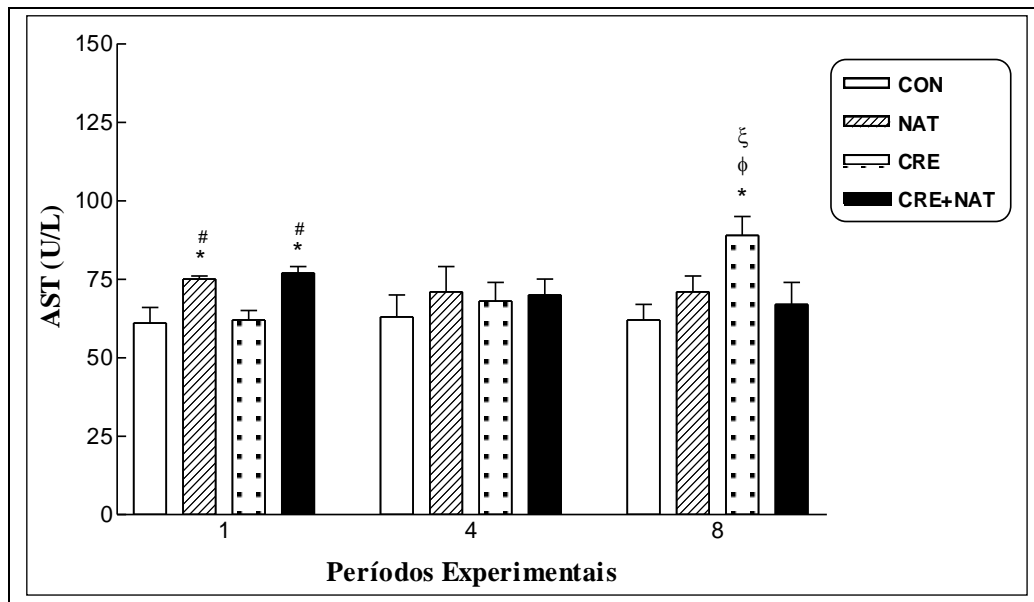


Figura 02



1 Figura 03



2

Study of malignant prostate lesions by near-infrared Raman spectroscopy: diagnostic model based on Principal Components Analysis

Marcos Augusto S. R. Silva MSc.^{a*}, Renato A. Souza PhD^{a,b}, Ricardo Matias Lopes MSc(Urol.)^a,
 Marcos Tadeu T. Pacheco PhD^c, Flávio A.S. Carvalho PhD^c, Kátia R. M. Leite MD (Urol.),
 PhD^d, Landulfo Silveira Jr PhD^c, Carlos A. Pasqualucci MD, PhD^e

^aLaboratory of Biomolecular Spectroscopy, Institute of Research and Development,
 Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP, 12244-
 000, Brazil

^bDepartment of Physiotherapy, Federal University of Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rodovia
 MG 367 – Km 583, 5000, Diamantina, MG, 39100-000, Brazil

^cCamilo Castelo Branco University, Street Carolina Fonseca, 584, Itaquera, São Paulo, SP,
 08230-030, Brazil

^dLaboratory of Medical Investigation, Department of Urology, University of São Paulo Medical
 School – USP, Av. Dr. Arnaldo, 455, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil

^eLaboratory of Medical Investigation, Department of Pathology, University of São Paulo
 Medical School – USP, Av. Dr. Arnaldo, 455, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil

* Corresponding author: Tel.: +55 01291417990

E-mail address: marcosaugusto_sjc@yahoo.com.br (Marcos Augusto S. R. Silva).

Abstract

Background: Although the Prostate cancer (CaP) is an important men's health problem worldwide, the diagnostic techniques of this cancer still need improvement. Due to the possibility of cancer diagnosis through Raman spectroscopy, this study was conducted to evaluate the use of near-infrared, dispersive Raman spectroscopy for differentiate between healthy and CaP fragments of human prostate tissues. *Materials and Methods:* It was used a Raman spectrometer with 80 mW and 830 nm excitation from a diode laser, an imaging spectrograph and a liquid-N₂ cooled CCD for collecting Raman scattering signal. A total of 34 samples of prostate tissue (20 healthy and 14 diagnosed with CaP) were scanned, with 50s exposure time for each spectrum collection. Following histopathology, tissues were separated in normal and CaP and an algorithm based on Principal Components Analysis (PCA) were developed to separate spectra according to differences observed in the first four principal components. *Results:* It was observed that the spectral differences between normal and CaP tissues were found mainly in the Raman bands attributed to protein, lipids and nucleic acids. Diagnostic algorithm based on the spectral features extracted from PCA and Mahalanobis distance as a discriminator showed sensitivity and specificity of 100% using PC2 and PC3 with this dataset, indicating the Raman spectroscopy capability to classify and identify the biochemical changes that occur in the presence of CaP when compared with normal tissue. *Conclusion:* Raman spectroscopy could be used to differentiate normal and neoplastic human prostate tissue samples in vitro, with high sensitivity and specificity using PCA and discriminant analysis.

Keywords: Raman spectroscopy; Prostate cancer; Diagnosis; Principal Components Analysis (PCA); Mahalanobis distance.

1. Introduction

Prostate cancer (CaP) is the sixth most common type of cancer worldwide and the most prevalent in men, representing around 10% of all cases of cancer [1]. The incidence rate of this cancer is around six-fold higher in developed countries compared to developing nations, with a mortality ratio that varies from 0.13 in North America to 0.80 in Africa [2]. The CaP is worldwide considered a cancer of the elderly, since around three-quarters of cases occur in men over 65 years of age [3]. World statistics for CaP can be found, but it is much more beneficial for an individual to look at the statistics in their own country as the indicators vary greatly from country to country and between continents. In Brazil, the estimated number of new cases of CaP for the year 2008 were 49,530, corresponding to a risk of 52 new cases per 100,000 men. If non-melanoma skin cancer is not considered, CaP is the most frequent men cancer in all regions of the country, with an estimated risk of 69/100,000 in the southern region, 63/100,000 in the southeastern region, 47/100,000 in the midwestern region, 38/100,000 in the northeastern region and 22/100,000 in the northern region [4].

The researchers have developed several tools to assess the potential for disease progression of CaP, but only two are widely recognized to be good predictors of cancer progression: Gleason tumor grading and prostate specific antigen (PSA) testing [5,6]. Gleason grading on histopathological examination is considered the best prognostic indicator in prostate cancer, however, inter-observer variation can occur and the biopsies grading may not correlate with the prostatectomy specimens because of sampling problems and cases of morphologically identical prostate cancer can behave differently [7,8]. This invasive method involves the removal of a fragment of the tissue from a suspected abnormal area, enabling the pathologist to identify

morphological abnormalities. Moreover, biopsies have some risks due to tissue removal, mistakes in sampling extensive areas, and relies upon a subjective judgment depending on the experience of the pathologist [9]. The decision of treatment based on radical surgical excision, radiotherapy or chemotherapy, which carries risks of mortality and substantial complications, rests on this pathological diagnosis [10]. However, pathological analysis involves a time delay between the investigation, diagnosis and treatment, leading to further medical procedures with inherent risks, patient anxiety and costs involved. On the other hand, although traditional prostate examinations (rectal touch and PSA testing) have being widely used as a screening test and is used routinely for the detection of CaP, his use and applications are still controversial because of the lack of sensitivity and specificity [11].

The study of the light interaction with the tissue biomolecules has been demonstrated that differences in the scattering and absorption are dependent on the tissue constitution and could be useful for developing techniques for diagnosis of human diseases [12]. Fluorescence and Raman spectroscopy are among those techniques with potential for detecting diseases in vivo in real time. Raman spectroscopy has advantages over fluorescence due to the fact that one could obtain information of the presence of molecular groups of proteins, lipids and nucleic acids from tissues [13]. The process of Raman scattering can be viewed as an inelastic phenomenon in which the incident photon is scattered with a shift in frequency as it either gains energy from or loses energy to a particular vibrational mode of the molecule [14,15]. Thus, Raman spectroscopy can be used to access the molecular constitution of a specific sample and then classify it according to differences observed in the spectra [16].

Raman spectroscopy have been used as a diagnostic tool of a variety of human illnesses such as coronary and carotid arteries [17,18], blood components [19], mineralized tissues [20], skin disorders [21] and ophthalmic disorders [22]; for review see Moreira et al. [16]. Cancer

diagnosis through Raman spectroscopy has been received special consideration due to the molecular specificity obtained from the Raman spectrum. Different neoplastic tissues have already been characterized [23-25]. Donna et al. established spectral criteria for the detection of malignancy in esophagus tissues by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy through a pilot study with 10 consecutive patients with adenocarcinoma of the esophagus. Tissue samples from the diseased and normal sites of the resected specimens were analyzed and compared using FTIR spectroscopy and histopathology, and specific changes were observed in the FTIR spectral features of esophageal [23]. Yu et al. used confocal Raman microspectroscopy to characterize normal and transformed human breast epithelial cell lines. Key molecular components (DNA, RNA, and proteins) were extracted from cell nuclei and their Raman spectra were measured and the spectrum-fitting revealed that DNA duplication activities in tumorigenic cell nuclei are significantly higher than in normal cells. These findings revealed that the Raman spectroscopy could be a powerful tool for rapid cell characterization and assessment of cellular activities at the sub-cellular level [24]. Fujioka et al. suggested that FTIR spectroscopy is a useful tool for screening gastric cancer. These authors determined whether malignant and normal human gastric tissues can be distinguished by FTIR spectroscopy. Compared with normal tissue, malignant tissues showed significant increases in infrared (IR) absorption in 10 bands lying in a region of 925–1660 cm^{-1} . Using the 10 IR absorption bands as markers, discriminant analysis was carried out for tissue discrimination. As a result, 22 out of the 23 gastric cancer samples and 9 out of the 12 gastric normal samples were correctly segregated, yielding 88.6% accuracy. The present results [25].

The CaP has been studied by Raman spectroscopy in order to develop a methodology for optical biopsy [26-27]. The first Raman study on prostate tissue was published in 2002 [29], which revealed variations in the molecular content (glycogen and nucleic acid) between

adenocarcinoma and benign prostatic hyperplastic (BPH) verified through the positions of selected bands. Crow et al. aimed to determine whether Raman spectroscopy was able to differentiate between CaP cell lines of varying degrees of biological aggressiveness. The Raman spectra were analysed with the aim of determining whether there were consistent differences between the molecular composition of the different cell lines and whether these differences would allow for construction of a diagnostic algorithm using Principal Components Analyses (PCA). The PCA algorithm achieved near perfect identification of each cell line, with sensitivities ranging from 96 to 100% and specificities all 99% or higher [30]. In other study, Crow et al. showed that Raman spectroscopy can be used to accurately identify BPH and three different grades of prostatic CaP in vitro through diagnostic algorithm also using PCA analyze, with sensitivity and specificity about of 90% [27]. The direct analysis of biochemical markers using Raman spectroscopy may provide a new methodology for non-invasive detection of disease, together with new information for classifying, grading and evaluating the progression of malignant neoplasm. This may lead to the development of an optical diagnostic tool for the study of the evolution of pre-cancerous and cancerous lesions in vivo [27,31].

The objective of the present work is to identify spectral differences between human CaP obtained from surgical fragments and normal tissue obtained from autopsies using near-infrared, dispersive Raman spectroscopy with 830 nm excitation, correlating such spectral differences to the tissue histopathology. Also, it is proposed a diagnostic algorithm based on the PCA scores as a featuring extraction and the Mahalanobis distance as a discriminator applied over all Raman spectra, obtaining the classification of normal and neoplastic samples according to the spectral differences and the histopathology.

2. Materials and Methods

Prostate Tissue Samples. Prostate gland specimens were obtained by two ways. First, malignant samples (approximately 5 mm) were surgically removed by radical prostatectomy procedures done at Hospital Sírio Libânes (São Paulo, SP, Brazil) from 14 patients with confirmed adenocarcinoma (digital rectal examination and histological findings from Gleason Grade and tumor volume) after persistent abnormal levels of PSA. Besides, all patients had indication for radical prostatectomy. Second, normal prostate samples (without malignant alterations confirmed by histopathology) were obtained from Autopsy Service of University of São Paulo (São Paulo, SP, Brazil) taken from 20 cadavers. Also, the normal prostate gland samples were sectioned transversely (approximately 5 mm) in the posterior portion that corresponds to the peripheral zone. Moreover, all samples have been snap-frozen and stored in liquid nitrogen (-196°C) prior to Raman spectroscopy analysis.

Raman Spectroscopic Analysis. At the time for the Raman data collection, samples were moisturized with commercial 0.9% saline to reach room temperature. Tissue fragments were cut into 3x3 mm pieces and placed in an anodized aluminum sample holder. Near-infrared Raman spectra were obtained using a laboratory dispersive Raman spectrometer (Fig. 1). Briefly, the Raman excitation is done by a semiconductor AsGaAl laser (Microlaser Systems Inc., model L4830S) operating at 830 nm wavelength and 80 mW excitation power. The laser hits the sample in a 90° geometry and the scattered light is collected by a set of lenses ($f = 100$ mm) which passes through a band rejection, notch filter at 830 nm (Spectral Iridian Technologies, model PN - ZX 000080) placed in front the entrance slit to block the Rayleigh scattering from the laser. Then the scattered light is coupled to the imaging spectrograph (Chromex, model 2501S, 600 lines/mm grating) that disperses and directs to a liquid-nitrogen, deep depletion CCD camera (Princeton

Instruments, model LN/CCD-1024-EHR1) and controller (Princeton Instruments, model ST130). Spectra were obtained with integrating time of 50 s under a spectrometer resolution of about 8 cm^{-1} . Spectra were pre-processed, basically a fluorescence background filtering using a 5th order polynomial applied over the 800 - 1800 cm^{-1} spectral range, a handy removal of cosmic rays and a spectral and intensity calibration using a routine developed in the laboratory and described elsewhere [32]. Each spectrum was normalized using the most intense band and mean centered.

At the end of the Raman spectra collection, the spot where the laser incident on the fragment was marked with India ink and the sample fragment was fixed with 10% buffered formalin, bottled and labeled. The samples were then sent to the Laboratory of Molecular Pathology and Surgery of the Hospital S rio Lib nes to carry out the histopathological analysis. A total of 34 fragments were spectroscopically scanned.

Histopathological Analysis. The prostate gland samples were subjected to traditional histopathological processing with dehydration in alcohol and clearing in xylol, followed by inclusion in paraffin, stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and analyzed by optical microscope [10]. Those sections containing normal and prostate malignant were then examined by a urologic pathologist [7,8].

Principal Components Analysis (PCA) and Diagnostic Algorithm. After data pre-processing, spectra were separated in two groups according to the histopathology: normal and CaP tissues. In order to develop an algorithm for sample classification based upon the histopathology, the Raman spectra data set was analyzed through PCA technique. The principal components spectral vectors (PC) and intensity scores (S) were calculated from all 34 fragments spectra using a PCA routine written in Matlab  software (The Mathworks, Inc., USA) with the

NIPALS-CA algorithm [33]. Since S is the vector weight, or the importance of each PC to reconstruct the original spectrum, they carry information of any spectral differences of all PCs in each spectrum, then can be used to build an algorithm to correlate the histopathological analysis findings to the Raman features, and a discriminator such as Mahalanobis distance (m-distance) can be applied to separate the classes. The m-distance is very useful way to determine the similarity of a set of values from one group of samples compared to another group for discriminate analysis and has been described as a multivariate equivalent of the confidence interval [34]. It compares the distance of an observed point to the points that comprise the modelled space. This space is set during calibration when a training set is established. The training set is comprised of spectra produced from material exhibiting the desired property [35].

3. Results

Spectral Features. The mean Raman spectra of in vitro normal prostate and CaP tissues are shown in Fig. 2. The spectra of prostate tissues exhibit bands assignable to structural proteins, amino acids, lipids and nucleic acids. Observed prominent bands at 863, 940, 1007, 1079, 1247, 1271, 1330, 1452, 1563 and 1665 cm^{-1} are due to molecular compounds which are described in Table 1. Visual inspection of the mean spectra in Fig. 2 demonstrated subtle, although potentially discriminatory, differences between the normal and malignant prostate samples. The most significant differences among normal and CaP tissues are the protein and lipids modes that appears as lower intense band at 1665 cm^{-1} in CaP samples, which can be attributed to C=O stretching mode of proteins (α -helix conformation) and C=C stretching of lipids, which are in less amount in the neoplastic tissues [27]. Further, by analyzing the vibration modes at 1330 cm^{-1} (polynucleotide chain: DNA purine bases) and 1563 cm^{-1} (guanine and adenine nucleic acid), the CaP specimens revealed greater concentrations which represented an increase in the bands related

to genetic material [28]. A prominent band appearing at 1452 cm^{-1} is attributed to CH_2 bending mode of proteins and revealed higher intensity for the malignant prostate tissue [27].

Principal Components Analysis. In the present study, the training data set using the first four PCs explained approximately 95% of all spectral variations. Fig. 3 shows the plot of the first four PCs calculated from the training spectral data. These PC vectors resemble Raman spectra, having spectral features in the form of peaks and valleys in positions with respect to those of prostate tissues. By inspection of all the first four PCs and correlating to Table 1, the first component (PC1) was found to have most of the features related generally to prostate tissues ($863, 940, 1007, 1079, 1452$ and 1665 cm^{-1}). The second one (PC2) has features at $1330, 1452$ and 1563 cm^{-1} . The third one (PC3) has features bands at $1247, 1271\text{ cm}^{-1}$. The fourth ones (PC4) also have some features but they do not provide any important band for tissue identification.

Since, the scores are the variables that represent the intensity of each PC to form the spectrum, the PC is in some way a mathematical representation of the spectra of biochemicals presented in the tissue [33]. The m-distance from each score of one sample group with respect to all the scores of other groups were calculated for all four PCs. The pair of scores with the higher m-distance was selected to model the diagnostic algorithm. The higher m-distance was obtained using the PC1 versus PC2, PC1 versus PC3 and PC2 versus PC3 scores of the training data set. This corroborates with the observations of the spectral information contained in each one of these PCs (Table 1 and Fig. 3).

Fig. 4 shows the scatter plot of the principal components scores for the 34 Raman spectra used as the training group. As seen in the graph, there is a good separation of the data into two well-defined categories: normal and CaP tissues according to histopathology. To separate the spectra into two groups and to build the diagnostic algorithm, discrimination curves were drawn

based on the m-distances calculated from the scores of the selected pair. These curves are the ones that represent mean m-distance among normal and CaP tissue. Analysis of the training group data (Fig. 4) shows that 20 out of 20 normal prostate samples were classified as normal, and 14 out of 14 malignant prostate samples were classified as CaP for the PC2 X PC3, indicating 100% of sensitivity and specificity. All these results are based on the histopathology, which is the conventional method for tissue classification, with an assumption that the histological results are fully accurate.

4. Discussion

The mortality rate from CaP is relatively low, which, in part, is a reflex of its good prognosis [6]. Although considered to have a relatively good prognosis if diagnosed opportunistically, the CaP remains the most prevalent type of cancer in men and continues being a serious health problem worldwide [1]. Currently available screening methods such as PSA testing have not been found to be successful in reducing mortality, and, moreover, lead to many unnecessary surgeries, resulting in financial losses and reduced quality of life [4]. In view of this situation, it is clear that there is a continued need for investment in the development of technology applied in prevention and treatment of CaP.

Recently, it has been demonstrated that Raman spectroscopy could identify and differentiate CaP tissues [26-31]. The results of this study have confirmed that Raman spectroscopy could be used as a technique for differentiate among normal and CaP tissues. In this study, it is presented a diagnostic algorithm based on the PCA scores and the m-distances as a discriminator, aiming to develop a simple and rapid method to identify normal and malignant pathologic findings of prostate tissue samples. Since the chemical changes preceding and accompanying morphological tissue changes are extremely complex [36], multivariate techniques

could help extracting diagnostic information from Raman spectra and would provide as much information as possible to facilitate the most accurate prediction of histopathology using a few spectral components [37].

The PCA with discriminant analysis has been applied with success in spectral analysis of biological samples aiming diagnostics [18]. This analysis identifies and extracts major trends within a given spectral data set, by generating a small set of principal components, as a means of condensing all spectral information with minimal information loss [38-40]. It has been shown that PCA scores applied to Raman spectra can be used to classify samples in normal and diseased groups when associated to discriminant analysis: characterization of cervical pre-cancer [40], identification of atherosclerosis in human coronary artery [41], discrimination of normal and malignant mucosal tissues of the colon [42], parathyroid tissue pathology [43], human breast cancer [44], skin [45], esophageal and bladder [46].

Moreover, the m-distance is a very useful way to find the similarity of a set of values from one group of samples compared to another group for discriminant analysis [17,18,33,34] because it is based on correlations between variables by which different patterns can be identified and analyzed [35]. In a previous study, the m-distance was applied to classify Raman spectra of atherosclerosis tissues and secret [17]. In this study, it was found that the calculated sensitivity and specificity for the CaP tissue was about 100%. Since the spectra of these tissues have special features that could be used in the discrimination [26,30], this result was expected because of the changes in the molecular constituents that are associated with disease led to significant differences in the spectra [28,30]. It is important to note that the training data sets in this study were normal tissue and CaP which provide a relevance distinction among the specimens, contrary that obtained in the study of [27,28,47] since they used malign and benign prostate tissue (i.e, lower distinction among specimens).

Recently, it has been demonstrated that Raman spectroscopy could identify endogenous biological markers associated with malignant changes, such as proteins, amino-acids, lipids and nucleic acids [48,49]. In this study, the comparison of the Raman spectral findings of normal and CaP (Fig. 2, Table 1) revealed reduced amount of protein (e.g., glycogen content: 940cm^{-1}), lipids (mostly at 1665cm^{-1} stretch mode of α -helix conformation and C=C lipid stretch) and increased nucleic acid (1330 cm^{-1} : DNA purine bases, and 1563 cm^{-1} : guanine and adenine bases) content in malignant tissue when compared to normal. These results are according to Stone et al. [28] that found greater concentrations of guanine, adenine, cytosine, uracil, O-P-O, β -sheet proteins, lipids and possibly porphyrins in neoplastic tissue when compared to benign prostate tissue. Others studies of Raman technique in cancerous tissues seem to show about the same molecular differences, as larynx [50], colon [42], esophagus [23] and cervix [40]. It has been verified that one can access the biochemical information regarding the composition of prostate tissue nondestructively [27,28,30,47]. Raman spectroscopy not only discriminates between healthy and pathological prostate tissue with molecular specificity, but also provides exclusive diagnostic signature for each tissue [27]. This technique will also enable the study of prostate malignancy in situ, allowing the investigation of the cancer progression as well as the response of different therapeutic modalities.

5. Conclusion

The results of this study demonstrated that Raman spectroscopy could be a powerful diagnostic technique applied prostate tissue, since it was capable to identify the adenocarcinoma (CaP) when compared to normal tissue, with 100% of sensitivity and specificity using a diagnostic algorithm based on the PCA scores and the m-distances as a discriminator. Besides,

the qualitative analysis of Raman spectra revealed reduced protein and lipids content and increased nucleic acid contents in malignant, compared to normal tissue, provide an insight into the type of molecular changes.

Acknowledgements

L. Silveira Jr. thanks CNPq for the Productivity Fellowship (305610/2008-2). M.A.S.R. Silva thanks Capes/PROSUP for the Master fellowship.

Conflict of interest

None.

Reference

- [1]. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murr T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2007; 57(1): 43-66.
- [2]. Zeigler-Johnson CM, Rennert H, Mittal RD, Jalloh M, Sachdeva R, Malkowicz SB, Mandhani A, Mittal B, Gueye SM, Rebbeck TR. Evaluation of prostate cancer characteristics in four populations worldwide. *Can J Urol*, 2008; 15(3):4056-64.
- [3]. Zerbib M, Zelefsky MJ, Higano CS, Carroll PR. Conventional treatments of localized prostate cancer. *Urology* 2008; 72(6 Suppl):S-25-35.
- [4]. Brazil. Ministry of Health. General office of Attention to the Health. National institute of Cancer. Coordination of Prevention and Surveillance. Estimate 2008: Cancer incidence in Brazil. Rio de Janeiro: INCA, 2008.
- [5]. Albertsen PC, The Treatment Paradigm Shifts Again on Prostate Cancer, *Eur Urol* 2008. [Epub ahead of print]

- [6]. Philip J, Manikandan R, Javlé P, Foster CS. Prostate cancer diagnosis: should patients with prostate specific antigen >10ng/mL have stratified prostate biopsy protocols? *Cancer Detect Prev* 2009. [Epub ahead of print]
- [7]. Allsbrook Jr WC, Mangold KA, Allsbrook WC, Johnson MH, Lane RB, Lane CG, Amin MB, Bostwick DG, Humphrey PA, Jones EC, Reuter VE, Sakr W, Sesterhenn IA, Troncoso P, Wheeler TM, Epstein JI. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: urologic pathologists. *Hum Pathol* 2001; 32(1):81-8. Erratum in: *Hum Pathol* 2001; 32(12):1417.
- [8]. Allsbrook Jr WC, Mangold KA, Johnson MH, Lane RB, Lane CG, Epstein JI. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. *Hum Pathol* 2001; 32(1):74-80.
- [9]. Murphy AM, McKiernan JM, Olsson CA. Controversies in prostate cancer screening. *J Urol* 2004; 172(5):1822-4.
- [10]. Bostwick DG, Foster CS. Evaluating radical prostatectomy specimens: therapeutic and prognostic importance. *Virchows Arch* 1997; 430(1):1-16.
- [11]. Beneduce L, Prayer-Galetti T, Giustinian AM, Gallotta A, Betto G, Pagano F, Fassina G. Detection of prostate-specific antigen coupled to immunoglobulin M in prostate cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2007; 31(5):402-7.
- [12]. Manoharan R, Wang Y, Field MS. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta. Part. A, Molecular Spectroscopy* 1996; 52(2):215-249.
- [13]. Salomon G, Hess T, Erbersdobler A, Eichelberg C, Greschner S, Sobchuk AN, Korolik AK, Nemkovich NA, Schreiber J, Herms M, Graefen M, Huland H. The Feasibility of Prostate Cancer Detection by Triple Spectroscopy. *Eur Urol* 2008. [Epub ahead of print]

- [14]. Lasch P, Kneipp J, Biomedical Vibrational Spectroscopy. Wiley-Interscience: Hoboken, New Jersey, 2008.
- [15]. Lin SY, Li MJ, Cheng WT. FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biondiagnosis of human tissues. *Spectroscopy* 2007; 21(1):1-30.
- [16]. Moreira LM, Silveira Jr. L, Santos FV, Lyon JP, Rocha R, Zângaro RA, Villaverde AB, Pacheco MTT. Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis. *Spectroscopy* 2008; 22 (1): 1-19.
- [17]. Silveira L Jr, Sathaiah S, Zângaro RA, Pacheco MTT, Chavantes MC, Pasqualucci CA. Near-Infrared Raman Spectroscopy of Human Coronary Arteries: Histopathological Classification Based on Mahalanobis Distance. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21(4):203-8.
- [18]. Nogueira GV, Silveira L, Martin AA, Zângaro RA, Pacheco MT, Chavantes MC, Pasqualucci CA. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. *J Biomed Opt.* 2005; 10(3):031117.
- [19]. Pilotto S, Pacheco MTT, Silveira L Jr, Villaverde AB, Zângaro RA. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. *Lasers Med Sci* 2001; 16(1):2-9.
- [20]. Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues *J Biomed Opt* 2000; 5(3):259-68.
- [21]. Cheng WT, Liu MT, Liu HN, Lin SY. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. *Microscop Res Tech* 2005; 68(2): 75–79.
- [22]. Lin SY, Lee SM, Li MJ, Liang RC. Fourier transform infrared spectral evidences for protein conformational changes in immature cataractous human lens capsules accerlerated by myopia and/or systemic hypertension. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 1997; 3A(9):1507-13.

- [23]. Maziak DE, Do MT, Shamji FM, Sundaresan SR, Perkins DG, Wong PT. Fourier-transform infrared spectroscopic study of characteristic molecular structure in cancer cells of esophagus: an exploratory study. *Cancer Detect Prev* 2007; 1(3):244-53.
- [24]. Yu C, Gestl E, Eckert K, Allara D, Irudayaraj J. Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Cancer Detect Prev* 2006; 30(6):515-22.
- [25]. Fujioka N, Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M. Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer Detect Prev* 2004; 28(1):32-6.
- [26]. Stone N, Prieto MCH, Crow P, Uff J, Ritchie AW. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(5):1657-68.
- [27]. Crow P, Molckovsky A, Stone N, Uff J, Wilson B, Wongkeesong LM. Assessment of fiberoptic near-infrared Raman spectroscopy for diagnosis of bladder and prostate cancer. *Urology* 2005; 65(6):1126-1130.
- [28]. Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P and Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss* 2004; 126:141-57.
- [29]. Crow P, Wright M, Persad R, Kendall C, Stone N. Evaluation of Raman spectroscopy to provide a real time, optical method for discrimination between normal and abnormal tissue in the bladder. *Eur Urol* 2002; 1(1): 80.
- [30]. Crow P, Barrass B, Kendall C, Hart-Prieto M, Wright M, Persad R, Stone N. The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 2005; 92(12):2166-70.

- [31]. Crow P, Uff JS, Farmer JA, Wright MP, Stone N. The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro. *BJU Int.* 2004; 93(9):1232-6.
- [32]. Lopes CB, Pacheco MTT, Silveira L Jr, Duarte J, Cangussú MC, Pinheiro AL. The effect of the association of NIR laser therapy BMPs, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with wire osteosynthesis: Raman spectroscopy study. *J Photochem Photobiol B*, 2007; 89(2-3):125-30.
- [33]. Silveira L Jr, Sathaiah S, Zângaro RA, Pacheco MTT, Chavantes MC, Pasqualucci CA. Correlation Between Near-Infrared Raman Spectroscopy and the Histopathological Analysis of Atherosclerosis in Human Coronary Arteries. *Lasers Surg Med* 2002; 30(4):290-7.
- [34]. Maesschalck R De, Jouan-Rimbaud D, Massart DL. The Mahalanobis distance. *Chemom Intell Lab Syst* 2000; 50:1-18.
- [35]. Ciaccio EJ, Dunn SM, Akay M. Biosignal pattern recognition and interpretation systems. Part 3 of 4: Methods of Classification. *IEEE Eng Med Biol Mag* 1994; 13(2): 129-135.
- [36]. Bird B., Miljkovic M., Romeo M. J., Smith J., Stone N., George M. W., Diem M. Infrared micro-spectral imaging: distinction of tissue types in axillary lymph node histology. *BMC Clin Pathol* 2008; 29;8:8
- [37]. Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys Med Biol* 2000; 45(2):R1-59.
- [38]. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Thomsen S, Malpica A, Wright T, Atkinson N, Richards-Kortum R. Development of a multivariate statistical algorithm to analyze human cervical tissue fluorescence spectra acquired in vivo. *Lasers Surg Med* 1996; 19(1):46-62.
- [39]. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Thomsen S, Malpica A, Wright T, Atkinson N, Richards-Kortum R. Spectroscopic diagnosis of cervical squamous intraepithelial neoplasia in

vivo using laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths. *Lasers Surg Med* 1996; 19(1):63-74.

[40]. Mahadevan-Jansem A, Mitchell MF, Ramanujam N, Malpica A, Thomsen S, Utzinger U, Richards-Kortum R. Near-infrared Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. *Photochem Photobiol* 1998; 68(1):123-32.

[41]. Rocha R, Villaverde AB, Pasqualucci CA, Silveira L Jr, Brugnera A Jr, Costa MS, Pacheco MT. Identification of calcifications in cardiac valves by near infrared Raman spectroscopy. *Photomed Laser Surg* 2007; 25(4):287-90.

[42]. Chowdary MVP, Kumar KK, Thakur K, Anand A, Kurien J, Krishna CM, Mathew S. Discrimination of Normal and Malignant Mucosal Tissues of the Colon by Raman Spectroscopy. *Photomed Laser Surg* 2007; 25(4): 269-274.

[43]. Das K, Stone N, Kendall C, Fowler C, Christie-Brown J. Raman spectroscopy of parathyroid tissue pathology. *Lasers Med Sci* 2006; 21(4): 192-97.

[44]. Chowdary MV, Kumar KK, Kurien J, Mathew S., Krishna CM. Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy. *Biopolymers* 2006; 83(5):556-69.

[45]. Sigurdsson S, Philipsen PA, Hansen LK, Larsen J, Gniadecka M, Wulf HC. Detection of skin cancer by classification of Raman spectra. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004; 51(10):1784-93.

[46]. Stone N, Kendall C, Barr H. Raman Spectroscopy as a Potential Tool for Early Diagnosis of Malignancies in Esophageal and Bladder Tissues. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*: John Wiley & Sons; 2008.

[47]. Crow P, Stone N, Kendall CA, Uff JS, Farmer JA, Barr H. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro. *Br J Cancer* 2003; 89(1):106-8.

[48]. Kast RE, Serhatkulu GK, Cao A, Pandya AK, Dai H, Thakur JS, Naik VM, Naik R, Klein MD, Auner GW, Rabah R. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal

breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model. *Biopolymers* 2008; 89(3):235-41.

[49]. Lyng FM, Faoláin EO, Conroy J, Meade AD, Knief P, Duffy B, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Byrne HJ. *Exp Mol Pathol* 2007; 82(2):121-9.

[50]. Stone N, Stavroulaki P, Kendall C, Birchall M, Barr H. Raman spectroscopy for early detection of laryngeal malignancy: preliminary results. *Laryngoscope* 2000; 110:1756-63.