

EFEITO DA NATAÇÃO ASSOCIADA A DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O MÚSCULO SÓLEO DE RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO



ARTIGO ORIGINAL

EFFECT OF SWIMMING ASSOCIATED WITH DIFFERENT TREATMENTS ON RAT SOLEUS MUSCLE: HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRIC STUDY

EFFECTO DE LA NATACIÓN VINCULADA A DIVERSOS TRATAMIENTOS SOBRE EL MÚSCULO SÓLEO DE RATONES: ESTUDIO HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO

Dean Rodrigues Oliveira

(Fisioterapeuta)¹

Anna Carolina Azambuja Pinho

(Bióloga)¹

Jaqueline Del Negri Delise

(Bióloga)¹

Mariana Pereira Nunes (Médica)²

Luana Beatriz MPV Diniz (Médica)²

Hélio Ribeiro Neto

(Graduando Engenharia Mecânica)³

Hélio Batista dos Santos (Biólogo)²

Vanessa Neves de Oliveira

(Educadora Física)⁴

Rosy Lara Maciel de Azambuja Ribeiro

(Bióloga)²

1. Fundação Educacional de Ituiutaba/Universidade do Estado de Minas Gerais, Ituiutaba, MG, Brasil.

2. Universidade Federal de São João Del Rei/Campus Centro-Oeste da (UFSJ-CCO), Divinópolis, MG, Brasil.

3. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

4. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Correspondência:

Rosy Lara Maciel de Azambuja Ribeiro. Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400, Chanadour, Divinópolis, MG, Brasil. 35501-296. rosy@ufsj.edu.br/rosyiar@gmail.com

RESUMO

Introdução: O uso de suplementos ergogênicos farmacológicos e nutricionais cresce a cada dia no ambiente esportivo. A creatina e os esteroides anabólicos são os recursos ergogênicos mais procurados ultimamente. **Objetivo:** Avaliar as alterações histológicas e morfométricas do músculo sóleo de ratos que receberam suplementos e foram submetidos a treinamento físico (TF) de natação. **Métodos:** Foram utilizados 50 ratos, distribuídos em cinco grupos: três não submetidos à atividade física (controles) e dois que receberam treinamento de natação (treinados). Um grupo controle recebeu apenas ração (grupo controle ração), dois grupos (um controle e outro treinado) receberam diariamente 3,3 mg de creatina por grama de dieta dissolvida em água aplicada oralmente via gavagem, e os outros dois grupos (um controle e outro treinado) receberam injeção intramuscular do esteroide anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-durabolin® – Organon) 5 mg/kg duas vezes por semana. Os grupos treinados foram submetidos ao TF com duração de 60 min/sessão de segunda a sexta-feira por nove semanas, e foram sacrificados no final deste período. Após o sacrifício, o músculo sóleo foi retirado, fixado em formalina (10%) tamponada e incluído em parafina. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina para avaliação de hiperplasia e hipertrofia muscular. Para análise dos dados aplicou-se a análise de variância ANOVA One-Way com *post hoc* de Tukey-Kramer com nível de significância de 5%. **Resultados:** Foi demonstrado que a creatina associada ao exercício provavelmente aumente o espaço intersticial no músculo esquelético sem alterar o tamanho ou número de fibras musculares, enquanto que o anabolizante aumentou o número de fibras musculares por área de músculo analisada, embora nenhuma alteração tenha sido observada na área da fibra. **Conclusão:** O músculo de ratos submetidos ao treinamento de natação responde diferentemente frente ao tipo de recurso ergogênico utilizado.

Palavras-chave: natação, anabolizantes, creatina, ratos *Wistar*.

ABSTRACT

Introduction: The use of pharmacologic and nutritional ergogenic supplements is growing every day in sports environment. Creatine and anabolic steroids are the most popular ergogenic resources used lately. **Objective:** To evaluate the histological and morphometric changes of the soleus muscle of rats receiving supplements and submitted to physical training (swimming). **Methods:** 50 rats were allocated into five groups: three did not undergo physical activity (controls) and two that received swimming training (trained). A control group received only rat chow (control chow group), two groups (one control and one trained) received 3.3mg of creatine per gram of diet dissolved in water daily applied orally via gavage, and the other two groups (control and other trained) received intramuscular injections of the anabolic steroid nandrolone decanoate (Deca-durabolin® - Organon) 5mg/kg twice weekly. The trained groups were submitted to the physical training 60min/day lasting from Monday to Friday for 9 weeks and were sacrificed at the end of the period. After sacrifice, the soleus muscle was removed, fixed in buffered formalin (10%) and embedded in paraffin. The histological sections were stained by hematoxylin-eosin for evaluation of muscle hyperplasia and hypertrophy. For data analysis we applied the One-Way ANOVA with *post hoc* Tukey-Kramer significance level of 5%. **Results:** It was shown that creatine during exercise probably increase the interstitial space in skeletal muscle without changing the size or number of muscle fibers, whereas the anabolic agent increased the number of muscle fibers per muscle area examined, though no changes have been observed in the area of the fiber. **Conclusion:** The muscle of rats submitted to swimming training responds differently opposite type of ergogenic aid used.

Keywords: swimming, anabolic agents, creatine, *Wistar* rats.

RESUMEN

Introducción: El uso de suplementos ergogénicos farmacológicos y nutricionales crece, cada día, en el ambiente deportivo. La creatina y los esteroides anabólicos son los recursos ergogénicos más procurados en los últimos tiempos. **Objetivo:** Evaluar las alteraciones histológicas y morfométricas del músculo sóleo de ratones que recibieron suplementos y fueron sometidos a entrenamiento físico (EF) de natación. **Métodos:** Se utilizaron 50 ratones, distribuidos en cinco grupos: tres de estos no sometidos a la actividad física (controles) y dos que recibieron entrenamiento de natación (entrenados). Un grupo de control recibió solamente ración (grupo de control por ración), dos grupos (uno de control y otro entrenado)

recibieron diariamente 3,3 mg de creatina, por gramo de dieta, disuelta en agua aplicada oralmente vía gavaje, y los otros dos grupos (uno de control y otro entrenado) recibieron inyección intramuscular del esteroide anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-durabolin® – Organon), 5 mg/kg dos veces por semana. Los grupos entrenados fueron sometidos al EF, con duración de 60 min/sesión, de lunes a viernes durante nueve semanas, y fueron sacrificados al final de este período. Después del sacrificio, el músculo sóleo fue retirado, fijado en formalina (10%) tamponada e insertado en parafina. Los cortes histológicos fueron coloridos mediante la técnica de hematoxilina-eosina para evaluación de hiperplasia e hipertrofia muscular. Para el análisis de los datos se aplicó el análisis de variancia ANOVA One-Way con post hoc de Tukey-Kramer, con nivel de significancia de 5%. Resultados: Se demostró que la creatina, vinculada al ejercicio, aumenta probablemente el espacio intersticial en el músculo esquelético, sin alterar el tamaño ni el número de fibras musculares, mientras que el anabolizante aumentó la cantidad de fibras musculares por área de músculo que se analizó, aunque no se observó cualquier alteración en el área de la fibra. Conclusión: El músculo de ratones, sometidos al entrenamiento de natación, responde de manera diferente frente al tipo de recurso ergogénico utilizado.

Palabras clave: natación, anabolizantes, creatina, ratones Wistar.

Artigo recebido em 23/06/2011, aprovado em 14/11/2013.

INTRODUÇÃO

O exercício ou o treinamento físico tem sido largamente utilizado com finalidade terapêutica e preventiva de uma série de condições fisiopatológicas, incluindo doenças cardiovasculares¹. Entretanto, um número cada vez maior de atletas tem utilizado suplementos alimentares como a creatina, associados ou não, aos esteroides anabolizantes, para melhor desempenho físico e estético²⁻³.

O músculo esquelético possui a capacidade de alterar suas propriedades estruturais e funcionais, como o perfil do fenótipo⁴ e/ou o tamanho da área da fibra muscular⁵ de acordo com os estímulos que recebe do meio externo. Essa capacidade adaptativa é denominada plasticidade muscular⁶. Entretanto, a resposta ao treinamento físico depende do nível inicial de força, especificidade e velocidade de contração do músculo, protocolo e fatores neurais. A natação impõe uma carga ao aparelho locomotor em função da viscosidade do meio, que causa resistência ao movimento, e também, das propriedades de flutuação do animal. Além disso, a pressão hidrostática e o calor específico da água também fornecem fatores adicionais que podem influenciar as respostas ao exercício⁷.

O músculo esquelético amplia a tensão máxima mediante hipertrofia, através do aumento na área seccional de fibras musculares individuais, caracterizando um aumento no peso total do músculo treinado⁸. Além disso, existem demonstrações de alterações no número de fibras (hiperplasia) em músculo esquelético de ratos, contestando o conceito de que o número de fibras musculares esqueléticas são prédefinidas antes ou logo após o nascimento⁹.

Com o objetivo de potencializar os efeitos obtidos em resposta ao treinamento físico, muitos atletas lançam mão da utilização de recursos ergogênicos¹⁰. Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são compostos naturais ou sintéticos, semelhantes à testosterona, que afetam o metabolismo celular através da ligação com seus receptores celulares¹¹, modulando os efeitos anabólicos e androgênicos. A indicação terapêutica clássica dos EAA está associada a situações de hipogonadismo, mas são também utilizados em quadros de deficiência do metabolismo proteico, por estimularem a síntese proteica¹². A utilização dos EAA durante o treinamento físico produz aumento tanto da massa como da força muscular, além de reduzir o tempo de recuperação após o treinamento físico, características desejáveis de alto desempenho¹³.

Dos suplementos nutricionais que apresentam efeito ergogênico comprovado cientificamente, a creatina tem sido bastante utilizada¹⁴. A creatina é um aminoácido, que além de aumentar a massa muscular também aumenta a capacidade do indivíduo de resistir à intensidade elevada de treinamento aeróbico ou anaeróbico, melhora a capacidade de recuperação pós-esforço e evita a fadiga muscular¹⁵. Além disso, as baixas concentrações desse composto encontram-se entre um dos limitantes do desempenho em atividades de curta e alta intensidade¹⁶. Alguns trabalhos apontam melhoras na propulsão bruta e na eficiência

da propulsão sem alteração na composição e peso corporal de nadadores suplementados com creatina¹⁷, por outro lado, alguns não acreditam no potencial ergogênico da creatina pois não observaram em seus trabalhos melhoras na performance e/ou composição corporal¹⁸⁻¹⁹.

De modo geral, o músculo esquelético tem a capacidade de se adaptar aos diferentes tipos de treinamento e estes, muitas vezes, estão associados às estratégias advindas de recursos ergogênicos, que somados podem ser o diferencial para a conquista do lugar mais alto do pódio. Por outro lado, não se pode desconsiderar os efeitos adversos que estes recursos promovem no sistema muscular.

Assim, o presente trabalho analisou as alterações histológicas e morfométricas das fibras do músculo sóleo de ratos submetidos a um programa de natação, associado ou não à administração do esteroide anabólico e creatina.

MÉTODOS

No presente trabalho, foram utilizados 50 ratos, machos, adultos com 90 dias de idade da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albina, Rodentia, Mammalia). Os animais foram mantidos no biotério da UEMG, Campus Ituiutaba, em gaiolas plásticas de polipropileno (41x34x16 cm) coletivas (cinco ratos por gaiola) com o controle de ciclos de luminosidade (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura controlada de 22±2°C. Durante todo o período do experimento, os animais receberam ração comercial para roedores (Purina® Labina) e água *ad libitum*. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa utilizando animais da Universidade Federal de São João Del Rei (CEPEA-UFSJ), nº 45/2010.

Os animais foram submetidos à tratamento durante 63 dias. Os animais foram randomicamente distribuídos em cinco grupos: três não submetidos à atividade física (controles) e dois que receberam treinamento de natação (treinados). Um grupo controle recebeu apenas ração (grupo controle ração – CR), dois grupos (um controle - CC e outro treinado - TC) receberam diariamente 3,3 mg de creatina por grama de ração, dissolvida em água e administrada por gavagem, e os outros dois grupos (um controle – CA, e outro treinado - TA) receberam injeção intramuscular de esteroide anabólico decanoato de nandrolona (Deca-durabolin® – Organon) 5mg/kg duas vezes por semana.

Os animais treinados foram submetidos a um protocolo de exercícios de natação durante nove semanas, cinco dias por semana e 60 minutos/ em um tanque de vidro (60 x 51 x 50 cm), e profundidade de 40 cm, contendo água a 30°C¹⁶ em quantidade suficiente para evitar que os animais apoiassem a extremidade distal da cauda no fundo do tanque. Os grupos controles foram submetidos aos mesmos procedimentos que os grupos treinados, com exceção da realização do protocolo de exercícios de natação. O peso corporal dos animais foi determinado no início, semanalmente e, ao final da realização do experimento.

Ao final do período experimental de treinamento de nove semanas, os animais foram mantidos em repouso e em jejum por 24 horas em relação à última sessão de treinamento. Então, os animais foram pesados e a eutanásia foi realizada em câmara de gás carbônico. Na dissecação, os tecidos conjuntivos das regiões da perna e coxa foram afastados e posteriormente foram retirados os músculos sóleos, dos quais se separou um fragmento central de 2,0x0,8cm, tomando-se o cuidado de manter as fibras musculares dispostas longitudinalmente no eixo maior do fragmento.

Para as análises histológicas, os fragmentos teciduais foram fixados em formalina (10%) tamponada e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes histológicos de cinco µm de espessura e as secções coradas em hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas confeccionadas foram fotografadas para a contagem e medida da área das fibras musculares e dos espaços intersticiais dos diferentes grupos experimentais. De cada animal, foram capturados dez campos, sendo 100 para cada grupo experimental. A morfometria foi realizada através do programa *HLImage++97 - Histogram Tool API Western Vision Software, L.C., 1997 - versão 2,0,0,0*.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico *Graphpad Instat (Versão 3.05 Graphpad Software Inc.)*. Os valores obtidos foram expressos como média aritmética e erro padrão. Para o estudo da comparação para os grupos de ratos (sedentários e ativos) e os tratamentos (ração, creatina e esteroide anabólico) aplicou-se *One-Way* análise de variância ANOVA, obtendo-se o efeito do grupo de ratos, dos tratamentos e da integração entre grupos e tratamento. Os resultados seguiram uma distribuição normal. Para as variáveis que apresentaram variações significativas, aplicou-se o teste de comparações múltiplas *Tukey-Kramer*, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

No presente trabalho, em relação ao peso corporal, nenhuma alteração foi observada nos animais no início e no final do período experimental. A tabela 1 apresenta as médias de número e área das fibras musculares, e área ocupada pelo espaço intersticial dos ratos controle e suplementados submetidos a treinamento de natação. O grupo treinado anabolizante (TA) apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) no número de fibras musculares quando comparado com os demais grupos analisados. A maior área ocupada pela fibra muscular foi observada no grupo controle ração (CR) que se mostrou estatisticamente superior ao grupo controle creatina (CC). Considerando o espaço intersticial e a relação entre este e o número de fibras musculares, o grupo treinado creatina (TC) mostrou-se estatisticamente superior em relação a todos os grupos. Portanto, esta última avaliação demonstra a alteração na composição do músculo frente ao treinamento com o uso de diferentes recursos ergogênicos (figura 1).

DISCUSSÃO

Neste trabalho são descritos os aspectos histológicos e morfométricos do músculo sóleo de ratos submetidos à natação (sem sobrecarga adicional) e à diferentes tratamentos (creatina e esteroide anabólico decanoato de nandrolona). A escolha pela modalidade da natação foi feita por este ser um exercício de *endurance*, que mobiliza a maioria das

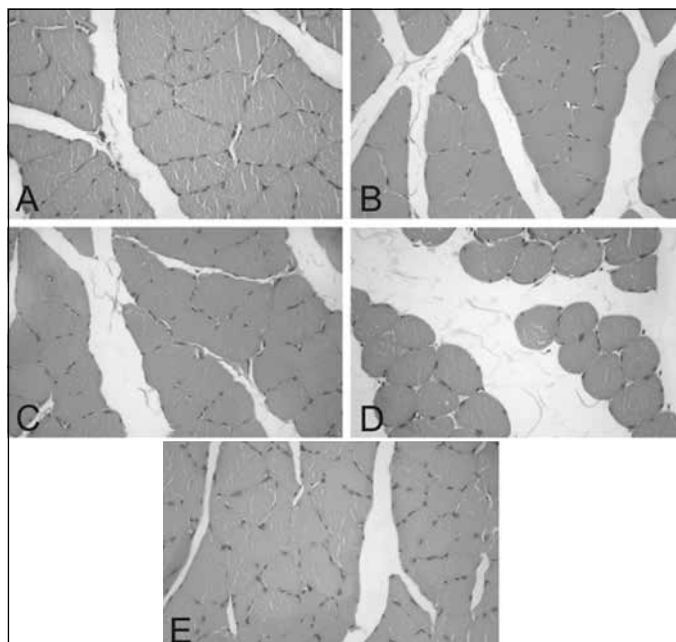


Figura 1. Cortes transversais de músculo sóleo de diferentes grupos experimentais. As micrografias representativas de 10 animais por grupo experimental. Grupos controle: (a) ração (CR), (b) creatina (CC), (c) decanoato de nandrolona (CA). Grupos treinados: (d) creatina (TC), (e) decanoato de nandrolona (TA). 400x.

articulações do corpo¹⁸ e promove a frequente utilização de músculos da perna tais como o sóleo e o gastrocnêmio, uma vez que os animais devem realizar a flexão plantar para se manterem na superfície da água.

A suplementação da creatina, além dos efeitos adversos na prevenção e/ou redução do dano muscular, seja por aumentar a estabilização das membranas, homeostase energética da mitocôndria e/ou por reduzir as lesões oxidativas do músculo¹⁹, também aumenta a ativação de células satélites musculares, contribuindo para a regeneração do músculo²⁰. Em ratos *Wistar*, a suplementação com creatina, via oral, associada ao treinamento de natação por 33 dias, aumentou a massa muscular total do *músculo* gastrocnêmio, do extensor longo dos dedos e do sóleo de acordo com Moura e cols.²¹. Entretanto, no presente trabalho, os animais suplementados com creatina, submetidos ou não, ao treinamento físico de natação, reduziram significativamente a área ocupada pelas fibras musculares do músculo sóleo, enquanto que nenhuma diferença foi observada quanto ao número de fibras e peso dos animais. Em contrapartida, o espaço intersticial foi substancialmente maior no grupo TC em relação a todos os outros tratamentos. Este resultado pode ser parcialmente explicado por alguns trabalhos que descrevem que a suplementação com creatina associada ao exercício leve pode levar a retenção hídrica no músculo, devido ao efeito osmótico decorrente da elevação da creatina intramuscular²². Além disso, a relação entre o espaço intersticial e o número de fibras musculares foi superior no músculo dos ratos do grupo TC, o que demonstra que as alterações induzidas pela creatina na composição do músculo podem ter sido causadas pelo treinamento associado e não apenas pela administração isolada da creatina. Outrossim, acredita-se que o edema celular proveniente da retenção de água no músculo diminua a proteólise do músculo por reduzir a liberação dos aminoácidos de cadeia ramificada²³.

Tabela 1. Médias e erros padrões das análises histológicas e morfométricas do tecido muscular de ratos submetidos a diversos tratamentos.

Variáveis/Grupos	CR	CC	CA	TC	TA
Nº de fibras (NF)	281,45 ± 15,82 ^a	286,55 ± 15,26 ^{ab}	291,95 ± 17,66 ^{ab}	273,16 ± 18,22 ^a	351,20 ± 20,02 ^b
Área da fibra (µm ²)	0,26 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,01 ^{ab}	0,19 ± 0,01 ^b	0,23 ± 0,16 ^{ab}
Espaço Intersticial (EI) (U.A.)	268,12 ± 12,97 ^{ac}	335,0 ± 17,77 ^a	296,2 ± 25,58 ^{ad}	446,8 ± 21,06 ^b	216,4 ± 29,09 ^{cd}
EI/ NF	0,99 ± 0,09 ^a	1,19 ± 0,08 ^a	1,03 ± 0,09 ^a	1,80 ± 0,11 ^b	0,66 ± 0,12 ^{ac}

CR - controle ração; CC - controle creatina; CA - controle anabolizante; TC - treinado creatina; TA - treinado anabolizante; Espaço Intersticial (EI) (U.A. - unidades arbitrárias); EI/NF - Espaço Intersticial em relação ao número de fibras musculares. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa $p < 0,05$. Valores foram expressos em média ± erro padrão.

Os animais do grupo TA não apresentaram aumento significativo quanto à área do músculo ocupada pela fibra muscular, mas este mesmo o grupo aumentou significativamente o número de fibras musculares em relação ao grupo CR e ao grupo TC. Além disso, a composição muscular dada pela razão entre o espaço intersticial e o número de fibras musculares observada no grupo TA, juntamente com o aumento do número de fibras neste mesmo grupo, sugere que tenha ocorrido proliferação de células satélites exercício dependentes²⁴ e/ou divisão celular (*splitting*) onde uma fibra se divide longitudinalmente em toda a sua extensão, resultando no aparecimento de duas novas fibras²⁵. O aumento de força muscular em consequência da hipertrofia das fibras pelo uso de esteroides ocorre quando sua administração é associada a um treinamento físico intenso e uma dieta hipercalórica e hiperproteica²⁶. Contudo, isso não foi observado neste trabalho, possivelmente pelo fato da dieta empregada possuir uma composição química balanceada e o exercício utilizado não ter sido incremental. Por outro lado, a administração de esteroide anabólico em ratos submetidos a exercício de natação de alta intensidade (cinco semanas - seis dias por semana) não alterou o diâmetro das fibras musculares, mas o exercício combinado com a administração de esteroide aumentou significativamente o diâmetro das fibras de contração lenta²⁷. Assim, acredita-se que a intensidade elevada da atividade bem como incrementos proporcionais ao peso utilizando cargas de chumbo presas com elástico ao pescoço²⁸ seja um dos fatores responsáveis pela discrepância no resultado encontrado já que neste trabalho não houve incremento de carga ao longo do treinamento.

Além disso, existem relatos de que a resposta do músculo frente ao tratamento é dose dependente. A administração do anabólico decanoato de nandrolona nas doses de 1,5mg/kg e 7,5 mg/kg (durante 35 dias consecutivos) aumentou o diâmetro das fibras do tipo I e tipo IIb respectivamente. No presente trabalho utilizou à dose de cinco mg/kg que é bem próxima a utilizada por outros autores²⁹ e que apresentou aumento no diâmetro das fibras do tipo IIb. Portanto, acredita-se que a ação do anabolizante seja seletiva, o que induz maior alteração no diâmetro de determinados tipos de fibras musculares¹⁶. Outros estudos relatam que as ações anabólicas e androgênicas dos EAA variam entre as espécies e também entre os diferentes grupos musculares da mesma espécie em função do número de receptores androgênicos presentes nos tecidos alvos³⁰. No entanto, neste trabalho o músculo estudado

foi o sóleo, que apresenta predomínio de fibras do tipo I e que são as menos responsivas a esse tipo de tratamento, por isso, acredita-se que a hipertrofia induzida pelo anabólico não foi suficiente para produzir alterações na média dos diâmetros das fibras musculares desse músculo.

CONCLUSÃO

O exercício físico de natação associado ao uso de recursos ergogênicos (creatina e esteroide anabólico) altera a composição do músculo sóleo de ratos *Wistar*. Durante as nove semanas de treinamento observou-se que a creatina associada ao exercício provavelmente aumente o espaço intersticial no músculo esquelético sem nenhuma alteração no tamanho ou número de fibras musculares. Entretanto, o esteroide anabólico decanoato de nandrolona alterou o número de fibras musculares por área de músculo analisada, embora nenhuma alteração tenha sido observada no que se refere ao aumento da área da fibra. Nos animais que se alimentaram com ração acredita-se que, por sofrerem menos manipulações, obtiveram um índice de estresse menor, o que pode ter contribuído para o resultado atingido.

Assim, concluiu-se que o músculo de ratos submetidos ao treinamento de natação responde diferentemente frente ao tipo de recurso ergogênico utilizado. Ressalta-se ainda, que os achados discrepantes na literatura podem, parcialmente, ser atribuídos às grandes diferenças metodológicas utilizadas nos estudos. Portanto, mais trabalhos devem ser realizados no intuito de elucidar os possíveis efeitos da suplementação de creatina e do decanoato de nandrolona associados a protocolos de atividade física sem incremento de carga sobre os tecidos musculares.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio e financiamento das agências FAPEMIG, CAPES, CNPq.

Ao professor Sérgio Vitorino Cardoso, do laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Uberlândia, pelo auxílio na aquisição de imagens. Ao professor Emersom Zumpichiatti (UFSJ-CCO) Arruda pelas sugestões dadas. À Fundação Educacional de Ituiutaba (FEIT-UEMG) pelo incentivo aos alunos e professores.

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

REFERÊNCIAS

1. Dorn J, Naughton J, Imamura D, Trevisan M. Correlates of compliance in a randomized exercise trial in myocardial infarction patients. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:1081-9.
2. Derave W, Eijnde BO, Verbessem P, Ramaekers M, Van Leemputte M, Richter EA, et al. Combined creatine and protein supplementation in conjunction with resistance training promotes muscle GLUT-4 content and glucose tolerance in humans. *J Appl Physiol.* 2003;94:1910-6.
3. Thorlindsson T, Halldorsson V. Sport, and use of anabolic androgenic steroids among Icelandic high school students: a critical test of three perspectives. *Subst Abuse Treat Prev Policy.* 2010;5:32.
4. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber type phenotypic profiles. *Histochemistry and Cell Biology.* 2001;115:359-72.
5. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther.* 2001;81:1810-6.
6. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81:540-51.
7. Campion MR. *Adult Hydrotherapy: a practical approach.* Oxford: Heinemann medical Books, 1990.
8. Gonyea WJ. Role of exercise in inducing increases in skeletal muscle fiber number. *J Appl Physiol.* 1980;48:421-6.
9. Gollnick PD, Timson BF, Moore RL, Riedy M. Muscular enlargement and number of fibers in skeletal muscles of rats. *J Appl Physiol.* 1981;50:936-43.
10. Goodman C, Peeling P, Ranchordas MK, Burke LM, Stear SJ, Castell LM. A to Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance--Part 21. *Br J Sports Med.* 2011;45:677-9.
11. Kuhn CM. Anabolic steroids. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:411-34.
12. Kuipers H, Wijnen JA, Hartgens F, Willems SM. Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders. *Int J Sports Med.* 1991;12:413-8.
13. Reents S. *Sport and exercise pharmacology.* Champaign: Human Kinetics, 2000.
14. Maughan RJ. Creatine supplementation and exercise performance. *Int J Sport Nutr.* 1995;5:94-101.
15. Hopwood MJ, Graham K, Rooney KB. Creatine supplementation and swim performance. *Journal of Sports Science and Medicine.* 2006;54:10-24.
16. Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids.* 2010;38:31-44.
17. Silva AJ, Machado Reis V, Guidetti L, Bessone Alves F, Mota P, Freitas J, et al. Effect of creatine on swimming velocity, body composition and hydrodynamic variables. *J Sports Med Phys Fitness.* 2007;47:58-64.
18. Theodorou AS, Havenetidis K, Zanker CL, O'Hara JP, King RF, Hood C, et al. Effects of acute creatine loading with or without carbohydrate on repeated bouts of maximal swimming in high-performance swimmers. *J Strength Cond Res.* 2005;19:265-9.
19. Mendes RR, Pires I, Oliveira A, Tirapegui J. Effects of creatine supplementation on the performance and body composition of competitive swimmers. *J Nutr Biochem.* 2004;15:473-8.
20. Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Francischetti FA, Belangero WD, Pai VD. Efeitos do esteroide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2006;12:243-247.
21. Dubowitz V, Brooke MH, Neville H. *Muscle biopsy: a practical approach.* 2 ed. London: Bailliere Tindall, 1985.
22. Reid WD, Shanks J, Samrai B. Regional and fiber-type percentages and sizes in the hamster diaphragm after swim training. *Phys Ther.* 1997;77:178-86.
23. Persky AM, Brazeau GA. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev.* 2001;53:161-76.
24. Dangott B, Schultz E, Mozdzial PE. Dietary creatine monohydrate supplementation increases satellite cell mitotic activity during compensatory hypertrophy. *Int J Sports Med.* 2000;21:13-6.
25. Moura IMW, Santos FF, Moura JAA, Curi R, Fernandes LC. Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional area in skeletal muscle fibers of wistar rats after swimming training. *Journal of Sports Science and Medicine.* 2002;1:87-95.
26. Ziegenfuss TN, Rogers M, Lowery L, Mullins N, Mendel R, Antonio J, et al. Effect of creatine loading on anaerobic performance and skeletal muscle volume in NCAA Division I athletes. *Nutrition.* 2002;18:397-402.
27. Parise G, Mihic S, MacLennan D, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA. Effects of acute creatine monohydrate supplementation on leucine kinetics and mixed-muscle protein synthesis. *J Appl Physiol.* 2001;91:1041-7.
28. Adams GR. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006;31:782-90.
29. Hawke TJ. Muscle stem cells and exercise training. *Exerc Sport Sci Rev.* 2005;33:63-8.
30. Haupt HA, Rovere GD. Anabolic steroids: a review of the literature. *Am J Sports Med.* 1984;12:469-84.