

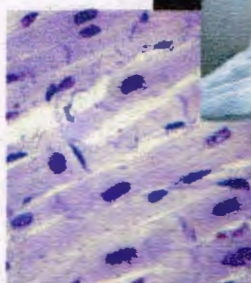
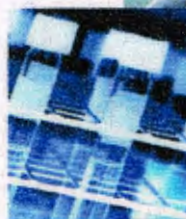
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
TRABAJO ESPECIAL II

EVALUACIÓN DE LA
SEGURIDAD DE LA
SUPLEMENTACIÓN CON
MONOHIDRATO DE
CREATINA A TRAVÉS
DE MARCADORES
BIOQUÍMICOS

Paula Cancela Cazorla

Mayo de 2004
Montevideo



577.124
CAN

P
577.124 CAN
Evaluación de la seguridad...
Cancela Cazorta, Paula



FC/10938

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MONOHIDRATO DE CREATINA A TRAVÉS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

ABSTRACT

Objetivo: El monohidrato de creatina (CrM) es un suplemento nutricional ampliamente usado por deportistas y para el tratamiento de patologías neurológicas y neuromusculares en las que el metabolismo energético está alterado, debido a que incrementa el rendimiento físico y retarda la fatiga muscular, entre otros efectos. El objetivo de este estudio fue evaluar la seguridad de la suplementación con CrM en deportistas sanos mediante el análisis de marcadores bioquímicos en sangre y orina que valoraran el metabolismo glucídico, la función renal, hepática y muscular.

Materiales y Métodos: En forma doble ciego y al azar, 14 jugadores de fútbol fueron asignados en dos grupos. El grupo Creatina (Cre) ingirió 15 g.día⁻¹ de CrM como dosis carga durante 7 días y luego 3.4 g.día⁻¹ por 49 días como dosis mantenimiento. Asimismo, el grupo Placebo (Pla) consumió iguales dosis de maltodextrina. Antes y después del período de suplementación se obtuvieron muestras de sangre en las que se determinó: la concentración de glucosa, creatinina, BUN, ácido úrico, proteínas totales, albúmina, colesterol total y triglicéridos, y la actividad de ASAT, ALAT, γ -GT y CK total; así como también se valoraron cualitativamente y cuantitativamente muestras de orina.

Resultados: Todos los marcadores bioquímicos evaluados, permanecieron dentro de los valores de referencia normales para deportistas sanos. La actividad de las enzimas ASAT, ALAT y γ -GT no varió significativamente; así como tampoco la concentración y el aclaramiento estimado de creatinina, BUN, relación BUN/creatinina, proteínas totales, albúmina, relación albúmina/globulina, colesterol total, triglicéridos; los marcadores y el sedimento urinario, luego del período de suplementación. Sin embargo, se observó una tendencia (p: 0.07) al descenso en la concentración de ácido úrico (mediana: 0.30 (Q₁: 0.23/ Q₃: 0.34) mmol.l⁻¹ vs. mediana: 0.27 (Q₁: 0.25/ Q₃: 0.30) mmol.l⁻¹), el incremento estadísticamente significativo (p: 0.04) en la actividad CK total (mediana: 255 (Q₁: 146/ Q₃: 443) UI.l⁻¹ vs. mediana: 378 (Q₁: 260/ Q₃: 577) UI. l⁻¹) y la disminución (p: 0.01) de la glicemia (mediana: 5.27 (Q₁: 5.05/ Q₃: 5.38) mmol.l⁻¹ vs. mediana: 4.61 (Q₁: 4.50/ Q₃: 5.22) mmol.l⁻¹) en el grupo Cre en comparación con el grupo Pla luego de finalizada la suplementación.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la CrM no afecta la función renal, hepática o muscular por lo que puede ser considerada un suplemento nutricional seguro para individuos sanos. El efecto ergogénico y terapéutico de la CrM podría deberse, en parte, a que incrementa la actividad CK total, produciendo la regulación positiva del circuito Cr-CK-FCr. Del mismo modo el suplemento parece impactar positivamente sobre la glucorregulación, lo que ofrecería nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de ciertas patologías.

Palabras clave: metabolismo energético, creatina monohidrato, marcadores bioquímicos, CK, glucosa, ácido úrico, ejercicio físico.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES.

La creatina (Cr) es un compuesto nitrogenado encontrado en forma natural, principalmente, en órganos y tejidos con alta y fluctuante demanda de energía como el músculo esquelético (95%), miocardio, encéfalo, testículos y retina, entre otros. El 60-70% se halla en forma fosforilada: fosfocreatina (FCr) y el resto como Cr libre (Jacobs 1999, Persky y Brazeau 2001, Wallimann *et al.* 1992) (Figura 1).

La FCr se localiza en el citosol y sirve como reservorio dinámico de fosfatos de alta energía debido

a su alto potencial de transferencia de grupos fosfato; a pH 7, la energía libre de hidrólisis es de -10,3 kcal.mol⁻¹ (Stryer 1990).

La creatina quinasa (CK) cataliza la transferencia reversible de un grupo fosforilo desde la FCr hasta el ADP para resintetizar ATP (Figura 1). Esta reacción se produce en fracciones de segundo, por lo que la energía almacenada como FCr está disponible en forma inmediata (Guyton y Hall 1998, Stryer 1990).

La concentración de creatina total en el mús-

culo de un individuo sano, determinada a través de biopsias musculares, varía entre 100-160 mmol. kg músc. seco⁻¹, dependiendo del tipo de fibra muscular; asimismo la capacidad de almacenaje está limitada por razones espaciales y funcionales (Engelhardt *et al.* 1998, Jacobs 1999).

El requerimiento promedio normal de Cr para reemplazar la pérdida por el catabolismo celular es de 2-3 g.día⁻¹ en un individuo de 70 a 100 kg de masa corporal. Aproximadamente el 50% es abastecido por la dieta primaria de carnes rojas y pescado, y el resto por la síntesis endógena (Terjung *et al.* 2000, Walker 1979).

Asimismo, la Cr como suplemento nutricional, bajo la forma de monohidrato de creatina (CrM)(C₄H₉N₃O₂·H₂O), es utilizada desde hace varios años por atletas profesionales y no profesionales, así como para el tratamiento de patologías neuromusculares y neurodegenerativas, debido a que incrementa el rendimiento del ejercicio físico y retarda la fatiga muscular, entre otros efectos.

Desde 1990 la CrM es aceptada por el Comité Olímpico Internacional y está incluida dentro de la «Dietary Supplement Health Education Act» (1994) de la «FDA» (*Food and Drugs Administration*) (Persky y Brazeau 2001). Es un producto comercializado en farmacias, de venta libre y ampliamente consumido por la población de nuestro país.

METABOLISMO.

La síntesis endógena de Cr se lleva a cabo a partir de arginina, glicina y metionina (Walker 1979) (Figura 1).

Existen varios puntos sobre los que es posible la regulación (Figura 1). El incremento de la velocidad, es el resultado de una dieta rica en arginina, glicina o guanidoacetato; lo que sugiere que la accesibilidad a estos aminoácidos es limitante en la síntesis del guanidoacetato, y que es un compuesto clave en la ruta metabólica (Walker 1979).

La retroinhibición de la arginina:glicina amidinotransferasa (AGAT) por la Cr o un derivado desconocido de esta es otro importante punto de regulación. De esta manera cuando la dieta es rica en Cr, la síntesis endógena es temporalmente suprimida, normalizándose al tiempo en que el compuesto es disminuido de la dieta (Walker 1979).

Se ha observado que la CrM atenúa o suprime la producción endógena de Cr, posiblemente a nivel de etapas precedentes a la traducción del ARNm de la AGAT (Walker 1979, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000). Sin embargo, luego del cese de la suplementación, se restablece la biosíntesis en aproximadamente 28 días (Vandenbergh *et al.* 1997). De todas maneras, este mecanismo aún no se ha establecido claramente.

La regulación también se lleva a cabo a nivel hormonal. Los individuos bajo condiciones anabólicas, con dieta adecuada y concentraciones sanguíneas óptimas de insulina, somatotropina, hormonas tiroideas y testosterona presentan una alta velocidad de biosíntesis (Walker 1979).

Si bien una pequeña proporción de la Cr es retenida en los tejidos donde es sintetizada, la mayoría es transportada por vía sanguínea para ser distribuida en el resto del organismo (Walker 1979).

En la figura 2 se observa un modelo fisiológico propuesto para la farmacocinética de la Cr (Persky y Brazeau 2001).

El protocolo clásico de suplementación con CrM implica dosis carga de 20-30 g. día⁻¹ (4-6 x 5 g) durante 5 - 7 días (Almada *et al.* 1997, Birch *et al.* 1994, Casey y Greenhaff 2000, Cox *et al.* 2002, Engelhardt *et al.* 1998, Finn *et al.* 2001, Greenhaff *et al.* 1994a, Gilliam *et al.* 2000, Harris *et al.* 1992, Hultman *et al.* 1996, Huso *et al.* 2002, Jones *et al.* 1999, Kamber *et al.* 1999, Kilduff *et al.* 2002, Mihic *et al.* 2000, Mujika *et al.* 2000, Nelson *et al.* 2000, Op' Eijnde *et al.* 2001c, Power *et al.* 2003, Preen *et al.* 2003, Rico-Sanz y Mendez 2000, Robinson *et al.* 2000, Schneider 1997, vanLeemputte *et al.* 1999, Volek *et al.* 1999, Wilder *et al.* 2001); y posteriormente, en algunos casos, dosis mantenimiento de 2-5 g.día⁻¹ (Almada *et al.* 1997, Burke *et al.* 2000, Hultman *et al.* 1996, Huso *et al.* 2002, Jones *et al.* 1999, Power *et al.* 2003, Preen *et al.* 2003, Robinson *et al.* 2000, Volek *et al.* 1999, Wilder *et al.* 2001).

Sin embargo, dosis carga tan elevadas no parece ser el método más efectivo para suplementar ya que podrían no ser totalmente retenidas por el músculo y por tanto ser excretadas. En estos casos, la saturación del músculo se ve reflejada en el progresivo incremento de la Cr urinaria y sus derivados. Similares, pero más graduales beneficios se observaron des-

pués de una suplementación con dosis iguales o menores a 10 g.d⁻¹. Resultados como estos llevaron a utilizar dosis menores, alcanzando iguales concentraciones de Cr intramuscular con mayor eficiencia (Almada *et al.* 1997, Engelhardt *et al.* 1998, Hultman *et al.* 1996, Peyrebrune *et al.* 1998, Terjung *et al.* 2000).

Por otro lado, las dosis usadas en los estudios clínicos varían debido a que son seleccionadas según la patología (Persky y Brazeau 2001).

La absorción de la Cr exógena está determinada por las propiedades fisicoquímicas de la molécula (PM: 131, carga neta positiva al pH duodenal y coeficiente de partición estimado: -2,7), así como por el flujo sanguíneo esplácnico (Persky y Brazeau 2001). Harris *et al.* (2002) demostraron que la CrM administrada en solución acuosa produce un mayor aumento de los niveles séricos en comparación con la forma sólida, debido a que esta última está más expuesta al pH ácido del estómago lo que podría reducir su biodisponibilidad.

Se cree que la absorción se realiza activamente a través del tracto gastrointestinal de forma similar a los aminoácidos y péptidos; sin embargo, estos mecanismos aún no han sido aclarados. La administración de CrM (1-10 g) muestra un tiempo máximo de concentración plasmática (Tmax) de <2 hs (Persky y Brazeau 2001).

La concentración de Cr en sangre es variable, los valores normales de referencia en hombres son: 8-31 µmol.l⁻¹ (Henry 1997).

Algunos trabajos muestran el incremento significativo luego del consumo de CrM (Kamber *et al.* 1999, Engelhardt *et al.* 1998, Terjung *et al.* 2000, Willer *et al.* 2000), sin embargo otros no (Mihic *et al.* 2000, Poortmans y Francaux 1999). No obstante, durante el ejercicio físico intenso, el alto consumo de Cr para la formación de FCr produce el descenso en los niveles sanguíneos (Henry 1997).

La Cr ingresa a los tejidos, contra gradiente de concentración, unida a una proteína transportadora

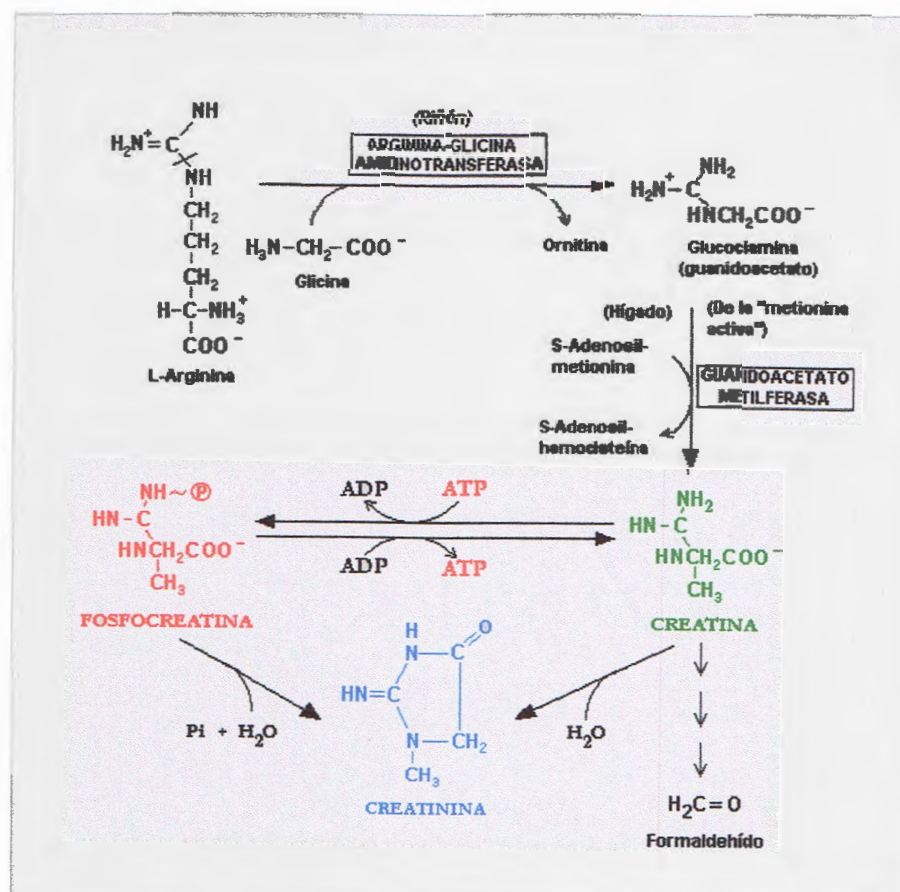


Figura 1. Biosíntesis de creatina, fosfocreatina y creatinina (Walker 1979).

específica (CreaT), sodio-cloro dependiente. El K_m y la velocidad máxima de la CreaT en el músculo se encuentran entre 20-160 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ y 100-600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, respectivamente (Guerrero-Ontiveros y Walliman 1998, Persky y Brazeau 2001, Snow y Murphy 2001, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

La distribución de Cr en el organismo es determinada por la presencia de este transportador en los tejidos (Persky *et al.* 2003.)

El ingreso no sólo está influenciado por la concentración intramuscular de Cr sino también por otros factores. El ejercicio físico que agota las reservas de FCr, incrementa marcadamente la acumulación intramuscular del compuesto luego de la actividad. Esta respuesta se atribuye a fenómenos tales como el incremento del flujo sanguíneo debido al ejercicio, lo cual estimula la distribución de Cr al músculo y/o el aumento de la translocación de la CreaT en la membrana celular como consecuencia de la actividad física (Persky y Brazeau 2001, Prevost *et al.* 1997, Raimondi *et al.* 1975, Schedel *et al.* 2000).

También la insulina estimula el ingreso al músculo, por tanto disminuye la retroinhibición de la AGAT en el hígado y en el páncreas. La administración de carbohidratos como glucosa o maltodextrina junto con CrM, potencia en ~60% la acumulación dentro de la fibra muscular (Casey y Greenhaff 2000, Green *et al.* 1996a, Persky y Brazeau 2001, Steenge *et al.* 1998, Walker 1979).

A través del análisis de biopsias musculares se determinó que la CrM (10-30 g por día) durante 5-7 días (en dosis de 5 g) produce un incremento intramuscular promedio de Cr del 15-30% y de FCr del 10-40%. La mayor retención se produce los primeros días de suplementación (Becque *et al.* 2000, Casey y Greenhaff 2000, Febbraio *et al.* 1995, Greenhaff *et al.* 1994a, Hultman *et al.* 1996, Jacobs 1999, McNaughton *et al.* 1998, Persky y Brazeau 2001, Sinclair *et al.* 1999, Snow *et al.* 1998).

Sin embargo, la magnitud de respuesta varía ampliamente entre los individuos. Aquellos con concentraciones naturalmente bajas, muestran una mayor acumulación (Greenhaff *et al.* 1994a). Individuos con miopatías o patologías neuromusculares neurodegenerativas que presentan característicamente concentraciones intramusculares disminuidas, son un claro ejemplo de esto (Persky y Brazeau 2001, Wyss

y Kaddurah-Daouk 2000).

Asimismo, se estima que ~20-30% de los su-

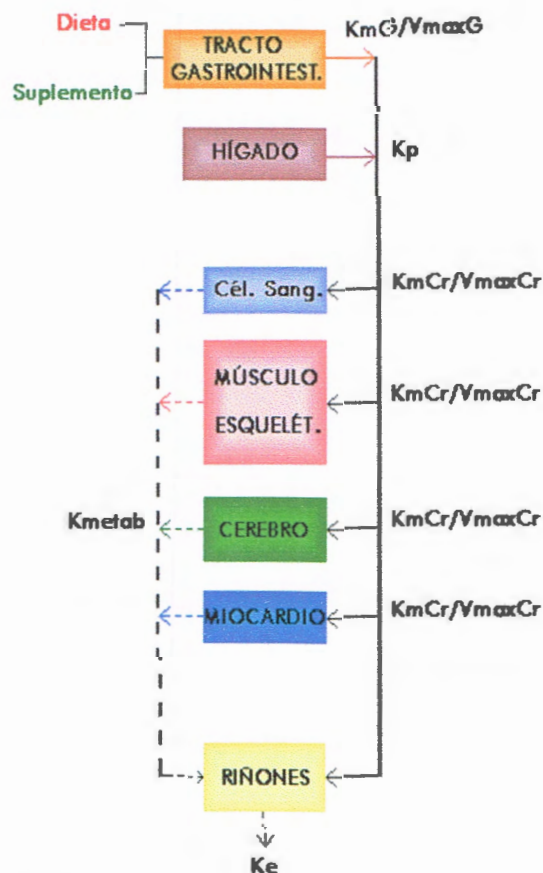


Figura 2. Modelo fisiológico propuesto para la farmacocinética de la creatina (Cr). La Cr entra al sistema a través de la dieta (constante de velocidad de Michaelis-Menten K_mG y V_{maxG}) o constante de orden cero de producción hepática (K_p). K_mCr y V_{maxCr} , que representa la cinética de Michaelis-Menten para el ingreso saturable de Cr a través del transportador de creatina (CreaT). K_{metab} es la constante de velocidad de primer orden para la conversión de Cr en Creatinina (Crn). K_e es la constante de velocidad de eliminación para la Crn. Las líneas sólidas indican la vía de la Cr y las líneas discontinuadas indican la vía de la Crn (Persky y Brazeau 2001).

jetos no responden con un aumento en la concentración intramuscular. Las razones de este fenómeno son aún desconocidas. No obstante, se ha observado que la administración de Cr junto con carbohidratos evita esta ausencia de respuesta (Persky y Brazeau 2001, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

La Cr que no ingresa a los tejidos es filtrada por los glomérulos renales a través de difusión simple pero en su mayor parte es reabsorbida a nivel de los túbulos contorneados proximales, mediante transpor-

te activo a través de membrana. Por consiguiente, la excreción neta en la orina es mínima: $0-0,30 \text{ mmol} \cdot 24\text{hs}^{-1}$ (en hombres) (Henry 1997). No obstante, como ya se mencionó, puede incrementarse como reflejo de la saturación de los tejidos.

Como resultado de la deshidratación no enzimática de la Cr y FCr, se forma un único compuesto de desecho: creatinina (Crn) (Figura 1). La cual es eliminada libremente a nivel de los túbulos contorneados proximales y prácticamente, en circunstancias normales, no es reabsorbida. Incluso las células tubulares renales secretan una pequeña cantidad del compuesto. Los valores normales de referencia en sangre y en orina son: $44,0-124,0 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ y $177-230 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 24\text{hs}^{-1}$, respectivamente. Son relativamente constantes debido a que como la mayoría de la Cr y FCr se encuentra en el músculo, la concentración de Crn varía en función de la masa muscular. En individuos sanos, la dieta rica en Cr y la acidificación del músculo debida, por ejemplo, al ejercicio físico vigoroso, provocan incremento significativo en la producción del compuesto (Henry 1997).

CIRCUITO: Cr-CK-FCr (MECANISMO DE ACCIÓN).

La Cr está involucrada en la producción inmediata de ATP a través del sistema: Cr-CK-FCr (Figura 1 y 3).

La CK, enzima de la familia de las guanidoacetato quinasas, presenta cuatro subunidades expresadas de manera tejido-específica: dos isoformas mitocondriales: CKmi: ubicua y sarcomérica, localizadas en el espacio intermembrana, formando moléculas diméricas y octaméricas interconvertibles; y dos isoformas citosólicas: M-CK y B-CK. *In vivo*, las subunidades M-CK y B-CK se combinan para dar tres isoenzimas diméricas: MM-CK (músculo esquelético), MB-CK (músculo cardíaco) y BB-CK (encéfalo) (Wallimann *et al.* 1992).

Las isoformas mitocondrial y citosólica se encuentran acopladas funcionalmente a la fosforilación oxidativa y a la glicólisis, respectivamente. De tal manera que el grupo fosforilo de la FCr proviene del ATP generado por estos dos mecanismos (Wallimann *et al.* 1992).

El aporte relativo de cada sistema dependerá del tipo de fibra muscular. En las fibras tipo I (lentas), el ATP para la fosforilación de la Cr proviene princi-

palmente de la fosforilación oxidativa, por lo que la isoforma CKmi es la predominante. En cambio, en las fibras tipo II (rápidas), el ATP es principalmente abastecido por la glicólisis (Wallimann *et al.* 1992).

Se considera que debido a la compartimentación de las isoenzimas de la CK, la FCr actúa como una lanzadera de fosfatos de alta energía transportando ATP desde los sitios de síntesis hacia los de consumo (miofibrillas). Esta función de transporte de energía es particularmente importante en las fibras tipo I donde es necesario transportar el ATP desde las mitocondrias hacia los filamentos contráctiles ubicados en el citoplasma. La Cr reciclada vuelve a la mitocondria y es fosforilada nuevamente a FCr por lo que puede influir sobre el control de la respiración mitocondrial. La FCr sirve como señal uniendo la utilización de energía en el citosol a la producción en la mitocondria (Raimondi *et al.* 1975, Wallimann *et al.* 1992) (Figura 3).

En cambio en las fibras tipo II predomina la función amortiguadora del sistema Cr-CK-FCr. El ATP es principalmente generado por la glicólisis anaerobia que ocurre en el citoplasma por lo que no es necesario transportar la energía hacia los sitios de consumo.

Para las ATPasas miofibrilares, la FCr sirve como donador de fosfatos, restaurando el ADP a ATP (Wallimann *et al.* 1992).

El sistema CK-FCr también impide la acumulación intracelular de ADP, esto evita la inactivación de las ATPasas celulares y la pérdida neta de nucleótidos de adenina (Wallimann *et al.* 1992).

Debido a que la hidrólisis de la FCr consume protones, contribuye a amortiguar la acidosis intracelular que podría producir la ruptura de grandes cantidades de ATP en un breve período de tiempo (Wallimann *et al.* 1992).

Asimismo los productos de hidrólisis de la FCr (Cr y Pi) activan la glicogenolisis y otras vías catabólicas. Parece razonable pensar entonces, que el aumento de la concentración de FCr dentro de la fibra, conlleve al aumento del Pi, estimulando la glicólisis y por tanto permitiendo un mayor trabajo muscular (Wallimann *et al.* 1992).

A su vez la CK es una enzima clave en el mantenimiento de la relación local: ATP/ADP apropiada en aquellos sitios donde está funcionalmente acoplada a procesos o enzimas que consumen energía. Esto pue-

de deberse a que la CK tiene un valor de K_m pequeño para el ADP (10-35 μM) y puede considerarse como un sensor de ADP de bajo umbral. Además, para mantener la relación alta ATP/ADP en la vecindad de una ATPasa, la CK incrementa la eficiencia termodinámica de la hidrólisis del ATP. Las mismas características reguladoras y metabólicas se aplican para la enzima en los sitios de producción de energía. En este caso la CK está minimizando la energía libre requerida para la síntesis del ATP (Wallimann *et al.* 1992).

Sin embargo, las reservas de FCr se agotan en pocos segundos (8-10 s) y se requieren aproximadamente 60-90 s para la recuperación total. Entonces en términos bioquímicos, la administración de CrM aumenta las reservas intramusculares de Cr total (Cr + FCr) recargando el circuito Cr-CK-FCr y por tanto retardando el agotamiento. Esto se refleja en que aquellos individuos que experimentan la mayor acumulación intramuscular de Cr durante la suplementación son los que demuestran los mayores beneficios durante la ejecución de los ejercicios, y retraso en la aparición de la fatiga muscular (Benzi 2000, Casey y Greenhaff 2000, Harris *et al.* 1992, Stout *et al.* 2000).

Existen varios argumentos para explicar estos fenómenos. El aumento de la accesibilidad mientras se

realiza el ejercicio y el incremento de la velocidad de resíntesis de FCr durante la recuperación, serían algunos de los mecanismos responsables de los efectos ergogénicos (Greenhaff *et al.* 1994, Hargreaves *et al.* 1998, Terjung *et al.* 2000).

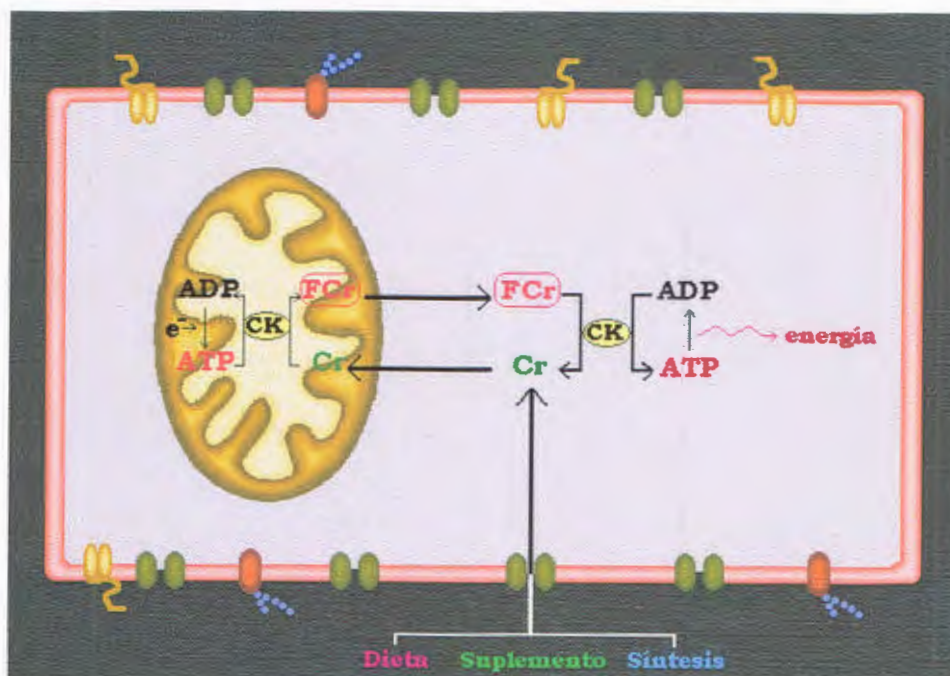
Otros trabajos sostienen que disminuye significativamente el tiempo de relajación muscular luego de la contracción máxima (vanLeemputte *et al.* 1999, Schneider *et al.* 1997). Como se sabe, un menor tiempo de relajación aumenta la eficiencia mecánica del movimiento (Morehouse y Miller 1976).

Por otro lado, varios estudios también mostraron el incremento significativo de la masa muscular (Ingwall 1976, Kreider *et al.* 1998, Hespel 2001, Persky y Brazeau 2001, Volek *et al.* 1999, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

Esto podría ser el resultado del aumento de la síntesis o la reducción del catabolismo proteico. Se encontró que la CrM incrementa la síntesis proteica *in vitro* e *in vivo*, lo que se manifestó en el aumento del diámetro de las fibras tipo I y II (Volek *et al.* 1999, Persky y Brazeau 2001).

Asimismo, se comprobó el incremento en la expresión del ARNm de la cadena pesada de las tres isoformas de la miosina, luego de 12 semanas de

Figura 3. Modelo de la función de amortiguación temporal y espacial (transporte) de energía de la CK.



suplementación (Willoughby y Rosene 2001), así como que la CrM podría incidir sobre las células satélite musculares intensificando su actividad mitótica (Dangott *et al.* 2000). También se observó que estimula la hipertrofia muscular durante la rehabilitación física luego de la atrofia por desuso. Se ha sugerido que este fenómeno podría estar mediado por cambios en la expresión de factores de transcripción miogénicos (MRF4 y miogenina) luego del consumo de CrM (Hespel 2001).

No obstante, otros trabajos no encontraron efectos sobre la síntesis proteica (Rawson *et al.* 1999, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

A su vez el trabajo de Kreider y sus colaboradores (1998) mostraron el descenso en el catabolismo proteico. La relación de metabolitos sanguíneos: urea-nitrógeno/Cr_u se mantuvo constante en comparación con el grupo control que mostró un significativo incremento. Esto es relevante, si se considera que esta relación es usada como marcador general del estado anabólico-catabólico muscular.

DEPORTE Y PATOLOGÍAS.

Alrededor del 70-80% de los estudios en los que se investigó el valor ergogénico a corto (5-7 días) y mediano o largo plazo (7-140 días) de suplementación, informaron el incremento significativo en el rendimiento del trabajo muscular que utiliza los fosfágenos (ATP y FCr) como fuente de energía (por ejemplo: ejercicios repetitivos, de potencia, etc.). Estos resultados positivos se observaron en numerosos ejercicios físicos y deportes como: fútbol, atletismo, trabajos de sobrecarga, ciclismo, remo, rugby, etc. (Balsom *et al.* 1995, Bembien *et al.* 2001, Birch *et al.* 1994, Casey y Greenhaff 2000, Cox *et al.* 2002, Engelhardt *et al.* 1998, Grindstaff *et al.* 1997, Izquierdo *et al.* 2002, Jones *et al.* 1999, Kambis y Pizzedaz 2003, Kilduff *et al.* 2002, Kreider *et al.* 1998, Lehmkuhl *et al.* 2003, Mujika *et al.* 2000, Preen *et al.* 2001, Prevost *et al.* 1997, Volek *et al.* 1999).

Del mismo modo, la CrM también es responsable de mejoras en la función muscular y el metabolismo energético en determinadas condiciones patológicas, varios trabajos lo demuestran (Barisic *et al.* 2002, Bianchi *et al.* 2000, Chang *et al.* 2002, Dedeoglu *et al.* 2003, Felber *et al.* 2000, Ferrante *et al.* 2000, Jacobs *et al.* 2002, Louis *et al.* 2003, Mazzini *et al.*

2001, Stout *et al.* 2001, Vorgerd *et al.* 2000, Wyss y Schulze 2002).

Sin embargo, no todas las investigaciones reflejan estos beneficios (Drory y Gross 2002, Febbraio *et al.* 1995, Klopstock *et al.* 2000, Op't Eijnde *et al.* 2001c, Redondo *et al.* 1996, Tarnopolsky *et al.* 2004, Terrillion *et al.* 1997).

MARCADORES BIOQUÍMICOS.

A pesar de todos los beneficios anteriormente citados, la seguridad del consumo de CrM ha sido cuestionada por diversas causas (Juhn 1999, Pritchard y Kalra 1998).

Una de ellas es que la administración crónica de Cr podría producir citotoxicidad. Esto radica en que la Cr puede metabolizarse a metilamina, la cual posteriormente se convierte en formaldehído, compuesto conocido por su afinidad con las proteínas y el ADN, lo que se relaciona con diversas condiciones patológicas (Yu y Deng 2000) (Figura 1).

En general el uso y la recomendación de suplementos nutricionales como ayuda ergogénica en deportistas es discutido. Los profesionales de la salud sugieren su uso en forma cuidadosa y sólo luego de exhaustivos estudios de calidad, seguridad y legalidad. Más aún, cuando estos productos pueden ser útiles además para el tratamiento de diversas patologías.

Si bien con las dosis de CrM comúnmente sugeridas no se informaron efectos no deseados, no existen suficientes estudios científicos en los que se haya investigado específicamente posibles riesgos para la salud.

a. Función renal

La CrM tiene un alto contenido de nitrógeno (32%), considerando que el exceso de compuestos nitrogenados en la dieta se asocia con hiperfiltración, vasodilatación e inhibición de la reabsorción tubular de proteínas; se ha argumentado que el consumo de este suplemento podría inducir deterioro de la función y estructura renal (Poortmans y Francaux 1999).

De acuerdo con esto, se informaron casos aislados en los que la CrM produjo insuficiencia renal (Barisic *et al.* 2002, Edmunds *et al.* 2001, Pritchard y Kalra 1998), sin embargo es de notar que los individuos involucrados presentaban enfermedad renal pre-existente, por lo que no deja claro la responsabilidad

del compuesto.

No obstante, el hecho de que en varias investigaciones la concentración de Crn en suero y orina durante la suplementación se encontrara ligeramente aumentada (Engelhardt *et al.* 1998, Hultman *et al.* 1996, Kamber *et al.* 1999, Kreider *et al.* 1998, Volek *et al.* 2000), es interesante. La razón es que la elevación en los niveles de Crn, urea y ácido úrico, entre otros compuestos, constituye un marcador de disfunción renal (Henry 1997, Ward 1981).

Sin embargo, no se puede olvidar que el ejercicio intenso puede producir, en individuos sanos, un incremento moderado de Crn (Henry 1997, Ward 1981), hallazgo que no es clínicamente importante.

En virtud de la independencia relativa con respecto a la dieta, al grado de hidratación y a su producción constante, se considera que la determinación de Crn en suero es uno de los índices más fiables para explorar la función renal. A su vez, la función renal global y algunos aspectos de su fisiología pueden determinarse a través del aclaramiento de Crn endógena, los valores de referencia normales oscilan entre 90-140 ml.min⁻¹. El descenso en el aclaramiento de Crn se relaciona con insuficiencia renal progresiva (Henry 1997, Ward 1981).

El aumento de la concentración sanguínea de urea también refleja una disminución del filtrado glomerular. Sin embargo este índice varía entre los individuos sanos y está influido por la ingestión de proteínas, el catabolismo proteico y el estado de hidratación. Como el nitrógeno representa el 47% del peso molecular de la urea, su concentración se expresa como nitrógeno ureico en sangre (BUN o *Blood Urea Nitrogen*). Los valores normales de referencia oscilan entre 5-23 mg.dl⁻¹ (1.8-8.3 mmol.l⁻¹) (Farreras y Rozmán 1988, Henry 1997, Ward 1981).

Debido a que el filtrado glomerular se relaciona con el BUN en forma hiperbólica, no aumenta significativamente hasta que el filtrado disminuye ~50%. Por lo que es evidente que resulta un indicador aproximado (Farreras y Rozmán 1988, Ward 1981).

De todas maneras, aunque la Crn es considerada superior al BUN como prueba única, no es óptima ya que presenta algunos problemas como indicador de falla renal incipiente, por tanto existen argumentos convincentes para realizar ambas determinaciones. Normalmente la relación BUN/Crn es ~10:1 a

20:1 (Farreras y Rozmán 1988, Ward 1981).

El ácido úrico también sirve como marcador de deterioro de la función renal. Sin embargo, como su elevación además puede estar relacionada con alteraciones primarias del metabolismo de las purinas, la uricemia por sí sola no se emplea para valorar el funcionalismo renal, sino que se utiliza junto con los parámetros anteriormente mencionados. Los valores de referencia normales en hombres son: 3,5-7,0 mg.dl⁻¹ (0,15-0,36 mmol.l⁻¹) (Farreras y Rozmán 1988, Henry 1997).

Asimismo, las alteraciones de la orina (proteinuria, hematuria, leucocituria, presencia de cilindros y cristaluria anormal) constituyen manifestaciones patológicas en la mayoría de las enfermedades renales.

La proteinuria, signo más frecuente de enfermedad renal, se debe a una disminución en la reabsorción (función tubular) o en la mayoría de los casos, a un aumento anormal de la permeabilidad de la membrana basal glomerular. Sin embargo, los individuos sanos pueden exceder levemente los niveles normales después de un ejercicio físico intenso o de deshidratación. Proteinurias patológicas, habitualmente dan resultados persistentes por encima de 30 mg.dl⁻¹ de orina (Farreras y Rozmán 1988, Henry 1997).

Poortmans y Francaux (1999) demostraron que individuos sanos suplementados durante 10 meses a 5 años, no mostraron alteración en el aclaramiento de Crn, urea y albúmina, con respecto al grupo control. Por lo que, la velocidad de filtración glomerular (aclaramiento de Crn), la reabsorción tubular (aclaramiento de urea) y/o la permeabilidad de la membrana glomerular (aclaramiento de albúmina) permanecieron normales en ambos grupos. Mihic y sus colaboradores (2000) estimaron el aclaramiento de Crn luego del consumo de CrM y obtuvieron resultados similares.

El pH urinario, que normalmente es menor de 6.5, refleja la capacidad renal para mantener la concentración normal de H⁺ en el plasma y en los líquidos extravasculares. Si bien la utilidad de una medida aislada es limitada, en las alteraciones del equilibrio ácidobase, permite detectar los intentos del riñón para compensar la situación (Farreras y Rozmán 1988, Henry 1997).

A su vez la densidad urinaria es utilizada, a pesar de su inexactitud, para estimar la capacidad de

concentración y dilución de la orina en los túbulos. El deterioro de la capacidad de concentración es una manifestación relativamente precoz de enfermedad renal crónica y se vuelve evidente antes que se presente en otras pruebas funcionales (Farreras y Rozmán 1988, Henry 1997).

Con respecto a esto se ha notado que ambos parámetros no se alteraron luego del consumo de CrM (5 g.día⁻¹ por 10 días) en individuos sanos (Ropero-Miller *et al.* 2000).

b. Función hepática

La valoración del hígado durante la administración de cualquier suplemento nutricional es fundamental.

Transaminasas

El estudio de la actividad de la aspartato-aminotransferasa (ASAT) y la alanina-aminotransferasa (ALAT) es comúnmente utilizado como indicador de lesión hepatocelular. La primera, transfiere el grupo amino del ácido aspártico al ácido α -cetoglutarico para formar ácido oxalacético y glutámico. La ALAT transfiere el grupo amino de la alanina al ácido α -cetoglutarico para formar ácido pirúvico y glutámico (Henry 1997).

En el hepatocito, la ASAT presenta una isoenzima citoplasmática y otra mitocondrial (80%), mientras que la ALAT es exclusivamente citoplasmática. En una lesión hepatocelular leve donde se produce daño de la membrana plasmática, se liberan en suero las ASAT y ALAT citoplasmáticas. Durante una agresión más profunda, la lesión mitocondrial provoca la liberación de la ASAT mitocondrial, elevando la proporción ASAT:ALAT. Los niveles normales de estas enzimas en sangre traducen la normal destrucción de las células y sus valores séricos de referencia son para la ALAT: 0-41 U.l⁻¹ y para la ASAT: 0-46 U.l⁻¹ (37°C) (Henry 1997).

Las aminotransferasas suelen aumentar su actividad durante el curso de ciertas patologías y el uso de ciertos medicamentos. El ejercicio físico intenso y prolongado puede elevar la actividad de la ASAT debido a la presencia de la enzima en el músculo esquelético (Henry 1997, Nuttal y Jones 1968).

Kamber *et al.* (1999) y Almada *et al.* (1996) no encontraron variaciones significativas en la activi-

dad de estas enzimas luego de la suplementación en sujetos sanos. Un paciente con *Miastenia gravis* mostró similares resultados (Stout *et al.* 2000), sin embargo, Kreider y sus colaboradores (1998) observaron un leve incremento, que sin embargo no se apartó de los valores normales para deportistas.

γ - glutamiltranspeptidasa

La γ - glutamiltranspeptidasa (γ -GT) regula el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares, catalizando la transferencia de un grupo γ - glutamilo desde el glutatión al grupo α -amino de un aminoácido aceptor. Se localiza en las membranas celulares, principalmente en el retículo endoplásmico liso, en los microsomas y en los conductos biliares. Los valores normales de referencia se encuentran entre 12.0-54.0 U.l⁻¹ (37°C) (Henry 1997).

Aunque la mayor actividad de la γ -GT se presenta en el tejido renal, la elevación de la enzima es generalmente el resultado de enfermedad hepática. Es una prueba sensible de lesión hepatocelular, pero no discrimina específicamente entre las diversas enfermedades hepáticas. También se encuentra elevada en afecciones musculares y durante la administración de dosis altas de determinadas sustancias químicas (Henry 1997).

Hasta la actualidad, ninguno de los estudios realizados en individuos sanos, mostró variaciones en la actividad de la γ -GT luego de la suplementación (Almada *et al.* 1996, Kamber *et al.* 1999, Kreider *et al.* 1998, Schilling *et al.* 2001).

Proteínas séricas

Debido a la participación del hígado en la síntesis y degradación de la mayoría de las proteínas plasmáticas, y a que estas tienen un papel importante en la fisiología humana, su valoración es fundamental para el monitoreo de la enfermedad hepática. Los valores de referencia normales oscilan entre 60-80 g.l⁻¹ (Henry 1997).

No obstante, no es un índice precoz ya que la hipoproteinemia suele presentarse, generalmente, en estadios avanzados de hepatopatías, cuando la síntesis proteica está muy comprometida. Mientras que en otras patologías se observa hiperproteínemia. En general ambas situaciones se ven acompañadas de hipoalbuminemia (Henry 1997).

La albúmina, principal coloide osmótico de la sangre, sirve como transportador de sustancias endógenas y exógenas. Los valores normales de referencia oscilan entre 29 y 45 g.l⁻¹. Es la proteína plasmática más abundante y el descenso en su concentración se relaciona con insuficiencia hepática, aunque no en forma específica. También se relaciona con enteropatías con pérdida de proteínas, enfermedad renal con albuminuria y malnutrición debido a un deterioro de la síntesis o a pérdidas, resultando en un grave equilibrio de la presión oncótica (Henry 1997).

Poortmans y Francaux (1999) no encontraron alteraciones de la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas luego de 10 meses a 5 años de suplementación. Similares resultados se observaron en un paciente con *Miastenia gravis* (Stout *et al.* 2000).

Sin embargo, Kreider *et al.* (1998) mostraron el descenso en la relación Albúmina/Globulina (A/G) y el incremento significativo de la concentración de globulinas con respecto al grupo que ingirió placebo.

Lípidos

La determinación de la concentración de colesterol total y de triglicéridos sangre también tiene utilidad en el diagnóstico de enfermedad hepática (Henry 1997).

El colesterol sérico se presenta libre y esterificado. Puesto que la esterificación se realiza en el hígado, la enfermedad intrahepática o la obstrucción biliar se caracterizan por un incremento del colesterol libre. En cambio el colesterol total puede disminuir hasta valores inferiores al rango de referencia en la enfermedad crónica asociada con la destrucción del parénquima celular (Henry 1997).

Los valores normales de referencia de colesterol total oscilan entre 140-220 mg.dl⁻¹ (3.6-5.7 mmol.l⁻¹) (Henry 1997).

Asimismo los triglicéridos cuyos valores normales de referencia se presentan entre 50-200 mg.dl⁻¹ (0.56-2.3 mmol.l⁻¹), aumentan en forma relativamente inespecífica como consecuencia de colestasis, deterioro de la lipólisis o lesión hepatocelular (Henry 1997).

El análisis de los perfiles lipídicos en un grupo de voluntarios sanos (n : 25), después de un período de suplementación de 28 días (15.75 g.día⁻¹) brindó evidencias de que el suplemento incide sobre los lípidos

sanguíneos. La concentración de HDL-colesterol fue significativamente incrementada mientras que la de VLDL-colesterol y los valores de la relación: colesterol total/HDL (índice aterogénico) decrecieron (Kreider *et al.* 1998).

En otro trabajo con individuos de ambos géneros, de edades entre 32 y 70 años, con dislipemias superiores a 240 mg.dl⁻¹, la CrM produjo una significativa reducción de la concentración plasmática de colesterol total, triglicéridos y VLDL-colesterol. No obstante, no se encontraron diferencias en el LDL-colesterol, en el HDL-colesterol ni en el índice aterogénico (Earnest *et al.* 1996).

En contraste con estos resultados, el trabajo presentado por Volek *et al.* (2000) no reflejó efectos sobre los lípidos sanguíneos.

Bilirrubina

La bilirrubina es un producto del desdoblamiento del grupo hemo de la hemoglobina, formado en las células retículoendoteliales del bazo, hígado, médula ósea; y transportado por la albúmina. Cuando la bilirrubina es conjugada con ácido glucurónico, en el hígado, formando diglucuronato de bilirrubina, se vuelve hidrosoluble y es normalmente excretada junto con la bilis al duodeno y puede ser filtrada por el glomérulo renal. La orina del adulto normal contiene una concentración no detectable por las pruebas habituales (Henry 1997).

La presencia de bilirrubina en la orina indica la elevación en la fracción conjugada de la bilirrubina sérica y la determinación es imprescindible para el estudio de las ictericias metabólicas, colestasis por litiasis o inducida por fármacos e insuficiencias hepatocelulares (Henry 1997).

Urea

La urea también es un marcador hepático. Debido a que se sintetiza en el hígado, durante la enfermedad hepática se presenta disminución del BUN (Henry 1997).

c. Función muscular

Como consecuencia del papel fundamental de la CK en el sistema Cr-FCr, varios estudios evaluaron los efectos de la suplementación con CrM sobre su actividad. Si bien algunos no determinaron alteracio-

nes en individuos sanos (Engelhardt *et al.* 1998, Kamber *et al.* 1999, Mihic *et al.* 2000), otros mostraron un moderado incremento que fue considerado normal para atletas con entrenamiento físico exigente (Kreider *et al.* 1998).

Los valores normales de referencia de actividad enzimática para CK total se encuentran entre 24-195 U.L⁻¹ (37° C). El incremento de la actividad de esta enzima es marcador útil de lesión muscular como se observa en varias patologías, pero no es completamente específico. La especificidad del ensayo de la CK está favorecida por la medición de sus isoenzimas (Henry 1997). También el ejercicio físico intenso puede causar la elevación de la actividad CK total (Angel 1990, Hunter y Critz 1971, Nuttal y Jones 1968).

d. Metabolismo glucídico

Debido a que se ha observado que el consumo de carbohidratos junto con CrM está relacionado con el ingreso de Cr a la célula, por intermedio de la insulina, ha surgido la interrogante acerca de la incidencia de la suplementación sobre el metabolismo glucídico.

Investigaciones previas encontraron que la glicemia, que en individuos sanos oscila entre 70-110 mg.dl⁻¹ (3.9-6.1 mmol.l⁻¹), no se modificó después de la suplementación (Kreider *et al.* 1998, Schilling *et al.* 2001). Sin embargo, resultados de otros estudios sí parecen mostrar cierta relación entre ambas vías metabólicas (Derave *et al.* 2003, Earnest *et al.* 1996, Ferrante *et al.* 2000, Op't Eijnde *et al.* 2001a).

Objetivo del trabajo

El objetivo de este estudio fue evaluar la seguridad de la suplementación con CrM en deportistas, mediante el análisis de enzimas y metabolitos en sangre y orina más probable de ser afectados por el suplemento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos.

En la investigación participaron 14 hombres sanos, jugadores de fútbol semi profesional. Todos pertenecían al mismo equipo, y estaban involucrados en un plan de entrenamiento físico regular. En el momento del estudio competían a nivel nacional en un campeonato interdepartamental y en el campeonato local, jugando un promedio de 2 partidos semanales.

Todos los sujetos fueron informados de los procedimientos, objetivos y posibles riesgos del estudio antes de firmar un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética para Investigaciones en Seres Humanos de la Universidad de la República, Hospital de Clínicas.

Además respondieron a un cuestionario donde se les solicitó información acerca de sus hábitos alimenticios, del consumo de suplementos nutricionales y su historia médica general. Los jugadores declararon no haber sido suplementados con creatina monohidrato, maltodextrina o algún otro suplemento nutricional hasta 6 meses antes del estudio y no tener una dieta vegetariana o muy enriquecida en carnes rojas. Sus dietas no fueron estandarizadas, sin embargo, se les indicó no cambiar sus hábitos alimenticios durante el curso del estudio. Asimismo según un interrogatorio se pudo establecer que siguieron una dieta equilibrada de nutrientes.

Los participantes no consumieron ningún medicamento en forma regular durante la investigación.

La edad y peso del grupo al comienzo de la investigación fue de 19.6, $s = 3.5$ años y 66.7, $s = 8.3$ kg (media, desvío estándar), respectivamente.

Ninguno de los sujetos recibieron compensación monetaria por participar del estudio.

Recolección de muestras de sangre.

Luego de un descanso nocturno de 8 hs, los sujetos se presentaron, con un ayuno de 12 hs, para la extracción de una muestra de sangre antes y después de la suplementación con CrM o placebo (Maltodextrina). Permanecieron sentados y serenos durante 5 min antes de realizarles la punción de la vena antecubital para extraer una muestra de 20 ml de sangre. Previamente se desinfectó la zona de punción con alcohol iodado (5%). La sangre fue vaciada lenta y

suavemente en tubos con gel separador de coágulo (Tapval, cod. 1561811) para análisis bioquímico.

De acuerdo con las recomendaciones de los «Centers for Disease Control» (CDC) y el «National Committee for Clinical Laboratory Standards» (NCCLS) las muestras fueron consideradas, en todo momento, potencialmente infecciosas con respecto a patógenos hematógenos; tomándose por tanto las precauciones correspondientes.

Inmediatamente, las muestras se transportaron al laboratorio en contenedores aislantes, evitando la agitación y reduciendo así la hemólisis.

Luego fueron centrifugados a 3000 rev.min⁻¹ por 10 min usando una centrífuga Labofuge AE (Heraeus Inc. Alemania). Los sueros fueron separados en 5 alícuotas de 1,5 ml cada una y almacenadas en tubos de ultracentrifugación, identificados como I, II, III, IV y V.

Las alícuotas II y III se refrigeraron a 4°C mientras que las alícuotas IV y V fueron conservadas a -20°C para análisis posterior. La alícuota I se utilizó inmediatamente para la determinación de glucosa y creatinina.

Como control de calidad intraensayo se utilizaron sueros comerciales liofilizados con concentraciones normales (Precinorm U, Roche Diagnostics®, In. EE. UU.) y patológicas (Precipath U, Roche Diagnostics®, In. EE.UU.) de metabolitos y enzimas. Los sueros control fueron reconstituidos con 5 ml de agua bidestilada. Se mezclaron por inversión suave, evitando la formación de espuma y se dejaron durante 20 min a temperatura ambiente hasta disolución completa, mezclando ocasionalmente por inversión. Posteriormente fueron separados en alícuotas y conservados a -20°C. Se observaron las mismas precauciones que con las muestras, en cuanto a conservación, estabilidad y manipulación, y se analizaron de la misma manera que una muestra desconocida de acuerdo con cada determinación.

Las determinaciones de las muestras, de las soluciones patrón y de los controles fueron realizadas por duplicado en cada técnica.

Determinación de Glucosa.

A través de un método enzimático de punto final se determinó la concentración de glucosa en sangre (Trinder 1969). Con 100 ml buffer fosfato 100

mM, pH 7.0 e hidroxibenzoato 12 mM, se reconstituyó un vial conteniendo glucosa oxidasa 10 kU.l⁻¹, peroxidasa 1 kU.l⁻¹ y 4-aminofenazona 0.5 mM (Glicemia enzimática AA, Lote: 107504, Wiener lab.). Se mezcló bien hasta disolución completa y se homogeneizó.

Se colocaron 20 µl de muestra junto con 2 ml de reactivo de trabajo. Al mismo tiempo se utilizó una solución patrón de glucosa de 1.0 g.l⁻¹, la cual se hizo reaccionar de igual manera. Las muestras y la solución patrón fueron incubadas por 25 min entre 15-25°C. Posteriormente se midió la absorbancia a 505 nm (Hewlett Packard HP8453 UV-VIS, con efecto Peltier, EE.UU.) llevando el equipo a cero con el blanco de reactivos.

Determinación de Creatinina.

A través de la reacción de Jaffe (1886) se determinó la concentración de creatinina en sangre. Para el reactivo de trabajo se mezclaron 50 ml de ácido pícrico 41.4 mM junto con 50 ml de reactivo alcalino: carbonato/NaOH pH 12.7 (Creatinina cinética AA, Lote: 109565, Wiener lab.).

En el espectrofotómetro a 500 nm, se equilibraron 2 ml de reactivo a la temperatura de trabajo (25°C). Antes de agregar el reactivo se llevó a cero con agua destilada. Se colocaron 0.4 ml de la muestra, mezclando inmediatamente, y se disparó al mismo tiempo el cronómetro, prosiguiendo con la incubación. A los 30 s se anotó la absorbancia y se continuó la incubación. Se registró la absorbancia nuevamente a los 5 min.

Junto con las muestras también se procesó de forma similar una solución patrón de creatinina de 20 mg.l⁻¹.

Se consideró la absorbancia correspondiente a la creatinina presente en el suero como la diferencia entre las dos medidas de absorbancia tomadas durante la reacción.

Aclaramiento estimado de creatinina.

El aclaramiento renal de creatinina fue estimado a través de la fórmula de Cockcroft y Gault (1976) (Ward 1981):

Aclaramiento de Crn (ml.min⁻¹ x 1,73 m²) = (140 - edad) x Masa corporal (kg) / 72 x creatinina sérica (mg.dl⁻¹)

Determinación de Triglicéridos.

A través de un método enzimático de punto final se determinaron los triglicéridos en suero (Nagele *et al.* 1984). Para el reactivo de trabajo se reconstituyó, con 50 ml de buffer Goods 50 mM.l⁻¹, pH 7.5 junto con clorofenol 2 mM; un vial conteniendo lipoproteína lipasa 800 U.l⁻¹, glicerolquinasa 500 U.l⁻¹, glicerol fosfato oxidasa 1500 U.l⁻¹, peroxidasa 900 U.l⁻¹, adenosina trifosfato 2 mM y 4-aminofenazona 0.4 mM.l⁻¹ (TG Color GPO/PAP AA, Lote: 107504, Wiener lab.). Se mezcló hasta disolución completa y se homogeneizó.

Se hicieron reaccionar 20 µl de suero (alícuota II) junto con 2 ml de reactivo. Se mezcló e incubó 20 min a temperatura ambiente (18-25 °C). Una vez transcurrido ese tiempo se leyó la absorbancia a 505 nm, llevando a cero con agua destilada.

Asimismo se utilizó una solución patrón de glicerol 2.26 mM (correspondiente a 2 g.l⁻¹ de trioleína) que fue procesada de igual manera.

Determinación de Ácido úrico.

Para determinar la concentración de ácido úrico en suero se empleó un método enzimático de punto final (Feichtmeier y Wrenn 1955, Fossati *et al.* 1980). Para el reactivo de trabajo se reconstituyó con 50 ml de buffer fosfato pH 7.4; un vial conteniendo uricasa 100 U.l⁻¹, peroxidasa 600 U.l⁻¹, diclorohidroxibenceno sulfónico 2.0 mM, 4-aminofenazona 0.10 mM y ferrocianuro de potasio 6 µM (Uricostat enzimático AA, Lote: 107504, Wiener lab.). Se mezcló hasta disolución completa y se homogeneizó.

Se colocaron 40 µl de suero (alícuota II) junto con 2 ml de reactivo de trabajo. Se mezcló suavemente y se incubó 20 min a temperatura ambiente (18-25°C). También se utilizó un suero patrón de ácido úrico 100 mg.l⁻¹ que fue procesado de igual manera. Se midió la absorbancia a 505 nm, llevando a cero con el blanco de reactivos.

Determinación de CK.

La actividad de la CK total fue determinada por el método de Oliver modificado por Rosalkiref y otros (Morin 1977, Witteveen *et al.* 1974). Para el sustrato de trabajo se reconstituyó, con 20 ml de buffer imidazol 100 mM, pH 6.7; un vial conteniendo

creatina fosfato 30 mM, ADP 2 mM, glucosa 20 mM, NADP 2 mM, hexoquinasa 2500 U.l⁻¹, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 2000 U.l⁻¹, acetato de magnesio 10 mM, AMP 5 mM, di-(adenosina-5') pentafofosfato 10 µM y N-acetilcisteína 20 mM (CK-NAC UV unitest y AA, Lote: 110557, Wiener lab.). Se ajustó el espectrofotómetro a 340 nm y en una cubeta mantenida a 37°C se colocaron 2.5 ml de sustrato reconstituido incubándose 4 min. Luego se agregaron 50 µl de suero (alícuota II), se mezcló inmediatamente y se esperó 3 min. Se ajustó la absorbancia a una lectura de referencia disparando simultáneamente el cronómetro. La absorbancia fue registrada luego de 1, 2, 3 min de la primera lectura.

Se determinó la diferencia promedio de absorbancia.min⁻¹ ($\Delta A.min^{-1}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Posteriormente se utilizó este promedio para los cálculos.

Determinación de aspartato aminotransferasa (ASAT).

Por medio de una reacción cinética se estableció la actividad de la ASAT (I.F.C.C. 1976, Karmen 1955). Como sustrato de trabajo se utilizó un vial reconstituido con 20 ml de buffer TRIS 80 mM, pH 7.8 (a 30°C) con L-aspartato 240 mM; conteniendo NADH 0.18 mM, malato deshidrogenasa 420 U.l⁻¹, NADH 0.18 mM, 2-oxoglutarato 12 mM y lactato deshidrogenasa 600 U.l⁻¹ (GOT (AST) UV AA, Lote: 110565, Wiener lab.) Se ajustó el espectrofotómetro a 340 nm y en una cubeta termostatizada a 37°C se colocaron 2.0 ml de sustrato reconstituido y se agregó 200 µl de suero (alícuota III), se mezcló inmediatamente y se disparó simultáneamente el cronómetro. Luego de 1 min se registró la absorbancia inicial y luego a los 1, 2 y 3 min de la primera lectura.

Se determinó la diferencia promedio de absorbancia.min⁻¹ ($\Delta A.min^{-1}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Posteriormente se utilizó este promedio para los cálculos.

Determinación de alanina aminotransferasa (ALAT).

Por medio de una reacción cinética se estableció la actividad de la ALAT (I.F.C.C. 1980, Wroblewski y LaDue 1956). Como sustrato de trabajo se utilizó un vial reconstituido con 20 ml de buffer TRIS 100 mM, pH 7.5 (30°C) con L-aspartato 500

mM; conteniendo las siguientes concentraciones finales: 2-oxoglutarato 15 mM, NADH 0.18 mM y LDH 1200 U.l⁻¹ (GPT (ALT) UV AA, Lote: 109503, Wiener lab.).

Se ajustó el espectrofotómetro a 340 nm y en una cubeta termostatzada a 37°C con 2.0 ml de sustrato reconstituido se agregó 200 µl de suero (alícuota III), se mezcló inmediatamente y se disparó simultáneamente el cronómetro. Luego de 1 min se registró la absorbancia inicial y luego a los 1, 2 y 3 min de la primera lectura. Se determinó la diferencia promedio de absorbancia.min⁻¹ ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores.

Posteriormente se utilizó este promedio para los cálculos.

Determinación de Urea y Nitrógeno ureico en sangre (BUN).

Se utilizó una reacción cinética para determinar urea (Talke y Schubert 1965, Tiffany *et al.* 1972). Como sustrato de trabajo se utilizaron viales reconstituidos, cada uno, con 20 ml de buffer Tris 100 mM, pH 7.9; conteniendo las siguientes concentraciones finales: 2-oxoglutarato 7.5 mM, NADH 0.28 mM, ureasa 4000 U.l⁻¹ y glutamato deshidrogenasa 400 U.l⁻¹ (Urea UV cinética AA, Lote: 106528, Wiener lab.).

Se ajustó el espectrofotómetro a 340 nm llevando a cero con agua destilada, y en una cubeta termostatzada a 37°C con 1.0 ml de sustrato reconstituido, se agregaron 10 µl de suero (alícuota III).

También se utilizó una solución patrón de 0.60 g.l⁻¹ que fue procesada de igual manera. Se mezcló inmediatamente disparando simultáneamente el cronómetro. A los 60 s fue medida la absorbancia y se continuó la incubación. A los 3 min de la primera lectura se leyó nuevamente.

Cabe notar que debido a que el peso molecular de la urea es de 60 g.mol⁻¹, y está formada por dos átomos de nitrógeno con un peso molecular de 28 g.mol⁻¹, el nitrógeno ureico se calcula corrigiendo la concentración de urea por el factor: $28/60 = 0.467$ (Henry 1997).

Determinación de Colesterol.

Mediante una técnica enzimática de punto final se determinó la concentración sérica de colesterol

(Abell *et al.* 1952). Para el reactivo de trabajo se reconstituyó con 100 ml de buffer Goods 50 mM, pH 6.8; con fenol 15 mM y colato de sodio 0.2 mM; un vial conteniendo colesterol esterasa 100 U.l⁻¹, colesterol oxidasa 100 U.l⁻¹, peroxidasa 1000 U.l⁻¹, y 4-aminofenazona 0.2 mM como concentraciones finales (Colestat enzimático AA, Lote: 107504, Wiener lab.). Se mezcló hasta disolución completa y se homogeneizó.

Posteriormente, se colocaron 10 µl de suero (alícuota IV) junto con 1 ml de reactivo de trabajo. Se mezcló suavemente y se incubó 20 min a temperatura ambiente (25°C). También se utilizó un suero patrón de colesterol de 2 g.l⁻¹ que fue procesado de igual manera. Se midió la absorbancia a 505 nm, llevando a cero con el blanco de reactivos.

Determinación de Albúmina.

Se utilizó el método de unión al bromo cresolsulfon ftaleína para la determinación de esta proteína (Doumas *et al.* 1971). Se colocaron 10 µl de suero (alícuota IV) junto con 2.5 ml de una solución de bromo cresolsulfon ftaleína 0.3 mM (en polioxietilén lauril éter) (Albúmina AA, Lote: 010025, Wiener lab.). Se mezcló con varilla y se incubó 10 min entre 15-28°C. La absorbancia fue medida a 625 nm, llevando a cero con el blanco de reactivos.

Previamente, se construyó una curva de calibración con cantidades crecientes de suero patrón: 32, 48 y 64 g.l⁻¹ (Proti 2 Suero Patrón, Lote: 009133, Wiener lab.).

Determinación de Proteínas totales.

Se utilizó el método de Biuret (Rodney 1986) para la determinación de proteínas totales en suero. Se colocaron 10 µl de suero (alícuota IV) junto con 2.0 ml complejo EDTA/Cu 13 mM en NaOH 875 mM y alquil aril poliéter (Proteínas Totales AA, Lote: 108047, Wiener lab.). Se mezcló con varilla y se incubó 15 min a 37°C. La absorbancia fue medida a 540 nm, llevando a cero con el blanco de reactivos.

Previamente, se construyó una curva de calibración con cantidades crecientes de suero patrón: 49, 74 y 98 g.dl⁻¹ (Proti 2 Suero Patrón, Lote: 009133, Wiener lab.).

Determinación de γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GT).

Por medio de una reacción cinética se estableció la actividad de la γ -GT (Fuke *et al.* 1976, Sazsa 1969).

Como sustrato de trabajo se utilizó un vial reconstituido con 20 ml de buffer TRIS 100 mM, pH 8.25 (25°C); conteniendo las siguientes concentraciones finales: L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 2.9 mM y glicilglicina 100 mM (γ -G-test cinética AA, Lote: 110573, Wiener lab.).

Se ajustó el espectrofotómetro a 405 nm y en una cubeta termostatzada a 37°C con 1.0 ml de sustrato reconstituido, se agregaron 100 μ l de suero (alícuota V), se mezcló inmediatamente y se prosiguió de inmediato con la incubación. Se ajustó la absorbancia a un valor de referencia y se disparó simultáneamente el cronómetro. Se registró la absorbancia a los 1, 2 y 3 min.

Se determinó la diferencia promedio de absorbancia.min⁻¹ (ΔA .min⁻¹), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Se utilizó este promedio para los cálculos.

Recolección y análisis de muestras de orina.

El mismo día de la extracción de sangre se solicitó a los voluntarios que se presentaran con la muestra de orina correspondiente a la primera micción matutina. Para ello se les suministraron frascos estériles debidamente identificados. Inmediatamente se realizaron valoraciones de las muestras, pruebas físicas, exámenes químicos y estudios del sedimento.

Se determinó volumen, color, turbidez, olor y presencia de espuma coloreada en las muestras. Se dejó equilibrar a temperatura ambiente y se sumergió durante 1 s una tira reactiva comercial conteniendo reactivos secos para la determinación semicuantitativa de urobilinógeno, glucosa, ácido acetoacético, bilirrubina, proteínas, nitritos, pH, sangre oculta, densidad y leucocitos (Urine-strip, Lote: 340103, Wiener lab.).

El tiempo de cada reacción, la sensibilidad y la composición de cada zona reactiva se detallan a continuación, basándose en el peso seco al momento de impregnar una tira: urobilinógeno: 2.5×10^{-2} mg de 4-metoxibencenodiazonio y 0.3 mg de ácido cítrico, con sensibilidad de 0.1 mg.dl⁻¹ y tiempo de reacción de 30-60 s.

Glucosa: glucosa oxidasa 4.5 I UI, peroxidasa 1.86 UI y 0.10 mg de ioduro de potasio; con sensibilidad de 100 mg.dl⁻¹ y tiempo de reacción de 30-60 s.

Ácido acetoacético: 0.20 mg de nitroprusiato de sodio y 2.46 mg de sulfato de magnesio; con sensibilidad de 0.5 mg.dl⁻¹ y tiempo de reacción de 30-60 s.

Bilirrubina: 0.03 mg de 2,4-diclorobenceno diazonio y 0.30 mg de ácido oxálico; con sensibilidad de 0.5 mg.dl⁻¹ y tiempo de reacción de 30-60 s.

Proteínas: 0.3×10^{-2} mg de azul de tetrabromofenol, 1.10 mg de ácido cítrico y 0.46 mg de citrato trisódico; con sensibilidad analítica mayor para albúmina (≥ 300 mg.l⁻¹) que para globulinas y mucoproteínas; tiempo de reacción de 30 s.

Nitritos: 0.05 mg de ácido p-arsanílico y 0.06 mg de N-(naftil)-etilendiamino; con sensibilidad de 0.05 mg.dl⁻¹ en orinas con densidad normal y concentraciones moderadas de ácido ascórbico; tiempo de reacción de 30 s.

pH: 0.4×10^{-3} mg de rojo de metilo y 0.5×10^{-2} mg de azul de bromotimol; con sensibilidad entre pH 5 y 9, tiempo de reacción inmediato.

Sangre: 0.40 mg de 2, 5-dimetilhexano-2, 5-dihidroxiperóxido y 3.7×10^{-2} mg de 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbencidina; con sensibilidad de 0.015 mg.dl⁻¹ de hemoglobina o 5-10 eritrocitos intactos. μ l⁻¹ y tiempo de reacción de 30-60 s.

Densidad: 1.2×10^{-2} mg de bromotimol blue y 0.12 mg de ácido dietilentriaminotetraacético; permitiendo la detección de densidades correspondientes a 1.000, 1.005, 1.010, 1.020, 1.025 y 1.030. Tiempo de reacción de 10-30 s.

Leucocitos: 1.0×10^{-2} mg de derivado del éster pirazolamino ácido y 0.7×10^{-3} mg de sal de diazonio, con sensibilidad de 20-25 leucocitos. μ l⁻¹ y tiempo de reacción de 90-120 s.

Bajo iluminación adecuada, se comparó la reacción de cada zona reactiva con su correspondiente en una carta de colores.

Posteriormente, se centrifugaron 12 ml de cada espécimen de orina, a 1500 rev. min⁻¹ durante 5 min. Se descartaron 11 ml del sobrenadante y se resuspendió el sedimento. Se cargó en láminas reticuladas (Kova slide®, Instruchemie B. V, Holanda), que contienen en cada pocillo un volumen estándar

de 6.6 μl en un área total de 32 mm^2 y se observó en microscopio óptico en campo claro (Alphaphot-2 YS2, NIKON®, Japón) a menor aumento (100x) y mayor aumento (400x) para la búsqueda de cilindros y demás elementos, respectivamente (Haber 1981, Haber 1991).

Suplementación con Monohidrato de Creatina o Placebo.

Luego de los controles iniciales, los jugadores fueron asignados al azar, a través de un programa informático (Excel para Microsoft Office® 2000 Premium), al grupo de suplementación con CrM (Cre, $n = 7$) y al grupo placebo (Pla, $n = 7$). La administración de los productos se llevó a cabo en forma doble ciego.

El grupo Cre ingirió 3 dosis de 4.4 g de Cr (5.0 g de CrM, Syllab®; 99.5% pura, Laboratorios Edatir, Uruguay) por día, como dosis carga durante 7 días; y posteriormente una dosis mantenimiento de 3.0 g de Cr (3.4 g de CrM) por día, durante 49 días. La CrM se presentaba en forma micronizada, lo que permite una mayor disolución en agua y mejor tolerancia gástrica.

Asimismo, el grupo Pla consumió la misma dosis de maltodextrina (Maltodextrina, Carbo Complex®, 100% pura).

Los suplementos, que se presentaban en polvo, tenían textura, sabor y apariencia similares. Se instruyó a los sujetos para que disolvieran cada dosis de los productos en agua con 5 g de sacarosa y que ingirieran la solución junto con las comidas, luego del entrenamiento físico y evitando, a su vez, consumirlos con bebidas que contengan cafeína (café, mate, té, bebidas cola) ya que se ha demostrado que neutraliza los efectos de la CrM, prolongando el tiempo de relajación después de la contracción muscular (Harris *et al.* 2002, Hespel *et al.* 2002, Vandenberghe *et al.* 1996). Asimismo se le solicitó que las dosis fueran separadas por períodos mayores de 2 horas.

Durante el estudio, los jugadores continuaron con el entrenamiento físico intenso que venían desarrollando, y a través del contacto semanal con los mismos, se supervisó estrictamente el período de suplementación.

El día 56 cesó la suplementación y los sujetos volvieron al laboratorio para las determinaciones post-suplementación las cuales se realizaron de forma simi-

lar a aquellas descritas para la fase de pre-suplementación.

Estudio estadístico.

El análisis estadístico se realizó a través del programa informático Statistica® para Windows® versión 4.5 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

Debido al tamaño del espacio muestral no fue posible establecer si presentaba distribución normal por lo que se utilizó la mediana para el estudio estadístico.

Se aplicaron pruebas no paramétricas de rangos signados de Wilcoxon para comparar cada grupo antes y después de la suplementación.

Los datos se presentan como mediana junto con los porcentajes de los cuartiles 25° (Q1) y 75° (Q3) y media ± 2 desvíos estándar de la media (s_x), por lo que el intervalo de confianza fue del 95%.

Los datos fueron considerados significativamente diferentes cuando $p < 0.05$.

Los parámetros que mostraron cambios significativos o una tendencia luego de la suplementación son presentados en gráficos de caja y línea. Este tipo de gráfico indica la tendencia central de la variable en términos de la mediana del valor (caja menor), la variabilidad en el valor de la variable como los cuartiles Q_1 y Q_3 (caja mayor) y los valores mínimos y máximos de la variable (líneas).

RESULTADOS

Marcadores en sangre.

Todas las variables evaluadas en sangre se mantuvieron dentro de los valores normales de referencia para deportistas sanos.

La actividad de las enzimas hepáticas: ASAT, ALAT y γ -GT no varió significativamente luego de la suplementación (Tabla 1).

No se observaron diferencias significativas en los valores de creatinina ($p > 0.05$), así como tampoco en el Aclaramiento estimado de creatinina (Tabla 2). Esto sugiere que la tasa de filtración glomerular no fue alterada en ninguno de los grupos. Tampoco el colesterol total, triglicéridos (Tabla 3), BUN, relación BUN/creatinina, proteínas totales, albúmina o la relación albúmina/globulina (Tabla 2) fueron influenciadas

Variable	Grupo	Media $\pm$ 2s _x	Mediana (Q ₁ /Q ₃)	P
Enzimas				
γ -GT (U.l ⁻¹)	Pre Pla	32.7 $\pm$ 4.8	34.0 (24.1/38.5)	0.19
	Post Pla	34.5 $\pm$ 7.5	32.8 (27.6/43.2)	
	Pre Cre	42.2 $\pm$ 24.9	32.4 (25.1/49.0)	0.19
	Post Cre	41.5 $\pm$ 17.1	35.8 (28.9/52.8)	
ASAT (U.l ⁻¹)	Pre Pla	38.3 $\pm$ 13.7	32.0 (29.0/59.0)	0.28
	Post Pla	41.1 $\pm$ 18.6	39.0 (23.0/51.0)	
	Pre Cre	31.3 $\pm$ 4.0	32.0 (29.0/35.0)	0.11
	Post Cre	35.0 $\pm$ 10.8	31.0 (29.0/35.0)	
ALAT (U.l ⁻¹)	Pre Pla	22.0 $\pm$ 6.9	19.0 (15.0/28.0)	0.29
	Post Pla	22.8 $\pm$ 8.8	21.0 (14.0/26.0)	
	Pre Cre	19.0 $\pm$ 6.1	18.0 (15.0/20.0)	0.18
	Post Cre	21.6 $\pm$ 4.7	22.0 (17.0/24.0)	

Tabla 1. Actividad de enzimas séricas para el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) antes y después de 8 semanas de suplementación con monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina, respectivamente.

Nota: La actividad enzimática fue determinada a 37°C.

Aspartato aminotransferasa (ASAT), Alanina aminotransferasa (ALAT), γ -glutamyltranspeptidasa (GGT).

Los datos se presentan como media $\pm$ 2 desvíos estándar de la media (s_x) y mediana junto con los porcentajes de los cuartiles 25° (Q₁) y 75° (Q₃).

N = 7 por grupo.

por el tratamiento.

Por otro lado, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en la concentración de ácido úrico, el grupo creatina mostró una tendencia al descenso en la concentración de este metabolito (mediana: 0.30 (Q₁: 0.23/Q₃: 0.34) mmol.l⁻¹ vs mediana: 0.27 (Q₁: 0.25/Q₃: 0.30) mmol.l⁻¹, p: 0.07) (Figura 1).

La prueba de rasgos signados de Wilcoxon reveló que la concentración de glucosa descendió significativamente en el grupo creatina (mediana: 5.27 (Q₁: 5.05/Q₃: 5.38) mmol.l⁻¹ vs mediana: 4.61 (Q₁: 4.50/Q₃: 5.22) mmol.l⁻¹, p: 0.01), si bien permaneció dentro de los niveles normales, mientras que no se modificó en el grupo placebo (mediana: 5.11 (Q₁: 5.11/Q₃: 5.38) mmol.l⁻¹ vs mediana: 5.05 (Q₁: 4.72/Q₃: 5.22) mmol.l⁻¹, p: 0.55) (Figura 2).

Adicionalmente, se encontró un incremento significativo en la actividad de la CK en el grupo creatina (mediana: 255 (Q₁: 146/Q₃: 443) U.l⁻¹ vs mediana:

378 (Q₁: 260/Q₃: 577) U.l⁻¹, p: 0.04) en comparación con el grupo placebo (mediana: 298 (Q₁: 189/Q₃: 317) U.l⁻¹ vs mediana: 300 (Q₁: 173/Q₃: 372) U.l⁻¹, p: 0.16) después de finalizado el período de suplementación (Figura 3).

Marcadores urinarios.

Como se puede notar en las Tablas 4, 5, 6 y 7 el estudio semicuantitativo de los marcadores urinarios no mostró diferencias significativas entre los grupos, antes y después de la suplementación.

Los sedimentos urinarios analizados no presentaron signos patológicos significativos, si bien en uno de los individuos del grupo creatina se observaron 12 eritrocitos con morfología normal por campo (400x) (Tabla 7).

Efectos secundarios.

Los sujetos toleraron bien el suplemento. No informaron la aparición de problemas gastrointestinales,

calambres, mialgias u otros signos y síntomas clínicos.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue investigar el impacto de 8 semanas de suplementación con CrM sobre varios marcadores de salud en sangre y orina. Los resultados mostraron que todos los

parámetros bioquímicos estudiados permanecieron dentro de los valores normales de referencia para deportistas sanos, de acuerdo con lo hallado en otros estudios (Kreider *et al.* 1998, Kreider *et al.* 2003, Mayhew *et al.* 2002, Poortmans y Francaux 1999, Robinson *et al.* 2000, Schilling *et al.* 2001).

Tal es así que no se encontraron evidencias de deterioro de la función renal, como se reflejó en la ausencia de variaciones significativas en la concentra-

Variable	Grupo	Media $\pm$ 2s _x	Mediana (Q ₁ /Q ₃)	P
Bioquímica clínica				
Creatinina ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Pre Pla	90.4 $\pm$ 12.2	87.5 (79.6/100.8)	0.29
	Post Pla	84.2 $\pm$ 19.5	91.9 (72.5/97.2)	
	Pre Cre	93.7 $\pm$ 7.7	93.7 (87.5/99.9)	0.40
	Post Cre	92.4 $\pm$ 7.3	95.5 (87.5/99.9)	
Nitrógeno ureico (BUN) (mmol.l^{-1})	Pre Pla	6.8 $\pm$ 1.1	6.3 (6.0/7.3)	0.23
	Post Pla	5.5 $\pm$ 1.4	5.8 (4.3/6.7)	
	Pre Cre	5.9 $\pm$ 0.7	5.7 (5.5/6.2)	0.23
	Post Cre	5.8 $\pm$ 1.5	6.0 (4.5/7.2)	
Nitrógeno ureico/ Creatinina	Pre Pla	19.2 $\pm$ 4.1	17.9 (16.2/24.4)	0.15
	Post Pla	18.5 $\pm$ 11.1	15.7 (10.9/17.9)	
	Pre Cre	15.8 $\pm$ 2.4	15.6 (13.6/18.4)	0.53
	Post Cre	15.3 $\pm$ 3.2	15.6 (12.7/17.7)	
Proteínas totales (g.l^{-1})	Pre Pla	70.2 $\pm$ 1.3	70.4 (69.1/71.0)	0.34
	Post Pla	71.7 $\pm$ 4.7	70.1 (68.0/73.0)	
	Pre Cre	69.7 $\pm$ 2.6	69.1 (68.3/71.6)	0.47
	Post Cre	70.5 $\pm$ 2.7	71.5 (66.7/73.0)	
Albumina (g.l^{-1})	Pre Pla	41.4 $\pm$ 1.2	41.3 (40.5/42.0)	0.23
	Post Pla	42.1 $\pm$ 1.6	41.8 (40.5/43.1)	
	Pre Cre	40.9 $\pm$ 1.6	41.5 (38.9/42.7)	0.10
	Post Cre	42.2 $\pm$ 1.3	42.0 (41.1/43.4)	
Albumina/Globulina	Pre Pla	1.5 $\pm$ 0.1	1.5 (1.4/1.5)	0.11
	Post Pla	1.5 $\pm$ 0.2	1.5 (1.4/1.6)	
	Pre Cre	1.4 $\pm$ 0.2	1.4 (1.3/1.6)	0.10
	Post Cre	1.5 $\pm$ 0.1	1.5 (1.4/1.6)	
Aclaramiento de Creatinina ($\text{ml.min}^{-1}.1.73 \text{ m}^2$)	Pre Pla	115.4 $\pm$ 15.9	112.5 (99.1/125.4)	0.28
	Post Pla	110.7 $\pm$ 16.2	108.7 (94.5/119.8)	
	Pre Cre	101.9 $\pm$ 7.9	101.9 (90.9/104.1)	0.15
	Post Cre	110.6 $\pm$ 12.6	108.0 (99.2/118.4)	

Tabla 2. Variables bioquímicas para el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) antes y después de 8 semanas de suplementación con monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina, respectivamente.

Los datos se presentan como media $\pm$ 2 desvíos estándar de la media (s_x) y mediana junto con los porcentajes de los cuartiles 25° (Q₁) y 75° (Q₃).

N = 7 por grupo.

Nota: Aclaramiento de creatinina fue estimado a partir de la fórmula descrita por Cockcroft y Gault (1976).

ción de creatinina y urea-nitrógeno, así como en el aclaramiento estimado de creatinina. Esto es consistente con varios trabajos publicados donde se informó que la suplementación a corto, mediano y largo plazo no produjo disfunción renal (Kamber *et al.* 1999, Kreider *et al.* 1998, Mayhew *et al.* 2002, Poortmans y Francaux 1999, Robinson *et al.* 2000).

Si bien en numerosas publicaciones se ha reportado un moderado incremento en la concentración de creatinina como consecuencia del aumento de la creatina intracelular (Kamber *et al.* 1999, Kreider *et al.* 1998, Robinson *et al.* 2000), en este estudio, al igual que en otros (Mihic *et al.* 2000, Poortmans y Francaux 1999), no se observó, se desconocen las razones. Como se ha mencionado anteriormente, la Crn es el único compuesto de desecho de la creatina y la fosfocreatina, por lo que su concentración es proporcional a los niveles de estos compuestos, principalmente, en el músculo y su velocidad de formación es constante. Podría pensarse que la suplementación no incrementó la concentración intracelular de creatina y/o fosfocreatina, sin embargo como se discutirá más adelante esto no es lo que parece haber ocurrido, de todas maneras en este estudio no se determinó específicamente la concentración intramuscular de creatina y fosfocreatina por lo tanto no es posible sa-

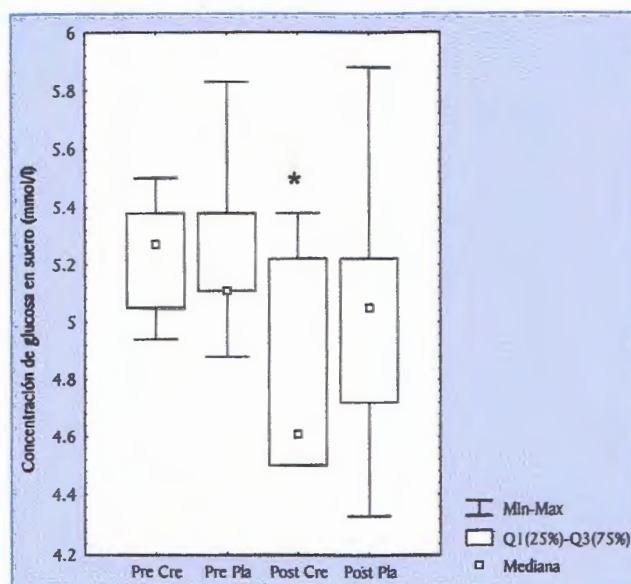


Figura 2. Gráfico de caja y línea representando la concentración de glucosa en suero (mmol.l^{-1}) en el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) antes y después de una semana de dosis carga (15 g.d^{-1}) y 7 semanas de dosis mantenimiento (3.4 g.d^{-1}) de monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina.

N = 7 por grupo.

* $p < 0.01$ diferencia significativa versus el valor correspondiente previo a la suplementación.

car conclusiones al respecto.

Asimismo, los parámetros urinarios no mostraron cambios en ninguno de los grupos, así como tampoco los sedimentos observados. Sólo en un individuo perteneciente al grupo creatina, se observó la presencia de algunos eritrocitos con morfología normal en el sedimento. No obstante, si se estudian todos los parámetros en forma global, se comparan con aquellos antes de la suplementación y se considera la ausencia de síntomas, puede establecerse que posiblemente se deba a una microhematuria asintomática provocada por el esfuerzo físico intenso desarrollado durante el entrenamiento y las competencias, y no al reflejo del detrimento de la función renal.

Sin embargo, a pesar de estos hallazgos no es posible descartar categóricamente que el consumo de CrM produzca nefropatía ya que han surgido algunas evidencias de que puede exacerbar la disfunción en individuos con enfermedad pre-existente (Barisic *et al.* 2002, Edmunds *et al.* 2001, Pritchard y Kalra 1998, Terjung *et al.* 2000). Asimismo existen reparos con el consumo de CrM en personas con riesgo de desarrollar insuficiencia renal como por ejemplo: hipertensas,

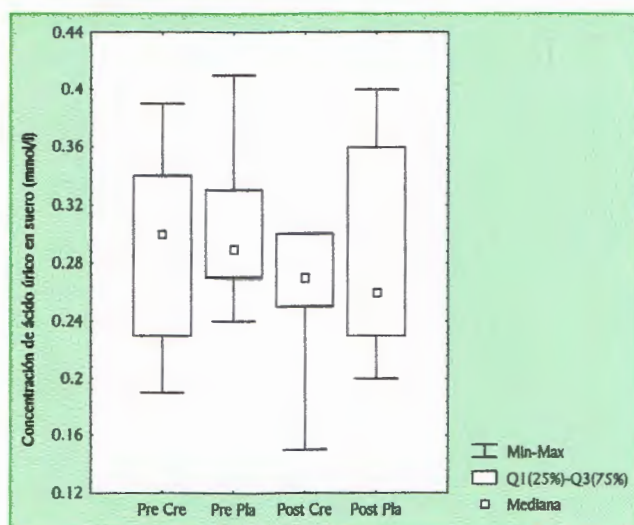


Figura 1. Gráfico de caja y línea representando la concentración de ácido úrico en suero (mmol.l^{-1}) en el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) antes y después de una semana de dosis carga (15 g.d^{-1}) y 7 semanas de dosis mantenimiento (3.4 g.d^{-1}) de creatina monohidrato (CrM) o maltodextrina.

N = 7 por grupo.

Variable	Grupo	Media $\pm 2s_x$	Mediana (Q ₁ /Q ₃)	P
Lípidos				
Colesterol total (mmol.l ⁻¹)	Pre Pla	4.10 $\pm$ 0.44	3.96 (3.75/4.63)	0.11
	Post Pla	3.95 $\pm$ 0.42	3.90 (3.49/4.32)	
	Pre Cre	4.06 $\pm$ 0.64	3.78 (3.57/4.29)	
	Post Cre	4.28 $\pm$ 0.42	4.32 (4.06/4.68)	
Triglicéridos (nmol.l ⁻¹)	Pre Pla	0.76 $\pm$ 0.28	0.62 (0.49/1.03)	0.15
	Post Pla	0.94 $\pm$ 2.86	0.89 (0.82/1.21)	
	Pre Cre	0.58 $\pm$ 0.12	0.58 (0.44/0.75)	
	Post Cre	0.69 $\pm$ 0.21	0.72 (0.46/0.86)	

Tabla 3. Concentración de lípidos en suero para el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) antes y después de 8 semanas de suplementación con monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina, respectivamente. Los datos se presentan como media $\pm$ 2 desvíos estándar de la media (s_x) y mediana junto con los porcentajes de los cuartiles 25° (Q₁) y 75° (Q₃). N = 7 por grupo.

diabéticas o con antecedentes familiares de dichas patologías, por lo que bajo estas circunstancias se recomendaría el consumo del suplemento junto con un control estricto.

Por otro lado, si bien numerosos estudios han demostrado que no produce insuficiencia renal en personas sanas, la mayoría, incluido el presente, se basaron en la determinación de creatinina en suero y/u orina como marcador para afirmar esto (Kamber *et al.* 1999, Kreider *et al.* 1998, Mihic *et al.* 2000, Poortmans y Francaux 1999, Robinson *et al.* 2000). Aunque la creatinina en suero es muy útil para detectar y monitorear la enfermedad renal, presenta ciertos inconvenientes como indicador de falla renal incipiente (Ward 1981), la que se presentaría probablemente en el caso de que la CrM produjera algún deterioro en el funcionalismo renal de individuos inicialmente sanos. Considerando esto sería una buena práctica entonces utilizar marcadores más precoces de disfunción renal como por ejemplo la determinación de microalbuminuria antes y después del período de suplementación. Se sabe que es una medida sencilla y no invasiva y que la excreción de cantidades mayores de 20 mg.l⁻¹ de albumina es considerada patológica. Por otro lado, la relación urea-nitrógeno/Cr_n tampoco presentó cambios en ninguno de los grupos estudiados,

por lo que el consumo de CrM no parece haber influido sobre el estado anabólico-catabólico muscular en estos sujetos.

Asimismo, se analizaron varios marcadores de función hepática para evaluar posibles efectos adversos de la suplementación y las evidencias revelaron que en este estudio las dosis administradas de CrM no produjeron alteraciones de la función hepática. Estos datos confirman resultados de investigaciones previas (Kamber *et al.* 1999, Mayhew *et al.* 2002, Robinson *et al.* 2000, Schilling *et al.* 2001, Stout *et al.* 2001).

De esta forma la actividad de las enzimas hepáticas ALAT, ASAT y g-GT no mostró cambios significativos luego de la suplementación. Así como tampoco la concentración de proteínas totales, albúmina y relación albúmina/globulina en ninguno de los grupos estudiados.

En cuanto a los lípidos sanguíneos, si bien estudios anteriores proveen información de que la CrM podría influir positivamente sobre ellos, tanto en individuos sanos como dislipémicos (Earnest *et al.* 1996, Kreider *et al.* 1998), en el presente trabajo, al igual que en otros (Kreider *et al.* 2003, Schilling *et al.* 2001, Volek *et al.* 2000) no se encontraron variaciones significativas. No obstante, debe tenerse en cuenta que no se estudió el perfil lipídico completo ya que el HDL-

colesterol, el LDL-colesterol, el VLDL-colesterol y el índice aterogénico no fueron determinados.

Por otra parte es de notar que la mayoría de los individuos que participaron en la actual investigación, mostraron desde el inicio de la suplementación niveles de lípidos sanguíneos muy cercanos al límite inferior del rango de normalidad, por lo que esta podría ser la causa de que no se produjera una disminución significativa. Por otro lado tal vez el potencial efecto de la CrM como modulador de lípidos sanguíneos se manifieste sólo en individuos dislipémicos, en ese caso sería interesante evaluar esto en próximos estudios.

Con respecto a la influencia sobre el sistema Cr-CK-FCr, varios estudios han demostrado que la suplementación con CrM incrementa la concentración de Cr y FCr en el músculo (Balson *et al.* 1994, Bellinger *et al.* 2000, Brannon *et al.* 1997, Febbraio *et al.* 1995, Finn *et al.* 2001, Green *et al.* 1996a, Green *et al.*

1996b, Greenhaff *et al.* 1994a, Harris *et al.* 1992, Hultman *et al.* 1996, Preen *et al.* 2003, Willer *et al.* 2000), pero la mayoría de ellos no encontraron cambios en la actividad de la CK (Brannon *et al.* 1997, Engelhardt *et al.* 1998, Kamber *et al.* 1999, Kreider *et al.* 2003, Mihic *et al.* 2000, Robinson *et al.* 2000, Willer *et al.*). No obstante, en el presente estudio se observó un incremento moderado (41%) en la actividad de la enzima.

En relación con esto se ha encontrado que ratas alimentadas durante algunas semanas con ácido 3-guanidinopropiónico, un análogo de Cr, induce numerosas alteraciones funcionales y metabólicas entre las que se encuentra el descenso en la actividad CK total, efectos similares a los observados en ratones transgénicos deficientes en CK (Wyss y Kaddurah-Daouk 2000). Esto muestra que la concentración de Cr intracelular parece incidir sobre la actividad de la enzima. En el estudio actual no fue medida la

Aspecto	Vogel	p	pH	Urob mg.dl ⁻¹	Glu mg.dl ⁻¹	Bili mg.dl ⁻¹	AA mg.dl ⁻¹	Proteínas mg.dl ⁻¹	Nit	Sangre	Leuc
CrM											
A	L	3	1.025	6	-	-	-	Trazas	-	-	-
B	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-
C	L	3	1.020	5	-	-	-	-	-	-	-
D	L	3	1.015	6	-	-	-	-	-	-	-
F	L	3	1.025	5	-	-	-	Trazas	-	-	-
G	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-
H	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-
Pla											
I	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-
J	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-
K	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-
L	L	3	1.025	5	-	-	-	-	-	-	-
M	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-
N	L	3	1.025	6	-	-	-	Trazas	-	-	-
Ñ	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4. Valoración fisicoquímica de las muestras de orina para el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) antes de 8 semanas de suplementación con monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina, respectivamente.

Nota: para preservar el identidad de los voluntarios se los representó con letras del alfabeto.

(-): ausencia, Urob: Urobilinógeno, Glu: glucosa, Bili: Bilirrubina, AA: Acetoacetato, Nit: Nitritos, Leu: Leucocitos, L: límpida.

N = 7 por grupo.

	Cilindros/ campo (100x)	Eritrocitos/ campo (400x)	Leucocitos - Píocitos/ campo (400x)	Cristales/ campo (400x)	Células Epiteliales/ Campo (400x)	Otros
CrM						
A	-	-	-	-	1	-
B	-	-	-	-	1	-
C	-	-	-	Escasos Oxalato de Ca	1	-
D	-	-	-	-	2	-
F	-	-	2 (Píocitos)	-	1	-
G	-	-	-	-	1	-
H	-	-	1 (Píocitos)	-	1	-
Pla						
I	-	1	-	-	2	-
J	-	-	-	-	3	-
K	-	-	-	-	1	-
L	-	-	1	-	1	-
M	-	-	3	-	1	-
N	-	-	1	-	1	-
Ñ	-	-	-	-	1	-

Tabla 5. Valoración del sedimento urinario para el grupo creatina (Cr) y placebo (Pla) antes de 8 semanas de suplementación con monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina, respectivamente.

Nota: para preservar el identidad de los voluntarios se los representó con letras del alfabeto.

(-): ausencia, Oxalato de Ca: Cristales de Oxalato de Calcio

N = 7 por grupo.

concentración de Cr intramuscular, por lo que no fue posible determinar esta relación.

Almada *et al.* (1996) han encontrado un incremento del 53% en la actividad enzimática en hombres de mediana edad luego de 8 semanas de suplementación (20 g.día⁻¹ por 5 días y 10 g.día⁻¹ por 51 días) que no fue acompañada por ejercicio físico intenso. De igual manera Kreider y sus colaboradores (1998) observaron el aumento del 155% en el grupo que consumió CrM junto con glucosa, taurina y electrolitos (15,75 g. día⁻¹ por 28 días) durante entrenamiento físico específico.

En el presente estudio la suplementación, al igual que en el trabajo de Kreider *et al.*, se prolongó junto con entrenamiento físico específico.

Si bien el ejercicio físico, especialmente aquel de tipo excéntrico, puede incrementar la actividad de CK y ASAT (Angel 1990, Hunter y Critz 1971, Nuttal y

Jones 1968) debido a las adaptaciones metabólicas del músculo al estímulo, el grupo placebo no reveló cambios significativos, ni aún una tendencia al incremento. Esto marca una diferencia con el estudio de Kreider *et al.* (1998) en el cual probablemente el incremento de la actividad enzimática fue el reflejo de la acción del suplemento junto con el entrenamiento, ya que el grupo placebo mostró un aumento, aunque no tan marcado como el del grupo creatina.

Considerando las evidencias anteriormente expuestas podría argumentarse entonces que el incremento de la actividad enzimática no sería sólo consecuencia del aumento en la intensidad del entrenamiento físico que posibilita la suplementación con CrM, lo cual lleva a un flujo mayor de enzimas; sino de que la CrM por sí sola produce una regulación positiva en el circuito Cr-CK-FCr.

No obstante, no fue posible determinar en la

presente investigación si el incremento en la actividad de la CK fue consecuencia de la suplementación por sí sola, si fue el reflejo del aumento en la intensidad del entrenamiento provocado por el suplemento, o si en todo caso contribuyeron ambos fenómenos. Sería muy interesante determinarlo en el futuro.

Sin embargo, sí podría sugerirse que la intensificación de la actividad citoplasmática y mitocondrial de la CK, probablemente incremente el sistema Cr-FCr, provocando el aumento de la velocidad de resíntesis de ATP, con lo cual sería accesible más rápidamente en los sitios de consumo de energía como por ejemplo los miofilamentos.

A su vez, se ha demostrado que la resíntesis de FCr, la cual se lleva a cabo durante la recuperación de la actividad muscular intensa a partir de procesos aeróbicos generadores de energía, es crítica para la restauración de la potencia muscular (Hultman *et al.* 1967) y existen evidencias de que la CrM acelera este

proceso (Greenhaff *et al.* 1994). De acuerdo con los hallazgos del presente estudio, esto podría deberse, aunque no exclusivamente, al aumento de la actividad de la CK. De todas formas estos argumentos tendrían más valor si se hubiera determinado la velocidad de resíntesis del ATP durante la actividad muscular y de fosfocreatina durante el reposo.

Sin embargo, existen controversias acerca del incremento de la actividad de la CK como consecuencia de la regulación positiva del circuito, ya que este fenómeno es también considerado marcador de lesión celular (Bailey *et al.* 2003, Evans *et al.* 2002, Rawson *et al.* 2001).

Algunos autores sostienen que podría deberse a que como la Cr es un compuesto osmóticamente activo, aumenta el volumen interno de fluidos, específicamente el intracelular (Ziegenfuss *et al.* 1998) lo cual podría dañar el sarcolema, produciendo lesión celular que se manifestaría en la liberación de material

	Aspecto	Vogel	ρ	pH	Urob mg.dl ⁻¹	Glu mg.dl ⁻¹	Bili mg.dl ⁻¹	AA mg.dl ⁻¹	Proteínas mg.dl ⁻¹	Nit	Sangre	Leuc
CrM												
A	L	3	1.025	6	-	-	-	Trazas	-	-	-	-
B	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-	-
C	L	3	1.020	5	-	-	-	-	-	-	-	-
D	L	3	1.015	6	-	-	-	-	-	-	+	-
F	L	3	1.025	5	-	-	-	Trazas	-	-	-	-
G	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-	-
H	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Pla												
I	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-	-
J	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-	-
K	L	3	1.025	6	-	-	-	Trazas	-	-	-	-
L	L	3	1.025	5	-	-	-	-	-	-	-	-
M	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-	-
N	L	3	1.025	6	-	-	-	Trazas	-	-	-	-
Ñ	L	3	1.025	6	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Valoración físicoquímica de las muestras de orina para el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) después de 8 semanas de suplementación con monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina, respectivamente.

Nota: para preservar el identidad de los voluntarios se los representó con letras del alfabeto.

(-): ausencia, (+): presencia, Urob: Urobilinógeno, Glu: glucosa, Bili: Bilirrubina, AA: Acetoacetato, Nit: Nitritos, Leu: Leucocitos, L: límpida.

N = 7 por grupo.

	Cilindros/ campo (100x)	Eritrocitos/ campo (400x)	Leucocitos – Píocitos/ campo (400x)	Cristales/ campo (400x)	Células Epiteliales/ Campo (400x)	Otros
CrM						
A	-	2	2 (píocitos)	-	1	-
B	-	-	-	-	1	-
C	-	-	-	Escasos Oxalato de Ca	1	-
D	-	12	-	-	1	-
F	-	-	-	-	1	-
G	-	-	-	-	1	-
H	-	-	-	-	1	-
Pla						
I	-	-	-	-	1	-
J	-	-	-	-	1	-
K	-	-	-	Regular Oxalato de Ca	1	-
L	-	-	-	-	1	-
M	-	-	-	-	1	-
N	-	-	-	-	1	-
Ñ	-	-	2 (Píocitos)	-	1	-

Tabla 7. Valoración del sedimento urinario para el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) después de 8 semanas de suplementación con monohidrato de creatina (CrM) o maltodextrina, respectivamente.

Nota: para preservar el identidad de los voluntarios se los representó con letras del alfabeto.

(-): ausencia, Oxalato de Ca: Cristales de Oxalato de Calcio

N = 7 por grupo.

celular como la CK (Mihic *et al.* 2000).

Otros investigadores, contrariamente a esta hipótesis han acumulado evidencias de que la suplementación si bien aumenta el agua corporal total, no altera la distribución intra y extracelular de fluidos (Powers *et al.* 2003). Incluso estudios sostienen que la CrM podría impedir el daño tisular ya que estaría involucrada en la estabilización de la membrana celular. Más específicamente, la FCr debido a su naturaleza anfótera, se uniría a las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, descendiendo la fluidez de la membrana y evitando la pérdida del contenido citoplasmático (Persky y Brazeau 2001, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

Recientemente se ha establecido una estrecha relación entre las alteraciones del sistema Cr-CK-FCr y numerosas enfermedades, especialmente aquellas de

tipo neuromuscular que se caracterizan por la muerte celular por necrosis o apoptosis como vía final común (Baker y Tarnopolsky 2003, Farreras y Rozmán 1988).

Por ejemplo, la actividad de la CK total está descendida en diversas regiones del encéfalo de pacientes esquizofrénicos. También en la enfermedad de Alzheimer ocurre este fenómeno, ya que se observó que la enzima es inactivada por la modificación de su sitio activo debido a la acción de especies reactivas del oxígeno (Wyss y Kaddurah-Daouk 2000). De acuerdo con esto, investigaciones recientes encontraron que la CrM es un potencial reductor del estrés oxidativo ya que actúa como neutralizante directo de aniones peroxinitrito y superóxido producidos por el ejercicio y ciertas condiciones patológicas (Lawler *et al.* 2002).

A su vez, varios trabajos presentaron numerosos argumentos que correlacionan la capacidad

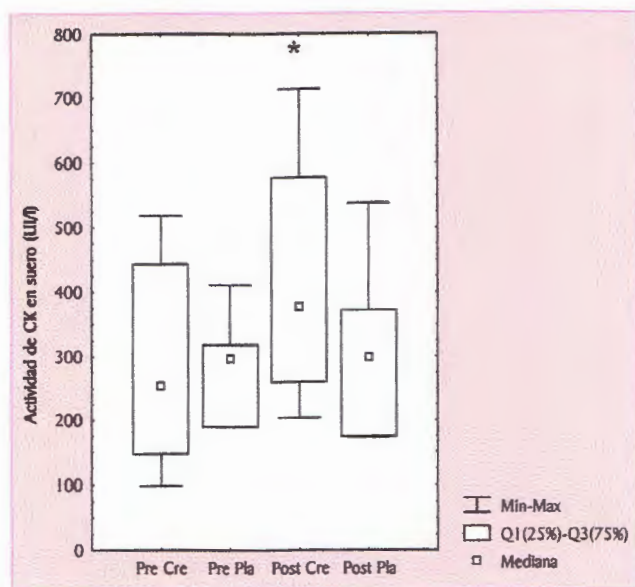


Figura 3. Gráfico de caja y línea representando la actividad de la CK en suero (UI.l⁻¹ a 37° C) en el grupo creatina (Cre) y placebo (Pla) antes y después de una semana de dosis carga (15 g.d⁻¹) y 7 semanas de dosis mantenimiento (3.4 g.d⁻¹) de creatina monohidrato (CrM) o maltodextrina.

N = 7 para el grupo Cre y N = 5 para el grupo Pla. Los valores de dos voluntarios del grupo placebo fueron excluidos debido a que sufrieron lesión muscular durante el entrenamiento, que provocó un importante incremento de la actividad CK.

* p < 0.05 diferencia significativa versus el valor correspondiente previo a la suplementación.

del sistema Cr-CK-FCr y el rendimiento cardíaco. De hecho alteraciones en este circuito parecen ser características clave de enfermedad cardíaca en modelos animales y en humanos. La utilización de inhibidores de la CK (iodoacetamida, 2,4-dinitrofluorobenceno, óxido nítrico, cianida, etc.) en modelos animales ha mostrado que causa disfunciones que se reflejan en alteraciones bioquímicas y fisiológicas del sistema cardiovascular. El trabajo cardíaco es energéticamente más costoso en términos del uso de fosfatos de alta energía, acumulación de ADP y descenso de la energía libre de la hidrólisis del ATP en aquellos órganos con actividad CK-M y CKmi sarcomérica disminuida (Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

Tal es así que pacientes con diversas cardiopatías (estenosis aórtica, enfermedad de la arteria coronaria con o sin hipertrofia, cardiomiopatía dilatada, etc.) presentan descenso de la actividad de CK total, del flujo químico a través de la reacción de la

CK y de los niveles tisulares de Cr y FCr. En los últimos años la idea de tratar la falla cardíaca con CrM ha sido evaluada y efectivamente, en algunos casos, ha mostrado efectos terapéuticos positivos (Wyss y Kaddurah-Daouk 2000). Podría argumentarse entonces que actuaría, en parte, incrementando la actividad miocárdica de la CK, especialmente la CKmi. Esta isoenzima que es la que se presenta en mayor proporción en este tejido, está funcionalmente acoplada a la fosforilación oxidativa (Wallimann *et al.* 1992) por lo que el aumento en la actividad de la CKmi provocaría el incremento de la capacidad oxidativa de estas células y por tanto del rendimiento cardíaco.

Sin embargo, otros estudios no consideran válida a la suplementación para el tratamiento de cardiopatías (Wyss y Kaddurah-Daouk 2000). Así que en vista de estas evidencias conflictivas y la importancia de las patologías involucradas deberían hacerse investigaciones más exhaustivas.

Del mismo modo, la actividad de la CK en el suero es marcadamente reducida en la poliartritis reumatoidea y se asocia con la debilidad muscular que presentan estos pacientes (Sanmarti *et al.* 1994, Stucki *et al.* 1996).

La suplementación con CrM ha demostrado ser beneficiosa en varias de las patologías anteriormente mencionadas tanto en modelos animales como en humanos, debido a que muestra efecto protector contra la isquemia, la hipoxia y el daño muscular y neurodegenerativo (Barisic *et al.* 2002, Bianchi *et al.* 2000, Chang *et al.* 2002, Ferrante *et al.* 2000, Jacobs *et al.* 2002, Louis *et al.* 2003, Mazzini *et al.* 2001, Persky y Brazeau 2001, Stockler *et al.* 1997, Stout *et al.* 2001, Tarnopolsky *et al.* 1999, Vorgerd *et al.* 2000, Wyss y Schulze 2002).

No parece razonable por tanto, especular con que la CrM cause lesión en la membrana celular, ya que si esto ocurriera no se observarían los efectos protectores del suplemento sino por el contrario se exacerbarían los síntomas de varias enfermedades. De acuerdo con esto, Passaquin *et al.* (2002) mostraron que la suplementación con CrM en ratones mdx, modelo usado para el estudio de la distrofia muscular de Duchenne, caracterizada por una gran destrucción de tejido muscular; inhibe la necrosis de fibras rápidas (63%) y restaura la capacidad respiratoria mitocondrial. También Felber *et al.* (2000) y Louis *et al.* (2003)

observaron que pacientes con distrofias de Duchenne y Becker, experimentaron mejoras en la función muscular luego de consumir el suplemento.

Incluso se ha observado que durante la isquemia cardíaca el tratamiento con FCr aumenta los niveles de ATP y FCr intracelulares y disminuye la liberación de CK así como el tamaño de la zona de isquemia (Wyss y Kaddurah-Daouk 2000). El incremento de la FCr y de la actividad CK, significa una mayor resíntesis de ATP generando energía mientras se restablecen las condiciones eupóxicas. Por lo que se podría considerar que el incremento de la capacidad funcional del sistema Cr-CK-FCr podría ser una estrategia para mejorar la tolerancia a la isquemia.

Si bien estos descubrimientos parecen muy alentadores, debe considerarse que la mayoría provienen de modelos animales, que el número de investigaciones es limitado y que los mecanismos aún permanecen poco claros. Así como tampoco debe ignorarse que existen estudios que no encontraron efectos terapéuticos positivos (Doherty *et al.* 2001, Klopstock *et al.* 2000, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

De todas maneras, considerando lo anteriormente expuesto, el incremento de la actividad de la CK observado en el presente trabajo, sugeriría evidencias adicionales de que las propiedades ergogénicas y terapéuticas de la CrM radican, en parte, en que induce por sí misma la regulación positiva del circuito Cr-CK-FCr y que por tanto no sería reflejo de daño celular.

No obstante el presente trabajo no ofrece evidencias suficientes para afirmar concluyentemente esto, ya que presenta limitaciones, entre ellas el pequeño número de individuos estudiados.

Futuras investigaciones podrían enfocarse en determinar el incremento de la actividad de la CK como consecuencia de la suplementación con CrM en poblaciones de mayor tamaño, y si es así, mediante métodos analíticos más específicos si se incrementa de forma más marcada la actividad de alguna isoenzima en particular, si se observan diferencias según el tipo de tejidos, así como también si se producen cambios en la concentración intracelular de la CK.

Asimismo, establecer la independencia entre el incremento de la actividad enzimática y la lesión celular por medio de otros marcadores de lesión. Así como comprobar si las mejoras en los pacientes que

consumen CrM se asocian con algún cambio en la actividad y/o concentración de la CK.

Por otra parte no se observaron cambios estadísticamente significativos en la concentración de ácido úrico luego del período de suplementación, como se ha notado en otros trabajos (Kreider *et al.* 1998, Schilling *et al.* 2001). No obstante el grupo creatina mostró una tendencia al descenso luego de finalizada la suplementación ($p = 0.07$).

El ácido úrico es un producto de degradación de las purinas. Cuando la velocidad de consumo de ATP excede la capacidad de resíntesis, comienza a acumularse ADP en la célula. El ADP es transfosforilado a través de la reacción de la adenilato quinasa para producir ATP y AMP. Este último es convertido en IMP y amonio por la adenilato desaminasa. El IMP es desfosforilado para dar hipoxantina, la cual posteriormente es oxidada por la xantina oxidasa para rendir xantina y por último ácido úrico (Stryer 1990, Wallimann *et al.* 1992).

De esta manera, durante y después de ejercicios físicos de alta intensidad, la concentración total de nucleótidos de adenina se reduce. Esto conlleva a la pérdida de ATP, ADP e IMP, por lo que se liberan cantidades significativas de productos de degradación como amonio, hipoxantina y ácido úrico (Hellsten *et al.* 1998, Stathis *et al.* 1999). Por lo tanto, debido a las demandas de energía del fútbol competitivo, estos compuestos están elevados en sangre durante y luego de los eventos deportivos (Bangsbo 1994).

La disminución en la concentración de ácido úrico, como consecuencia de la suplementación, sugeriría una mayor eficiencia en la resíntesis del ATP, resultando en una menor pérdida de nucleótidos de adenina. De acuerdo con esto, existen trabajos que han informado la reducción en la degradación del ATP, así como en la acumulación de amonio, hipoxantina y/o ácido úrico en sangre luego del consumo de CrM (Bellinger *et al.* 2000, Birch *et al.* 1994, Greenhaff *et al.* 1994b, Mujika *et al.* 2000, Peyrebrune *et al.* 1998, Rico-Sanz y Mendez 2000).

Asimismo se sabe que el circuito Cr-CK-FCr controla eficientemente el metabolismo de los nucleótidos de adenina. La CK regenera rápidamente el ATP y es un sensor de ADP de bajo umbral. El ADP y los H^+ , productos de reacción de las ATPasas celulares, son al mismo tiempo sustratos de la CK por

lo que se consumen durante la resíntesis de ATP a partir de la reacción catalizada por esta enzima. Esto refleja la relación mutuamente excluyente entre la CK y la adenilato quinasa en mediar el transporte intracelular de fosfatos de alta energía (Ventura-Clapier *et al.* 2004, Wallimann *et al.* 1992, Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

Entonces el incremento en la actividad de la CK, fenómeno observado en este estudio como consecuencia de la suplementación, podría haber regulado la actividad de la adenilato quinasa, evitando la acidificación local en las inmediaciones de las ATPasas así como también la acumulación de ADP, permitiendo entonces conservar los nucleótidos de adenina.

De todas maneras, en este estudio el descenso del ácido úrico no fue estadísticamente significativo, sino que sólo mostró una tendencia. Esto posiblemente ocurrió como consecuencia de que la cantidad de sujetos evaluados fue pequeña y por tanto las diferencias, si bien importantes, no alcanzaron el grado de significancia preestablecido. Por tanto es posible pensar que la disminución existe y hubiera sido significativa con un espacio muestral mayor.

Los resultados de esta investigación también han revelado la disminución significativa de la glicemia en el grupo Creatina luego de 8 semanas de suplementación en deportistas sanos.

Los estudios previos son contradictorios ya que algunos no han encontrado influencia de la CrM sobre el metabolismo glucídico (Kreider *et al.* 1998, Nelson *et al.* 2001, Schilling *et al.* 2001), mientras que otros sí (Derave *et al.* 2003, Earnest *et al.* 1996, Ferrante *et al.* 2000, Op't Eijnde *et al.* 2001a).

Se ha observado que la adición de creatina a la dieta de ratones transgénicos con enfermedad de Huntington produce un efecto neuroprotector marcado y reduce la hiperglicemia característica de estos ratones (Ferrante *et al.* 2000).

Asimismo un trabajo en ratones KKAy y C57BL6/ob/ob, modelos de diabetes no insulino requiriente, mostró que el ácido 3-guanidinopropiónico redujo la hiperglicemia y la hiperinsulinemia. Este compuesto también mostró las mismas propiedades en monos Rhesus insulino-resistentes (Meglasson *et al.* 1993).

Por otro lado, Earnest y sus colaboradores (1996) encontraron que la glucosa sanguínea tendió a

descender ($p = 0.051$) luego de 8 semanas de suplementación en individuos con dislipemia, y similarmente Derave *et al.* (2003) informaron que el suplemento combinado con entrenamiento de resistencia mejoró la prueba de tolerancia oral a la glucosa en voluntarios sanos.

El hecho es que existe una interdependencia entre la insulina y el ingreso de creatina y carbohidratos a los tejidos.

Se ha demostrado que la ingestión de CrM (5 g) en combinación con grandes cantidades de carbohidratos simples (93 g) aumenta la acumulación de creatina en el músculo (Green *et al.* 1996a). Esto se le atribuye a que los transportadores de glucosa (GLUT-4) y de creatina (CreaT) en el músculo son estimulados por la insulina (Op't Eijnde *et al.* 2001). Odoom y colaboradores (1996) propusieron que la insulina estimularía la actividad de la Na^+K^+ -ATPasa lo cual indirectamente facilitaría el transporte Na^+ -dependiente de la Cr. No obstante, según Steenge *et al.* (1998) la insulina parece aumentar la acumulación intramuscular de creatina sólo cuando está presente en concentraciones altas o suprafisiológicas.

A su vez, el ingreso de glucosa a los tejidos es estimulado por la insulina además de otros factores como la contracción muscular, IGF I y II (factores de crecimiento afines a la insulina I y II), hormona T_3 , etc.; que provocan la traslocación de los transportadores de glucosa desde el interior de la célula hacia la membrana plasmática (Guyton y Hall 1998, Richter *et al.* 1998, Shepherd y Kahn 1999).

En el presente estudio la suplementación con creatina tuvo un efecto hipoglucemiante, por tanto, así como el metabolismo de la glucosa influye sobre el ingreso de creatina a los tejidos, también parece darse de forma inversa.

En tal caso surge la interrogante de cómo actúa la Cr para influir sobre el metabolismo glucídico. Durante los últimos años han surgido varias explicaciones.

Debido a que la mayor parte de la creatina se almacena en el músculo esquelético y este simultáneamente es un gran consumidor de glucosa durante la actividad, y reserva la mayor parte del glucógeno corporal durante el reposo (Lehninger 1987, Stryer 1990), parece lógico pensar que posiblemente la interacción de la Cr con el metabolismo glucídico tenga especial importancia a este nivel.

Si bien en el presente trabajo no se estandarizó la dieta de los sujetos ni tampoco se determinó la concentración sérica de insulina, es posible presumir que la CrM no fue consumida junto con una cantidad de carbohidratos capaz de inducir concentraciones altas o suprafisiológicas de insulina que produjera una gran entrada de glucosa a los tejidos.

Si se toma en cuenta la relación entre la insulina y el ingreso de creatina y glucosa a los tejidos, podría suponerse que la creatina por sí misma potenció la acción (secreción en el páncreas o sensibilidad en los tejidos periféricos) de la insulina.

Se ha planteado que la lanzadera Cr-CK-FCr podría estar involucrada en la vía de señalización de la secreción de la insulina en las células β del páncreas. A través del incremento de la resíntesis de ATP se estimularía la secreción de la hormona (Gerbitz *et al.* 1996). De acuerdo con esto, Rooney y sus colaboradores (2002) han observado que el aumento en el contenido pancreático de creatina luego de 8 semanas de suplementación en ratas, fue acompañado por la elevación en los niveles de insulina sanguínea, aunque no se apreciaron efectos sobre la prueba oral de tolerancia a la glucosa.

No obstante, la mayoría de los trabajos en humanos y animales no observaron que la CrM sola aumente la concentración de insulina (Green *et al.* 1996a, Newman *et al.* 2003, Rooney *et al.* 2003), a pesar de que en algunos se advirtieron efectos beneficiosos sobre el metabolismo glucídico (Op't Eijnde *et al.* 2001b, vanLoon *et al.* 2004).

Siendo así, ¿cómo podría explicarse el hecho de que en varios estudios se observaran efectos en la glucorregulación y esto no se correlacionara con incremento de concentración de insulina durante la administración de CrM?

Trabajos con ácido 3-guanidinopropiónico, el cual ha mostrado tener propiedades para disminuir la hiperglicemia y la hiperinsulinemia características de la diabetes no insulino requiriente, indican que actúa mejorando la sensibilidad a la insulina (Meglasson *et al.* 1993).

Sin embargo, Newman *et al.* (2003) no encontraron cambios en la sensibilidad a la hormona en humanos, aunque tampoco mejoras en la tolerancia oral a la glucosa luego del consumo de CrM. No obstante, la suplementación fue sólo por 4 semanas,

la mitad del tiempo del presente estudio.

De todas maneras, existen evidencias que sugieren que la mejora en la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos como consecuencia de la suplementación con CrM, estaría relacionada con el aumento de la expresión y/o actividad de las proteínas involucradas en las vías de señalización intracelulares de la hormona.

Una muestra de esto es la siguiente: la traducción de señales que regulan el ingreso de glucosa estimulado por insulina, más específicamente a nivel de la fosforilación de tirosinas del sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1) y la actividad de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-quinasa), está reducida en el músculo esquelético de pacientes con resistencia a la insulina o Diabetes mellitus tipo 2 (Zierath 2002). Se ha demostrado que la CrM o un análogo de esta, pueden disminuir la hiperglicemia y la hiperinsulinemia en modelos animales (Ferrante *et al.* 2000, Meglasson *et al.* 1993), por lo que podría pensarse que la CrM ejerce su acción a este nivel. Como el IRS-1 y la PI3-quinasa son pasos reguladores importantes en el transporte de glucosa (Zierath 2002), el incremento en la traducción de la señal luego de la suplementación en estos sitios clave podría contribuir al aumento de la acción de la insulina.

Asimismo, en el presente estudio la suplementación fue acompañada de ejercicio físico intenso. Se sabe que inmediatamente luego del ejercicio, se incrementa el transporte de glucosa insulino independiente, a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMP-5' (AMPK), y que varias horas después se produce un incremento persistente de la sensibilidad a la insulina. Si se toma en cuenta que la CrM permite incrementar el trabajo físico, puede pensarse que se intensificó esta regulación sobre el metabolismo glucídico, ya que la sensibilidad a la insulina se relaciona directamente con el grado de actividad física realizada (Zierath 2002). Sin embargo, el ejercicio no parece ser un factor imprescindible para que la CrM ejerza sus efectos positivos, como lo demuestran algunas investigaciones (Earnest *et al.* 1996, Op't Eijnde *et al.* 2001a, Op't Eijnde *et al.* 2001b, vanLoon *et al.* 2004), aunque sería interesante estudiar si podría tener un efecto aditivo.

Pese a estos planteos, en la mayoría de los trabajos (Derave *et al.* 2003, Earnest *et al.* 1996,

Nelson *et al.* 2001, Op't Eijnde *et al.* 2001a), incluido el presente, donde se observaron efectos positivos sobre la homeostasis de la glucosa no se determinó específicamente la secreción de la insulina o la sensibilidad a esta, por lo que no es posible establecer una relación directa.

No obstante, el aumento de la sensibilidad puede reflejarse en cambios en los transportadores de glucosa (Eberling *et al.* 1993). La proteína GLUT-4 es el transportador principal en el músculo esquelético, miocardio y tejido adiposo. La tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina son incrementadas por el aumento de la concentración de GLUT-4 en personas sanas y diabéticas (Richter *et al.* 1998, Shepherd y Kahn 1999).

Como el paso limitante en la entrada de glucosa al músculo es el transporte a través de la membrana plasmática (Shepherd y Kahn 1999) se ha estudiado la influencia de la suplementación con CrM sobre los transportadores de glucosa.

Derave *et al.* (2003) y Op't Eijnde *et al.* (2001a) realizaron trabajos con un diseño experimental relativamente similar en sujetos jóvenes, donde se estudiaron los efectos sobre la concentración de GLUT-4 intramuscular durante 2 semanas de inmovilización de un miembro inferior y un período de rehabilitación física posterior. En el primer estudio se encontró que descendió por igual en el grupo control y creatina como consecuencia de la inmovilización, pero el grupo creatina aumentó el contenido de GLUT-4 durante el período de rehabilitación a la vez que mejoró la tolerancia oral a la glucosa. En cambio en el segundo trabajo, en tanto que en el grupo control descendió, en el grupo creatina se mantuvieron los niveles basales de GLUT-4 durante la inmovilización y se incrementaron durante la rehabilitación.

Las bases moleculares involucradas en esta respuesta aún no se conocen, sin embargo, podrían relacionarse con la insulina. Se sabe que es un potente estimulador del GLUT-4. La presencia de insulina produce, a través de cascadas de señalización intracelulares, la expresión y traslocación del transportador hacia la membrana plasmática y el sistema de túbulos transversos, aumentando la velocidad de transporte de glucosa hacia el interior de la célula. Por tanto el aumento del contenido de GLUT-4 incrementa la sensibilidad a la insulina (Richter *et al.* 1998, Shep-

herd y Kahn 1999).

No obstante, hay estudios que no encontraron efectos sobre la concentración de GLUT-4, así como tampoco sobre el ARNm de la proteína (Ceddia y Sweeney 2004, Op't Eijnde *et al.* 2001b, vanLoon *et al.* 2004).

Concomitantemente con el incremento en el contenido de GLUT-4, Derave *et al.* (2003) y Op't Eijnde *et al.* (2001a) encontraron que la concentración de glucógeno intramuscular aumentó luego del consumo del suplemento. Esto también se observó en otros estudios (Green *et al.* 1996b, Nelson *et al.* 2001, Robinson *et al.* 2000, vanLoon *et al.* 2004) y no parece restringirse a la combinación de CrM y ejercicio o CrM y dieta rica en carbohidratos, ya que se confirmó también en músculo aislado de rata (Op't Eijnde *et al.* 2001b).

Se sabe que síntesis de glucógeno es en parte estimulada por la insulina que actúa como activador de enzimas que catalizan la síntesis de glucógeno, ya que induce la conversión de la forma inactiva de la glucógeno sintasa a la forma activa (Guyton y Hall 1998, Halse *et al.* 2003, Lehninger 1987). Interesantemente la concentración de glucógeno se incrementó, en la mayoría de los estudios, durante las primeras semanas. Este fenómeno se le atribuye a que la creatina por ser osmóticamente activa, atrae agua produciendo el aumento de volumen celular, lo cual actúa como estimulador de la síntesis de glucógeno (Nelson *et al.* 2001, Robinson *et al.* 1999, Ziegenfuss *et al.* 1998). Esto coincide con que el agua corporal aumenta en los primeros días de suplementación (Hultman *et al.* 1996, Kern *et al.* 2001, Powers *et al.* 2003, Ziegenfuss *et al.* 1998).

Tomando en cuenta esto, podría considerarse que 8 semanas de suplementación y entrenamiento fueron probablemente suficientes para inducir un grado de hidratación celular tal que incrementara la síntesis de glucógeno, aunque en el presente estudio no se determinó.

De todas maneras no todas las investigaciones encontraron incremento en la concentración de glucógeno intramuscular luego de la suplementación (Ceddia y Sweeney 2004, Febbraio *et al.* 1995, Newman *et al.* 2003, Preen *et al.* 2001, Rooney *et al.* 2002), así como tampoco en el ARNm de la glucógeno sintasa-I o de la glucogenina-I (Op't Eijnde *et al.*

2001b, van Loon *et al.* 2004). Sin bien el regulador primario de la síntesis de glucógeno no es la actividad de la glucógeno sintasa sino la accesibilidad a la glucosa en la célula (Holloszy 2002), la cual pareciera haber aumentado en este estudio como refleja la disminución de la glicemia.

Por otro lado, se ha informado que la suplementación acompañada por ejercicio físico, intensificó la oxidación de carbohidratos durante el reposo (Huso *et al.* 2000). Este parecería ser otro hallazgo que se sumaría a las evidencias a favor de que la suplementación con CrM influye sobre la sensibilidad a la insulina, lo que resulta en el incremento de la utilización de carbohidratos por el tejido muscular en reposo.

Interesantemente, estudios precedentes informaron que el descenso en la actividad de la CK y en los niveles de ARNm que codifican para la subunidad CK-M y B en el corazón de ratas con Diabetes mellitus experimental, puede ser restaurado a los niveles normales con la administración crónica de insulina (Mitani *et al.* 2000, Popovich *et al.* 1989, Popovich *et al.* 1991). Esto muestra nuevamente la interacción entre la acción de la insulina y el sistema Cr-CK-FCr.

Si se considera que en el presente estudio se observó el incremento de la actividad de la CK, podría sugerirse que estaría relacionado de alguna manera, por ejemplo vía la insulina, con el descenso de la glicemia. No obstante esto no pudo establecerse en la presente investigación.

Adicionalmente, la insulina produce otros efectos: inhibe el catabolismo proteico (disminuyendo la velocidad de liberación de aminoácidos en la célula), aumenta la velocidad de transcripción de determinadas secuencias del ADN nuclear, formando mayor cantidad de ARN y aumentando la traducción del ARNm; induce el transporte activo de varios aminoácidos hacia el interior de la célula e inhibe ciertas enzimas (piruvato quinasa y fructosa-difosfatasa) de la gluconeogénesis (Guyton y Hall 1998, Lehninger 1987). Tal vez este sea uno de los mecanismos a través del cual se produce el aumento de la masa muscular observado en varios estudios luego del consumo del suplemento (Ingwall 1976, Kreider *et al.* 1998, Persky y Brazeau 2001, Volek *et al.* 1999, Hespel 2001), no obstante esto aún permanece en la teoría.

Por otro lado, se ha demostrado que la CrM

produce cambios en la actividad de la AMPK *in vitro* (Ceddia y Sweeney 2004). Esta enzima constituye un sensor de energía que se activa cuando aumenta la relación AMP:ATP y Cr:FCr, es decir en condiciones de estrés metabólico (hipoxia, isquemia, etc.) o ejercicio intenso prolongado (Tomás *et al.* 2002, Zierath 2002) cuando es necesario activar rutas generadoras de ATP.

Por esta razón, entre otras cosas, es un mediador intracelular del transporte de glucosa a través de cascadas de señalización insulino independientes. Regula positivamente genes involucrados en el ingreso de glucosa en el músculo esquelético, produciendo el incremento del ARNm y la concentración de GLUT-4, de enzimas mitocondriales y del contenido de glucógeno (Winder 2001, Zierath 2002).

Asimismo la activación de la AMPK inicia los procesos que lideran el incremento de la sensibilidad a la insulina (Fisher *et al.* 2002, Tomás *et al.* 2002).

La CrM intensifica el trabajo muscular por lo que podría pensarse que se produce la activación de la AMPK lo cual se asocia con el aumento del transporte de glucosa en el músculo y el descenso de la glicemia. Sin embargo, se observó que la suplementación incrementó la actividad de esta quinasa y la oxidación de la glucosa en fibras musculares de rata sin que mediara la contracción muscular, a la vez que no se alteró el transporte de glucosa estimulado por insulina, así como tampoco la concentración y la síntesis de glucógeno y de GLUT-4 (Ceddia y Sweeney 2004).

Interesantemente, se demostró que la AMPK durante la contracción muscular, isquemia o hipoxia fosforila e inactiva la CK-MM en las células musculares (Ponticos *et al.* 1998). En tal caso, si en el presente estudio la CrM activó la AMPK de tal manera que descendió la glucosa sanguínea, no se correspondería con los hallazgos de que el compuesto produjo aumento de la actividad CK, lo cual reflejaría el incremento de la resíntesis del ATP a través de la regulación positiva del circuito Cr-CK-FCr.

Por tanto parece difícil sacar conclusiones a partir de estos resultados ya que no dejan claro el papel de la AMPK en la glucorregulación producida por la CrM.

La consideración de los hallazgos previos y los de la presente investigación, sugiere que la suplementación con CrM a mediano plazo podría tener efectos positivos sobre la glucorregulación. Este parece

ser el primer estudio en deportistas sanos, jugadores de fútbol, que mostró beneficios sobre esta ruta metabólica.

Los mecanismos aún no están claramente establecidos, pero las evidencias se inclinan hacia que la CrM podría actuar induciendo, de alguna manera, el aumento de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, probablemente a nivel de la expresión y/o actividad de proteínas que intervienen en la vía de señalización intracelular. Esto se manifestaría en el aumento de la concentración de GLUT-4 en la membrana plasmática, del transporte de glucosa al interior de la célula y/o de la síntesis de glucógeno en el músculo, entre otros fenómenos. Tal vez no debería descartarse que la CrM regule el transporte de glucosa a través de la expresión y/o activación de moléculas pertenecientes a vías independientes de la insulina, o que actúe sobre ambas vías a través de moléculas en común.

Asimismo dichos efectos parecen no depender del ejercicio físico, si bien sería interesante estudiar si podrían tener efecto acumulativo. También lo sería encontrar bajo qué condiciones la CrM regula la concentración de glucosa sanguínea ya que en el presente estudio lo hizo en individuos con glicemia normal y sin embargo en otros, la regulación se presentó bajo condiciones de hiperglicemia, y conjuntamente determinar los efectos de la combinación con ejercicio físico.

Los resultados del estudio actual muestran la integración del circuito FCr-CK-Cr con el metabolismo de los carbohidratos para mantener los niveles de ATP dentro de la célula. Podría sugerirse que durante el reposo, la suplementación con creatina incrementa las reservas de creatina total y de carbohidratos y de esta forma prepara al músculo para acrecentar la capacidad de generar energía a partir de estas fuentes durante la contracción muscular.

La presencia de altas concentraciones de glucosa en el músculo es muy favorable ya que representa un combustible esencial durante el ejercicio físico en numerosos deportes, entre ellos el fútbol.

Es fundamental que la restauración de las reservas de glucógeno en el músculo se produzca lo más rápidamente posible. Junto con la dieta rica en carbohidratos (supercompensación) que suele consumirse durante la recuperación de ejercicios

intensos donde se agotaron los almacenes de glucógeno, podría realizarse una suplementación con CrM, lo cual recargaría el músculo de creatina y carbohidratos, simultáneamente. Incluso se ha observado que permite alcanzar concentraciones de glucógeno de tal magnitud que serían suficientes para producir una mejora significativa en ejercicios de intensidad moderada y larga duración. Por lo que la respuesta a la supercompensación podría ser considerablemente aumentada por la ingestión de creatina.

Sería interesante que próximas investigaciones evaluaran, entre otras cosas, el impacto de la CrM en aquellos ejercicios que dependen principalmente del metabolismo de la glucosa para generar ATP.

Asimismo, el suplemento podría ser una estrategia efectiva para tratar la resistencia a la insulina, principal factor patogénico de la obesidad, Diabetes gestacional y tipo 2, y Síndrome de resistencia a la insulina (Síndrome X) caracterizado por dislipemia, hipertensión y un incremento del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Shepherd y Kahn 1999). El principal defecto en la resistencia a la insulina se produce a nivel de las vías de señalización que dirigen la traslocación del GLUT-4 hacia la membrana, por lo que tratamientos que mejoren la traslocación, exposición y/o activación del transportador hacia la superficie celular probablemente reduzcan la morbilidad asociada con estas patologías y podrían impedir o retardar el desarrollo de Diabetes en personas de alto riesgo. Si bien cabe tener en cuenta los potenciales riesgos de disfunción renal mencionados anteriormente, que pueden llegar a tener estos pacientes, por lo que el consumo de CrM debería ser controlado.

De todas maneras el estudio actual presentó varias limitaciones ya que se realizó en una población pequeña y no se evaluó la secreción de insulina, la sensibilidad a esta, la concentración de GLUT-4 o de glucógeno en los sujetos suplementados, entre otras cosas.

Futuras investigaciones podrían centrarse en determinar los efectos de la CrM en poblaciones de mayor tamaño de individuos sanos y con disregulación del metabolismo glucídico. Asimismo sería interesante señalar el "blanco" de acción de la CrM, a nivel de qué vía de señalización ejerce sus efectos y determinar si incrementa la expresión o la actividad de alguna

proteína. Del mismo modo cuántos días de suplementación son necesarios para producir efectos sobre el citado metabolismo y durante cuánto tiempo se prolongan, así como las dosis óptimas para alcanzarlos, entre otros muchos puntos a estudiar.

Por tanto no hay estudios concluyentes sobre los beneficios de la suplementación con CrM sobre el metabolismo de los carbohidratos, sin embargo los resultados que han surgido son prometedores, por lo que dejan la puerta abierta para futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

El presente estudio fue diseñado para evaluar la influencia de la suplementación con CrM sobre diversos marcadores de salud en jugadores de fútbol. Los resultados indicaron que todos los parámetros sanguíneos y urinarios medidos luego de una semana de dosis carga (15 g.día^{-1}) y 7 semanas de dosis mantenimiento (3.4 g.día^{-1}) permanecieron dentro de los valores normales de referencia para deportistas sanos.

No se notaron evidencias de efectos adversos en la función renal o hepática. Estos descubrimientos confirman investigaciones anteriores que sostienen que la CrM puede ser considerado un suplemento nutricional seguro para individuos sanos.

Asimismo, las dosis de CrM administradas indujeron el incremento moderado en la actividad de la CK. Este fenómeno se le atribuyó a que el suplemento produce la regulación positiva del circuito Cr-CK-FCr, provocando probablemente el incremento en la velocidad de resíntesis de FCr durante el reposo y de ATP durante la actividad muscular. Se sugiere entonces que este sea uno de los mecanismos por los cuales la suplementación con CrM promueve el incremento del rendimiento físico y las mejoras en ciertas patologías que presentan alteraciones del metabolismo energético.

De acuerdo con esto se observó la tendencia al descenso de la concentración de ácido úrico lo cual también indica una mayor eficiencia en la resíntesis de ATP.

La disminución de la glicemia parece revelar que el suplemento podría tener efectos positivos sobre la glucorregulación, recargando a las fibras musculares de glucosa al mismo tiempo que de creatina. Estos

hallazgos pueden tener impacto sobre el rendimiento físico de deportistas y sobre individuos con alteraciones del metabolismo glucídico, como la resistencia a la insulina, la Diabetes mellitus tipo 2, etc.

Si bien en la presente investigación no hay evidencias de efectos negativos sobre la salud, los estudios deberían ser más profundos en aquellos deportistas que habitualmente consumen el suplemento y especialmente cuando es usado en forma terapéutica ya que esto implica tratamientos prolongados de meses o años que deberían ser monitoreados muy estrechamente.

Asimismo como la farmacocinética del compuesto varía según la condición del individuo, las dosis administradas deberían ser ajustadas para cada caso en particular buscando los mayores beneficios y minimizando de esta manera los potenciales efectos adversos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Profesora Adjunta de Química Clínica de la Lic. en Laboratorio Clínico - E.U.T.M. (Fac. de Medicina) Q. F. Matilde Álvarez por la dedicación.

Al Ing. Qco. Sergio Sgarbi de «Sport Nutrition», a Relab S. R. L. y especialmente al Sr. Daniel Ruiz.

A la Sra. Directora del Hospital de San José (MSP) Dra. Susana Nicola, y especialmente al personal del Laboratorio Central.

Al Club Río Negro, su directiva, jugadores y al Sr. Martín Taborda.

Al Dr. Marcelo Lavega, médico y post-gradado en Medicina del Deporte

Al Ayudante de Matemática- opción estadística (Fac. de Ciencias) Lic. Eduardo Cuitinho, por la ayuda con el procesamiento estadístico.

A la Profesora Titular en Bioquímica (PhD) Zulema Coppes (Fac. de Química) por su tiempo, cariño y consejos.

A la Ayudante de Química Clínica de la Lic. en Laboratorio Clínico - E.U.T.M. (Fac. de Medicina) Lic. Marta Castro, al Lic. Leonardo Arias, al Lic. Daniel Amoedo y a la Lic. Ma. José Amuz del Laboratorio Central del Complejo Hospitalario Pereira Rossell.

A la Asistente de Química Clínica de la Lic. en

Laboratorio Clínico - E.U.T.M. (Fac. de Medicina) Q. F. Ángela Dell'Aqua.

A la Dra. Carmen Monzó y Q. F. Mónica Revello del Laboratorio Central de las Fuerzas Armadas.

Al personal de la Biblioteca y Hemeroteca de Facultad de Ciencias y especialmente a la encargada de las búsquedas por Internet.

A Emiliano, María Nilda, Mónica y a mi Josefina.

Y especialmente a Carlos, por todo el apoyo, la paciencia y el cariño; y a Nelly y Raúl, mis padres, por lo que soy.

BIBLIOGRAFÍA

- Abell L. L., Levy B. B. *et al.* (1952). Simplified methods for the estimation of the total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem.* 195: 357-366.
- Almada A. L., Mitchell T. *et al.* (1996). Impact of chronic creatine supplementation on serum enzyme concentrations. *FASEB J.* 9: A4567.
- Angel G. M. y Angel M. (1990). Interpretación clínica del laboratorio. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. pp. 231-232.
- Bailey D. M., Bartsch P. *et al.* (2003). Electron paramagnetic resonance spectroscopic evidence of increased free radical generation and selective damage to skeletal muscle following lightning injury. *High Alt Med Biol.* 4: 281-289.
- Baker S. K. y Tarnopolsky M. A. (2003). Targeting cellular energy production in neurological disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* 12: 1655-1679.
- Balsom P. D., Soderlund K. *et al.* (1994). Creatine in humans with special reference to creatine supplementation (Abstract). *Sports Med.* 18: 268-280.
- Balsom P. D., Soderlund K. *et al.* (1995). Skeletal muscle metabolism during short duration high-intensity exercise: influence of creatine supplementation (Abstract). *Acta Physiol Scand.* 154: 303-310.
- Bangsbo J. (1994). Energy demands in competitive soccer. *J Sports Sci.* 12, S5-12.
- Barlsic N., Bernert, G. *et al.* (2002). Effects of oral creatine supplementation in a patient with MELAS phenotype and associated nephropathy. *Neuropediatrics.* 33: 157-161.
- Bellinger B. M., Bold A. *et al.* (2000). Oral creatine supplementation decreases plasma markers of adenine nucleotide degradation during a 1-h cycle test. *Acta Physiol Scand.* 170, 217-220.
- Bemben M. G., Bemben D. A. *et al.* (2001). Creatine supplementation during resistance training in college football athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 1667-1673.
- Benzi G. (2000). Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport? (Abstract). *Pharmacol Res.* 41: 255-264.
- Bianchi M. C., Tosetti M. *et al.* (2000). Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann Neurol.* 47: 511-513.
- Birch R., Noble D. *et al.* (1994). The influence of dietary creatine supplementation on performance during repeated bouts of maximal isokinetic cycling in man (Abstract). *Eur J Appl Physiol.* 69: 268-276.
- Brannon T. A., Adams G. R. *et al.* (1997). Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 29: 489-495.
- Burke D. G. Silver S. *et al.* (2000). The effect of continuous low dose creatine supplementation on force, power, and total work. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 10: 235-244.
- Casey A. y Greenhaff P. L. (2000). Does dietary creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance? *Am J Clin Nutr.* 72: 607S-617S.
- Ceddia R. y Sweeney G. (2004). Creatine increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells (Abstract). *J Physiol.* 555: 409-421.
- Cockcroft D. W. and Gault M. H. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 16: 31-41.
- Cox G., Mujika I. *et al.* (2002). Acute creatine supplementation and performance during a field test simulating match play in elite female soccer players. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 12: 33-46.
- Chang C. T., Wu C. H. *et al.* (2002). Creatine monohydrate treatment alleviates muscle cramps associated with haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 17: 1978-1981.
- Dangott B., Schultz E. *et al.* (2000). Dietary creatine monohydrate supplementation increases satellite cell mitotic activity during compensatory hypertrophy (Abstract). *Int J Sports Med.* 21: 13-16.
- Derave W., Op't Eijnde B. *et al.* (2003). Combined creatine and protein supplementation in conjunction with resistance training promotes muscle GLUT-4 content and glucose tolerance in humans (Abstract). *J Appl Physiol.* 94: 1910-1916.
- Doherty T. J., Loughhead K. *et al.* (2001). Creatine monohydrate does not increase strength in patients with hereditary neuropathy. *Neurology.* 14: 559-560.
- Doumas B. T., Watson W. A. *et al.* (1971). Albumin standards and measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chem Acta.* 31: 87-96.
- Earnest C. P., Almada A. L. *et al.* (1996). High-performance capillary electrophoresis-pure creatine monohydrate reduces blood lipids in men and women (Abstract). *Clin Sci (Colch).* 91: 113-118.
- Ebeling P., Bourey R. *et al.* (1993). Mechanism of enhanced insulin sensitivity in athletes. Increases blood flow, muscle glucose transport protein (GLUT-4) concentration, and glycogen synthase activity (Abstract). *J Clin Invest.* 92: 1623-1631.
- Edmunds J. W., Jayapalan S. *et al.* (2001). Creatine supplementation increases renal disease progression in Han: SPRD-cy rats. *Am J Kidney Diseases.* 37: 73-78.
- Engelhardt M., Neumann A. *et al.* (1998). Creatine supplementen-

- tation in endurance sports. *Med Sci Sports Exerc.* 30: 1123-1129.
- Evans R. K., Knight K. L. *et al.* (2002). Effects of warm-up before eccentric exercise on indirect markers of muscle damage. *Med Sci Sports Exerc.* 34: 1892-1899.
- Farreras P. y Rozmán C. (1988). *Medicina Interna*. 11ª edición. Doyma S. A., Barcelona. pp. 821-824, 1169-1418.
- Febbraro M., Flanagan T. *et al.* (1995). Effect of creatine supplementation on intramuscular TCr metabolism and performance during intermittent, supramaximal exercise in humans. *Acta Physiol Scand.* 155: 387-395.
- Feichtmeyer T. V. and Wrenn H. T. (1955). Direct determination of uric acid using uricase. *Am J Clin Pathol.* 25: 833-839.
- Felber S., Skladal D. *et al.* (2000). Oral creatine supplementation in Duchenne muscular dystrophy: a clinical and ^{31}P magnetic resonance spectroscopy study. *Neurol Res.* 22: 145-150.
- Ferrante R. J., Andreassen O. A. *et al.* (2000). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neuroscience.* 20: 4389-4397.
- Finn J. P., Ebert T. R. *et al.* (2001). Effect of creatine supplementation on metabolism and performance in humans during intermittent sprint cycling. *Eur J Appl Physiol.* 84: 238-243.
- Fisher J. S., Gao J. *et al.* (2002). Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282: E18-E23.
- Fossati P., Prencipe L. *et al.* (1980). Use of 3,5-dichloro-2-hydroxy-benzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymatic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem.* 26: 227-231.
- Fuke H., Yagi, H. *et al.* (1976). A sensitive automated colorimetric method for the determination of serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin Chim Acta.* 69: 43-51.
- Gerbitz K. D., Gempel K. *et al.* (1996). Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes.* 45: 113-126.
- Gilliam J. D., Hohzorn C. *et al.* (2000). Effect of oral creatine supplementation on isokinetic torque production (Abstract). *Med Sci Sports Exerc.* 32: 993-996.
- Green A. L., Hultman E. *et al.* (1996a). Carbohydrate ingestion augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. *Am J Physiol.* 271: E821-E826.
- Green A., Sewell D. *et al.* (1996b). Creatine ingestion augments muscle creatine uptake and glycogen synthesis during carbohydrate feeding in man. *J Physiol.* 491: P63-P64.
- Greenhaff P. L., Söderlund B. K. *et al.* (1994a). Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine synthesis. *Am J Physiol. (Endocrinol Metab).* 266: E725-E730.
- Greenhaff P. L., Constantini T. *et al.* (1994b). The effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle ATP degradation during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. *J Physiol (Lond).* 476: 84P.
- Grindstaff P. D., Kreider R. *et al.* (1997). Effects of creatine supplementation on repetitive sprint performance and body composition in competitive swimmers. *Int J Sport Nutr.* 7: 330-346.
- Guerrero-Ontiveros M. L. y Wallimann T. (1998). Creatine supplementation in health and disease. Effects of creatine ingestion in vivo: down regulation of expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle (Abstract). *Mol Cell Biochem.* 184: 427-437.
- Guyton A. C. y Hall J. E. (1998). *Tratado de Fisiología Médica*. 9ª edición. Interamericana Mc.Graw-Hill. México. pp. 1063-1066.
- Haber M. H. (1981). *Urinary Sediment: A textbook Atlas. Education products division american society of clinical pathologists Chicago.*
- Haber M. H. (1991). A primer of microscopic urinalysis. *Hycor Biomedical inc. California.* pp. 33-34.
- Halse R., Fryer L. G. D. *et al.* (2003). Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen. A possible role for AMP-activated protein kinase. *Diabetes.* 52: 9-15.
- Hargreaves M., McKenna M. J. *et al.* (1998). Muscle metabolites and performance during high-intensity, intermittent exercise. *J Appl Physiol.* 84: 1687-1691.
- Harris R. C., Soderlund K. *et al.* (1992). Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation (Abstract). *Clin Sci (Colch).* 83: 367-374.
- Harris R. C., Nevill M. *et al.* (2002). Absorption of creatine supplied as a drink, in meat or in solid form. *J Sports Sci.* 20: 147-151.
- Hellsten Y., Sjodin B. *et al.* (1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol.* 274 (Endocrinol. Metab.) 37: E600-E606.
- Henry J. B. (1997). *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. 9ª edición. Editorial Masson-Salvat Medicina. pp. 145, 147-148, 274.
- Hespel P., Op't Eijnde B. *et al.* (2001). Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J Physiol.* 536: 625-633.
- Hespel P., Op't Eijnde B. *et al.* (2002). Opposite actions of caffeine and creatine on muscle relaxation time in humans. *J Appl Physiol.* 92: 513-518.
- Holloszy J. O. (2002). A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle. *Am J Physiol (Endocrinol. Metab).* 284: E453-E467.
- Hultman E., Soderlund K. *et al.* (1996). Muscle creatine loading in man. *J Appl Physiol.* 81: 232-237.
- Hunter B. J. y Critz J. B. (1971). Effect of training on plasma enzyme levels in man. *J Appl Physiol.* 31: 20-23.
- Huso M. E., Hampl J. S. *et al.* (2002). Creatine supplementation influences substrate utilization at rest. *J Appl Physiol.* 93: 2018-2022.
- I.F.C.C. (1976). Expert panel on Enzymes. Method for aspartate aminotransferase. *Clin Chim Acta.* F19.
- I.F.C.C. (1980). Expert panel on Enzymes. Methods for alanine aminotransferase (L-alanine 2-oxoglutarate aminotransferase). *Clin Chim Acta.* 147F-154F.
- Ingwall J. S., Morales M. F. *et al.* (1976). Creatine: a possible stimulus skeletal cardiac muscle hypertrophy (Abstract). *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab.* 8: 467-481.
- Izquierdo M., Ibañez J. *et al.* (2002). Effects of creatine supplementation on muscle power, endurance, and sprint performance.

- Med Sci Sports Exerc.* 34: 332-343.
- Jacobs I. (1999). Dietary creatine monohydrate supplementation. *Can J Appl Physiol.* 24: 503-514.
- Jacobs P. L., Mahoney E. T. *et al.* (2002). Oral creatine supplementation enhances upper extremity work capacity in persons with cervical-level spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 83: 19-23.
- Jaffe M. (1886). Ueber den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Physiol Chem.* 10: 391-400.
- Jones A. M., Atter T. *et al.* (1999). Oral creatine supplementation improves multiple sprint performance in elite ice-hockey players. *J Sports Med Phys Fitness.* 39: 189-196.
- Juhn M. S. (1999). Oral Creatine supplementation. Separating fact from hype. *The Physician and Sportsmedicine.* 27: 47-56, 61, 89.
- Kamber M., Koster R. *et al.* (1999). Creatine supplementation - Part I: performance, clinical chemistry, and muscle volume. *Med Sci Sports Exerc.* 31: 1763-1769.
- Kambis K. W. y Pizzedaz S. K. (2003). Short-term creatine supplementation improves maximum quadriceps contraction in women. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 13: 87-97.
- Karmen S. (1955). A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest.* 34: 131-135.
- Kern M., Podewils L. J. *et al.* (2001). Physiological response to exercise in the heat following creatine supplementation. *J Exerc Physiol on line.* 4: 18-27.
- Kilduff L. P., Vidakovic P. *et al.* (2002). Effects of creatine on isometric bench-press performance in resistance-trained humans. *Med Sci Sports Exerc.* 34: 1176-1183.
- Klopstock T., Querner V. *et al.* (2000). A placebo-controlled cross-over trial of creatine in mitochondrial diseases. *Neurology.* 55: 1748-1751.
- Kreider R. B., Ferreira M. *et al.* (1998). Effects of creatine supplementation on body composition, strength, and sprint performance. *Med Sci Sports Exerc.* 30: 73-82.
- Kreider R. B., Melton C. *et al.* (2003). Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes. *Mol Cell Biochem.* 244: 95-104.
- Lawler J. M., Barnes W. S. *et al.* (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun.* 290: 47-52.
- Lehmkuhl M., Malone M. *et al.* (2003). The effects of 8 weeks of creatine monohydrate and glutamine supplementation on body composition and performance measures. *J Strength Cond Res.* 17: 425-438.
- Lehninger A.L. (1987). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª edición. Ediciones Omega S. A. Barcelona. pp. 750-752, 828-833.
- Louis M., Lebacqz J. *et al.* (2003). Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve.* 27: 604-610.
- Mayhew D. L., Mayhew J. L. *et al.* (2002). Effects of long-term creatine supplementation on liver and kidney functions in American College football players. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 12: 453-460.
- Mazzini L., Balzarini C. *et al.* (2001). Effects of creatine supplementation on exercise performance and muscular strength in amyotrophic lateral sclerosis: preliminary results. *J Neurol Sci.* 191: 139-144.
- McNaughton L. R., Dalton B. *et al.* (1998). The effects of creatine supplementation on high-intensity exercise performance in elite performers (Abstract). *Eur J Appl Physiol.* 78: 236-240.
- Meglasson M. D., Wilson J. M. *et al.* (1993). Antihyperglycemic action of guanidinoalkanoic acids: 3-guanidinopropionic acid ameliorates hyperglycemia in diabetic KKAY and C57BL6/ob/ob mice and increases glucose disappearance in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 266: 1454-1462.
- Mihic S., MacDonald J. R. *et al.* (2000). Acute creatine loading increases fat-free mass, but does not in blood pressure, plasma creatinine, or CK activity in men and women. *Med Sci Sports Exerc.* 32: 291-296.
- Mitani S., Okumura K. *et al.* (2000). Insulin alters cardiac muscle creatine kinase activity. *Heart Vessels.* 15: 23-29.
- Morehouse L. E., y Miller A. T. (jr) (1976). Fisiología del ejercicio. 3ª edición. El Ateneo Editorial. pp. 252-253.
- Morin L. G. (1977). Creatine kinase: stability, inactivation, reactivation. *Clin Chem.* 23: 646-652.
- Mujika I., Padilla S. *et al.* (2000). Creatine supplementation and sprint performance in soccer players. *Med Sci Sports Exerc.* 32: 518-525.
- Nagele U., Hagele E. O. *et al.* (1984). Reagent for the enzymatic determinations of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem.* 22: 165-174.
- Nelson A. G., Day R. *et al.* (2000). Creatine supplementation alters the response to a graded cycle ergometer test. *Eur J Appl Physiol.* 83: 89-94.
- Nelson A. G., Arnall D. A. *et al.* (2001). Muscle glycogen supercompensation is enhanced by prior creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 1096-1100.
- Newman J. E. N., Hargreaves M. *et al.* (2003). Effects of creatine ingestion on glucose tolerance and insulin sensitivity in men. *Med Sci Sports Exerc.* 35: 69-74.
- Nuttall F. Q. y Jones B. (1968). Creatine kinase and glutamic oxalacetic transaminase activity in serum: kinetics of change with exercise and effect of physical conditioning. *J Lab & Clin Med.* 71: 847-854.
- Odoom J. E., Kemp G. J. *et al.* (1996). The regulation of total creatine content in a myoblast cell line. *Mol Cell Biochem.* 24: 158-188.
- Op't Eijnde B., Ursø B. *et al.* (2001a). Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT-4 protein content after immobilization. *Diabetes.* 50: 18-23.
- Op't Eijnde B., Richter E. A. *et al.* (2001b). Effect of creatine supplementation on creatine and glycogen content in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 171: 169-176.
- Op't Eijnde B., Vergauwen L. *et al.* (2001c). Creatine loading does not impact on stroke performance in tennis. *Int J Sports Med.* 22: 76-80.
- Passaquin A. C., Renard M. *et al.* (2002). Creatine supplementation reduces skeletal muscle degeneration and enhances mitochondrial function in mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 12: 174-

- 182.
- Persky A. M. y Brazeau G. A. (2001). Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev.* 53: 161-176.
- Persky A., Brazeau G. *et al.* (2003). Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. *Clin Pharmacokinet.* 42: 557-574.
- Peyrebrune M. C., Nevill M. E. *et al.* (1998). The effects of oral creatine supplementation on performance in single and repeated sprint swimming. *J Sports Sci.* 16: 271-279.
- Ponticos M., Lu L. Q. *et al.* (1998). Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J.* 17:1688-1699.
- Poortmans J. R. y Francaux M. (1999). Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 31: 1108-1110.
- Popovich B. K., Boheler K. R. *et al.* (1989). Diabetes decreases creatine kinases enzyme activity and mRNA level in the rat heart. *Am J Physiol.* 257: E573-E577.
- Popovich B. K., Sayen M. R. *et al.* (1991). Insulin responsiveness of CK-M and CK-B mRNA in the diabetic rat heart. *Am J Physiol.* 261: E377-E381.
- Powers M. E., Arnold B. L. *et al.* (2003). Creatine supplementation increases total body water without altering fluid distribution. *J Athl Train.* 38: 44-50.
- Preen D., Dawson B. *et al.* (2001). Effect of creatine loading on long-term sprint exercise performance and metabolism. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 814-821.
- Preen D., Dawson B. *et al.* (2003). Creatine supplementation: a comparison of loading and maintenance protocols on creatine uptake by human skeletal muscle. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 13: 97-111.
- Prevost M. C. Nelson A. G. *et al.* (1997). Creatine supplementation enhances intermittent work performance. *Res Q Exerc Sport.* 68: 233-240.
- Pritchard N. R. y Kalra P. A. (1998). Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. *The Lancet.* 351: 1252-1253.
- Raimondi G. A., Puy R. J. *et al.* (1975). Effects of physical training on enzymatic activity of human skeletal muscle (Abstract). *Biomedicine.* 22: 496-501.
- Rawson E. S., Wehnert M. L. *et al.* (1999). Effects of 30 days of creatine ingestion in older men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 80: 139-144.
- Rawson E. S., Gunn B. *et al.* (2001). The effects of creatine supplementation on exercise-induced muscle damage. *J Strength Cond Res.* 15: 178-184.
- Redondo D. R., Dowling E. A. *et al.* (1996). The effect of oral creatine monohydrate supplementation on running velocity. *Int J Sport Nutr.* 6: 213-221.
- Richter E. A. Kristiansen S. *et al.* (1999). Glucose transport and transporters in skeletal muscle. En *Biochemistry of Exercise X. Capítulo 14: Metabolism.* Ed. Hargreaves M. y Thompson M. Human Kinetics. Estados Unidos de America. pp. 169-179.
- Rico-Sanz J. y Mendez Marco M. T. (2000). Creatine enhance oxygen uptake and performance during alternating intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 32: 379-385.
- Robinson T. R., Sewell D. A. *et al.* (1999). Role of submaximal exercise in promoting creatine and glycogen accumulation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 87: 598-604.
- Robinson T. M., Sewell D. *et al.* (2000). Dietary creatine supplementation does not affect some haematological indices, or indices of muscle damage and hepatic and renal function. *Br J Sports Med.* 34: 284-288.
- Rodney F. B. (1986). Modern Experimental Biochemistry. Addison-Wesley. Publishing Company, Inc.
- Rooney K. B., Bryson J. M. *et al.* (2002). Creatine supplementation alters insulin secretion and glucose homeostasis in vivo. *Metabolism.* 51: 518-522.
- Rooney K. B., Bryson J. M. *et al.* (2003). Creatine supplementation affects glucose homeostasis but not insulin secretion in humans. *Ann Nutr Metab.* 47: 11-15.
- Ropero-Miller J. D., Paget-Wilkes, H. *et al.* (2000). Effect of oral creatine supplementation on random urine creatinine, pH, and specific gravity measurements. *Clin Chem.* 46: 295-297.
- Sanmarti R., Collado A. *et al.* (1994). Reduced activity of serum creatine kinase in rheumatoid arthritis: a phenomenon linked to the inflammatory response. *Br J Rheumatol.* 33: 231-234.
- Sazsa G. (1969). A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transferase. *J Clin Chem.* 15: 124-136.
- Schedel J. M. Terrier P. *et al.* (2000). The biomechanic origin of sprint performance enhancement after one-week creatine supplementation. *Jpn J Physiol.* 50: 273-276.
- Schilling B. K., Stone M. H. *et al.* (2001). Creatine supplementation and health variables: a retrospective study. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 183-188.
- Schneider D. A., McDonough P. J. *et al.* (1997). Creatine supplementation and the total work performed during 15 s and 1 min bouts of maximal cycling (Abstract). *Aust J Sci Med Sport.* 29: 65-68.
- Shepherd P. R. y Kahn B. B. (1999). Glucose transporters and insulin action -implications for insulin resistance and Diabetes Mellitus. *N Eng J Med.* 341: 248-257.
- Sinclair A., Scott J. M. *et al.* (1999). Effects of creatine supplementation on the energy cost of muscle contraction a ^{31}P -MRS study. *J Appl Physiol.* 87: 116-123.
- Snow R. J., McKenna M. J. *et al.* (1998). Effect of creatine supplementation on sprint exercise performance and muscle metabolism. *J Appl Physiol.* 84: 1667-1673.
- Snow R. J. y Murphy R. M. (2001). Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol Cell Biochem.* 224: 169-181.
- Stathis C. G., Zhao S. *et al.* (1999). Purine loss after repeated sprint bouts in humans. *J Appl Physiol.* 87: 2037-2042.
- Steenge G. R., Lambourne J. *et al.* (1998). Stimulatory effect of insulin on creatine accumulation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 275: E974-E979.
- Stockler S., Holzbach U. *et al.* (1994). Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res.* 36: 409-413
- Stockler S., Marescau B. *et al.* (1997). Guanidino compounds in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis. *Metabolism.* 46: 1189-1193.
- Stout J., Eckerson J. *et al.* (2000). Effect of creatine loading on

- neuromuscular threshold (Abstract). *J Appl Physiol*. 88(1): 109-112.
- Stout J., Eckerson J. *et al.* (2001). Effects of resistance exercise and creatine supplementation on myasthenia gravis: a case study. *Med Sci Sports Exerc*. 33: 869-872.
- Stryer L. (1990). Bioquímica. 3ª edición. Editorial Reverté S. A. Barcelona. pp. 324, 624-625.
- Stucki G., Bruhlmann P. *et al.* (1996). Low serum creatine kinase activity is associated with muscle weakness in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 23: 603-608.
- Talke H. y Schubert G. E. (1965). Enzymatische hasnstoffbestimmung im blut und serum im optischem Test nachwarburg. *Klin Wschr*. 43: 174-175.
- Tarnopolsky M. A., Roy B. D. *et al.* (1999). A randomized, controlled trial of creatine monohydrate in patients with mitochondrial cytopathies. *Muscle Nerve*. 22: 1299-1300.
- Terjung R. L., Clarkson P. *et al.* (2000). American College of Sports Medicine roundtable. The physiological and health effects of oral creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc*. 32: 706-717.
- Terrillion K. A., Kolkhorst F. W. *et al.* (1997). The effect of creatine supplementation on two 700-m maximal running bouts. *Int J Sport Nutr*. 7: 138-143.
- Tiffany T. O., Jansen J. M. *et al.* (1972). Enzymatic kinetic rate and endpoint analysis of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer. *Clin Chem*. 18: 829-840.
- Tomás E., Zorzano A. *et al.* (2002). Exercise effects on muscle insulin signaling and action exercise and insulin signaling: a historical perspective. *J Appl Physiol*. 93: 765-772.
- Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*. 6: 24-27.
- Van Leemputte M., Vandenbergh K. *et al.* (1999). Shortening of muscle relaxation time after creatine loading. *J Appl Physiol*. 86: 840-844.
- Van Loon L. J., Murphy R. *et al.* (2004). Creatine supplementation increases glycogen storage but not GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Clinical Science (Lond.)*. 106: 99-106.
- Vandenbergh K., Gillis N. *et al.* (1996). Caffeine counteracts the ergogenic action of muscle creatine loading (Abstract). *J Appl Physiol*. 80: 452-457.
- Vandenbergh K., Goris M. *et al.* (1997). Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *J Appl Physiol*. 83: 2055-2063.
- Ventura-Clapier R., Kaasik A. *et al.* (2004). Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency. *Mol Cell Biochem*. 256-257: 29-41.
- Volek J. S., Duncan N. D. *et al.* (1999). Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. *Med Sci Sports Exerc*. 31: 1147-1156.
- Vorgerd M., Grehl T. *et al.* (2000). Creatine therapy in myophosphorylase deficiency (McArdle disease): a placebo-controlled crossover trial. *Arch Neurol*. 57: 923-924.
- Walker J. B. (1979). Creatine: Biosynthesis, regulation and function. *Adv. Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 50: 177-242.
- Wallimann T., Wyss M. *et al.* (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*. 281: 21-40.
- Ward P. C. (1981). Renal dysfunction I. Urea and creatinine. *Postgrad Med*. 69: 93-104.
- Wilder N., Deivert R. G. *et al.* (2001). The effects of low-dose creatine supplementation versus creatine loading in Collegiate Football Players. *J Athl Train*. 36: 124-129.
- Willer B., Stucki G. *et al.* (2000) Effects of creatine supplementation on muscle weakness in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 39: 293-298.
- Willoughby D. S. y Rosene J. (2001). Effects of oral creatine and resistance training on myosin heavy chain expression. *Med Sci Sports Exerc*. 33: 1674-1681.
- Winder W. W. (2001). Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 91: 1017-1028.
- Witteveen S. A., Sobel B. E. *et al.* (1974). Kinetic properties of the isoenzymes of human creatine phosphokinase. *Proc Natl Acad Sci*. 71: 1384-1387.
- Wroblewski E. y LaDue J. S. (1956). Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 91: 569-571.
- Wyss M. y Kaddurah-Daouk R. (2000). Creatine y creatinine metabolism. *Physiological Rev*. 80: 1107-1213.
- Wyss M. y Schulze A. (2002). Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience*. 112: 243-260.
- Yu P. H. y Deng Y. (2000). Potencial cytotoxic effect of chronic administration of creatine, a nutrition supplement to augment athletic performance (Abstract). *Med Hypotheses*. 54: 726-728.
- Ziegenfuss T. N., Lowery L. M. *et al.* (1998). Acute fluid volume changes in men during three days of creatine supplementation. *J Exerc Physiol on line*. 1, Nº3.
- Zierath J. R. (2002). Exercise effects of muscle insulin signaling and action. Invited Review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 93: 773-781.



10938