

Efeitos da Suplementação Oral com Creatina sobre o Metabolismo e a Morfologia Hepática em Ratos

ARTIGO ORIGINAL



Effects of Creatine Oral Supplementation on the Hepatic Metabolism and Morphology of Rats

Rodolfo de Paula Vieira¹

Rafaela Ferreira França²

Celso Ricardo Fernandes de Carvalho³

Marisa Dolhnikoff¹

Wellington Ribeiro²

Rodrigo Álvaro Brandão Lopes

Martins⁴

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

2. Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba São José dos Campos, SP, Brasil.

3. Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

4. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão

Lopes Martins

Av. Lineu Prestes, 1524, Prédio Biomédicas I, 2º andar (Secret. Farmacologia)

Cidade Universitária, CEP 05508-900 - São Paulo, SP

Telefone: (11) 3091-7316

E-mail: rmartins@icb.usp.br

Submetido em 02/02/2007

Versão final recebida em 18/07/2007

Aceito em 06/09/2007

RESUMO

A creatina é uma amina nitrogenada e tem sido utilizada principalmente por atletas e praticantes de atividade física que desejam aumentar a massa muscular e o desempenho físico. Entretanto seu uso não está somente relacionado à prática esportiva, pois inúmeros trabalhos apresentam efeitos benéficos na prática médica. Alguns estudos demonstraram que a suplementação oral com creatina resulta em aumento da sua biodisponibilidade plasmática e também de seus estoques em inúmeros órgãos. Entretanto, estudos sobre possíveis efeitos tóxicos da suplementação com creatina são escassos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos da suplementação oral com creatina sobre a função e morfologia hepáticas em ratos após 14 dias de suplementação oral com creatina na dose de 0.5 g/kg/dia. A função hepática foi avaliada através de testes bioquímicos e a estrutura hepática foi avaliada através da massa hepática relativa e da análise histológica. Os resultados demonstraram que 14 dias de suplementação com creatina não alteraram a função hepática quando comparado os grupos controle e suplementado: AST (39.5 x 44.4 U/L), ALT (18.6 x 30.8 U/L), ALP (38.5 x 31.4 U/L), GGT (134.8 x 143.8 U/L), proteínas totais (5.1 x 5.5 g/dl), triglicérides (141.0 x 141.0 mg/dl), colesterol total (130.1 x 126.2 mg/dl), colesterol LDL (36.1 x 36.1 mg/dl), colesterol HDL (65.6 x 62.4 mg/dl), colesterol VLDL (25.0 x 28.0 mg/dl), e também estrutura hepática, exceto nos níveis plasmáticos de albumina (3.0 x 3.5 mg/dl – p<0.02). Nossos resultados demonstraram claramente que, ao menos na dose utilizada, a suplementação oral com creatina não induziu a nenhum tipo de efeito tóxico sobre o fígado.

Palavras-chave: creatina, suplementos dietéticos, fígado.

ABSTRACT

Creatine is a nitrogenated amine and it has been used mainly by athletes and physical activity practitioners who wish to increase muscle mass and performance. However its use is not just related to sports practice, once several studies have shown beneficial effects on medical practice. Some studies have demonstrated that oral creatine supplementation increases its plasmatic bioavailability and also its concentration in several organs. However, studies about the possible toxic effects followed by creatine supplementation are scarce. Therefore, the aim of this work was to evaluate the hepatic structure and function in rats after 14 days of oral creatine supplementation at dose of 0.5g/kg/day. The hepatic function was evaluated through biochemical assays and the hepatic structure was analyzed through the relative hepatic mass and histological analysis. The results showed that 14 days of creatine supplementation did not alter the hepatic function and structure when compared with the control and supplemented groups, AST (39.5 x 44.4 U/L), ALT (18.6 x 30.8 U/L), ALP (38.5 x 31.4 U/L), GGT (134.8 x 143.8 U/L), total proteins (5.1 x 5.5 g/dl), triglycerides (141.0 x 141.0 mg/dl), total cholesterol (130.1 x 126.2 mg/dl), LDL cholesterol (36.1 x 36.1 mg/dl), HDL cholesterol (65.6 x 62.4 mg/dl), VLDL cholesterol (25.0 x 28.0 mg/dl), and also the hepatic structure, except for the albumin plasmatic levels (3.0 x 3.5 mg/dl – p<0.02). Our results clearly demonstrated that, at least at the used dosage, oral creatine supplementation did not induce any toxic effect on the liver.

Keywords: creatine, dietary supplements, liver.

INTRODUÇÃO

A creatina é uma amina nitrogenada denominada ácido acético metilguanidina e sua importância sobre o organismo foi inicialmente demonstrada por Hunter em 1928⁽¹⁾. Sua forma fosforilada, a creatina fosfato, foi descrita em 1927, momento em que sua importância no metabolismo energético foi relatada⁽²⁾. Sua síntese endógena ocorre principalmente no fígado a partir dos aminoácidos glicina, arginina e ornitina⁽²⁾. A partir de 1967, o papel da creatina durante o exercício e na sua recuperação passou a ser investigado⁽³⁻⁵⁾. O conteúdo celular

de creatina pode variar de acordo com a dieta e principalmente decorrente do uso de suplementos alimentares a base de creatina^(6,7). A diminuição dos níveis teciduais de creatina tem sido associada a uma série de doenças, razão pela qual os efeitos da suplementação vem sendo estudados, tanto em modelos experimentais quanto em estudos clínicos⁽⁸⁻¹¹⁾. Se por um lado a suplementação com creatina apresenta efeitos benéficos, por outro, alguns trabalhos experimentais e clínicos têm associado à sua suplementação à alguns efeitos colaterais, particularmente sobre o fígado e rins⁽¹³⁻¹⁷⁾. Por exemplo, Tarnopolsky et al.

2003⁽¹³⁾ demonstraram que a suplementação com creatina pode levar a um quadro de hepatite. Edmonds et al. 2001⁽¹⁴⁾ avaliaram os efeitos da suplementação com creatina sobre a progressão da doença renal crônica demonstrando que a suplementação acelerou a progressão da doença e sugerindo que a suplementação com creatina deveria ser realizada com especial cuidado em pacientes renais. Poortmans et al. 2005⁽¹⁷⁾ também investigaram os efeitos da suplementação com creatina sobre os rins, demonstrando que a suplementação levou a um aumento na formação de metilamina e formoldeído, ambos compostos com ação tóxica sobre os rins. Entretanto, neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que o aumento dos níveis desses compostos não resultou no aumento da permeabilidade glomerular, nem em alterações da função renal.

Alguns estudos fazem uma estimativa da necessidade diária de creatina em torno de 2 g/dia para um homem adulto de 70kg não praticante atividade física^(1,2). Esses trabalhos também apresentam que essa necessidade diária de creatina é suprida por síntese endógena, tendo como pressuposto a ingestão de alimentos que contenham os aminoácidos necessários para a síntese de creatina^(1,2). Entretanto, a necessidade de creatina em atletas e em casos patológicos pode estar aumentada^(1,8-12). Por exemplo, doenças na qual a função mitocondrial está alterada, resultando numa diminuição da síntese de adenosina trifosfato, como no caso da doença de Parkinson, Huntington e miopatias, a suplementação com creatina tem apresentado importantes efeitos benéficos⁽¹²⁾. Por outro lado, é possível que a ingestão de grandes quantidades de creatina para indivíduos saudáveis possa resultar em alguma alteração na estrutura e função orgânica e existem poucos estudos avaliando esses efeitos, particularmente em diferentes tempos e doses. Portanto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a função e morfologia hepática, respectivamente através da análise bioquímica e histológica após 14 dias de suplementação com creatina em ratos não submetidos à atividade física.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba, processo N° 018/2004 e estavam de acordo com o "Guide for care and use of laboratory animals" (NIH publication 85-23, revised 1985).

ANIMAIS

Treze ratos Wistar, machos, com 10 semanas de idade, pesando entre 330-370 g, obtidos do biotério da Universidade do Vale do Paraíba foram mantidos em caixas individuais durante os 14 dias do experimento. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura 22-25°C, com um ciclo de 12h-claro/12h-escuro e tiveram livre acesso à água e ração para animais de laboratório (Labina, Purina®, São Paulo, Brasil).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em grupos Controle (CO / n = 6) e grupo Creatina (Creatina Micronizada HPLC, Probiótica®, São Paulo, Brasil) (CR / n = 7). O grupo tratado recebeu creatina micronizada diluída em água (15ml) em uma dose correspondente a 0,5g/kg/dia durante 14 dias e o grupo controle somente água. Uma avaliação da ingestão de água foi realizada três vezes ao dia, com o intuito de verificar possíveis vazamentos e principalmente o consumo de água e da solução com creatina. Após três dias de experimento, percebemos que o conteúdo de água ou da solução com creatina (15ml) era completamente ingerido até as 18h00 de cada dia. Assim sendo, todos os dias após as 18h00, o bebedouro dos animais era completado com água ou solução contendo creatina.

Anestesia, Coleta de Sangue e Tecido Hepático e Sacrifício dos Animais

No décimo quinto dia do experimento, o que correspondeu há um dia após o último dia de tratamento, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de ketamina (50mg/kg) e xilazina (40mg/kg) e pesados. Uma incisão de 03 cm próxima ao processo xifóide foi realizada e 05 ml de sangue foram coletados e imediatamente centrifugados a 04°C, durante 10 minutos a 1000 rpm. Após a coleta de sangue os animais foram sacrificados por superdosagem de anestésico e o fígado foi retirado, pesado e imediatamente cortado e fixado para processamento histológico.

Análise Histológica

Os espécimes de fígado foram cortados e fixados em formol 10% por 24 horas. Após este período as amostras foram desidratadas e clarificadas e embebidas em parafina histológica. Os blocos foram cortados em 4-5µm e as lâminas coradas com hematoxilina/eosina. As fotomicrografias foram realizadas em um microscópio trinocular Leica, modelo DMR (Bensheim, ALE). A análise qualitativa da histologia buscou possíveis alterações como áreas com infiltrado inflamatório, congestão de vasos e capilares sinusóides, aumento do número de hepatócitos binucleados, de células perisinusóides e de Kupfer, núcleos com cromatina extremamente condensada e áreas de degeneração hidrópica.

Análise Bioquímica

Seis horas após a centrifugação do sangue dos animais, o plasma coletado foi utilizado para análise bioquímica dos níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamitranferase (GGT), proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicérides. Todos os testes bioquímicos foram realizados utilizando-se kits comerciais da marca Analisa® (Minas Gerais, Brasil) em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2001 (Ohio, EUA).

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do software SigmaStat 3.1 (Califórnia, EUA). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e utilizado o teste Mann-Whitney para comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% (p<0.05). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.0 (Califórnia, EUA).

RESULTADOS

Peso Corporal e Peso Hepático Relativo

A média de aumento de peso corporal durante 14 dias de experimento entre os grupos não apresentaram diferença estatística, apesar de o grupo creatina apresentar uma tendência de aumento (Controle 37.8g ± 10.3 e Creatina 61.1 ± 44.0) (Figura 1 A). O peso hepático relativo (peso do fígado/peso corporal do rato) também não apresentou diferença quando comparados os grupos controle e creatina (respectivamente, 0.028±0.003 e 0.026±0.003) (Figura 1 B).

Enzimas Hepáticas

Os níveis plasmáticos da AST, ALT, ALP e GGT não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, figura 2 A, 2 B, 2 C e 2 D, respectivamente.

Proteínas e Lipoproteínas Plasmáticas

Os níveis plasmáticos de proteínas totais, colesterol total, colesterol hdl, colesterol ldl, colesterol vldl e triglicérides não apresentaram

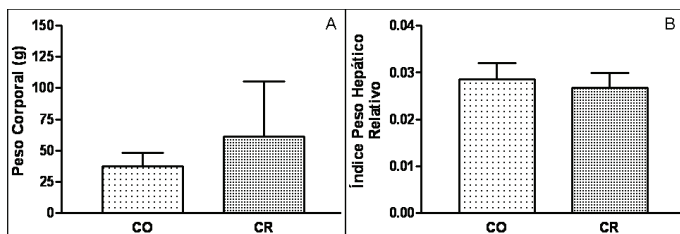


Figura 1. Em 1 A são apresentados o ganho de peso corporal dos animais dos grupos Controle e Creatina. Em 1 B são apresentados o peso hepático relativo dos animais dos grupos controle e creatina. Resultados expressos como média e desvio padrão.

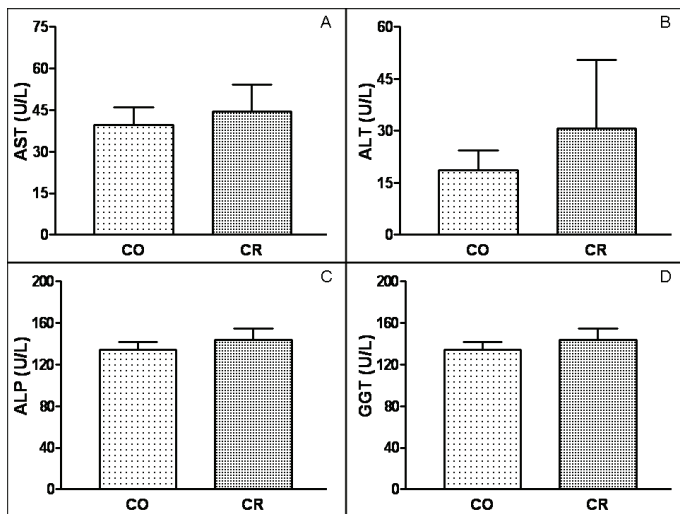


Figura 2. Em 2 A, 2 B, 2 C e 2 D são apresentados os níveis plasmáticos da enzima AST, ALT, ALP e GGT, respectivamente, para os grupos Controle e Creatina. Resultados expressos como média e desvio padrão.

diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de albumina, entretanto, apresentaram-se significativamente elevados no grupo creatina (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis plasmáticos de proteínas e lipídios para os grupos Controle e Creatina. Resultados expressos como média e desvio padrão. * = $p < 0,05$.

Níveis Plasmáticos de Proteínas e Lipoproteínas		
Parâmetros Avaliados	Grupo Controle	Grupo Creatina
Proteínas Totais (g/dl)	5.15±0.3	5.51±0.2
Albumina (g/dl)	3.02±0.1	3.49±0.2*
Colesterol Total (mg/dl)	130.16±4.4	126.28±7.6
Colesterol LDL (mg/dl)	36.17±12.4	36.16±12.4
Colesterol HDL (mg/dl)	65.66±7.3	62.42±10.9
Colesterol VLDL (mg/dl)	25±3.8	28±4.0
Triglicérides (mg/dl)	141.0±18.4	141±18.0

Análise Histológica

Nenhuma das possíveis alterações histopatológicas avaliadas, as quais foram descritas nos materiais e métodos foram encontradas em nenhum dos dois grupos estudados (Figura 3 A, 3 B, 3 C, 3 D).

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado concomitantemente, pela primeira vez, a estrutura e função hepática após 14 dias de suplementação

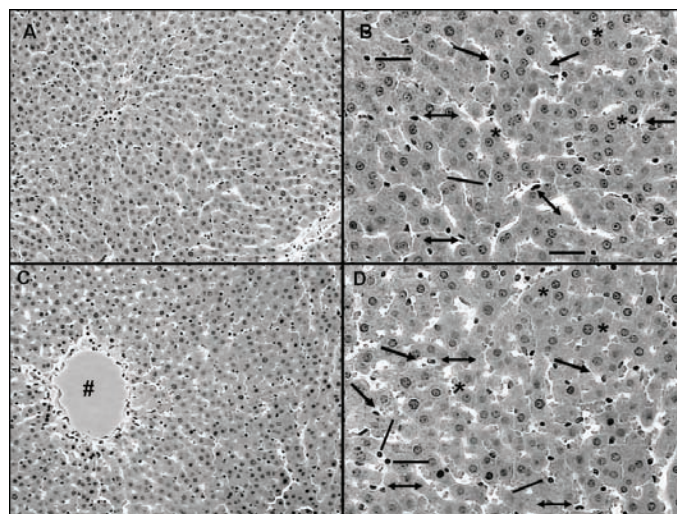


Figura 3 – Em 3 A e 3 C as fotomicrografias representam o fígado de um animal do grupo Controle sem a presença de alterações histopatológicas. Aumento de 200x e 400x respectivamente. Em 3 B e 3 D as fotomicrografias representam o fígado de um animal do grupo Creatina sem a presença de alterações histopatológicas. Aumento de 200x e 400x respectivamente. Em 3 B e 3 D observamos hepatócitos com caracteres morfológicos regulares e justapostos (*), capilares sinusóides não congestionados (.), células de Kupfer (x) e células perisinusóides (y). Em 3 C observamos uma veia centrolobulillar não congestionada (#).

com creatina em ratos não submetidos à atividade física. A análise histológica e bioquímica não revelou nenhuma alteração significativa sugerindo que a suplementação durante 14 dias com creatina em ratos não submetidos à atividade física não leva a hepatotoxicidade.

Diversos estudos demonstram que elevações dos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas como AST, ALT, GGT e ALP estão relacionadas com o aumento da taxa metabólica do fígado indicando toxicidade hepática, principalmente quando exposto a drogas, agentes virais ou bacterianos^(18,19). Estudos clínicos prévios avaliando possíveis efeitos da suplementação com creatina sobre o fígado têm procurado relacionar o seu uso às alterações da resposta hepática. Entretanto esses trabalhos ainda deixam muitas dúvidas, não permitindo uma afirmação de que a suplementação com creatina leva às alterações hepáticas, principalmente por se tratar de relatos de casos e estudos retrospectivos⁽²⁰⁻²³⁾. Um outro estudo de Robinson et al.⁽²⁴⁾ demonstraram que a suplementação com creatina tanto aguda quanto cronicamente, não alterou significativamente parâmetros hematológicos, hepáticos e renais, com exceção dos níveis de albumina. Entretanto, os mesmos autores demonstraram que esses níveis apesar de significativamente aumentados, permaneceram dentro dos valores de normalidade, referindo-os como resultados sem significância clínica. Tarnopolsky et al. avaliaram os efeitos da suplementação com creatina, em diferentes doses, e em 21 tecidos de ratos e camundongos, geneticamente modificados ou não, após 50, 56, 150, 159 e 365 dias de suplementação com creatina. Os resultados demonstraram que a suplementação com creatina levou ao aparecimento de um infiltrado inflamatório difuso no fígado, tanto dos camundongos quanto dos ratos, geneticamente modificados ou não. Os autores também comentaram que nenhuma outra alteração foi encontrada em qualquer dos 20 outros tecidos analisados e concluíram que a suplementação com creatina, independentemente da dose induz a um quadro de hepatotoxicidade típico de hepatite aguda. Entretanto, a presença de pequenos e isolados focos inflamatórios no fígado, como os apresentados por Tarnopolsky et al. poderiam ser mais bem classificados como alterações hepáticas transitórias, e isoladamente não podem ser considerados como achados de grande

importância clínica, ainda mais, como no caso deste trabalho citado, no qual os autores não mostraram nenhuma outra alteração da morfologia e da função hepática⁽²⁵⁻²⁸⁾. Portanto, os estudos clínicos prévios que avaliam os possíveis efeitos da suplementação com creatina sobre o fígado têm procurado relacionar o seu uso às alterações da resposta hepática. Entretanto esses trabalhos ainda deixam muitas dúvidas, não nos permitindo afirmar que a suplementação com creatina leva a alterações hepáticas.

Embora o presente estudo tenha avaliado a suplementação de creatina em uma única dose (0,5g/kg/dia) por um período de 14 dias, encontramos resultados semelhantes àqueles dos estudos clínicos encontrados na literatura, onde discretos aumentos nos níveis de enzimas hepáticas, sem significância estatística e, discretos aumentos nos níveis de proteínas e lipoproteínas⁽²⁴⁾. Além disso, em nosso estudo também encontramos aumentos significativos nos níveis de albumina, entretanto, esses valores permaneceram dentro da faixa de normalidade não permitindo alguma interpretação com significância clínica. Entretanto, estudos dose e tempo dependente são necessários para uma melhor compreensão dos efeitos da suplementação com creatina sobre o metabolismo e estrutura hepática. Em adição, estudos sobre os efeitos hepáticos da suplementação com creatina em animais submetidos a

treinamento físico também são necessários, tendo em vista que, apesar das várias aplicações clínicas da creatina, a maior parte do uso da creatina está associado à prática esportiva. Portanto, uma vez que não foram encontradas alterações hepáticas decorrentes da suplementação com creatina, achamos não serem necessários, neste momento, estudos que avaliassem a suplementação com creatina sobre a resposta hepática em animais submetidos a treinamento físico.

Assim sendo, concluímos que, ao menos em nossas condições experimentais, a suplementação com creatina durante 14 semanas em ratos não alterou a estrutura e função hepática.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Museu do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na pessoa dos técnicos Ana Luiza e Reginaldo Silva pela colaboração na obtenção das fotomicrografias.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Branch JD, Kreider RB, Williams MH. Creatina. 1 ed. Editora Manole. São Paulo, 2000.
2. Walker JB. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1979; 50: 177-242.
3. Hultman E. Studies on muscle metabolism of glycogen and active phosphate in man with special reference to exercise and diet. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1967; 94: 1-63.
4. Busby SJ, Gadian DG, Radda GK, Richards RE, Seeley PJ. Phosphorus nuclear-magnetic-resonance studies of compartmentation in muscle. *Biochem J.* 1978 Jan 15; 170(1): 103-14.
5. Hug F, Bendahan D, Le Fur Y, Cozzone PJ, Grelot L. Metabolic recovery in professional road cyclists: a ³¹P-MRS study. *Med Sci Sports Exerc.* 2005 May; 37(5): 846-52.
6. Delanghe J, De Slypere JP, De Buyzere M, Robbrecht J, Wieme R, Vermeulen A. Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. *Clin Chem.* 1989 Aug; 35(8): 1802-3.
7. Ipsiroglu OS, Stromberger C, Ilas J, Hoger H, Muhl A, Stockler-Ipsiroglu S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. *Life Sci.* 2001 Aug 31; 69(15): 1805-15.
8. Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Ferrante KL, Bogdanov MB, Kaddurah-Daouk R, et al. Increases in cortical glutamate concentrations in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice are attenuated by creatine supplementation. *Journal of Neurochemistry,* 2001, 77, 383-390.
9. Holtzman D, Khait I, Mulken R, Allred E, Rand T, Jensen F, et al. In vivo development of brain phosphocreatine in normal and creatine-treated rabbit pups. *J Neurochem.* 1999 Dec; 73(6): 2477-84.
10. Woo YJ, Grand TJ, Zentko S, Cohen JE, Hsu V, Atluri P, Berry MF, et al. Creatine phosphate administration preserves myocardial function in a model of off-pump coronary revascularization. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2005 Jun; 46(3): 297-305.
11. Prass K, Royl G, Lindauer U, Freyer D, Megow D, Dirmagl U, et al. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Mar; 27(3): 452-459.
12. Persky AM, Brazeau GA. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev.* 2001 Jun; 53(2): 161-176.
13. Tarnopolsky MA, Bourgeois JM, Snow R, Keys S, Roy BD, Kwicien JM, et al. Histological assessment of intermediate- and long-term creatine monohydrate supplementation in mice and rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Oct; 285(4): R762-769.
14. Edmunds JW, Jayapalan S, DiMarco NM, Saboorian MH, Aukema HM. Creatine supplementation increases renal disease progression in Han:SPRD-cy rats. *Am J Kidney Dis* 37: 73-78, 2001.
15. Koshy KM, Griswold E, Schneeberger EE. Interstitial nephritis in a patient taking creatine. *N Engl J Med* 340: 814-815, 1999.
16. Pritchard NR, Kalra PA. Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. *Lancet* 351: 1252-1253, 1998.
17. Poortmans JR, Kumps A, Duez P, Fofonka A, Carpentier A, Francaux M. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. *Med Sci Sports Exerc.* 2005 Oct; 37(10): 1717-20.
18. Bjornsson E. Drug-induced liver injury: Hy's rule revisited. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Jun; 79(6): 521-8.
19. Takahashi H, Fujimoto J, Hanada S, Isselbacher KJ. Acute hepatitis in rats expressing human hepatitis B virus transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28; 92(5): 1470-4.
20. Bizzarini E, De Angelis L. Is the use of oral creatine supplementation safe? *J Sports Med Phys Fitness.* 2004 Dec; 44(4): 411-6.
21. Bemben MG, Lamont HS. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Med.* 2005; 35(2): 107-25.
22. Kreider RB, Melton C, Rasmussen CJ, Greenwood M, Lancaster S, Cantler EC, et al. Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes. *Mol Cell Biochem.* 2003 Feb; 244(1-2): 95-104.
23. Schilling BK, Stone MH, Utter A, Kearney JT, Johnson M, Coglianese R, et al. Creatine supplementation and health variables: a retrospective study. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Feb; 33(2): 183-8.
24. Robinson TM, Sewell DA, Casey A, Steenge G, Greenhaff PL. Dietary creatine supplementation does not affect some haematological indices, or indices of muscle damage and hepatic and renal function. *Br J Sports Med.* 2000 Aug; 34(4): 284-8.
25. Gayotto LCC, Alves VAF. 1 ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2001.
26. Cohen M, Bohling MW, Wright JC, Welles EA, Spano JS. Evaluation of sensitivity and specificity of cytologic examination: 269 cases(1999-2000). *J Am Vet Med Assoc.* 2003 Apr; 222(7): 964-7.
27. The METAVIR Cooperative Group. Inter- and intra-observer variation in the assessment of liver biopsy of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1994; 20(1): 15-20.
28. Romagnuolo J, Jhangri GS, Jewell LD, Bain VG. Predicting the liver histology in chronic hepatitis C: how good is the clinician? *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 3165-74.