

Influência da suplementação de creatina sobre a massa óssea de ratos espontaneamente hipertensos

Christiano Robles Rodrigues Alves¹, Igor Hisashi Murai¹, Pamella Ramona²,
Humberto Nicastro³, Lilian Takayama⁴, Fabiana Guimarães⁵, Antonio Herbert Lancha Junior⁶,
Maria Claudia Irigoyen⁷, Rosa Maria Rodrigues Pereira⁸, Bruno Gualano⁹

RESUMO

Introdução: Recentes evidências indicam que a suplementação de creatina (Cr) é capaz de aumentar a densidade mineral óssea (DMO) no fêmur de ratos saudáveis em crescimento. Entretanto, há poucos estudos que testam a efetividade da suplementação desse nutriente em condições de perda óssea. **Objetivo:** Investigar o efeito da suplementação de Cr na DMO e no conteúdo mineral ósseo (CMO) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), um modelo experimental de baixa massa óssea. **Materiais e métodos:** Dezesesseis ratos SHR machos com 8 meses de idade foram randomizados em dois grupos experimentais pareados pelo peso corporal, a saber: 1) Pl: SHR tratados com placebo (água destilada; n = 8); e 2) Cr: SHR tratados com Cr (n = 8). Após nove semanas de suplementação os animais foram eutanasiados e o fêmur e a coluna vertebral (L1–L4) foram analisados por densitometria óssea (*Dual Energy X-Ray Absorptiometry*). **Resultados:** Não houve diferença significativa na DMO (Pl = 0,249 ± 0,003 g/cm² vs. Cr = 0,249 ± 0,004 g/cm²; P = 0,95) e no CMO (Pl = 0,509 ± 0,150 g vs. Cr = 0,509 ± 0,017 g; P = 0,99) da coluna vertebral e na DMO (Pl = 0,210 ± 0,004 g/cm² vs. Cr = 0,206 ± 0,004 g/cm²; P = 0,49) e no CMO (Pl = 0,407 ± 0,021 g vs. Cr = 0,385 ± 0,021 g; P = 0,46) do fêmur total entre os grupos experimentais. **Conclusão:** Neste estudo, usando um modelo experimental de baixa massa óssea, a suplementação de Cr não afetou a massa óssea.

Palavras-chave: osteoporose, creatina, densidade mineral óssea.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

O rato espontaneamente hipertenso (SHR) tem sido considerado o modelo genético de hipertensão arterial que mais se assemelha à hipertensão primária observada em seres humanos.^{1,2} Diversas evidências indicam redução da densidade mineral óssea (DMO) nesse modelo, decorrente de alterações no metabolismo do cálcio que provocam um

aumento da reabsorção óssea.^{3–5} Enquanto ratos Sprague Dawley saudáveis apresentam o pico de massa óssea por volta de 30–36 semanas de idade, ratos SHR estabilizam seu crescimento ósseo com apenas 18 semanas. Além disso, o valor de pico de massa óssea é cerca de 40 mg/cm² menor nos ratos SHR em comparação aos ratos saudáveis.⁶ Portanto, ratos SHR são considerados um modelo experimental para o estudo de osteoporose.⁷

Recebido em 30/05/2011. Aprovado, após revisão, em 05/03/2012. Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse. Comitê de Ética: 2011/10. Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo – EEF/USP.

1. Aluno de Graduação em Educação Física, Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo – EEF/USP

2. Mestranda em Fisiopatologia Experimental, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – InCor-HCFM/USP

3. Doutorando em Educação Física, EEF/USP

4. Especialista do Laboratório de Metabolismo Ósseo, FMUSP

5. Mestranda em Ciências, EEF/USP

6. Doutor em Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCM/USP; Professor Titular, EEF/USP

7. Doutora em Fisiologia Cardiovascular, USP; Professora do Departamento de Cardiopneumologia, FMUSP

8. Doutora em Reumatologia, FMUSP; Pós-Doutorado em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Célula Óssea, Connecticut University; Professora-Associada da Divisão de Reumatologia, FMUSP

9. Professor Doutor do Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano, EEF/USP

Correspondência para: Bruno Gualano. Av. Prof. Mello Moraes, 65 – Cidade Universitária. CEP: 05508-030. São Paulo, SP, Brasil. E-mail: gualano@usp.br

A demanda energética das células ósseas para sobreviver, proliferar, diferenciar-se e sintetizar matriz extracelular é sabidamente alta.⁸ Há evidências indicando que parte da energia necessária para esses processos é proveniente da creatina (Cr; ácido α -metil guanidínico acético), que exerce papel central na manutenção dos níveis de ATP e ADP em diversos tecidos, tais como musculoesquelético, cerebral, testicular, cartilaginoso e ósseo (para uma recente e abrangente revisão sobre o tema, ver Wallimann *et al.*⁹).

A hipótese de que a Cr poderia exercer importante participação no metabolismo ósseo foi primeiramente sugerida com base na identificação de isoformas da creatina quinase (CK), enzima responsável pela reação reversível: creatina fosfato + ADP + H⁺ \leftrightarrow creatina + ATP no osso.^{9,10} Além disso, ensaios *in vitro* indicam que estímulos capazes de induzir o desenvolvimento da massa óssea [p. ex., fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e hormônio paratireoideiano] elevam concomitantemente a atividade da CK, sugerindo que o sistema Cr/CK está associado ao processo de remodelamento ósseo.^{11,12} De fato, um estudo demonstrou que a incubação de Cr em meio de cultura com osteoblastos primários promove efeitos estimulatórios sobre diferenciação, atividade metabólica e mineralização óssea, elevando a razão fosforilcreatina/Cr e preservando a ultraestrutura e a função mitocondrial de osteoblastos.⁸

Evidências *in vivo*^{13,14} corroboram esses achados. Sabe-se que a suplementação de Cr pode aumentar a DMO e ocasionar adaptações biomecânicas benéficas no fêmur de ratos saudáveis.¹⁵ Em humanos, há evidências preliminares de que a suplementação de Cr pode prevenir a perda de massa óssea em pacientes com distrofia de Duchenne¹⁴ e em idosos submetidos a treinamento físico.¹⁶

Claramente, entretanto, o papel da suplementação alimentar com Cr permanece pouco explorado. Com o objetivo de aumentar a compreensão sobre os efeitos da Cr em possíveis condições de perda de massa óssea, o presente estudo investigou o efeito desse nutriente sobre a DMO e o conteúdo mineral ósseo (CMO) de ratos SHR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A amostra foi composta por 16 ratos SHR machos com 8 meses de idade. Os animais foram alocados no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados à Atividade Motora (Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo – EEF/USP) e mantidos em gaiolas plásticas (três a quatro animais por caixa), a uma temperatura ambiente

de 22,0 °C–24,0 °C e em ciclo de 12 horas (claro:escuro invertido). Água e ração foram oferecidas de modo irrestrito, com dieta normoproteica (12% de proteínas).

Desenho experimental

Os animais foram randomizados em dois grupos experimentais pareados pelo peso corporal, a saber: 1) Pl: ratos SHR tratados com placebo (n = 8); e 2) Cr: ratos SHR tratados com Cr (n = 8). Após nove semanas de intervenção os animais foram eutanasiados por decapitação. As peças ósseas (fêmur direito e coluna vertebral L1–L4) foram removidas com auxílio de material cirúrgico, imersas em soro fisiológico 0,9% e congeladas a –80 °C para posterior análise da DMO.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EEF/USP sob o protocolo 2011/10.

Suplementação de creatina

O grupo Cr foi suplementado diariamente com Cr (Ethika, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por meio de gavagem, durante nove semanas. A Cr em pó foi diluída em água (temperatura ambiente) na proporção de 200 g para cada litro de água, e a dosagem utilizada foi de 5 g/kg peso/dia.¹³ Os animais foram pesados diariamente para as correções necessárias. O grupo Pl recebeu água destilada via gavagem para mimetizar o estresse imposto ao grupo suplementado.

Densitometria mineral óssea

As análises da DMO e do CMO da coluna vertebral (L1–L4) e do fêmur total (o fêmur inteiro, incluindo a diáfise e as epífises) foram realizadas por densitometria óssea (*Dual Energy X-Ray Absorptiometry*; DXA). Para tal, utilizou-se o aparelho Discovery-A SN: 80999 Hologic (Bedford, MA, EUA) no modo *high resolution*, com auxílio do programa *small animal*, oferecido pelo mesmo fabricante. A precisão do DXA para análise da DMO foi previamente analisada pela mensuração do coeficiente de variação, expresso na porcentagem da média.^{17,18} O coeficiente de variação foi de 1,9% para a coluna vertebral e de 0,6% para o fêmur total. Em conjunto, esses dados indicam um alto nível de precisão nas medidas.

Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Empregou-se o teste *t* não pareado para comparar a DMO e o CMO dos grupos experimentais e ANOVA de dois fatores para avaliar semanalmente o peso corporal. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese nula foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Apenas um rato (PI) morreu ao longo do seguimento. O peso corporal não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos experimentais durante todo o estudo ($P = 0,48$; Figura 1).

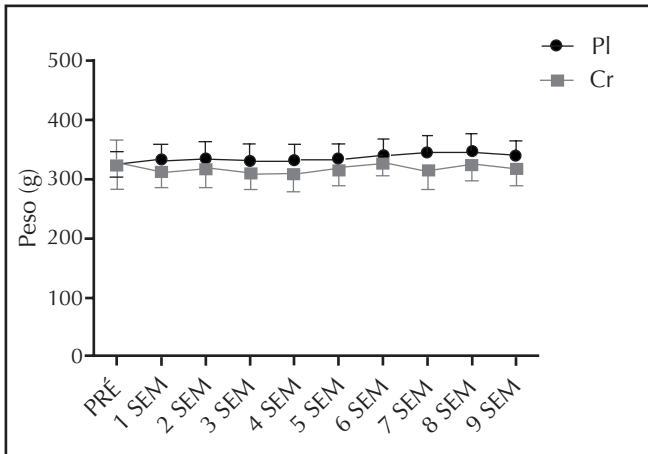


Figura 1

Peso corporal dos grupos experimentais (g).

PI: ratos SHR tratados com placebo; Cr: ratos SHR tratados com creatina. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos durante todo o seguimento.

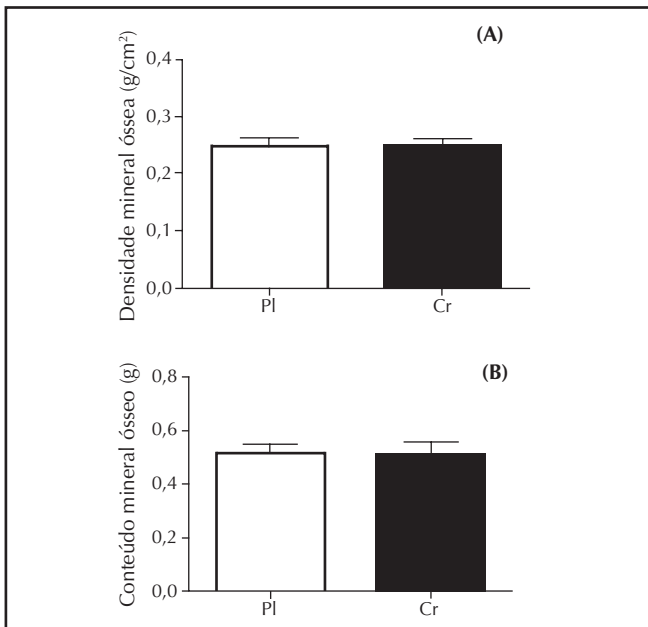


Figura 2

Densidade mineral óssea (A) e conteúdo mineral ósseo (B) na região de coluna lombar (L1–L4) dos grupos experimentais.

PI: ratos SHR tratados com placebo; Cr: ratos SHR tratados com creatina. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos.

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para a DMO (PI = $0,249 \pm 0,003$ g/cm² vs. Cr = $0,249 \pm 0,004$ g/cm²; $P = 0,95$; Figura 2A) e o CMO (PI = $0,509 \pm 0,150$ g vs. Cr = $0,509 \pm 0,017$ g; $P > 0,99$; Figura 2B) da coluna vertebral, bem como para a DMO (PI = $0,210 \pm 0,004$ g/cm² vs. Cr = $0,206 \pm 0,004$ g/cm²; $P > 0,49$; Figura 3A) e o CMO (PI = $0,407 \pm 0,021$ g vs. Cr = $0,385 \pm 0,021$ g; $P > 0,46$; Figura 3B) do fêmur total.

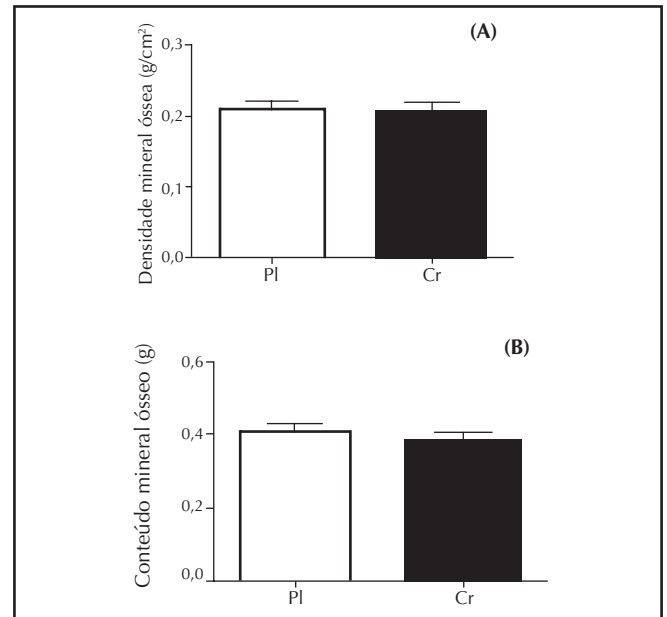


Figura 3

Densidade mineral óssea (A) e conteúdo mineral ósseo (B) na região do fêmur total dos grupos experimentais.

PI: ratos SHR tratados com placebo; Cr: ratos SHR tratados com creatina. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos.

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de Cr na massa óssea de ratos SHR, um modelo experimental bem-descrito para estudo de baixa massa óssea.³⁻⁵ Nossos achados vêm de encontro aos obtidos por Antolic *et al.*,¹⁵ que observaram efeitos benéficos da suplementação de Cr na massa óssea de ratos Sprague Dawley. Algumas diferenças metodológicas podem explicar os resultados contraditórios. Antolic *et al.*¹⁵ demonstraram benefícios da suplementação de Cr em ratos em fase de crescimento, ao passo que, no presente estudo, foram usados ratos adultos. O processo de crescimento e desenvolvimento ósseo é caracterizado por alto *turnover* ósseo, período mais suscetível a influências ambientais sobre a massa óssea.¹⁹ Possivelmente, os ganhos com a suplementação

de Cr poderiam ter sido acentuados nessa fase. Além disso, é importante ressaltar que o modelo SHR apresenta sabidamente alta reabsorção óssea e, por conseguinte, baixa massa óssea. Em contrapartida, o modelo Sprague Dawley estudado por Antolic *et al.*¹⁵ não apresenta alterações no metabolismo ósseo. Com base nas diferenças dos modelos experimentais, é possível especular que a suplementação de Cr seja mais eficaz em potencializar o ganho de massa óssea em ratos saudáveis em fase de crescimento que atenuar a perda de massa óssea em ratos em processo de perda de massa óssea.

Este trabalho apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, não avaliamos a captação tissular de Cr a fim de garantir o sucesso da suplementação. Contudo, a dosagem empregada neste estudo (5 g/kg peso/dia) tem sido considerada alta na literatura^{20,21} e efetiva em aumentar o conteúdo musculoesquelético de Cr em ratos Wistar.²¹ Estudos futuros precisam avaliar se a suplementação de Cr é capaz de elevar as concentrações desse substrato também no tecido ósseo. Por fim, é importante ressaltar que apenas ratos machos foram avaliados em nosso estudo. Sabendo que o gênero é um fator que influencia diretamente na resposta da massa óssea²² e, portanto, dada a impossibilidade de generalização desses dados para ambos os gêneros, novos estudos devem também avaliar o potencial terapêutico da Cr no remodelamento da massa óssea em fêmeas.

Embora existam evidências de que a suplementação de Cr poderia promover importantes efeitos terapêuticos, incluindo aumento de massa óssea,²³ nossos achados indicam que ratos SHR suplementados com Cr não apresentam tais ganhos. Tendo em vista a evidente dificuldade em se realizar grandes ensaios clínicos longitudinais, outros modelos que se caracterizam por perda de massa óssea (p. ex., ratos policísticos ou tratados com corticoides) devem ser investigados, a fim de se avaliar com maior profundidade o potencial terapêutico da Cr sobre a preservação da DMO em condições de baixa massa óssea. Contudo, cabe ressaltar que o metabolismo da Cr parece diferir substancialmente entre espécies, razão pela qual estudo em humanos deve ser conduzido com o intuito de comprovar todos os achados pré-clínicos.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

1. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res* 1981; 48(3):309–19.
2. Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE *et al.* The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1):383–96.
3. Bastos MF, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. *Braz Oral Res* 2010; 24(2):170–6.
4. Wright GL, DeMoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism* 2000; 49(9):1130–3.
5. Metz JA, Karanja N, Young EW, Morris CD, McCarron DA. Bone mineral density in spontaneous hypertension: differential effects of dietary calcium and sodium. *Am J Med Sci* 1990; 300(4):225–30.
6. Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1995; 22(1):S242–3.
7. Yamori Y, Fukuda S, Tsuchikura S, Ikeda K, Nara Y, Horie R. Stroke-prone SHR (SHRSP) as a model for osteoporosis. *Clin Exp Hypertens A* 1991; 13(5):755–62.
8. Gerber I, ap Gwynn I, Alini M, Wallimann T. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *Eur Cell Mat* 2005; 10:8–22.
9. Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 2011; 40(5):1271–96.
10. Wallimann T, Hemmer W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 1994; 133–134:193–220.
11. Sömjen D, Kaye AM, Rodan GA, 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* 1985; 37(6):635–8.
12. Sömjen D, Kaye AM. Stimulation by insulin-like growth factor-I of creatine kinase activity in skeletal-derived cells and tissues of male and female rats. *J Endocrinol* 1994; 143(2):251–9.
13. Chilibeck PD, Chrusch MJ, Chad KE, Shawn Davison K, Burke DG. Creatine monohydrate and resistance training increase bone mineral content and density in older men. *J Nutr Health Aging* 2005; 9(5):352–3.
14. Louis M, Lebacqz J, Poortmans JR, Belpaire-Dethiou MC, Devogelaer JP, Van Hecke P *et al.* Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve* 2003; 27(5):604–10.
15. Antolic A, Roy BD, Tarnopolsky MA, Zernicke RF, Wohl GR, Shaughnessy SG *et al.* Creatine monohydrate increases bone mineral density in young Sprague-Dawley rats. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39(5):816–20.
16. Candow DG, Chilibeck PD. Potential of creatine supplementation for improving aging bone health. *J Nutr Health Aging* 2010; 14(2):149–53.
17. Gala Paniagua J, Díaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo García M. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 1998; 71(847):754–8.
18. Patullo IM, Takayama L, Patullo RF, Jorgetti V, Pereira RM. Influence of ovariectomy and masticatory hypofunction on mandibular bone remodeling. *Oral Dis* 2009; 15(8):580–6.
19. Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Guerra B, Calbet JA. Exercise and bone mass in adults. *Sports Med* 2009; 39(6):439–68.

20. Nicastro H, Gualano B, de Moraes WM, de Salles Painelli V, da Luz CR, Dos Santos Costa A *et al.* Effects of creatine supplementation on muscle wasting and glucose homeostasis in rats treated with dexamethasone. *Amino Acids* 2011 Mar 5 [Epub ahead of print].
21. Aoki MS, Lima WP, Miyabara EH, Gouveia CH, Moriscot AS. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. *Clin Nutr* 2004; 23(5):1176–83.
22. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res* 1993; 8(5):567–73.
23. Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids* 2010; 38(1):31–44.