

SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA ASSOCIADA AO TREINAMENTO DE FORÇA DE ALTA INTENSIDADE ALTERA PARÂMETROS RENAI E HEPÁTICOS SEM PROMOVER LESÃO

CREATINE SUPPLEMENTATION ASSOCIATED WITH HIGH-INTENSITY STRENGTH TRAINING ALTERS RENAL AND HEPATIC PARAMETERS WITHOUT PROMOTING INJURY

LA SUPLEMENTACIÓN DE CREATINA ASOCIADA CON EL ENTRENAMIENTO DE FUERZA DE ALTA INTENSIDAD ALTERA LOS PARÁMETROS RENALES Y HEPÁTICOS SIN PROMOVER LESIONES

Resumo: A creatina é um suplemento utilizado por atletas e praticantes de atividade física porém, os efeitos adversos desse suplemento ainda são alvos de vários debates científicos. **Objetivo:** Avaliar a suplementação de creatina associada ao treinamento de força de alta intensidade sobre biomarcadores renais e hepáticos em ratos. **Métodos:** Ratos Wistar machos (n=24) foram divididos em quatro grupos: sedentário (S); sedentário + creatina (SC); treinado (T); treinado + creatina (TC). Os grupos com creatina foram suplementados com 0,040g/kg/peso corporal de creatina. O treinamento de força consistiu em saltos verticais em tanque com água, 3 dias/semana, durante 8 semanas. Amostras de sangue e urina foram coletadas para análise bioquímica renal e/ou hepática. O teste One-way-ANOVA foi usado com $p < 0,05$. **Resultados:** O treinamento associado à creatina aumentou a proteinúria no grupo TC ($16,38 \pm 1,94$ mg/24h) comparado ao grupo SC ($9,58 \pm 1,84$ mg/24h) ($p=0,02$). O treinamento, com ou sem creatina, foi efetivo em aumentar a concentração de lactato plasmático nos animais T ($61,17 \pm 2,7$ mg/dL) e TC ($82,2 \pm 13,1$ mg/dL) em relação aos sedentários ($40,17 \pm 0,65$ mg/dL) assim como a creatinina e a osmolaridade plasmática e enzima transaminase glutâmico-oxalacética (GOT). No entanto, o ritmo de filtração glomerular (RFG), a concentração plasmática e urinária de sódio e potássio, a transaminase glutâmico-pirúvica (GPT) e a relação GOT/GPT não foram alterados pelo exercício de força ou pela creatina. **Conclusão:** As alterações renais e hepáticas evidenciadas parecem ser causadas por adaptações fisiológicas ao exercício físico e/ou suplementação de creatina, e não por lesões nesses órgãos.

Palavras-chave: Suplementos dietéticos, Treinamento de força, Rim, Fígado, Creatina.

Abstract: Creatine is a supplement used by athletes and physical activity practitioners, however, the adverse effects of this supplement are still the subject of several scientific debates. **Objective:** To evaluate creatine supplementation associated with high-intensity strength training on kidney and liver biomarkers in rats. **Methods:** Male Wistar rats (n=24) were divided into four groups: sedentary (S); sedentary + creatine (SC); trained (T); trained + creatine (TC). The creatine groups were supplemented with 0.040g/kg/body weight of creatine. Strength training consisted of vertical jumps in a water tank, 3 days/week, for 8 weeks. Blood and urine samples were collected for renal and/or liver biochemical analysis. The One-way-ANOVA test was used with $p < 0.05$. **Results:** Training associated with creatine increased proteinuria in the TC group (16.38 ± 1.94 mg/24h) compared to the SC group (9.58 ± 1.84 mg/24h) ($p=0.02$). Training, with or without creatine, was effective in increasing plasma lactate concentration in T (61.17 ± 2.7 mg/dL) and TC (82.2 ± 13.1 mg/dL) animals compared to sedentary animals. (40.17 ± 0.65 mg/dL) as well as creatinine and plasma osmolality and glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT). However, the glomerular filtration rate (GFR), plasma and urinary sodium and potassium concentrations, glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and the GOT/GPT ratio were not altered by strength exercise or creatine. **Conclusion:** The renal and hepatic changes evidenced

Lílian Fernanda Pacheco¹ 

Raphael Martins Cunha² 

Christoffer Novais de Farias Silva³ 

Rodrigo Martins Miranda³ 

Johnattas Vinícius Gonçalves de Assis¹ 

Patrícia Maria Ferreira³ 

- 1- Universidade Estadual de Goiás;
- 2- UniEVANGELICA;
- 3- Universidade Federal de Goiás.

E-mail: lilianx@hotmail.com.

Recebido em: 27/10/2023

Revisado em: 03/07/2024

Aceito em: 10/07/2024



Copyright: © 2024. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

appear to be caused by physiological adaptations to physical exercise and/or creatine supplementation, and not by injuries to these organs.

Keywords: Dietary supplements, Strength training, Kidney, Liver, Creatine.

Resumen: La creatina es un complemento utilizado por deportistas y practicantes de actividad física, sin embargo, los efectos adversos de este complemento siguen siendo objeto de varios debates científicos. **Objetivo:** Evaluar la suplementación con creatina asociada con el entrenamiento de fuerza de alta intensidad en biomarcadores renales y hepáticos en ratas.

Métodos: Se dividieron ratas Wistar macho ($n=24$) en cuatro grupos: sedentarias (S); sedentario + creatina (SC); entrenado (T); entrenado + creatina (TC). Los grupos de creatina fueron suplementados con 0,040 g/kg/peso corporal de creatina. El entrenamiento de fuerza consistió en saltos verticales en un tanque de agua, 3 días a la semana, durante 8 semanas. Se recogieron muestras de sangre y orina para análisis bioquímicos renales y/o hepáticos. Se utilizó la prueba ANOVA unidireccional con $p < 0,05$. **Resultados:** El entrenamiento asociado a creatina aumentó la proteinuria en el grupo TC ($16,38 \pm 1,94$ mg/24 h) en comparación con el grupo SC ($9,58 \pm 1,84$ mg/24 h) ($p=0,02$). El entrenamiento, con o sin creatina, también fue eficaz para aumentar la concentración de lactato plasmático en los animales T ($61,17 \pm 2,7$ mg/dL) y TC ($82,2 \pm 13,1$ mg/dL) en comparación con los animales sedentarios ($40,17 \pm 0,65$ mg/dL) así como creatinina y osmolaridad plasmática y transaminasa glutámico-oxalacética (GOT). Sin embargo, el ritmo de filtración glomerular (TFG), las concentraciones plasmáticas y urinarias de sodio y potasio, transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) y la relación GOT/GPT no fueron alteradas por el ejercicio de fuerza o la creatina. **Conclusión:** Los cambios renales y hepáticos evidenciados parecen ser causados por adaptaciones fisiológicas al ejercicio físico y/o suplementación con creatina, y no por lesiones en estos órganos.

Palabras clave: Suplementos Dietéticos, Entrenamiento de Fuerza, Riñón, Hígado, Creatina.

INTRODUÇÃO

A Creatina (ácido α -metil guanidino acético) é o suplemento nutricional mais utilizado entre praticantes de exercícios e atletas que buscam melhorar o desempenho esportivo e também do exercício^{1,2}. É um composto orgânico que possui reconhecida ação ergogênica promovendo aumento do desempenho físico, força, potência, além de influenciar no aumento da massa magra³⁻⁵. Além disso, tem a capacidade de alterar o balanço hídrico, a osmolaridade celular e, por consequência, o equilíbrio de proteínas em humanos^{6,7}. É um composto encontrado no organismo nas formas livre e fosforilada, sendo armazenado predominantemente (~95%) no músculo estriado esquelético¹, produzido endogenamente e absorvido pela dieta, principalmente a partir de carnes vermelhas e peixes⁸. Cerca de 1 a 2% da creatina muscular é degradada em creatinina, sendo excretada pelos rins⁹. Os efeitos positivos da suplementação de creatina sobre o

desempenho atlético, execução de força e hipertrofia muscular, composição corporal em exercícios de força¹⁰ ou exercícios de alta intensidade¹¹ e também em idosos já estão bem estabelecidos na literatura científica.

O treinamento físico é uma forma de estresse fisiológico que causa diversas alterações neuroendócrinas, bioquímicas e cardiovasculares, e quando realizado em altas intensidades pode contribuir para o aumento desse estresse¹². O treinamento de força traz inúmeros benefícios para seus praticantes, entre eles o aumento da força e massa muscular, melhorou a composição corporal por meio da otimização dos padrões estéticos¹³, melhorou o condicionamento físico, tanto motor quanto relacionado à saúde¹⁴, além de melhorar a qualidade de vida de seus praticantes¹⁵. Nesse contexto, a suplementação de creatina é utilizada tanto como recurso ergogênico, gerando uma melhora na performance do praticante de treinamento de força¹⁶, bem como estética, por atuar na melhora dos

ganhos hipertróficos, aumento do gasto calórico e redução da gordura corporal¹⁷.

Porém, ao contrário dos benefícios, ainda se especula sobre os efeitos colaterais da suplementação de creatina. Alguns estudos têm sido desenvolvidos para entender possíveis efeitos deletérios sobre os rins e o fígado tanto em modelos experimentais¹⁸ quanto em estudos clínicos¹⁹. Os efeitos da suplementação de creatina sobre a função renal têm sido tema de debate desde a década de 1990, quando os primeiros estudos foram publicados associando a suplementação de creatina a danos renais²⁰, o que gerou uma reação em cadeia nos órgãos reguladores de saúde de vários países, que proibiram sua comercialização, levantando questões sobre sua segurança até os dias atuais. Embora seja claro o posicionamento da Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva¹ em garantir a eficácia e segurança deste suplemento, alguns estudos ainda encontram associações negativas em seu uso em parâmetros renais e/ou hepáticos^{18,21,22}.

Ainda é necessário conhecer os efeitos da suplementação de creatina, em diferentes protocolos, dosagens, bem como associada a diferentes tipos de exercícios e intensidades, em marcadores renais e hepáticos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de creatina associada ao treinamento de força de alta intensidade sobre biomarcadores renais e hepáticos em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Vinte e quatro ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*-Wistar) com 70 a 90 dias de

idade, $242,6 \pm 4,31$ g de peso corporal foram utilizados no presente estudo. Durante os protocolos experimentais, os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno ($45 \times 30 \times 15$ cm) cobertas com grades metálicas. Foram alocados 4 animais por caixa e mantidos sob ciclo claro-escuro (07:00–19:00), temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade de 40-70%, com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram seguidos pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) em pesquisa da Universidade Federal de Goiás-Brasil (número do protocolo 012.16) e esses procedimentos estão de acordo com a Resolução 897/2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os ratos foram divididos aleatoriamente, em igual número em 4 grupos:

a) Sedentário (S) (n = 6): Os ratos não foram submetidos ao treinamento de força e não foram suplementados com creatina;

b) Sedentário + creatina (SC) (n = 6): Os ratos não foram submetidos ao treinamento de força, mas foram suplementados com creatina;

c) Treinamento de força (T) (n = 6): Os ratos foram submetidos ao treinamento de força, mas não foram suplementados com creatina;

d) Treinamento de força + creatina (TC) (n = 6): Os ratos foram submetidos ao treinamento de força e foram suplementados com creatina.

Administração de Creatina

Os animais dos grupos SC e TC foram suplementados com creatina monohidratada micronizada HPLC (Probiótica, Brasil) apenas uma vez ao dia, às 09h00. A dose administrada foi de 400mg/kg/dia, três vezes por semana²³, durante oito semanas²⁴. A creatina foi diluída em

água destilada e administrada por gavagem²¹ por sonda oroesofágica adaptada a uma seringa. O regime de suplementação de creatina adotado no presente estudo deve ser considerado suprafisiológico²⁴ uma vez que a dose diária de 300 mg de creatina por quilograma de peso corporal utilizada em estudos com animais equivale à dose de ataque usual de 30g/dia em uma pessoa de 70 kg que produz os efeitos máximos em 5 dias²⁵.

Protocolo de treinamento de força

Os ratos alocados nos grupos experimentais com treinamento (T e TC) foram submetidos a um protocolo de treinamento de força na água, com um período de adaptação ao meio líquido antes do início do experimento. Os animais foram submetidos a 2 dias de natação, com duração de 60 minutos sem nenhuma sobrecarga, a fim de reduzir o estresse gerado pelo treinamento físico, sem, no entanto, causar adaptações fisiológicas significativas²⁶.

Após a adaptação hídrica, iniciou-se o protocolo experimental, onde os ratos foram submetidos a sessões individuais de treinamento de força realizadas conforme protocolo de Oliveira et al.²⁶. O treinamento de força, considerado de alta intensidade²⁷ consistia em saltos verticais do animal desde o fundo do tanque (apoio dos pés) até a narina ficar fora d'água, sendo realizado em 4 séries de 10 saltos com um -minuto de intervalo entre as séries. O treinamento foi realizado três vezes por semana, durante 8 semanas, iniciando às 10h de forma individual em um tanque cheio de água (diâmetro: 30 cm e altura: 55 cm). A temperatura da água foi mantida entre 30 e

32°C e para calcular a profundidade da água no tanque, inicialmente foi calculada a altura do animal considerando a distância da cauda ao focinho, a profundidade da água foi de 10 cm acima da altura de cada animal²⁸. Somado ao peso corporal, pequenas esferas de chumbo inseridas em saquinhos plásticos e presas ao corpo do animal foram utilizadas como sobrecarga (20% a 50% do peso corporal). A sobrecarga foi aumentada ao longo do período experimental, começando com 20% do peso do animal na primeira semana, e aumentando 10% a cada semana subsequente, até atingir 50%, permanecendo até a oitava semana.

Durante o protocolo experimental, o peso corporal dos animais foi medido sempre antes do treinamento, a fim de estabelecer a carga de treinamento e também a quantidade de creatina a ser administrada.

Dosagens e análises bioquímicas

As medições bioquímicas foram feitas a partir de amostras de sangue e urina. Para a análise do lactato sanguíneo, imediatamente após a última sessão de treinamento, o animal foi colocado em uma câmara aquecida para dilatar os vasos sanguíneos e, em seguida, colocado em uma caixa de contenção de acrílico.

A cauda foi limpa com gaze e álcool 70% e em seguida, sem uso de anestesia, foi coletada amostra de sangue por punção venosa na extremidade da cauda, com auxílio de cateter intravenoso, Jelco®24 G (0,7 x 19). O sangue coletado foi transferido para tubos de microcentrífuga heparinizados (capacidade de 1,5ml) e centrifugado a 5000 rpm/10min. Uma alíquota do sobrenadante (plasma) foi

transferida para outro tubo de microcentrifuga, rotulado, congelado e armazenado até que as medições fossem realizadas. Para avaliação de os níveis plasmáticos de lactato, foram utilizados kits comerciais Labtest® (lactato enzimático). As amostras foram quantificadas em um analisador automático LabMax Pleno®, (Labtest Diagnóstica, Brasil) usando um comprimento de onda entre 530 a 570 nm.

Após coleta de sangue para medição de lactato, os ratos foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais (Nalgene, Rochester, NY) por 24 horas. Ao final deste período, foram medidos o volume de urina (mL/24h), consumo de água (mL/24h) e consumo de ração (g/24h). A urina coletada foi centrifugada a 3.000 rpm/5min e uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo de microcentrifuga, marcada e congelada. Essas amostras foram submetidas às dosagens de creatinina, Na⁺, K⁺, osmolaridade e proteinúria.

Em seguida, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico 60 mg/kg (ip) e colocados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica. Foi feita uma incisão no abdome de forma que as paredes abdominais fossem rebatidas. Para determinação plasmática de creatinina, Na⁺, K⁺, osmolaridade, transaminase glutâmico-oxalacética (GOT) e transaminase glutâmico-pirúvica (GPT), foi coletado aproximadamente 1 mL de sangue por punção da veia cava inferior com seringa heparinizada. O sangue coletado foi transferido para um tubo de microcentrifuga, também heparinizado e centrifugado a 5000/10 min. O plasma sobrenadante foi então transferido para outro tubo de microcentrifuga, marcado e congelado até que as medições

fossem feitas. Após a eutanásia dos ratos, realizada com overdose anestésica de tiopental (100 mg/kg), os rins, baço, fígado e coração foram retirados e pesados.

O ritmo de filtração glomerular (RFG)- (mL/24h) foi calculado pelo clearance de creatinina. As concentrações plasmáticas e urinárias de creatinina foram medidas pelo método de Jaffé modificado usando um kit comercial (Bioclin K016, Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil)²⁹. As concentrações de Na⁺ e K⁺ nas amostras de urina e plasma foram determinadas por fotometria de chama (CELM, FC 280). Foi utilizado um padrão contendo 140 mEq/L de Na⁺ e 5 mEq/L de K⁺ preparado em água destilada na diluição de 1:200 e as leituras foram feitas em duplicata³⁰.

A determinação da osmolaridade plasmática e urinária foi realizada em osmômetro de ponto de congelamento (Microsmette, Advanced Instruments) utilizando padrões com osmolaridades adequadas para amostras de urina e plasma (100, 290 e 500 mOsm/Kg)³¹. Conhecendo as osmolaridades plasmáticas e urinárias, alguns parâmetros foram avaliados quantitativamente: depuração osmolar (Closm) e depuração de água livre (CH₂O).

A concentração de proteína urinária (proteinúria) foi obtida a partir do volume total de urina (24h) coletada no último dia do experimento. A proteinúria foi determinada por espectrofotômetro (BELphotonics 1105 com comprimento de onda de 600 nm) utilizando o kit comercial de pirogalol (MICROPROTE, Doles, Goiânia, GO, Brasil). Os valores foram calculados com base no fator de calibração, e

a concentração de proteína foi expressa em mg/24h²⁹.

Os níveis séricos das enzimas hepáticas transaminase glutâmico-oxalacética (GOT) e transaminase glutâmico-pirúvica (GPT) foram obtidos a partir dos kits LabTest® (GOT e GPT). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro BioTek® Synergy HT, de acordo com o comprimento de onda pré-estabelecido pelos kits. Todos os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas e Ensino em Saúde da Universidade Federal de Goiás (LACES/GFU). A relação entre GOT e GPT foi calculada (GOT/GPT).

Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA/USA). Os dados foram apresentados como média ± erro

padrão da média (EPM). Aplicou-se o teste ANOVA One-Way, com post-hoc de Tukey para comparação múltipla entre os grupos. Todas as análises foram consideradas significativas quando p<0,05.

RESULTADOS

A partir desta pesquisa, buscou-se conhecer os efeitos que a suplementação de creatina monohidratada associada ao treinamento de força de alta intensidade pode ter sobre os sistemas renal e hepático de ratos wistar adultos.

Para conhecer o efeito da creatina e do treinamento de força no desenvolvimento corporal, foram avaliados o ganho de peso corporal (peso final - peso inicial), rim, baço, fígado e peso do ventrículo esquerdo em ratos wistar após 8 semanas de intervenção (Tabela 1), e não houve diferença significativa entre os grupos para todos os órgãos.

Tabela 1. Peso corporal, peso dos rins, baço, fígado e ventrículo esquerdo de ratos Wistar após oito semanas de treinamento de força e suplementação de creatina.

Parâmetros	Grupos			
	S (n=6)	SC (n=6)	T (n=6)	TC (n=6)
Ganho de peso corporal (g)	137,3 ± 6,3	129,3 ± 8,9	122,0 ± 6,3	118,8 ± 6,7
Peso do rim direito (g)	1,25 ± 0,05	1,24 ± 0,02	1,20 ± 0,03	1,20 ± 0,08
Peso do rim esquerdo (g)	1,21 ± 0,04	1,19 ± 0,01	1,15 ± 0,03	1,17 ± 0,07
Peso do baço (g)	0,76 ± 0,03	0,73 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,67 ± 0,02
Peso do fígado (g)	14,37 ± 0,8	12,96 ± 0,6	14,31 ± 0,3	12,92 ± 0,9
Ventrículo esquerdo (g)	0,24 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,02

Legenda: S, Grupo sedentário; SC- Grupo sedentário + creatina; T – Grupo de treinamento de força; TC - Grupo treinamento de força + creatina.

Não houve diferença significativa no fluxo urinário e no consumo de ração, mas os animais do grupo TC apresentaram aumento significativo quanto a ingestão de água quando comparados aos animais do grupo SC (tabela 2).

Para avaliar a função renal, foi medida a concentração de proteína na urina (Figura 1). Houve um aumento significativo da proteinúria que passou de $9,58 \pm 1,84$ mg/24h nos animais que não treinaram, mas receberam creatina (SC) para $16,38 \pm 1,94$ mg/24h nos animais que treinaram e receberam suplementação de creatina (TC) ($p=0,02$).

Amostras de plasma e/ou urina foram utilizadas para avaliar as concentrações de lactato, creatinina, ritmo de filtração glomerular (RFG), bem como osmolaridade, *clearance* osmolar (Closm) e *clearance* de água livre

(CH₂O) (Tabela 3). Os animais dos grupos T e TC apresentaram aumento significativo do lactato sanguíneo quando comparados ao grupo S. Além do aumento em relação ao grupo S, o grupo TC também apresentou aumento significativo do lactato quando comparado ao grupo SC. A creatinina plasmática foi significativamente menor nos grupos que treinaram (T e TC) quando comparados aos grupos que não treinaram (S e SC). A creatinina urinária e o RFG não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Os animais dos grupos T e TC apresentaram aumento significativo da osmolaridade plasmática quando comparados aos grupos S e SC, assim como da osmolaridade urinária em que os grupos SC, T e TC apresentaram aumento significativo em relação ao grupo S.

Tabela 2 - Fluxo urinário, consumo de água e ração em ratos durante oito semanas de treinamento de força e suplementação de creatina.

Parâmetros	Grupos			
	S (n=6)	SC (n=6)	T (n=6)	TC (n=6)
Fluxo urinário (mL/24h)	$18,8 \pm 1,5$	$17,8 \pm 2,5$	$20,8 \pm 1,2$	$20,7 \pm 2,3$
Ingestão de água (mL/24h)	$36,5 \pm 2,3$	$34,2 \pm 6,56$	$53,3 \pm 5,6$	$55,0 \pm 5,0^{\#}$
Consumo de ração (g/24h)	$21,0 \pm 1,6$	$20,0 \pm 0,37$	$18,2 \pm 0,7$	$20,7 \pm 1,7$

Legenda: S, Grupo sedentário; SC- Grupo sedentário + creatina; T - Grupo de treinamento de força; TC - Grupo treinamento de força + creatina. # Indica uma diferença estatisticamente significativa de $p < 0,05$ vs SC.

O *clearance* osmolar (Closm) aumentou significativamente nos grupos T e TC em relação ao grupo S. O *clearance* de água livre (CH₂O) foi negativo em todos os grupos avaliados, indicando que a urina estava mais concentrada

do que diluída. Os animais dos grupos T e TC apresentaram CH₂O significativamente mais negativo quando comparados aos animais dos grupos S e SC.

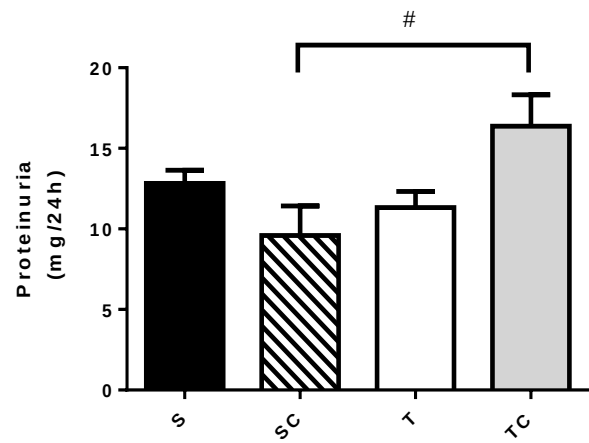


Figura 1- Proteinúria em ratos ao longo de oito semanas de treinamento e suplementação de creatina. S - Grupo sedentário; SC - Grupo sedentário + creatina; T - Grupo de treinamento de força; TC - Grupo treinamento de força + creatina. # p<0,05 vs SC.

Tabela 3- Concentração plasmática de lactato, creatinina, RFG e osmolaridade em ratos após oito semanas de treinamento de força e suplementação de creatina.

Parâmetros	Grupos			
	S (n=6)	SC (n=6)	T (n=6)	TC (n=6)
Lactato (mg/dL)	40,17 ± 0,65	48,50 ± 5,3	61,17 ± 2,7*	82,21 ± 13,1*#
Cr plasmática (mg/dL)	0,50 ±0,06	0,49 ± 0,07	0,30 ± 0,01*#	0,28 ± 0,03*#
Cr urinária (mg/dL)	49,80 ± 5,7	78,20 ± 16,0	62,50 ±8,2	54,12 ± 8,7
RFG (mL min)	1,40 ± 0,27	1,90 ± 0,36	3,10 ± 0,5	2,83 ± 0,6
Na ⁺ plasmático (mEq/L)	146,60 ± 0,79	144,60 ± 1,5	143,30 ± 0,6	142,91 ± 0,66
K ⁺ plasmático (mEq/L)	4,84 ± 0,2	4,87 ± 0,16	4,67 ± 0,19	5,20 ± 0,54
Osm plasmática (mg/dL)	307,80 ± 4,4	301,80 ± 9,5	324,00 ± 5,4*#	332,01 ± 6,0*#
Osm urinária (mg/dL)	1300 ± 197	1734 ± 71*	1890 ± 209*	2042 ± 101*#
Closm (mL/24h)	79,40 ± 7,6	102,27 ± 3,8	121,33 ± 2,0*	127,31 ± 5,5*
CH ₂ O (mL/min)	-0,042 ± 0,005	-0,059 ± 0,001*	-0,069±0,002*#	-0,074±0,001*#

Legenda: Cr - creatinina; RFG- Ritmo de filtração glomerular; Osm - Osmolaridade; Cl- clearance; S, Grupo sedentário; SC- Grupo sedentário + creatina; T – Grupo de treinamento de força; TC - Grupo treinamento de força + creatina. *p <0,05 vs S; #p <0,05 vs SC.

Em relação à função hepática, houve aumento significativo da enzima transaminase glutâmico-oxalacética (GOT) (U/L) nos animais dos grupos T ($117,8 \pm 6,4$) e TC ($106,8 \pm 4,0$) em relação ao grupo S ($63,0 \pm 13,4$) (tabela 4). No

entanto, não houve alterações significativas na concentração da enzima transaminase glutâmico-pirúvica (GPT) e na relação GOT/GPT entre os grupos.

Tabela 4- Concentração das enzimas hepáticas GOT e GPT e relação GOT/GPT em ratos após oito semanas de treinamento de força e suplementação de creatina.

Parâmetros	Grupos			
	S (n=6)	SC (n=6)	T (n=6)	TC (n=6)
GOT (U/L)	$63,0 \pm 13,4$	$90,3 \pm 14,3$	$117,8 \pm 6,4^*$	$106,8 \pm 4,0^*$
GPT (U/L)	$87,4 \pm 10,3$	$93,0 \pm 18,9$	$55,0 \pm 2,8$	$65,0 \pm 2,3$
GOT/GPT	$0,83 \pm 0,3$	$1,12 \pm 0,3$	$0,80 \pm 0,3$	$1,64 \pm 0,06$

Legenda: GOT - transaminase glutâmico-oxalacética; TGP - transaminase glutâmico-pirúvica; S, grupo sedentário; SC- grupo sedentário + creatina; T – grupo de treinamento de força; TC - grupo treinamento de força + creatina. * $p < 0,05$ vs S; # $p < 0,05$ vs SC.

DISCUSSÃO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de creatina associada ao treinamento de força de alta intensidade sobre os biomarcadores renais e hepáticos em ratos Wistar. Os dados mostraram excesso de proteinúria no grupo TC, sem alterações nos demais grupos. Não foram observadas alterações no Ritmo de filtração Glomerular (RFG) em nenhum grupo e a enzima GOT foi a única que apresentou aumento significativo nos grupos T e TC. No entanto, não houve alteração no fluxo urinário, consumo de ração, peso corporal, GPT, relação GOT/GPT e peso dos órgãos analisados.

O excesso de proteína na urina (proteinúria) é considerado um importante marcador da manifestação da doença renal³²

e é considerado um forte indicador de risco de morte³³. E embora muitas vezes a proteinúria não possa, por si só, indicar dano renal, autores afirmam que quanto maior a proteinúria, mais rápido o declínio da função renal³⁴. O presente estudo mostrou um aumento significativo da proteinúria apenas no grupo TC, e esse dado é corroborado por estudos semelhantes, que também mostraram que o exercício intenso associado à creatina pode promover um aumento na proteinúria tanto em animais³⁵ quanto em humanos³⁶.

O RFG é considerado um ponto central na avaliação da função renal³⁷ e quando a proteinúria está associada ao RFG e também ao aumento da concentração plasmática de creatinina, há evidências de lesão renal³⁸. No entanto, no presente estudo, embora tenha sido

observado aumento significativo da proteinúria no TC, houve uma redução significativa na creatinina plasmática e nenhuma alteração na RFG. Tais dados reforçam que esse aumento da proteinúria não está relacionado à lesão renal, mas sim a um provável aporte metabólico aumentado de proteínas, potencializado pelo intenso treinamento de força.

Em relação ao lactato, os grupos submetidos ao exercício intenso tiveram valores significativamente maiores após a intervenção do que o grupo S (sedentário), onde o grupo TC foi significativamente maior do que todos os outros grupos, evidenciando uma potencialização da suplementação de creatina na capacidade anaeróbica. Em um estudo³⁵ foram encontrados resultados semelhantes, onde os autores avaliaram ratos após um período de intervenção com natação com sobrecarga, com e sem suplementação de creatina, e tal aumento do lactato parece estar associado ao aumento do metabolismo anaeróbio e tem relação mais próxima com o treino, que é potencializado pelo uso da creatina, devido às outras adaptações neuromusculares que em conjunto a desencadeiam.

O treinamento de força utilizado no presente estudo caracteriza-se como de alta intensidade²⁶. Mesmo quando não associado à suplementação de creatina, esse tipo de treinamento parece promover alterações osmolares, pois houve alteração significativa tanto no grupo T quanto no grupo TC, quando comparado ao grupo S nos parâmetros osmolaridade plasmática, osmolaridade urinária, CH_2O e Closm . O exercício físico de alta intensidade é capaz de provocar alterações

hidroeletrolíticas, promovendo aumento da osmolaridade plasmática, causando alterações no equilíbrio osmótico³⁹. O sódio é o principal cátion do fluido extracelular e que ajuda a preservar o equilíbrio osmótico através da membrana plasmática e participa de muitos fenômenos eletrofisiológicos em células de mamíferos⁴⁰. No entanto, embora o Na^+ plasmático não tenha sido alterado pela suplementação de creatina ou pelo exercício, a osmolaridade plasmática e a depuração osmolar foram elevadas nos grupos que receberam creatina, com e sem treinamento, indicando uma regulação desse equilíbrio, que foi alterado pela suplementação e exercício.

Estudos com homens submetidos à condição de hiperosmolaridade extracelular mostraram aumento do volume celular devido ao aumento da síntese protéica⁴¹, o que pode ajudar a explicar, pelo menos em parte, o grupo TC apresentar valores mais elevados em relação aos grupos S e SC. Embora o mecanismo pelo qual a creatina promove alterações na osmolaridade dos líquidos corporais ainda não esteja totalmente elucidado⁶, os resultados, aqui apresentados, mostraram que a creatina associada ao treinamento de força intenso é eficaz em alterar esse equilíbrio osmótico. Sabe-se que o aumento da osmolaridade plasmática ativa osmorreceptores centrais que por sua vez ativam o circuito neural da sede⁴² e pode-se notar que animais que receberam creatina e que foram submetidos ao treinamento de força (TC) apresentaram aumento da osmolaridade plasmática, bem como aumento da ingestão de água quando comparados aos animais que não treinaram, mas receberam creatina (SC),

sem, no entanto, apresentar alterações no fluxo urinário.

Além disso, os animais treinados com ou sem suplementação de creatina apresentaram *clearance* de água livre de solutos (CH_2O) significativamente mais negativa do que os animais que não treinaram, indicando maior concentração de solutos na urina, indicando que o organismo está conservando água⁴³. A hipótese mais aceita para explicar o aumento da osmolaridade urinária e plasmática é o aumento da liberação do hormônio antidiurético (ADH), que, atuando nas porções inferiores do néfron, mais acentuadamente no ducto coletor, leva à produção de urina hipertônica, aumentando a osmolaridade urinária⁴⁴. Além disso, o ADH atua aumentando a permeabilidade das membranas das porções inferiores do néfron à água isenta de soluto, fazendo com que a depuração da água livre se torne negativa⁴⁵. Também é importante observar que, além do desequilíbrio osmótico, o exercício físico é um grande estimulante para o aumento da liberação de ADH, hormônio diretamente relacionado à manutenção dos fluidos corporais e do equilíbrio eletrolítico⁴⁶, o que poderia, pelo menos em parte, explicar o fato dos animais do grupo TC terem maior ingestão hídrica, mas sem alteração do fluxo urinário.

Com relação às enzimas hepáticas, o presente estudo demonstrou que houve aumento significativo do GOT nos animais treinados (T e TC) em relação ao grupo sedentário (S), porém não houve alteração no GPT. Exercício físico de alta intensidade podem desenvolver danos musculares que podem variar de micro a macro lesões, podendo

ocasionar a liberação de substâncias resultantes da degradação dos miócitos na corrente sanguínea⁴⁷, como eletrólitos, mioglobinas, proteínas sarcoplasmáticas⁴⁸ e também de isoformas musculares GOT^{49,50}, que ajudaria a explicar o aumento da GOT após um período de intenso exercício de força, com ou sem suplementação de creatina. A GPT é encontrada principalmente no citoplasma dos hepatócitos, enquanto 80% da GOT está presente na mitocôndria celular, sendo altamente sensível e um forte indicador de dano hepático⁵¹. No presente estudo, o treinamento de força associado ou não à creatina, embora tenha promovido aumento dos níveis plasmáticos de GOT, não alterou os níveis de GPT ou a relação GOT/GPT, indicando ausência de lesão hepática.

A literatura ainda diverge sobre o assunto. Santos et al.⁵² constataram que o treinamento de alta intensidade por um período de quatro semanas, em ratos, reduziu os valores de GOT e GPT. Diferentemente, Souza et al.¹⁸ estudaram ratos por 40 dias de intervenção com 60 minutos de natação moderada, 3 dias por semana, ou controle, com ou sem suplementação de creatina, e encontrou após intervenção um aumento de GOT no grupo creatina, e grupo exercício, e uma redução no grupo exercício com creatina, comparado ao grupo controle. O GPT aumentou no grupo exercício em relação aos grupos controle e creatina e diminuiu no grupo exercício com creatina em relação ao grupo exercício. Essas diferenças podem estar relacionadas aos diferentes protocolos adotados em cada estudo.

Esse estudo apresentou algumas limitações, tais como a contaminação das lâminas histológicas o que comprometeu a análise do parênquima renal e hepático. No entanto, as análises bioquímicas forneceram importantes informações a respeito das alterações fisiológicas decorrentes do uso da creatina associada ao treino de força de alta intensidade. E, embora haja muitos estudos mostrando os benefícios da creatina, é salutar destacar que a indicação desse suplemento, na prática clínica, deve ser feita com cautela e por profissionais qualificados para que tais alterações possam ser minimizadas.

CONCLUSÃO

Os dados mostram que a associação entre a suplementação de creatina e o treinamento de força de alta intensidade em ratos Wistar aumentou significativamente a proteinúria, o lactato, além da osmolaridade, bem como diminuiu significativamente o CH_2O livre e a creatina plasmática. Houve também

aumento significativo do GOT sem alterar o GPT e a relação GOT/GPT. As alterações bioquímicas evidenciadas no estudo não parecem estar relacionadas a lesões renais e hepáticas, mas a prováveis adaptações fisiológicas causadas pelo treinamento de força de alta intensidade, e que muitas vezes são potencializados pela suplementação de creatina.

APROVAÇÃO DA ÉTICA

Todos os procedimentos experimentais foram seguidos pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) em pesquisa da Universidade Federal de Goiás-Brasil (protocolo número 012.16) e esses procedimentos estão de acordo a Resolução 897/2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Kreider RB, Kalman DS, Antonio J, Ziegenfuss TN, Wildman R, Collins R *et al.* International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *J Int Soc Sports Nutr* 2017; 14: 18.
2. Wax B, Kerkick CM, Jagim AR, Mayo JJ, Lyons BC, Kreider RB. Creatine for Exercise and Sports Performance, with Recovery Considerations for Healthy Populations. *Nutrients* 2021; 13: 1915.
3. Pinto CL, Botelho PB, Carneiro JA, Mota JF. Impact of creatine supplementation in combination with resistance training on lean mass in the elderly. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; 7: 413–421.
4. Delpino FM, Figueiredo LM, Forbes SC, Candow DG, Santos HO. Influence of age, sex, and type of exercise on the efficacy of creatine supplementation on lean body mass: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutrition* 2022; 103–104: 111791.
5. Burke R, Piñero A, Coleman M, Mohan A, Sapuppo M, Augustin F *et al.* The Effects of Creatine Supplementation Combined with Resistance Training on Regional Measures of Muscle Hypertrophy: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Nutrients* 2023; 15: 2116.
6. Gualano B, Acquesta FM, Ugrinowitsch C, Tricoli V, Serrão JC, Lancha Junior AH. Efeitos da suplementação de creatina sobre força e hipertrofia muscular: atualizações. *Rev Bras Med Esporte* 2010; 16: 219–223.
7. Aragão GDC, Ferreira JCDS. Benefícios da creatina como suplemento nutricional. *Res Soc Dev* 2022; 11: e12511527827.
8. Sahlin K, Harris RC. The creatine kinase reaction: a simple reaction with functional complexity. *Amino Acids* 2011; 40: 1363–1367.

9. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiol Rev* 2000; 80: 1107–1213.
10. Souza-Junior TP, Willardson JM, Bloomer R, Leite RD, Fleck SJ, Oliveira PR *et al.* Strength and hypertrophy responses to constant and decreasing rest intervals in trained men using creatine supplementation. *J Int Soc Sports Nutr* 2011; 8: 17.
11. da Silva Azevedo AP, Michelone Acquesta F, Lancha AH, Bertuzzi R, Poortmans JR, Amadio AC *et al.* Creatine supplementation can improve impact control in high-intensity interval training. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 2019; 61: 99–104.
12. Morgado JM, Rama L, Silva I, de Jesus Inácio M, Henriques A, Laranjeira P *et al.* Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. *Eur J Appl Physiol* 2012; 112: 471–482.
13. Mata CS da, Espig CC, Santos DB dos. Efeitos de um treinamento de hipertrofia no ganho de força muscular e variação da composição corporal de mulheres participantes de musculação de academia. *RBPfEX - Rev Bras Prescrição E Fisiol Exerc* 2011; 5. <http://www.rbpfex.com.br/index.php/rbpfex/article/view/328> (accessed 14 Apr2021).
14. Santos AL dos, Costa VV da, Filho FSLV, Silva RC da R e, Oliveira LC da R, Aquino LSD *et al.* Efeito de um programa de treinamento concorrente com carga auto selecionada na aptidão física relacionada à saúde / Effect of a concurrent training program with auto selected load in health-related physical aptitude. *Braz J Dev* 2020; 6: 90551–90567.
15. Češeiko R, Eglītis J, Srebnij A, Timofejevs M, Purmalis E, Erts R *et al.* The impact of maximal strength training on quality of life among women with breast cancer undergoing treatment. *Exp Oncol* 2019; 41: 166–172.
16. Cooper R, Naclerio F, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J Int Soc Sports Nutr* 2012; 9: 33.
17. Eckerson JM. Creatine as an Ergogenic Aid for Female Athletes. *Strength Cond J* 2016; 38: 14–23.
18. Souza WM, Heck TG, Wronski EC, Ulbrich AZ, Boff E. Effects of creatine supplementation on biomarkers of hepatic and renal function in young trained rats. *Toxicol Mech Methods* 2013; 23: 697–701.
19. Almeida D, Colombini A, Machado M. Creatine supplementation improves performance, but is it safe? Double-blind placebo-controlled study. *J Sports Med Phys Fitness* 2020; 60: 1034–1039.
20. Pritchard N, Kalra P. Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. *The Lancet* 1998; 352: 233–234.
21. Baracho NC do V, Castro LP de, Borges N da C, Laira PB. Study of renal and hepatic toxicity in rats supplemented with creatine. *Acta Cir Bras* 2015; 30: 313–318.
22. Richards JR, Scheerlinck PH, Owen KP, Colby DK. Bodybuilding supplements leading to copper toxicity, encephalopathy, fulminant hepatic failure and rhabdomyolysis. *Am J Emerg Med* 2020; 38: 2487.e1–2487.e5.
23. Rahmani A, Asadollahi K, Soleimannejad K, Khalighi Z, Mohsenzadeh Y, Hemati R *et al.* The Effects of Creatine Monohydrate on Permeability of Coronary Artery Endothelium and Level of Blood Lipoprotein in Diabetic Rats. *Ann Clin Lab Sci* 2016; 46: 495–501.
24. Souza RA, Miranda H, Xavier M, Lazo-Orsorio RA, Gouvea HA, Cogo JC *et al.* Effects of high-dose creatine supplementation on kidney and liver responses in sedentary and exercised rats. *J Sports Sci Med* 2009; 8: 672–681.
25. Gerbatin RR, Silva LFA, Hoffmann MS, Della-Pace ID, do Nascimento PS, Kegler A *et al.* Delayed creatine supplementation counteracts reduction of GABAergic function and protects against seizures susceptibility after traumatic brain injury in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2019; 92: 328–338.
26. Oliveira CAM de, Rogatto GP, Luciano E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. *Rev Bras Med Esporte* 2002; 8: 219–224.
27. Bento-Silva, MT, Santos, MA, Almeida, FE. Exercise of light intensity decrease pain induced for thermal and chemical stimulus in rats. *Braz J Biomotric* 2010; 4: 14–23.
28. Franco FSC, Costa NMB, Oliveira TT, Gomes G de J, Silva KA da, Natali AJ. Effects of creatine and caffeine supplementation on the bone breaking force in rats subjected to vertical jumping exercise. *Rev Educ Física UEM* 2012; 23: 105–114.
29. Moreira Galdino P, Nunes Alexandre L, Fernanda Pacheco L, de Souza Lino Junior R, de Paula JR, Rodrigues Pedrino G *et al.* Nephroprotective effect of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth leaves on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol* 2017; 201: 100–107.

30. Portella VG, Cosenza GP, Diniz LRL, Pacheco LF, Cassali GD, Caliri MV *et al.* Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Nephron Extra* 2012; 2: 177–183.
31. Ahmed MM, Andleeb S, Saqib F, Hussain M, Khatun MostN, Ch BA *et al.* Diuretic and serum electrolyte regulation potential of aqueous methanolic extract of *Solanum surattense* fruit validates its folkloric use in dysuria. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16. doi:10.1186/s12906-016-1148-3.
32. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet Lond Engl* 2017; 389: 1238–1252.
33. Wagner DK, Harris T, Madans JH. Proteinuria as a biomarker: risk of subsequent morbidity and mortality. *Environ Res* 1994; 66: 160–172.
34. Burton C, Harris KPG. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 765–775.
35. Souza RA de, Miranda H, Xavier M, Salles BF de, Simão R, Osório RAL *et al.* Influence of short and long term creatine supplementation on enzymatic markers of muscle damage in sedentaries and exercised rats. *Rev Bras Educ Física E Esporte* 2010; 24: 343–352.
36. Melo Neto OP de, Carvalho AS de, Nicolau L de S, Costa AC, Dias GP da S. Análise da proteinúria após exercício físico intenso. *Rev Bras Análises Clínicas* 2017; 49. doi:10.21877/2448-3877.201700564.
37. Longobardi I, Gualano B, Seguro AC, Roschel H. Is It Time for a Requiem for Creatine Supplementation-Induced Kidney Failure? A Narrative Review. *Nutrients* 2023; 15: 1466.
38. Levey AS, Coresh J, Bolton K, Culleton B, Harvey KS, Ikizler TA *et al.* K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: i-ii+S1-S266.
39. Rehrer NJ. Fluid and Electrolyte Balance in Ultra-Endurance Sport. *Sports Med* 2001; 31: 701–715.
40. Lambert IH, Hoffmann EK, Pedersen SF. Cell volume regulation: physiology and pathophysiology. *Acta Physiol* 2008; 194: 255–282.
41. Berneis K, Ninnis R, Häussinger D, Keller U. Effects of hyper- and hypoosmolality on whole body protein and glucose kinetics in humans. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 1999; 276: E188–E195.
42. Pereira-Derderian DTB, Vendramini RC, Menani JV, Chiavegatto S, De Luca LA. Water deprivation-partial rehydration induces sensitization of sodium appetite and alteration of hypothalamic transcripts. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 2015; 310: R15–R23.
43. Distenhreft JIQ, Vianna JGP, Scopel GS, Ramos JM, Seguro AC, Luchi WM. The role of urea-induced osmotic diuresis and hypernatremia in a critically ill patient: case report and literature review. *Braz J Nephrol* 2019; 42: 106–112.
44. Cuzzo B, Padala SA, Lappin SL. Physiology, Vasopressin. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526069/> (accessed 14 Jul2023).
45. Naves LA, Vilar L, Costa ACF, Domingues L, Casulari LA. Abnormalities of ADH secretion and action. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol* 2003; 47: 467–481.
46. Pontes FL, Bacurau RFP, Moraes MR, Navarro F, Casarini DE, Pesquero JL *et al.* Kallikrein kinin system activation in post-exercise hypotension in water running of hypertensive volunteers. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 261–266.
47. Martelli A, Zavarize SF, Hunger MS, Delbim LR. ASPECTOS CLÍNICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA RABDOMIÓLISE APÓS ESFORÇO FÍSICO INTENSO. *Biológicas Saúde* 2014; 4. doi:10.25242/88684132014182.
48. Amorim MZ, Machado M, Hackney AC, de Oliveira W, Luz CPN, Pereira R. Sex differences in serum ck activity but not in glomerular filtration rate after resistance exercise: is there a sex dependent renal adaptative response? *J Physiol Sci* 2014; 64: 31–36.
49. Sayers SP, Clarkson PM. Exercise-induced Rhabdomyolysis. *Curr Sports Med Rep* 2002; 1: 59–60.
50. Morales AP, Maciel RN, Jorge FS, Arêas Neto NT, Cordeiro DDC, Viana MAS *et al.* Alterações dos níveis séricos de creatinina, ácido úrico, creatina kinase e da taxa de filtração glomerular em corredores de “rua”. *Rev Bras Cineantropometria E Desempenho Hum* 2013; 15: 71–81.
51. Liu Y, Zhao P, Cheng M, Yu L, Cheng Z, Fan L *et al.* AST to ALT ratio and arterial stiffness in non-fatty liver Japanese population: a secondary analysis based on a cross-sectional study. *Lipids Health Dis* 2018; 17: 275.
52. dos Santos FS, da Silva LA, Pochapski JA, Raczenski A, da Silva WC, Grassioli S *et al.* Effects of L-arginine and creatine administration on spatial memory in rats subjected to a chronic variable stress model. *Pharm Biol* 2014; 52: 1033–1038.