



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas: Bioquímica

## **TESE DE DOUTORADO**

Alterações musculares e cerebrais em ratos jovens submetidos ao  
modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa: Papel  
protetor da creatina

**Janaína Kolling**

Orientadora: Profa Dra Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre  
2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas: Bioquímica

## **TESE DE DOUTORADO**

Alterações musculares e cerebrais em ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa: Papel protetor da creatina

**Janaína Kolling**

Orientadora: Profa Dra Angela Terezinha de Souza Wyse

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica

Porto Alegre, 2015.

*“Não vim até aqui,  
Pra desistir agora...”*

[Até o Fim – Engenheiros do Hawaii]

*Dedico essa tese às pessoas mais importantes da minha vida,  
Neiva, minha mãe, por ser meu porto seguro sempre, pela doação,  
incentivo e força.  
José Valdir, meu pai.  
Jenifer, minha irmã.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, obrigada Deus pela proteção divina. Por iluminar minhas decisões e atitudes. Por me manter serena e confiante em mais uma etapa.

À minha orientadora, Profa Dra Angela Wyse, pelos ensinamentos, pelo exemplo profissional, pela amizade, pela paciência e por todas as oportunidades que me destes.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ao pessoal da secretaria do nosso PPG e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 36, agradeço pela convivência, amizade construída e pela ajuda de todos aqueles que já fizeram parte da nossa família científica e também aos que estão agora tornando nosso ambiente de trabalho agradável.

Em especial, não poderia deixar de citar:

Emilene, minha colega e amiga, pela ajuda incansável, pela amizade e pelo convívio durante esses anos. Te adoro e te admiro.

Tiago, meu amigo e companheiro sempre perto e presente, obrigada por todas as vezes que tu me disses “-Relaxa teu coração”.

Aline, que bom que Deus te colocou na minha vida, muito obrigada por tudo.

Cassiana, obrigada pela parceria e dedicação para a realização dessa tese.

Aos colegas dos laboratórios 34, 36C e 38 pela amizade e convívio.

Aos professores do grupo de Erros Inatos do Metabolismo: Clóvis, Dutra e Moacir.

Aos meus pais Neiva e Valdir, por todo apoio, paciência, atenção e doação.

À minha irmã Jenifer.

Àqueles que de alguma forma ou de outra estiveram ao meu lado durante a realização desse trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A TODOS, obrigada de coração.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	VII
<b>ABSTRACT</b>	IX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	XI
<b>FIGURA</b>	XIII
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	1
1. Homocisteína	2
2. Hiperhomocisteinemia	3
3. Toxicidade da homocisteína	4
4. Modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa	6
5. Metabolismo energético	7
6. Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	9
7. Creatina cinase	11
8. Estresse Oxidativo	12
9. Defesas Antioxidantes	14
10. Inflamação	16
11. Colinesterases	18
12. Creatina	20
<b>II. OBJETIVOS</b>	23
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24

<b>III. METODOLOGIA E RESULTADOS</b>	27
Modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa crônica e suplementação de creatina	28
<b>Capítulo I:</b> Homocysteine induces energy imbalance in rat skeletal muscle: Is creatine a protector?	29
<b>Capítulo II:</b> Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats	40
<b>Capítulo III:</b> Chronic Hyperhomocysteinemia Increases Inflammatory Markers In skeletal muscle and serum of rats	49
<b>Capítulo IV:</b> Severe hyperhomocysteinemia alters the activity and immunocontent of the $\alpha 1$ subunit of $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and causes mitochondrial changes in amygdala of rats	69
<b>IV. DISCUSSÃO</b>	100
<b>V. CONCLUSÕES</b>	118
<b>VI. PERSPECTIVAS</b>	121
<b>VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	123

## RESUMO

A hiperhomocisteinemia severa ou homocistinúria clássica é um erro inato do metabolismo caracterizado pela deficiência na atividade da enzima cistationina- $\beta$ -sintetase. Estudos mostram que perturbações bioenergéticas, inflamatórias e o estresse oxidativo parecem estar relacionados às alterações causadas pela hiperhomocisteinemia severa. Alterações em alguns desses parâmetros em encéfalo, fígado e rim de ratos submetidos a esse modelo experimental já foram observadas em estudos prévios realizados em nosso laboratório. Considerando que pacientes com hiperhomocisteinemia severa apresentam alterações musculares, o objetivo principal dessa tese foi padronizar técnicas para avaliar alguns parâmetros de metabolismo energético, estresse oxidativo e inflamação em músculo esquelético de ratos jovens. Também avaliamos a bioenergética e a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em amígdala desses animais. A atividade da butirilcolinesterase e parâmetros inflamatórios também foram avaliados em soro. O efeito do tratamento com creatina sobre as possíveis alterações nos parâmetros bioquímicos encontradas nesse modelo experimental também foi investigado. A hiperhomocisteinemia severa foi induzida em ratos Wistar através da administração subcutânea de homocisteína ou salina (controle), do 6º ao 28º, onde as doses variam de acordo com o desenvolvimento dos animais, atingindo 0,03  $\mu\text{mol/g}$  de peso corporal. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal por dia de creatina (50 mg/Kg) concomitante com a administração de homocisteína ou salina (controle). Em relação aos parâmetros bioquímicos no músculo esquelético, mostramos que a homocisteína é capaz de diminuir tanto a viabilidade celular, como a oxidação da glicose, bem como alterar enzimas chave para a manutenção da homeostase energética, como piruvato cinase, creatina cinase e enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, a homocisteína aumentou a produção de espécies reativas e lipoperoxidação, alterou as enzimas antioxidantes e o conteúdo de glutatona reduzida, sulfidrilas, carbonilas e nitritos. Em relação aos parâmetros inflamatórios foi observado um aumento nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

and IL-6, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) em músculo esquelético e soro de ratos. Os ratos submetidos à hiperhomocisteinemia severa apresentaram um aumento na atividade da acetilcolinesterase em músculo esquelético. A enzima butirilcolinesterase não teve sua atividade alterada em soro de ratos. Em conjunto, os resultados desse trabalho mostram que a homocisteína promove perturbações no metabolismo energético, insultos oxidativos e inflamatórios, além de prejudicar a funcionalidade de enzimas importantes em músculo esquelético de ratos jovens. Em relação à amígdala, mostramos que a homocisteína é capaz de alterar enzimas essenciais da cadeia transportadora de elétrons, funções mitocondriais importantes como massa e potencial, diminuir a atividade e o imunoconteúdo da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e causar apoptose em amígdala de ratos jovens. A creatina foi capaz de prevenir alterações importantes em músculo esquelético, amígdala e soro desses animais submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia severa, onde ela contribuiu para a homeostase energética celular e pôde atuar como antioxidante. Sendo usada com cautela, pode se tornar um adjuvante terapêutico promissor para minimizar sintomas característicos de pacientes homocistinúricos.



## ABSTRACT

Severe hyperhomocysteinemia or classical homocystinuria is an inborn error of metabolism characterized by a deficiency in the activity of cystathionine- $\beta$  synthetase enzyme. Studies show that bioenergy disturbances and oxidative stress appear to be related to changes caused by severe hyperhomocysteinemia. Changes in some of these parameters in brain, liver and kidney of rats undergoing this experimental model have been observed in previous studies performed in our laboratory. Whereas patients with severe hyperhomocysteinemia have muscle disorders, the main objective of this thesis was to standardize techniques for assessing some energy metabolism parameters, oxidative stress and inflammation in skeletal muscle of young rats. We also evaluate the bioenergetics and enzyme activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in the amygdala of these animals. The activity of butyrylcholinesterase and inflammatory parameters were also evaluated in serum. The effect of treatment with creatine on the possible changes in biochemical parameters found in this experimental model was also investigated. The severe hyperhomocysteinemia was induced in rats by subcutaneous administration of homocysteine or saline (control), 6<sup>th</sup> to 28<sup>th</sup>, and the doses vary according to the development of animals, totaling 0.03  $\mu\text{mol/g}$  body weight. The animals received one intraperitoneal injection of creatine per day (50 mg/kg) with concomitant administration of homocysteine or saline (control). The biochemical parameters in the skeletal muscle, show that homocysteine can reduce both cell viability and glucose oxidation, and change the key enzymes for the maintenance of energy homeostasis, such as pyruvate kinase and creatine kinase enzymes cycle Krebs and electron transport chain. In addition, homocysteine increased ROS generation and lipid peroxidation, altered the antioxidant enzymes and the reduced glutathione content, sulfhydryl, carbonyl and nitrites. Regarding inflammatory parameters was observed increased levels of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 chemotactic protein-1 monocytes (MCP-1) in skeletal muscle and serum of rats. The rats with severe hyperhomocysteinemia showed an increase in acetylcholinesterase activity in skeletal muscle. The enzyme butyrylcholinesterase had not changed their activity in rat serum. Taken together, the results of this work show that homocysteine promotes disruption of

energy metabolism, oxidative and inflammatory insults, and impair the functionality of important enzymes in skeletal muscle of young rats. Regarding the amygdala showed that homocysteine can alter essential enzymes of the carrier electrons chain significant mitochondrial functions as a mass and the potential, decrease the activity and immunocontent  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase and cause apoptosis in amygdala of young rats. Creatine was able to prevent major changes in skeletal muscle, amygdala and serum of these animals subjected to chronic model of severe hyperhomocysteinemia, where she contributed to the energy cell homeostasis and could act as an antioxidant. Being used with caution, it can become a promising therapeutic adjuvant to minimize symptoms characteristic of homocistinurics patients.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina  
AChE: acetilcolinesterase  
ADP: difosfato de adenosina  
AGAT: arginina:glicina amidinotransferase  
AMP: monofosfato de adenosina  
ATP: trifosfato de adenosina  
BHMT: betaína homocisteína metiltransferase  
BuChE: butirilcolinesterase  
CAT: catalase  
C $\beta$ S: cistationina  $\beta$ -sintase  
CGL: cistationina  $\gamma$ -liase  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
EIM: erros inatos do metabolismo  
ERN: espécies reativas de nitrogênio  
ERO: espécies reativas de oxigênio  
GSH: glutationa (forma reduzida)  
GPx: glutationa peroxidase  
HCU: homocistinúria  
Hcy: homocisteína  
IL-1 $\beta$ : interleucina 1- $\beta$   
IL-6: interleucina 6  
JNM : junção neuromuscular  
LPS: lipopolissacarídeo  
MAT: metionina adenosiltransferase  
MCP-1: proteína quimiotática de monócito do tipo 1  
Met: metionina  
MS: metionina sintase  
MTHFR: metileno tetraidrofolato redutase  
5-MeTHF: 5-metiltetraidrofolato  
NMDA: N-metil - D- aspartato  
NOS: óxido nítrico sintase

PEP: fosfoenolpiruvato

PK: piruvato cinase

PLP: piridoxal fosfato

RNA: ácido ribonucléico

SAM: S-adenosilmetionina

SAH: S-adenosil homocisteína

SAHH: S-adenosil homocisteína hidrolase

SDH: succinato desidrogenase

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

## FIGURA

**Figura 1.** Metabolismo da homocisteína

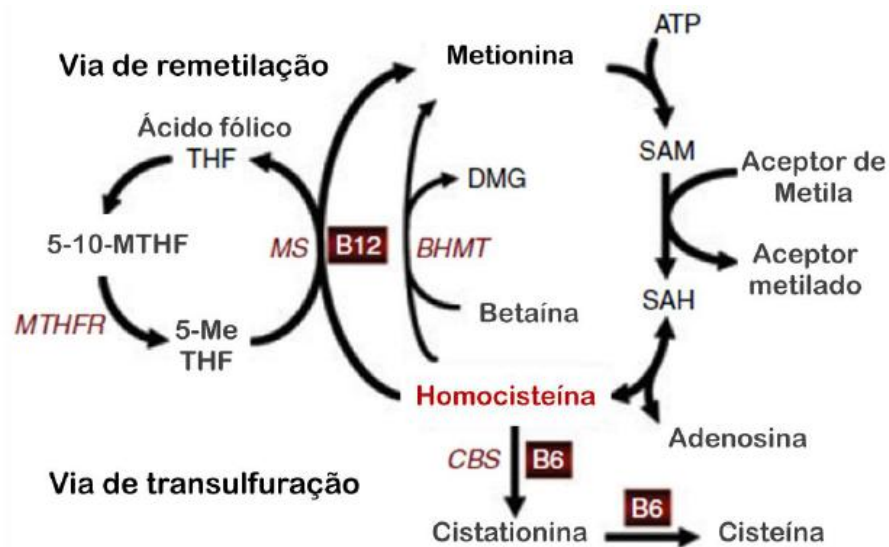
3

## **I. INTRODUÇÃO**

## 1. Homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado não-protéico derivado da desmetilação da metionina (Met). A Met, que é obtida da dieta e da degradação de proteínas endógenas, tem um papel fundamental nos processos de metilação molecular. A Met é convertida à S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima metionina adenosiltransferase (MAT, EC 2.5.1.6), recebendo um grupo adenosil do trifosfato de adenosina (ATP). A SAM é o principal doador de grupos metil presente no meio biológico, sendo convertida à S-adenosil homocisteína (SAH) por diversas metiltransferases, específicas para cada substrato. A SAH é hidrolisada a Hcy e adenosina pela S-adenosil homocisteína hidrolase (SAHH, EC 3.3.1.1) (Williams & Schalinske, 2010).

Nesse ponto, o catabolismo da Hcy pode seguir duas vias: (1) a remetilação à Met, onde a Hcy recebe um grupo metil proveniente do N5-metiltetraidrofolato, em uma reação catalisada pela metionina sintase (MS, EC 2.1.1.13), ou da betaína, em uma reação catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase (BHMT, EC 2.1.1.15), ou (2) a transulfuração à cisteína, onde a Hcy sofre condensação com a serina, produzindo cistationina, em uma reação catalisada pela enzima cistationina  $\beta$ -sintase (C $\beta$ S; EC 4.2.1.22), que utiliza como coenzima o piridoxal fosfato (PLP), e, no passo seguinte, a cisteína é formada através da reação de clivagem catalisada pela cistationina  $\gamma$ -liase (CGL, EC, 4.4.1.1) (Figura 1). A rota de remetilação é amplamente distribuída no organismo, enquanto que a via de transulfuração da Hcy tem distribuição limitada, participando do catabolismo da Hcy principalmente no fígado, rins, intestino delgado, pâncreas e cérebro (Brosnan et al., 2004; Finkelstein, 2007).



**Figura 1:** Metabolismo da homocisteína. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; CBS: cistationina β-sintase; MS: metionina sintase; BHMT: betaína homocisteína metiltransferase; MTHFR: metileno tetrahydrofolato redutase; DMG: dimetil glicina; THF: tetrahydrofolato; 5-10-MTHF: 5,10-metilenotetrahydrofolato; 5-Me-THF: 5-metiltetrahydrofolato (Adaptado de Lentz, 2005).

## 2. Hiperhomocisteinemia

A homocistinúria clássica (HCU) é um erro inato do metabolismo (EIM) dos aminoácidos sulfurados, associado à deficiência da enzima CβS. Em 1969 essa doença metabólica foi reportada pela primeira por McCully. Em indivíduos normais, níveis plasmáticos de Hcy variam entre 5 a 15 μmol/L. A elevação dos níveis de Hcy, causada por fatores genéticos e ambientais, gera uma condição chamada de hiperhomocisteinemia que pode ser classificada em três graus conforme a severidade: leve (16-30 μmol/L), moderada (31-100 μmol/L) e severa (> 100 μmol/L) (Banecka-Majkutewicz et al., 2012). A hiperhomocisteinemia severa é rara e pode ser causada por deficiência genética na atividade da enzima CβS caracterizando a HCU, uma desordem autossômica recessiva que pode ser gerada por 92 diferentes mutações no gene que codifica a enzima CβS. A HCU clássica apresenta uma prevalência



mundial que varia de 1:200.000 a 1:335.000 nascidos vivos e resulta no acúmulo de Hcy e Met nos tecidos e plasma (Mudd et al., 2001). Defeitos genéticos envolvendo as enzimas metileno-H<sub>4</sub>folato redutase (MTHFR) e metionina sintase também podem levar a um acúmulo anormal de Hcy nos fluidos biológicos.

Os mecanismos pelos quais a Hcy exerce seus efeitos tóxicos não estão completamente elucidados. A hiperhomocisteinemia tem sido evidenciada em pacientes acometidos por doenças neuromusculares (Huang et al, 2011; Leishear et al, 2012; Veeranki e Tyagi, 2013), neurodegenerativas (Diaz-Arrastia, 2000), psiquiátricas (Sachdev, 2004; Bottiglieri, 2005), vasculares (Faraci & Lentz, 2004), hepáticas (Adinolfi et al., 2005) e pulmonares (Jiang et al., 2005; Hamelet et al., 2007). Concentrações plasmáticas elevadas de Hcy também estão associadas a defeitos congênitos do tubo neural, como também a defeitos congênitos do coração, abortos e outras complicações da gravidez (Kang, 1996).

### **3. Toxicidade da homocisteína**

A hiperhomocisteinemia é uma condição sistêmica e tem sido atribuída a patologias de vários órgãos (Veeranki e Tyagi, 2013). As manifestações clínicas incluem além de anormalidades neurológicas e vasculares, que são bem documentadas, alguns sintomas incluindo um grau variável de disfunção motora (Huang et al, 2011; Leishear et al, 2012, Veeranki e Tyagi, 2013).

A neurotoxicidade da Hcy se deve principalmente a sua capacidade de ser captada através de um transportador específico de membrana (Grieve et al., 1992). A ausência de duas vias importantes de eliminação da Hcy também

favorece sua toxicidade cerebral, já que a enzima BHMT e parte da via de transulfuração até cisteína não estão presentes no cérebro (Finkelstein, 2007).

A Hcy tem sido associada à morte neuronal via excitotoxicidade, através da ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I (Zieminska et al., 2003) e ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Lipton et al., 1997). Além disso, a Hcy pode sofrer auto-oxidação do seu grupo tiol e causar prejuízo à homeostase redox, danificando células vasculares e neuronais (Perna et al., 2003; Weiss et al., 2003; Zou & Banerjee, 2005). Foi demonstrado que a Hcy aumenta a neurotoxicidade do peptídeo beta-amilóide por indução de estresse oxidativo (Ho et al., 2001). Além disso, existem dados mostrando que a hiperhomocisteinemia severa crônica diminui a captação de glutamato e a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, da catalase e da superóxido dismutase em hipocampo de ratos (Machado et al., 2011).

Outro mecanismo proposto é que a Hcy causa prejuízo nos processos de metilação celular. O acúmulo de Hcy leva a um aumento na SAH, um potente inibidor de reações de metilação que são extremamente importantes para diversas funções (Troen, 2005).

A indução de estresse oxidativo também é utilizada para tentar explicar os efeitos citotóxicos da Hcy, via aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem atuar sobre lipídios, proteínas e sobre o ácido desoxirribonucleico (DNA), por redução na produção de defesas antioxidantes (Halliwell, 2011). Resultados obtidos em nosso laboratório mostram que a Hcy promove peroxidação lipídica e aumenta a produção de ERO, além de diminuir as defesas antioxidantes enzimáticas e os níveis de nitritos em coração de ratos (Kolling et al., 2011). Além disso, a Hcy induz estresse oxidativo no

hipocampo, córtex parietal e fígado de ratos (Streck et al., 2003; Matté et al., 2009a; Matté et al., 2009b). Em adição, Ho et al. (2002) demonstraram que a Hcy promove o acúmulo citosólico de  $Ca^{2+}$ , hiperfosforilação da proteína Tau, além de induzir apoptose e estresse oxidativo.

Em relação aos danos vasculares, a Hcy reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), aumenta a adesão e agregação de plaquetas estimulando a formação de trombos, além de alterar a morfologia vascular e estimular a inflamação (Stanger et al., 2004; Julve et al., 2013). A Hcy também pode promover um estado pró-inflamatório, verificado através de estudos in vitro que demonstraram que a Hcy é capaz de induzir um aumento na expressão de várias citocinas pró-inflamatórias em tecidos e cultura de células (Poddar et al., 2001).

Alguns estudos mostram fortes evidências de envolvimento do estresse oxidativo e perturbações no metabolismo energético, presentes nos efeitos mediados pela hiperhomocisteinemia severa (Streck et al., 2003; Matte et al., 2009a; 2009b; Kolling et al., 2010).

#### **4. Modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa**

A hiperhomocisteinemia severa pode ser induzida pelo uso de animais *nocaute* para a enzima C $\beta$ S (Watanabe et al., 1995), com deficiência severa na atividade da enzima MTHFR (Chen et al., 2001), ou ainda ser induzida quimicamente em animais (Streck et al., 2002). Em 2002 foi desenvolvido no nosso grupo de pesquisa o modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa para mimetizar a HCU. Nesse modelo, os animais recebem injeções subcutâneas de Hcy do 6º ao 28º dia de vida, período caracterizado por um

rápido desenvolvimento cerebral em ratos, sendo que os níveis plasmáticos de Hcy chegam a 500  $\mu\text{M}$ , semelhante aos pacientes portadores de HCU (Streck et al., 2002).

Nosso grupo tem mostrado várias alterações em ratos utilizando esse modelo, tais como estresse oxidativo em cérebro, sangue (Matte et al., 2009a), coração (Kolling et al., 2011), fígado (Matte et al., 2009b) e pulmão (da Cunha et al., 2011), bem como alterações nas atividades das enzimas da cadeia transportadora de elétrons (Streck et al., 2003),  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Machado et al., 2011), acetilcolinesterase (da Cunha et al., 2012), inflamação (da Cunha et al., 2010) e déficit na memória (Matte et al., 2007).

## **5. Metabolismo energético**

A glicólise e a fosforilação oxidativa são essencialmente importantes para a produção de energia para os seres vivos. Dentro das células, a glicose pode ser metabolizada em diferentes rotas metabólicas, em condições aeróbicas ou anaeróbicas. A glicose entra no ciclo do ácido cítrico, que ocorre na matriz mitocondrial, sob a forma de acetil-CoA, que é então oxidada completamente a  $\text{CO}_2$ . O ciclo de Krebs consiste de uma sequência de reações onde, em cada volta do ciclo são formadas três moléculas de NADH, uma de  $\text{FADH}_2$ , duas de  $\text{CO}_2$  e uma de GTP. O NADH e o  $\text{FADH}_2$  formados são carreadores de elétrons para a cadeia respiratória. A cadeia respiratória é formada por uma série de complexos protéicos, onde ocorre a transferência de elétrons concomitantemente com o bombeamento de prótons da matriz para o lado citosólico da membrana mitocondrial interna. O gradiente de prótons é

usado como força-motriz para impulsionar a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (Pierron et al., 2012). No cérebro, a fosforilação oxidativa fornece mais de 95% do ATP sintetizado (Orth e Schapira, 2001; Raichle, 2006).

No músculo, as mitocôndrias também têm um papel fundamental na produção de ATP celular e os fatores que comprometem a função mitocondrial e/ou retardam a biogênese na mitocôndria podem limitar a capacidade do sistema muscular funcionar de forma adequada (Wredenberg et al., 2002; Cartoni et al., 2005; Yamada et al., 2012). Mudanças em genes que regulam o metabolismo aeróbio e anaeróbio têm importância relevante nas causas da fadiga muscular (Weston et al., 1985). A identificação de fatores que causam a disfunção mitocondrial e/ou diminuem a biogênese; e de alterações no metabolismo energético, são necessárias para melhorar a capacidade muscular.

A manutenção do fluxo de energia e de nutrientes para dentro da célula é essencial para a homeostasia e o funcionamento celular. Uma das vias de liberação de energia das células é a rota glicolítica. A piruvato cinase (PK) é uma enzima que está intimamente associada com a regulação dessa via metabólica, catalisando a transferência de fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) para o ADP, sintetizando ATP. Essa enzima é regulada alostericamente e participa com uma maior função no controle do fluxo metabólico da frutose-1,6-bifosfato a piruvato, o qual está envolvido em uma variedade de rotas metabólicas, indicando que a PK pode ser considerada uma enzima chave não somente para a rota glicolítica, mas também para o metabolismo celular (Mattevi et al, 1996; Lee e Herman, 2011).

As mitocôndrias representam a principal fonte e alvo de ERO (Milner et al., 2007). A redução no metabolismo energético pode levar a uma diminuição na síntese de ATP, comprometer a síntese de neurotransmissores, captação de glutamato pelos astrócitos e neurônios e induzir apoptose (Heales et al., 1999). Neste contexto, alterações na bioenergética celular podem desencadear uma série de complicações que perturbam o funcionamento normal de vários tecidos, tais como uma sinalização pró-apoptótica (morte celular programada), dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA, além de prejudicar a reparação do DNA mitocondrial. Tem sido demonstrado que as alterações no metabolismo energético podem estar relacionadas com a patogênese de algumas complicações musculares (Veeranki e Tyagi, 2013; Veeranki et al., 2015) e neurológicas (Chinta e Andersen 2006; Mattson et al., 2008), distúrbios metabólicos (Bavaresco et al., 2006; Delwing et al., 2003, 2007; Matte et al., 2007), psiquiátricas (Freitas et al., 2010), bem como, no envelhecimento (Barja, 2004; Linford et al., 2006; Navarro e Boveris, 2007).

Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que a hiperhomocisteinemia severa diminuiu a produção de CO<sub>2</sub> e a captação de glicose, bem como inibiu as atividades das enzimas SDH e citocromo c oxidase em hipocampo de ratos jovens (Streck et al., 2003).

## **6. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, ou bomba de Na<sup>+</sup>, é uma proteína integral de membrana, presente em praticamente todas as células, incluindo o cérebro, músculos esquelético e cardíaco. Ela está inserida na bicamada lipídica, e é responsável pela geração do potencial de membrana através da translocação

de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) contra seus gradientes de concentração. A energia necessária para a troca iônica é derivada da hidrólise de uma molécula de ATP (Kaplan, 2002). Além disso, essa enzima regula o volume e pH intracelular, está envolvida na transdução de sinal para ouabaína e compostos relacionados, mantém o potencial de membrana em repouso e auxilia no transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de  $\text{Na}^+$ , como aminoácidos, neurotransmissores e glicose (Jorgensen et al., 2003; Blanco, 2005; Taguchi, 2006).

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase funcional é composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades menores  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$ , responsável pela atividade catalítica da enzima, sofre fosforilação e transição conformacional acoplada à hidrólise de ATP e transporte dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Essa subunidade também contém o sítio de ligação da ouabaína (glicosídeo cardíaco e inibidor específico da enzima). A subunidade  $\beta$  é uma proteína glicosilada de adesão intercelular necessária para direcionar a subunidade  $\alpha$  para a membrana plasmática. Além disso, estudos mostram a presença de outra subunidade ainda menor ( $\gamma$ ) que regula a atividade da enzima (Geering, 2008).

Nos mamíferos existem genes que codificam quatro isoformas da subunidade catalítica  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ ). As isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  se encontram em diferentes tipos de células do SNC, entretanto a  $\alpha 4$  não é expressa no cérebro. As funções dessas isoformas têm sido investigadas. Uma das funções mais bem relatadas pela  $\alpha 3$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, é a restauração dos gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , importante para a manutenção da excitabilidade neuronal e condução do potencial de ação em axônios mielinizados e para o transporte secundário de neurotransmissores acoplados ao  $\text{Na}^+$  (Benarroch, 2011).

A ouabaína em doses menores, quando ligada a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, pode também modular a proliferação celular, apoptose, interação célula-célula e migração celular. A enzima dessa forma passa a funcionar como transdutora de sinal, independente do bombeamento de íons (Aperia, 2007; Desfrere et al., 2009).

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode ser regulada por diversos fatores como disponibilidade de substrato, componentes da membrana celular, hormônios e fosforilação (Lopina, 2000; Wang & Yu, 2005). Além disso, essa enzima é sensível ao ataque de radicais livres (Wang et al., 2003), sendo inibida por metabólitos formados durante a lipoperoxidação e por alterações na membrana plasmática (Rauchová et al., 1999; Chakraborty et al., 2003; Wang et al., 2003; Dencher et al., 2007).

Alterações na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase têm sido associadas a diversas patologias que afetam o SNC, tais como enxaqueca (Suhail, 2010), doença de Alzheimer (Vitvitsky et al., 2012), depressão (Goldstein et al., 2006), Parkinson e epilepsia (Aperia, 2007, Benarroch, 2011). Além disso, estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que alguns aminoácidos como a metionina (Stefanello et al., 2011), prolina (Ferreira et al., 2011) e a Hcy (Streck et al., 2002; Matté et al., 2006; Machado et al., 2011) inibem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase cerebral, provavelmente, através da indução de estresse oxidativo.

## **7. Creatina Cinase**

Outro importante sistema que auxilia na manutenção dos níveis de ATP é o da creatina cinase, que consiste de um grupo de isoenzimas presentes



tanto no citosol quanto ligada às membranas mitocondriais, com um papel central no metabolismo energético, responsável por ressintetizar e fornecer o ATP, para tecidos com alta demanda energética, principalmente nos músculos esquelético e cardíaco e no cérebro. Nesse sistema enzimático, ocorre a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para o ADP, regenerando dessa forma o ATP, mantendo assim constantes os níveis de substratos fosforilados (Schnyder et al., 1991; Wallimann et al., 1992). Algumas funções particularmente importantes como tamponamento energético (através da regeneração do ATP e da manutenção de níveis baixos de ADP) e transferência de ATP de sítios de produção para outros de consumo, têm sido associadas a esse sistema (Erecinska & Silver, 1994). Sabendo que a energia é fundamental para o desenvolvimento e regulação de diversas funções, qualquer alteração na atividade da creatina cinase pode ter um papel crítico no desenvolvimento de algumas doenças relacionadas ao sistema muscular e SNC (David et al., 1998; Aksenov et al., 2000).

## **8. Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo está associado a danos musculares (Hammouda et al, 2012; Swart et al, 2012), doenças neurodegenerativas e complicações vasculares (Hazell, 2007; Zhu, 2007; Shi & Lui, 2007) presentes em pacientes hiper-homocisteinêmicos.

Os radicais livres são produzidos como uma função normal do metabolismo celular. Fatores externos como o tabagismo, poluentes ambientais, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio também ajudam a promover a produção de radicais livres (Carocho & Ferreira, 2013;

Lobo et al, 2010). O equilíbrio entre a produção e a neutralização de espécies reativas por antioxidantes é muito delicada, e se ocorrer uma quebra nesse equilíbrio tendendo a uma superprodução de espécies reativas, as células começam a sofrer as consequências do insulto oxidativo (Wiernsperger, 2003). Os principais alvos são as proteínas, moléculas de DNA e ácido ribonucléico (RNA), açúcares e lipídeos (Craft et al, 2012; Halliwell, 2011).

As principais espécies reativas podem ser divididas em dois grupos: ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO mais importantes são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), ânion hipoclorito ( $OCl^-$ ) e o oxigênio “singlet” ( $^1O_2$ ). ERO são geradas nos sistemas vivos através do metabolismo energético celular. A redução tetravalente completa do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é essencial para a formação de ATP. No entanto, aproximadamente 5% do  $O_2$  não é completamente reduzido à água nesse processo, sendo convertido a  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\bullet}$ . O  $NO^{\bullet}$  e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), formado a partir da reação do  $NO^{\bullet}$  com o  $O_2^{\bullet-}$ , constituem as principais ERN. ERO e ERN podem ser benéficas ou deletérias para sistemas vivos. Em baixas concentrações atuam, entre outros, na defesa contra agentes infecciosos e nos processos de sinalização intracelular (Halliwell e Whiteman, 2004; Valko et al., 2004).

A peroxidação da bicamada lipídica presente nas membranas celulares altera a fluidez e prejudica a seletividade para a troca iônica, além de liberar produtos como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal que são potencialmente tóxicos. As proteínas podem ser oxidadas pelas ERO, o que pode levar a perda da função celular através da alteração de enzimas, proteínas transportadoras e

receptores. As espécies reativas também podem oxidar bases púricas e pirimídicas levando a mutações no DNA (Valko et al., 2007; Halliwell, 2012).

As espécies reativas diferem em relação à reatividade: o  $O_2^{\bullet-}$  não é capaz de promover peroxidação lipídica. Sua reatividade é devida principalmente à reação com outras espécies reativas como o  $NO^{\bullet}$  para formar  $ONOO^-$ , geração de  $H_2O_2$  e formação de  $OH^{\bullet}$  através da reação de Haber-Weiss. O  $H_2O_2$  por si só não é um radical livre e também não promove peroxidação lipídica direta (Halliwell e Gutteridge, 2007). No entanto, ele é capaz de gerar o  $OH^{\bullet}$  através das reações de Fenton na presença de íons  $Cu^{+2}$  ou  $Fe^{+2}$ . Diferentemente do  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , o  $OH^{\bullet}$  tem uma elevada reatividade, tornando-se uma espécie reativa muito perigosa com uma meia-vida muito curta (aproximadamente  $10^{-9}$ s) (Pastor et al., 2000). Essa ERO pode iniciar o processo de peroxidação lipídica e reagir com as outras biomoléculas. O  $ONOO^-$  é capaz de depletar antioxidantes e promover dano a lipídios, proteínas e DNA (Alvarez e Radi, 2003; Halliwell e Whiteman, 2004; Halliwell, 2006).

A oxidação da Hcy pode levar a um aumento na produção espécies reativas e acredita-se que o estresse oxidativo, entre outros fatores, esteja relacionado com as disfunções características de pacientes hiperhomocisteinêmicos (Mudd et al., 2001; Vanzin et al., 2011). Neste contexto, estudos realizados no nosso grupo de pesquisa mostraram que a hiperhomocisteinemia severa aumenta a produção de espécies reativas (Kolling et al., 2011) e diminui defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas em córtex parietal e sangue de ratos (Matte et al., 2009a).

## **9. Defesas Antioxidantes**

A exposição a espécies reativas levou o organismo ao desenvolvimento de mecanismos de defesa. Dentre eles, podemos destacar as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Os antioxidantes não-enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutathione, carotenóides, flavonóides e outros antioxidantes (Halliwell, 2011).

A SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do ânion  $O_2^{\bullet-}$ , formando  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Existem três isoformas dessa enzima: a cobre/zinco dependente (CuZnSOD), a manganês dependente (Mn/SOD) e a ferro dependente (Fe/SOD). A CuZn/SOD é encontrada no citosol, lisossomos, espaço mitocondrial intermembranas e peroxissomos. Existe ainda outro tipo de CuZn/SOD, chamada de SOD extracelular (EC-SOD), presente em fluidos extracelulares. A Mn/SOD é encontrada nas mitocôndrias enquanto a Fe/SOD é encontrada em bactérias (Yu, 1994).

O  $H_2O_2$  pode ser decomposto pelas enzimas CAT e GPx. A CAT atua na decomposição do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  sendo encontrada principalmente nos peroxissomos da maioria dos tecidos em humanos, estando presente em maior quantidade no fígado. Por outro lado, o cérebro apresenta pequenas quantidades de CAT (Marklund et al., 1982). A GPx, localizada nas membranas celulares, decompõe o  $H_2O_2$  através do acoplamento de sua redução a  $H_2O$  com a concomitante oxidação da GSH ao dissulfeto de glutathione (GSSG) ( $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Entretanto, quando esse

equilíbrio é rompido ocorre o estresse oxidativo que pode estar associado a diversas patologias. Todas as células aeróbias sofrem danos oxidativos, no entanto, o cérebro dos mamíferos é altamente sensível. Alguns fatores que tornam o SNC altamente suscetível às espécies reativas incluem: alto consumo de oxigênio; presença de neurotransmissores que sofrem auto-oxidação como dopamina, serotonina e noradrenalina; alta concentração de ferro e lipídios de membrana ricos em ácidos graxos insaturados (Halliwell e Whiteman, 2004).

O estresse oxidativo também desempenha um papel relevante em doenças que afetam o sistema muscular (McLean et al., 2014; Martinez et al., 2015; Margaritelis et al., 2015), causando alterações motoras pertinentes que provocam sinais e sintomas característicos atribuídos ao aumento na produção de espécies reativas.

## **10. Inflamação**

A inflamação é um mecanismo homeostático e complexo utilizado para proteger a integridade do organismo contra agentes nocivos endógenos ou exógenos. A resposta inflamatória envolve células e fatores solúveis e consiste na sequencial liberação de mediadores e o recrutamento de leucócitos da circulação, que se tornam ativados no local da inflamação e liberam mais mediadores. Entre esses mediadores se destacam as proteínas de fase aguda (proteína C reativa, fibrinogênio, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-antitripsina, haptoglobina e ceruloplasmina), interleucinas [interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 2 (IL-2), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], quimiocinas (interleucina 8 (IL-8) e proteína quimiotática de monócito

do tipo 1 (MCP-1)] prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e NO\* (Salerno et al., 2002; Colton, 2009; Zhang, 2008).

A inflamação está presente em várias doenças neuromusculares e neurodegenerativas. Em doenças musculoesqueléticas degenerativas, como em distrofias musculares (Brancaccio et al., 2007; Sari et al., 2008). Na doença de Alzheimer e demência vascular também tem sido observado um aumento nos níveis de proteínas inflamatórias em cérebro e plasma de pacientes (Engelhart et al., 2004).

As citocinas são um grupo de proteínas solúveis de baixo peso molecular, sintetizadas e secretadas por diversos tipos de células mediante estímulos provenientes de situações fisiológicas ou patológicas. Elas são produzidas principalmente por monócitos, macrófagos, células endoteliais, linfócitos e fibroblastos (Hirano, 1992). Além disso, também podem ser produzidas e secretadas dentro do SNC, pela microglia e pelos astrócitos (Jones e Thomsen, 2013). Essas proteínas medeiam a sinalização célula-célula, se ligam a receptores de superfície de alta afinidade, podem ter ação local ou sistêmica e influenciar a síntese de outras citocinas (Bruunsgaard, 2005).

As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interleucina 6 (IL-6) desempenham papel crucial na resposta de fase aguda. O TNF- $\alpha$ , secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos (Vitale e Ribeiro, 2007), é um potente ativador de neutrófilos. Além disso, essa citocina estimula as células endoteliais a expressar moléculas de adesão e promove alterações na permeabilidade vascular (Hehlgans e Pfeffer, 2005). A IL-1 $\beta$  é produzida por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais em resposta a outras citocinas, como

o TNF- $\alpha$ , ou produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS). Ela atua sobre o endotélio aumentando a expressão de moléculas de adesão (Cao et al., 2005; Kondera-Anasz et al., 2005). A IL-6, produzida em resposta ao TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  e a algumas células T ativadas, estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, promove proliferação de linfócitos B e secreção de anticorpos (Hirota et al., 2005).

A inflamação está presente em doenças músculo-esqueléticas degenerativas, como em distrofias musculares (Brancaccio et al., 2007; Sari et al., 2008) e neurodegenerativas, como na Doença de Alzheimer, onde é observado um aumento nos níveis de proteínas inflamatórias no cérebro e plasma de pacientes (Engelhart et al., 2004).

Tem sido demonstrado que a Hcy ativa células endoteliais em cultura, o que resulta no aumento da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão (Koga, 2002; Silverman et al., 2002). Poddar et al. (2001) demonstraram que concentrações de 10 a 50  $\mu$ M de Hcy promovem um estado pró-inflamatório com o aumento da expressão e secreção de IL-8 e proteína quimiotática de monócito do tipo 1 (MCP-1) em cultura de células endoteliais aórticas humanas.

## **11. Colinesterases**

O sistema colinérgico é conhecido por modular diversas funções importantes (Sarter e Bruno, 1997; Perry et al., 1999; Li et al., 2003). Estudos demonstram o papel da acetilcolina (ACh) na interação do sistema muscular e nervoso com o sistema imune inato para controlar a resposta inflamatória, ressaltando seu envolvimento através da "via colinérgica anti-inflamatória"

(Wang et al., 2003; Pavlov e Tracey, 2005; Rosas-Ballina e Tracey, 2009) composta pelo nervo vago, pela ACh e pela subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de ACh. Essa via representa um mecanismo de resposta do SNC à presença de estímulos inflamatórios na circulação sendo mediada pela ação do nervo vago (Pavlov & Tracey, 2005; Tracey, 2007). Junto com isso, ambas as enzimas capazes de hidrolisar ACh, acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8) têm sido consideradas reguladoras da inflamação, pois controlam ação da ACh (Das, 2007).

Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  ativam as fibras aferentes do nervo vago, as quais servem de sensor para a inflamação (Pavlov & Tracey, 2005; Gwilt et al., 2007). Esta informação é transmitida ao sistema nervoso central (SNC), o qual estimula o nervo vago eferente para a produção de ACh, que induz então a inibição da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células produtoras de citocinas (Gwilt et al., 2007; Parrish et al., 2008). Assim, a via colinérgica anti-inflamatória representa um mecanismo fisiológico pelo qual o sistema muscular e o SNC inter-atuam com o sistema imune inato para controlar a resposta inflamatória (Gallowitsch-Puerta & Pavlov, 2007).

Neurônios colinérgicos e as suas projeções são amplamente distribuídos, desempenhando um papel essencial na regulação de várias funções vitais. Em particular, a enzima AChE é uma das enzimas chave desse sistema e é frequentemente usada como um marcador do seu funcionamento. Ela desempenha um papel central na regulação da concentração de ACh, sendo encontrada no organismo nas formas ligada à



membrana e solúvel, e em maior concentração no SNC, membrana de eritrócitos e junção neuromuscular (Zimmerman & Soreq, 2006).

A contração do músculo esquelético é estimulada pela emissão do neurotransmissor ACh pelo neurônio motor, e terminada pela AChE na junção neuromuscular (JNM). A interrupção da transmissão do sinal dentro da JNM resultante de defeitos pré-sinápticos, sinápticos, ou pós-sinápticos pode provocar síndrome miastênica congênita, doenças neuromusculares heterogêneas, caracterizadas por fraqueza muscular e fadiga (Rinz et al., 2014).

## **12. Creatina**

A creatina (ácido-metil guanidinoacético) é uma amina de ocorrência natural, encontrada primariamente no músculo esquelético e sintetizada endogenamente pelo fígado, rins e pâncreas a partir dos aminoácidos glicina e arginina (Walker et al., 1976). No corpo humano, ela é encontrada nas formas livre (60 a 70%) e fosforilada (30 a 40%). Cerca de 95% do conteúdo total de creatina é armazenado no músculo esquelético, sendo que o restante situa-se no coração, músculos lisos, cérebro e testículos (Terjung et al., 2000; Wyss & Schulze, 2002). Essa amina tem um papel muito importante no metabolismo energético (Wallimann et al., 2011). Sua principal função ocorre quando se encontra na forma fosforilada, agindo como uma doadora de fosfato para moléculas de ADP, ressintetizando o ATP principalmente no músculo onde é degradado em condições de alta demanda energética dentro da célula (Wyss e Schulze, 2002; Pan e Takahashi, 2007).

Embora o papel da creatina seja mais bem descrito no sistema muscular (Andres et al., 2008), ela também tem propriedades protetoras e estudos mostram que ela pode auxiliar no tratamento de certas doenças neurodegenerativas (Bender et al., 2006; Chung et al., 2007; Tarnopolsky, 2007; Beal, 2011). Além disso, a creatina apresenta propriedades antioxidantes per se (Lawler et al., 2002; Sestili et al., 2006).

A creatina em sua síntese requer uma considerável porção de grupos metila no fígado. Mudd e Poole, (1975) e Mudd et al., (1980), estudando o balanço de metilação com dietas normais e dietas ricas em metionina e colina, bem como avaliando pacientes sarcosinêmicos (pacientes com deficiência na enzima sarcosina desidrogenase), respectivamente, demonstraram que a síntese da creatina é responsável por 70 a 75% da formação de Hcy. Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) relataram que esse processo utiliza mais SAM que todas as outras reações de metiltransferases juntas. A teoria proposta por esses autores é que a síntese endógena de creatina é o maior modulador do balanço de metilação e formação da Hcy. Dessa forma, a síntese de creatina e a formação de Hcy estão metabolicamente conectadas (Taes et al., 2004). Por esse motivo, alguns autores têm estudado ingestão de creatina e sua relação com o metabolismo da Hcy (Stead et al., 2001; Taes et al., 2003; 2004; McCarty, 2001; Bodamer et al., 2005). Esses autores trabalham com a hipótese de que tal ingestão resultaria em uma queda na demanda de metilação e conseqüente queda nos níveis de Hcy. A suplementação com creatina pode inibir a biossíntese da enzima arginina:glicina amidinotransferase (AGAT), principal reguladora da síntese desta substância, ou seja, o excesso de

creatina poderia exercer um *feedback* de repressão no fluxo de metilação (Stead et al., 2004).

## **II. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo Geral**

Considerando que há uma estreita relação entre a hiperhomocisteinemia severa e o desenvolvimento de doenças musculares e cerebrais e que alterações bioenergéticas, oxidativas e inflamatórias parecem estar relacionadas com a fisiopatologia dessas doenças, o presente trabalho teve como objetivo avaliar: parâmetros de metabolismo energético, incluindo a análise da função mitocondrial; parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios; bem como a atividade de enzimas importantes em músculo esquelético, amígdala e soro de ratos jovens submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia severa. Também investigamos o papel protetor da creatina sobre as possíveis alterações bioquímicas observadas neste modelo.

## **2.2. Objetivos específicos:**

Os objetivos específicos estão subdivididos em quatro capítulos, que serão apresentados na forma de artigos científicos, como segue:

### **Capítulo I**

- Analisar a viabilidade mitocondrial pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio), bem como outros parâmetros de metabolismo energético: oxidação da glicose, atividade das enzimas piruvato cinase, citrato sintase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase, complexo II, citocromo c oxidase e creatina cinase em músculo esquelético de ratos jovens;

- Investigar o possível papel protetor da creatina sobre as alterações bioquímicas encontradas.

## Capítulo II

- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo, denominados oxidação do DCFH, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), conteúdo de GSH, de sulfidrilas e de carbonilas e níveis de nitritos em músculo esquelético de animais submetidos ao modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa.
- Investigar o possível papel protetor da creatina sobre as alterações bioquímicas encontradas.

## Capítulo III

- Avaliar a atividade dos complexos da cadeia respiratória: succinato desidrogenase (SDH), complexo II e citocromo *c* oxidase, bem como a função mitocondrial através da massa e potencial;
- Analisar parâmetros de apoptose e necrose celular;
- Investigar o efeito da Hcy sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e o imunoc conteúdo das subunidades catalíticas (isoformas  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$ ) em amígdala de ratos jovens;
- Investigar o possível papel protetor da creatina sobre as alterações bioquímicas encontradas.

## Capítulo IV

- Investigar os níveis das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e da quimiocina CCL<sub>2</sub> (MCP-1) em músculo esquelético e soro de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia severa crônica;
- Avaliar o efeito da Hcy sobre a atividade da enzima AChE em músculo esquelético de ratos;
- Avaliar o efeito da Hcy sobre a atividade da enzima BuChE em soro;
- Investigar o possível papel protetor da creatina sobre as alterações bioquímicas encontradas.

### **III. METODOLOGIA E RESULTADOS**



Os capítulos I, II, III e IV serão apresentados na forma de artigos científicos, os quais apresentam o mesmo desenho experimental de hiperhomocisteinemia severa crônica.

### **Modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa crônica**

Ratos Wistar foram submetidos a duas injeções subcutâneas diárias de Hcy ou salina (controle), do 6º ao 28º dias com doses diárias de acordo com Streck et al., 2002. Os animais foram decapitados 12 horas após a última administração das soluções.

### **Suplementação com creatina**

Os animais receberam duas injeções i.p. por dia de creatina (50 mg/Kg) (Vasques *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009; Kolling et al., 2010) concomitante com a administração de Hcy ou salina (controle).

## Capítulo I

### CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION

CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION

*Cell Biochem Funct* 2013; **31**: 575–584.

Published online 5 December 2012 in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/cbf.2938

#### Homocysteine induces energy imbalance in rat skeletal muscle: Is creatine a protector?

Janaína Kolling<sup>1,2</sup>, Emilene B. S. Scherer<sup>1,2</sup>, Cassiana Siebert<sup>1,2</sup>, Fernanda Hansen<sup>3</sup>, Felipe V. Torres<sup>3</sup>, Giselli Scaini<sup>4</sup>, Gabriela Ferreira<sup>4</sup>, Rodrigo B. de Andrade<sup>2</sup>, Carlos A. S. Gonçalves<sup>3</sup>, Emílio L. Streck<sup>4</sup>, Clovis M. D. Wannmacher<sup>2</sup> and Angela T. S. Wyse<sup>1,2,\*</sup>

**Periódico:** Cell Biochemistry and Function

**Status:** Publicado

## Capítulo II



### Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats



Janaína Kolling, Emilene B.S. Scherer, Cassiana Siebert, Eduardo Peil Marques, Tiago Marcom dos Santos, Angela T.S. Wyse\*

<sup>a</sup> *Laboratório de Neuroproteção e Doenças Neurometabólicas, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

**Periódico:** Gene

**Status:** Publicado

## Capítulo III

### Chronic Hyperhomocysteinemia Increases Inflammatory Markers In skeletal muscle and serum of rats

Janaína Kolling<sup>1,2</sup>, Emilene B.S. Scherer<sup>1,2</sup>, Cassiana Siebert<sup>1,2</sup>, Aline Longoni<sup>1,2</sup>, Tiago Marcon dos Santos<sup>1,2</sup>, Bruna Zanotto<sup>1,2</sup> and Angela T.S. Wyse<sup>1,2</sup>

**Periódico:** Life Sciences

**Status:** Submetido

## Capítulo IV

### Severe hyperhomocysteinemia causes mitochondrial changes in amygdala of rats

<sup>1,2</sup>Janaína Kolling, <sup>1,2</sup>Emilene B.S. Scherer, <sup>1,2</sup>Cassiana Siebert, <sup>1,2</sup>Aline Longoni, Samanta Loureiro, Simone Nardin Weis, Letícia Petenuzzo and <sup>1,2</sup>Angela T.S. Wyse\*

**Status:** Em processo final de formatação.

## **IV. DISCUSSÃO**

A hiperhomocisteinemia severa é um distúrbio metabólico devido principalmente à remoção indevida ou acúmulo do aminoácido Hcy. Fatores genéticos e nutricionais também são implicados na causa da hiperhomocisteinemia. Embora as deformidades no músculo esquelético em pacientes hiper-homocisteinêmicos já eram conhecidas, atualmente essa associação entre acúmulo de Hcy e o declínio da função muscular é cada vez mais relatada na literatura. Como o metabolismo da Hcy gera grupos metil para alimentar às reações celulares de metilação, entre elas a metilação do DNA, a hiperhomocisteinemia é proposta como um modulador epigenético. No entanto, a relevância das mudanças epigenéticas nas alterações causadas no músculo não é conhecida (Veeranki e Tyagi, 2013; 2015).

Os pacientes homocistinúricos apresentam anormalidades esqueléticas e invariavelmente alterações no SNC e vascular. Problemas no sistema ocular, renal, hepático e pulmonar também são relatados (Mudd et al., 2001; Jiang et al., 2005). Entretanto, o exato mecanismo dos danos provocados pela HCU clássica permanece incerto, mesmo com muitos estudos realizados na tentativa de melhor compreender as alterações encontradas nessa aminoacidopatia.

Com o intuito de melhor compreender de que forma o metabolismo da Hcy pode ser capaz de gerar todos esses danos, Streck et al. (2002) desenvolveram um modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa, através da administração subcutânea diária de Hcy, a fim de obter níveis plasmáticos similares aos encontrados em pacientes homocistinúricos. Esse modelo inicia no 6º dia de vida pós-natal dos ratos, pois o desenvolvimento cerebral dos animais nesse período é similar ao de um neonato humano. É

nesse período que ocorre a maturação funcional, ganho de peso corporal, desenvolvimento da arquitetura do cérebro, neurogênese e sinaptogênese.

Já foi demonstrado que o acúmulo Hcy alcançado nesse modelo, induz alterações no estresse oxidativo em diferentes tecidos (Wyse et al., 2002, Streck et al., 2003; Matté et al., 2009a; Matté et al., 2009b; Kolling et al., 2011), causa disfunção mitocondrial e depleção energética (Streck et al., 2003), alterações comportamentais (Matté et al., 2007; Matté et al., 2009c), inflamatórias (da Cunha et al., 2012), excitotoxicidade, via ativação de receptores glutamatérgicos (Matté et al., 2010; Machado et al., 2011). Entretanto, ainda não havia sido investigado nenhum parâmetro no tecido muscular de ratos seguindo esse modelo experimental.

Disfunção motora e distrofias musculares são observadas em pacientes com hiperhomocisteinemia (Huang et al., 2011; Leishear et al., 2012; Veeranki e Tyagi, 2013). Sabe-se que existem quantidades relativamente significativas da enzima C $\beta$ S no tecido muscular (Chen et al., 2010), porém a fisiopatologia do comprometimento que ocorre no músculo esquelético não está completamente elucidada na presença do quadro de hiperhomocisteinemia severa. Existem alguns estudos mostrando que níveis elevados de Hcy no plasma e no fluido cerebrospinal estão associados com doenças neuromotoras que podem estar envolvidas com o comprometimento e degeneração muscular (Valentino et al., 2010; Zoccolella et al., 2008). A esclerose múltipla, por exemplo, está associada com níveis elevados de Hcy no plasma e pode afetar a função muscular (Zoccolella et al., 2012).

Iniciamos a presente tese investigando alguns parâmetros de metabolismo energético em músculo esquelético de ratos submetidos ao



modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia severa. Também analisamos o possível papel protetor da administração concomitante de creatina sobre os parâmetros analisados.

A integridade funcional das mitocôndrias é crucial para a sobrevivência celular, conseqüentemente, a disfunção mitocondrial é um problema bem pertinente associado com um número significativo de doenças (Snow et al., 2003). Iniciamos nosso estudo avaliando a integridade mitocondrial, realizada por um método colorimétrico (MTT), onde observamos que a Hcy diminui a viabilidade das células em músculo esquelético de ratos. A creatina foi capaz de prevenir este efeito. Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) relataram que a síntese endógena de creatina é o maior modulador do equilíbrio de metilação e formação de Hcy. Assim, a síntese de creatina e a formação de Hcy são conectadas metabolicamente (Taes et al., 2004). Por esta razão, alguns autores estudaram a ingestão de creatina e sua relação com o metabolismo de Hcy (McCarty, 2001; Taes et al., 2003; Stead et al., 2004; Bodamer et al., 2005). Corroborando com nossos resultados, esses autores trabalham com a hipótese de que esse consumo teria como resultado uma diminuição na demanda de metilação e conseqüente decréscimo nos níveis de Hcy, e, assim, melhora na viabilidade celular prejudicada por esse aminoácido. Além disso, a suplementação de creatina pode inibir a biossíntese da enzima AGAT, o principal regulador da síntese de creatina, logo o excesso de creatina exerce um feedback, reprimindo o fluxo de metilação (Stead et al., 2001).

Nossos resultados mostram que a Hcy não alterou a oxidação da glicose no músculo esquelético de ratos jovens. Por outro lado, a creatina *per se* ou quando associada com Hcy causou um aumento na oxidação da glicose. O

papel terapêutico da suplementação da creatina tem sido investigado (Gualano et al., 2010; Nicastro et al., 2012); há estudos mostrando que este composto pode contrariar a perda muscular em modelos animais (McCully, 2011), bem como a distrofia em pacientes (Kley et al., 2013). Além disso, a creatina melhora o controle glicêmico em pacientes diabéticos, provavelmente através do aumento da secreção de insulina e translocação do GLUT-4 para o sarcolema (Gualano et al., 2011). Perante estas conclusões, a suplementação de creatina emergiu como uma estratégia nutricional adjuvante no tratamento de condições caracterizadas por perda de massa muscular progressiva e resistência à insulina (Op't Eijnde et al., 2006). Por conseguinte, Gualano et al. 2011 e Op't Eijnde et al. 2006 têm demonstrado que a suplementação com creatina pode melhorar a captação de glicose e controle glicêmico em indivíduos saudáveis e em indivíduos com diabetes tipo 2; esta amina é levada para dentro do músculo esquelético por um transportador dependente de sódio e esse movimento é reforçado pela presença de insulina (Sora et al., 1994; Steenge et al., 1998). Estes estudos podem sugerir uma explicação para o aumento da oxidação de glicose causada pela creatina *per se* ou quando associada à Hcy.

A administração crônica de Hcy também diminuiu significativamente a atividade das enzimas piruvato cinase e creatina cinase. A creatina quando administrada concomitante foi capaz de prevenir tais efeitos. Estas enzimas são muito importantes para a manutenção dos níveis de ATP. A piruvato cinase é uma enzima intimamente associada com a regulação da via glicolítica, catalisa a transferência de fosfato a partir de fosfoenolpiruvato para ADP, sintetizando ATP. Por outro lado, a creatina cinase e a fosfocreatina são

eficientes sistemas tampão de energia por duas razões: primeiro, pois a fosfocreatina tem uma capacidade de difusão ligeiramente maior do que o ATP, se tornando um “entregador de energia” mais eficiente para diferentes localizações celulares. Em segundo lugar, a localização citosólica e mitocondrial da creatina cinase, ligando áreas de geração de energia às de produção de energia. Assim, a creatina cinase e a fosfocreatina servem essencialmente como um circuito de energia dentro da célula (Wallimann e Schlattner, 2010). O efeito benéfico da suplementação com creatina pode ocorrer como um resultado das melhorias funcionais bem definidas no tecido muscular.

Também avaliamos o efeito da hiperhomocisteinemia crônica sobre a atividade das enzimas do ciclo de Krebs. A Hcy não alterou a atividade da citrato sintase, isocitrato desidrogenase ou malato desidrogenase. A creatina *per se* também não causou nenhuma alteração, porém quando associada à Hcy, provocou um aumento na atividade da citrato sintase e da isocitrato desidrogenase. Algumas mudanças na metilação da Hcy ou na permeabilidade da mitocôndria causada pela creatina podem ter interferido com este resultado. Além disso, a creatina é capaz de inibir a transição da permeabilidade mitocondrial via nucleotídeo adenina translocase (que exporta ATP da matriz mitocondrial e importa ADP para a matriz); e também melhorar a função mitocondrial, estimulando a produção de energia (Dolder et al., 2003).

Como discutido anteriormente, o aumento da oxidação da glicose causada pela creatina *per se* ou quando associada à Hcy pode ser responsável pela ativação da citrato sintase e da isocitrato desidrogenase observada em nosso estudo. Observamos também que a atividade da malato desidrogenase

não foi alterada provavelmente porque a função mitocondrial é particularmente mais sensível às variações de concentrações fisiológicas de piruvato. Em contraste, as concentrações de malato exercem pouca influência sobre a oxidação do piruvato na mitocôndria (Messer et al., 2004).

Em relação às atividades de enzimas da cadeia respiratória, observamos que a Hcy aumentou a atividade da SDH, mas não alterou a atividade do complexo II e da citocromo c oxidase. A administração de creatina *per se* não causou nenhuma alteração, porém quando associada à Hcy, causou um aumento na atividade do complexo II.

Sabemos que a fosforilação oxidativa é muito ativa no músculo esquelético (Scholte et al., 1987; Jacobs et al., 2012) e está intimamente ligada ao sistema creatina cinase/fosfocreatina/creatina. Não foi possível determinar se o aumento da SDH altera a síntese de ATP, pois não foi observada nenhuma alteração na atividade da citocromo c oxidase, um marcador da fosforilação oxidativa. Sugerimos que o aumento da SDH pode ter sido para compensar um possível déficit energético em decorrência da diminuição na atividade das enzimas PK e CK.

Taes et al. (2003) mostrou um efeito de economia de folato induzida pela suplementação de creatina. A importância do ácido fólico na remetilação da Hcy, diminuindo os níveis deste aminoácido, é bem conhecida (Huang et al., 2001; Taes et al., 2004). Assim, a administração de creatina pode reduzir indiretamente os níveis de Hcy e evitar os seus efeitos deletérios.

Tomados em conjunto, os dados do presente capítulo sugerem que a creatina pode ser utilizada como uma terapia adjuvante para melhorar alguns sintomas relacionados ao desequilíbrio energético em pacientes

homocistinúricos; no entanto, se extrapolarmos nossos resultados para os indivíduos saudáveis, ressalta-se que a creatina deve ser usada com cautela, pois é capaz de alterar a homeostase de componentes essenciais para o normal funcionamento fisiológico das células.

Dando continuidade ao nosso trabalho, no segundo capítulo da presente tese, passamos a investigar parâmetros de estresse oxidativo em músculo esquelético de ratos jovens, submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia. Primeiramente, demonstramos que a Hcy aumentou a oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), um índice de produção de espécies reativas e de TBARS, que reflete a formação de malondialdeído, um produto final de lipoperoxidação (Halliwell, 2011). As defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas também foram investigadas. A administração crônica de Hcy aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, diminuiu o conteúdo GSH, de grupamentos sulfidrilas e carbonilas, bem como os níveis de nitritos, um produto estável proveniente da auto-oxidação do NO<sup>•</sup> (Ignarro et al., 1993). A administração concomitante de creatina foi capaz de prevenir esses efeitos.

Nossos dados corroboram com estudos mostrando que no plasma a Hcy pode sofrer auto-oxidação do seu grupamento sulfidrilas e gerar homocistina, dissulfetos mistos e espécies reativas tais como O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>•</sup> (Tyagi, 1998; Baydas et al., 2006). As alterações em lipídios de membranas podem prejudicar várias funções como transporte, permeabilidade, fluidez e atividade de enzimas importantes (Swapna et al., 2006). As lipoproteínas plasmáticas bem como os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas são suscetíveis ao ataque dessas espécies reativas (Gutteridge, 2001).

Vale ressaltar que a hiperhomocisteinemia está relacionada a um acúmulo da dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Devido à sua elevada reatividade, o grupo sulfidril da Hcy pode reagir com o  $\text{NO}^\bullet$  levando a formação de S-nitroso-homocisteína. Em condições fisiológicas, a formação de S-nitroso-homocisteína fornece proteção às células endoteliais para os efeitos da Hcy. Entretanto, o excesso de Hcy gera  $\text{O}_2^{\bullet-}$  que reage com o  $\text{NO}^\bullet$  para formar  $\text{NOOO}^-$ , um potente agente oxidante (Tyagi et al., 2005). A formação de  $\text{NOOO}^-$  reduz a disponibilidade de  $\text{NO}^\bullet$ , prejudicando suas funções regulatórias. Podemos sugerir que o aumento na produção do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pela Hcy leva a formação de  $\text{NOOO}^-$ , com conseqüente redução dos níveis de nitritos observada em músculo esquelético.

A SOD atua sobre o radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dismutando essa molécula a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que pode ser decomposto pela CAT ou GPX. Dessa forma, um equilíbrio entre a atividade coordenada dessas enzimas na detoxificação de espécies reativas é necessário para manter a integridade das biomoléculas.

Estudos mostram que a redução dos níveis de Hcy pela suplementação de creatina está associada com uma redução significativa de biomarcadores de lipoperoxidação (Deminice e Jordão, 2012). A correlação negativa entre os níveis de creatina e de TBARS no plasma tem sido demonstrada por alguns autores, sugerindo dessa forma que ela pode atuar como um antioxidante (Lawler et al, 2002; Sestili et al., 2011).

Sabe-se que a creatina pode ser citoprotetora, independente do status antioxidante das defesas enzimáticas, indicando uma interação direta entre creatina e oxidante e/ou radicais livre. Alguns estudos também mostram que a

suplementação de creatina reduz os níveis plasmáticos de Hcy em ratos (Deminice e Jordão, 2012; Stead et al, 2001; Taes et al., 2003). Em um trabalho recente desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, mostramos que a creatina preveniu o aumento do TBARS em coração de ratos jovens, evidenciando seu papel antioxidante (Kolling e Wyse, 2010).

No terceiro capítulo dessa tese, analisamos parâmetros inflamatórios em músculo esquelético e soro de ratos jovens submetidos ao mesmo modelo de hiperhomocisteinemia severa já descrito. A atividade das enzimas AchE e BuChE também foram avaliadas em músculo esquelético e soro, respectivamente.

A inflamação está associada à fisiopatologia de doenças neuromusculares (Duan et al., 2009; De Bleecker et al., 2002). A ACh é o neurotransmissor único na JNM, onde se liga a receptores nicotínicos de ACh muscular com a consequente despolarização da fibra muscular, abertura de canais dependentes de  $\text{Na}^+$ , e o disparo de um potencial de ação na fibra (Rich, 2006). Este processo termina quando a ACh é hidrolisada pela enzima AChE.

A ACh regula os processos inflamatórios (Gallowitsch-Puerta e Pavlov, 2007; Shaked et al., 2009), no entanto, o controle colinérgico e a sinalização para inflamação no músculo esquelético ainda são pouco esclarecidos. Recentes evidências sugerem que os músculos esqueléticos podem funcionar como um tecido imunológico ativo (Marino et al., 2011). As células musculares podem atuar como células apresentadoras de antígeno (Englund et al., 2001) e expressar um rico repertório de citocinas e quimiocinas. Por exemplo, fibras musculares (tipos I e II) expressam a IL-6 em resposta às contrações do

músculo, que, em seguida medeiam uma resposta inflamatória induzida pelo exercício e seus efeitos metabólicos (Pedersen e Febbraio, 2008). De Fato, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias foram observadas em distrofia muscular (Acharyya et al., 2007) e em outras miopatias (De Bleecker et al., 2002).

Certas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) desempenham um papel chave no início da resposta inflamatória no músculo esquelético (Geyer et al., 2012). O acúmulo de Hcy pode estar relacionado com desordens musculares e associado a danos sub-celulares seguidos por liberação de citocinas e uma rápida infiltração de leucócitos no músculo.

Diante do exposto, somado a nossa indagação, buscamos analisar parâmetros inflamatórios em músculo esquelético e soro, e também as atividades das enzimas AChE e BuChE em músculo esquelético e soro, respectivamente, de ratos submetidos ao modelo de hiperhomocisteinemia severa crônica.

Em relação aos parâmetros inflamatórios foi observado um aumento nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e da quimiocina MCP-1 em músculo esquelético e soro de ratos. Os ratos submetidos à hiperhomocisteinemia severa apresentaram um aumento na atividade da AChE em músculo esquelético. A enzima BuChE não teve sua atividade alterada em soro de ratos. Observamos que a creatina foi capaz de impedir o aumento das citocinas pró-inflamatórias em músculo esquelético e soro, e o aumento da atividade da AChE em músculo esquelético.

No capítulo II mostramos que a Hcy promove estresse oxidativo em músculo de ratos. Considerando que as citocinas pró-inflamatórias podem ser



produzidas em resposta ao estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007) é plausível sugerir que esses achados podem estar estritamente relacionados.

Corroborando com nossos dados, vários estudos têm demonstrado que a Hcy promove um estado pró-inflamatório. Foi demonstrada a ativação de células endoteliais em cultura expostas à Hcy, o que resulta em um aumento na expressão de quimiocinas (Poddar et al., 2001) e moléculas de adesão (Koga et al., 2002; Silverman et al., 2002). Além disso, estudos prévios realizados no nosso grupo de pesquisa demonstraram que a hiperhomocisteinemia severa aumentou a concentração de citocinas pró-inflamatórias em cérebro e sangue de ratos neonatos (da Cunha et al., 2010; da Cunha et al., 2012).

Recentemente, estudos têm demonstrado o importante papel do sistema colinérgico no processo inflamatório. A inflamação periférica é controlada, entre outros, pela “via colinérgica anti-inflamatória”, que envolve a inibição da resposta imune inata através da liberação de ACh pelo nervo vago. Através dessa via, a liberação de citocinas por monócitos e macrófagos é suprimida (Tracey, 2007; Rosas-Ballina e Tracey, 2009).

Há evidências de que a suplementação oral diária de creatina pode aumentar substancialmente as reservas de creatina dos músculos esqueléticos humanos (Cribb e Hayes, 2006). Além disso, também há trabalhos mostrando que a suplementação com a creatina tem um papel terapêutico em vários estados de doença que afetam o tamanho do músculo e sua funcionalidade por meio da expressão do gene envolvido na hipertrofia (Safdar et al., 2008) ou na atenuação da fase degenerativa em certas miopatias (Kley et al., 2013).

Tendo em vista os nossos resultados, podemos sugerir que a creatina preveniu o aumento da atividade da enzima AChE, conseqüentemente, os níveis de ACh puderam manter-se elevados, contribuindo para ação anti-inflamatória da via colinérgica. Dessa forma, a creatina indiretamente pode diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias estudadas nesse capítulo.

Considerando que a Hcy parece estar envolvida com doenças que afetam o SNC, no quarto capítulo dessa tese, investigamos o efeito da administração crônica de Hcy sobre alguns parâmetros de metabolismo energético em amígdala de ratos jovens.

A amígdala, estrutura subcortical situada no lobo temporal medial, é componente chave do circuito do medo e das emoções (Shumyatsky et al., 2002; Packard et al., 2004). A amígdala está envolvida nos processos de ansiedade, alerta e aversão, e é responsável pelo conteúdo emocional que determinadas memórias possuem (Izquierdo e Medina, 1997). Nesse contexto, para nosso conhecimento existem poucos estudos relacionando a ação da Hcy sobre a amígdala. Alguns autores associam níveis elevados de Hcy com prejuízo da memória aversiva em ratos (Matté et al., 2009) e também com o comportamento depressivo nessa espécie animal (Setnik et al., 2004). Tais efeitos podem talvez, estarem relacionados com processos distintos que ocorram na amígdala (Lanteaume et al., 2007). Sendo assim, mais estudos são necessários para investigar quais conseqüências podem ser causadas pela Hcy nessa estrutura cerebral, e desvendar a relação existente entre os prejuízos encontrados.

Sabendo que níveis elevados de Hcy podem ser considerados neurotóxicos (Belcastro et al., 2010; Esse et al., 2013; Misiak et al., 2014),

buscamos entender algumas conseqüências das alterações na bioenergética e na função mitocondrial e suas influências sobre a amígdala. O metabolismo energético é muito ativo no cérebro, onde grandes quantidades de energia química como moléculas de ATP são consumidas, em sua maioria necessária para a manutenção de gradientes iônicos que são a base para potenciais de ação e repouso, além de estarem envolvidos na propagação de impulsos nervosos e liberação de neurotransmissores.

Dando continuidade, no capítulo IV dessa tese, avaliamos alguns parâmetros do metabolismo energético e outros diretamente relacionados com a função mitocondrial. Analisamos a atividade dos complexos da cadeia respiratória; massa e potencial mitocondrial; apoptose e necrose; atividade e imunocnteúdo das subunidades  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Nossos resultados mostraram que a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons foi prejudicada pelo acúmulo de Hcy. Houve uma inibição da SDH e da citocromo c oxidase. A transferência de elétrons através dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória foi significativamente diminuída e, provavelmente, a transferência de energia para formar ATP foi reduzida.

Distúrbios na integridade mitocondrial, na homeostase energética, ERO e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  podem estar envolvidos na patogênese de desordens neurológicas (Nicholls e Budd, 2000). Funções celulares são dependentes de fontes de energia; o cérebro é particularmente sensível, pois necessita de um fornecimento contínuo de oxigênio e glicose para manter a sua função normal e viabilidade. Quando esta oferta é reduzida a níveis críticos, uma cascata de eventos ocorre desencadeada pela depleção de ATP (Moro et al., 2005).

O potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) pode ser considerado um indicador chave da função mitocondrial (Distelmaier et al., 2008) e as alterações neste sistema podem sugerir disfunções na mitocôndria (Iijima, 2006). A fim de verificar se a atividade reduzida da cadeia respiratória foi devida a uma diminuição da massa mitocondrial, e se isso afetou o potencial de membrana, avaliamos massa e  $\Delta\psi$  mitocondrial por citometria de fluxo utilizando fluoróforos mitocondriais. A Hcy levou a uma diminuição das células com baixa massa mitocondrial e um aumento das células com alta massa mitocondrial. Além disso, aumentou o número de células com maior  $\Delta\psi$  mitocondrial. O aumento das células com maior  $\Delta\psi$  mitocondrial, com uma diminuição das células com baixa massa mitocondrial pode sugerir uma possível biogênese mitocondrial por compensação ao insulto causado pelo desequilíbrio energético observado no nosso estudo.

Danos mitocondriais são considerados eventos centrais na apoptose (Belhadj et al., 20014). No presente estudo, avaliamos o número de células coradas com anexina V, a qual identifica as células apoptóticas e também analisamos o número de células coradas com o homodímero de etídio, utilizado para detectar as células mortas por necrose. A apoptose de células endoteliais relacionadas com Hcy tem sido relatada em vários estudos (Kerkeni et al., 2006; Sipkens et al., 2013). Estudos *in vitro* em células endoteliais têm mostrado que a Hcy tem um efeito patogênico nestas células através da indução do estresse oxidativo, resultando em morte celular (Perez-de-Arce et al., 2005). Os nossos resultados mostram que a administração de Hcy aumentou a apoptose tardia, e a creatina foi capaz de prevenir esse efeito. A creatina também aumentou o número de células vivas em amígdala de ratos.

No que diz respeito à  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, nossos resultados mostraram que a hiperhomocisteinemia severa diminuiu a sua atividade, o que pode estar relacionado com a redução de suas unidades catalíticas. A creatina preveniu essa diminuição. Também investigamos se a Hcy poderia alterar o imunoconteúdo das subunidades catalíticas da enzima em amígdala de ratos jovens. Os resultados mostraram que o imunoconteúdo da subunidade  $\alpha 1$  foi diminuído, enquanto o da  $\alpha 3$  não foi alterado. A redução do teor da subunidade catalítica pode diminuir os níveis das moléculas da enzima e, conseqüentemente, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase pode apresentar uma redução na sua atividade como observado no presente estudo. A creatina não teve efeito *per se* ou associada à Hcy se tratando do imunoconteúdo.

A creatina apresenta papel neuroprotetor e permite que a homeostase energética seja mantida, evitando insultos induzidos pela administração Hcy (Balestrino et al., 2002; Caretti et al., 2011; Sestili et al., 2011). Alguns autores têm sugerido que os efeitos antioxidantes da creatina podem ser atribuídos à melhoria da capacidade energética dos mecanismos celulares e antioxidantes indiretos, tais como a estabilidade da membrana (Wyss e Schulze, 2002).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para os efeitos da creatina. A creatina pode proporcionar uma proteção contra danos oxidativos. Além disso, reduzir a degradação dos fosfolipídios da membrana e retardar a formação de lisofosfoglicerídeos, produtos do catabolismo dos fosfolipídios de membrana conhecidos por influenciar a função da membrana em vários sistemas (Saks et al., 1986). Em uma revisão, Guzun et al. (2011) reafirmaram a hipótese de que a creatina pode desempenhar dois papéis importantes na regulação do metabolismo energético: em primeiro lugar, mantendo “pools” locais de ATP,

através de reações compartimentalizadas da creatina cinase; e em segundo lugar, estabilizando as membranas celulares devido às interações eletrostáticas com os fosfolipídios.

Sugerimos essa hipótese de que a creatina tem um efeito protetor sobre o SNC e podemos considerá-la válida, corroborando com outros estudos que apoiam este ponto de vista. Alguns autores demonstram efeitos protetores claros da administração de creatina no miocárdio isquêmico e/ou na sua falta, em diferentes modelos experimentais. O mecanismo de ação protetor da creatina é complexo e inclui diversos componentes. Há evidências de que a creatina contribui para a homeostase energética celular em outras doenças humanas, desde insuficiência cardíaca congestiva, doença cardíaca isquêmica, hipotrofia no músculo esquelético e isquemia cerebral (Strumia et al., 2012).

Concluindo o último capítulo dessa tese, demonstramos que a administração crônica de Hcy causa mudanças relevantes na homeostase energética em amígdala de ratos jovens. Associando nossos resultados ao que já está descrito na literatura, esses resultados podem contribuir pelo menos em parte, para o esclarecimento de certos sintomas identificados no cérebro de pacientes com HCU e elucidar uma terapia adjuvante com o uso da creatina.

Em conjunto, os resultados dessa tese mostram que a Hcy promove perturbações no metabolismo energético, insultos oxidativos e inflamatórios, além de prejudicar a funcionalidade de enzimas importantes em músculo esquelético de ratos jovens. Em relação à amígdala, mostramos que a Hcy é capaz de alterar enzimas essenciais da cadeia transportadora de elétrons, funções mitocondriais importantes como massa e potencial, diminuir a atividade e o imunoconteúdo da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e causar apoptose tardia em amígdala

de ratos jovens. A creatina foi capaz de prevenir alterações importantes em músculo esquelético, amígdala e soro desses animais submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia severa, onde ela contribuiu para a homeostase energética celular e pôde atuar como antioxidante. Sendo usada com cautela, pode se tornar um adjuvante terapêutico promissor para minimizar sintomas característicos de pacientes homocistinúricos.

## **V. CONCLUSÕES**



1. A homocisteína diminuiu a viabilidade celular, a oxidação da glicose, alterou a atividade de enzimas chave para a manutenção da homeostase energética, como a piruvato cinase e a creatina cinase e também enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons em músculo esquelético de ratos;
2. A homocisteína aumentou a produção de espécies reativas e a lipoperoxidação, alterou enzimas antioxidantes e o conteúdo de glutathiona reduzida, sulfidrilas, carbonilas e nitritos em músculo esquelético;
3. Ratos tratados cronicamente com Hcy apresentaram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e da quimiocina MCP-1 em músculo esquelético e soro;
4. Em relação ao sistema nervoso central, mostramos que a homocisteína é capaz de alterar enzimas essenciais da cadeia transportadora de elétrons, funções mitocondriais importantes como massa e potencial e causar apoptose em amígdala de ratos jovens;
5. A atividade e o imunoc conteúdo da isoforma  $\alpha_1$  da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foram diminuídas em amígdala de ratos;
6. A hiperhomocisteinemia severa promoveu uma estimulação da atividade da AChE em músculo esquelético de ratos;
7. A atividade da BuChE não foi alterada pela Hcy em soro de ratos jovens;
8. A creatina foi capaz de prevenir alterações importantes em músculo esquelético, amígdala e soro de ratos submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia severa, onde ela contribuiu para a homeostase energética celular e pôde atuar como antioxidante.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Em conjunto, os resultados desse trabalho mostram que a Hcy promove perturbações no metabolismo energético, insultos oxidativos e inflamatórios, além de prejudicar a funcionalidade de enzimas importantes em músculo esquelético, amígdala e soro de ratos jovens.

A creatina foi capaz de prevenir alterações importantes em músculo esquelético, amígdala e soro desses animais submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia severa. Sendo usada com cautela, pode se tornar um adjuvante terapêutico promissor para minimizar sintomas característicos de pacientes homocistinúricos.

## **VI. PERSPECTIVAS**

Avaliar os seguintes parâmetros em ratos jovens submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia severa:

- Função mitocondrial (massa e potencial) em músculo esquelético;
- Função mitocondrial (massa e potencial) e parâmetros de metabolismo energético em coração;
- O imunoconteúdo e expressão gênica da enzima AChE em músculo esquelético;
- Memória espacial e aversiva associada à suplementação com creatina;
- Morfologia em tecido muscular e cerebral;
- Dosar os níveis de Hcy e creatina em músculo esquelético;
- Dosar níveis de creatinina em urina.

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acharyya, S., Villalta, SA., Bakkar, N., Bupha-Intr, T., Janssen, PM., Carathers, M., Li, ZW, Beg, AA., Ghosh, S., Sahenk, Z., Weinstein, M., Gardner, KL., Rafael-Fortney, JA.,Karin, M., Tidball, JG., Baldwin, AS., Guttridge, DC., 2007. Interplay Of IKK/NF-Kappab Signaling In Macrophages And Myofibers Promotes Muscle Degeneration In Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal Of Clinical Investigation*. 117, 889-901.
- Adinolfi, L.E., Ingrosso, D., Cesaro, G., Cimmino, A., D'Antò, M., Capasso, R., Zappia, V., Ruggiero, G., 2005. Hyperhomocysteinemia And The MTHFR C677T Polymorphism Promote Steatosis And Fibrosis In Chronic Hepatitis C Patients. *Hepatology*. 41, 995-1003.
- Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D.A., Markesbery, W.R., 2000. Oxidative Modification Of Creatine Kinase BB In Alzheimer's Disease Brain. *Journal Of Neurochemistry*. 74, 2520–2527.
- Alvarez, B., Radi, R., 2003. Peroxynitrite Reactivity With Amino Acids And Proteins. *Amino Acids*. 25, 295-311.
- Andres, R.H., Ducray, A.D., Schlattner, U., Wallimann, T., Widmer, H.R., 2008. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Research Bulletin*. 76, 329-343.
- Aperia, A., 2007. New Roles For An Old Enzyme: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Atpase Emerges As An Interesting Drug Target. *J Intern Med*. 261, 44-52.
- Balestrino, M., Lensman, M., Parodi, M., Perasso, L., Rebaudo, R., Melani, R., Polenov, S., Cupello, A., 2002. Role Of Creatine And Phosphocreatine In Neuronal Protection From Anoxic And Ischemic Damage. *Amino Acids*. 23, 221-229.
- Banecka-Majkutewicz, Z., Sawula, W., Kadzinski, L., Wegrzyn, A., Banecki, B., 2012. Homocysteine, Heat Shock Proteins, Genistein And Vitamins In Ischemic Stroke--Pathogenic And Therapeutic Implications. *Acta Biochim Pol*. 59, 495-499.
- Barja, G., 2004. Free Radicals And Aging. *Trends In Neurosciences*. 27, 595–600.
- Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Wajner, M., Netto, C.A., De Souza Wyse, A.T., 2006. Intrastratial Hypoxanthine Administration Affects Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, Acetylcholinesterase And Catalase Activities In Striatum, Hippocampus And Cerebral Cortex Of Rats. *International Journal Of Developmental Neuroscience*. 24, 411–417.
- Baydas, G., Ozer, M., Yasar, A., Koz, S.T., Tuzcu, M., 2006. Melatonin Prevents Oxidative Stress And Inhibits Reactive Gliosis Induced By Hyperhomocysteinemia In Rats. *Biochemistry*. 71, 91-95.
- Beal, F.M., 2011. Neuroprotective Effects Of Creatine. *Amino Acids*. 40, 1305-1313.
- Belcastro, V., Pierguidi, L., Castrioto, A., Menichetti, C., Gorgone, G., Ientile, R., Pisani, F., Rossi, A., Calabresi, P., Tambasco, N., 2010. Hyperhomocysteinemia Recurrence In Levodopa-Treated Parkinson's Disease Patients. *European Journal Of Neurology*. 17, 661-665.

- Belhadj Slimen, I., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., Abdrabbah, M., 2014. Reactive Oxygen Species, Heat Stress And Oxidative-Induced Mitochondrial Damage. *International Journal Of Hyperthermia*. 30, 513-523.
- Benarroch, E.E., 2011. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: Functions In The Nervous System And Involvement In Neurologic Disease. *Neurology*. 76, 287-293.
- Bender, A., Koch, W., Elstner, M., Schombacher, Y., Bender, J., Moeschl, M., Gekeler, F., Müller-Myhsok, B., Gasser, T., Tatsch, K., Klopstock, T., 2006. Creatine Supplementation In Parkinson Disease: A Placebo-Controlled Randomized Pilot Trial. *Neurology*. 67, 1262-1264.
- Blanco, G., 2005. Na,K-ATPase Subunit Heterogeneity As A Mechanism For Tissue-Specific Ion Regulation. *Seminars In Nephrology*. 25, 292-303.
- Bodamer, O.A., Sahoo, T., Beaudet, A.L., O'brien, W.E., Bottiglieri, T., Stockler-Ipsiroglu, S., Wagner, C., Scaglia, F., 2005. Creatine Metabolism In Combined Methylmalonic Aciduria And Homocystinuria. *Ann Neuro*. 57, 557-560.
- Bottiglieri, T., 2005. Homocysteine And Folate Metabolism In Depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29, 1103-1112.
- Brancaccio, P., Maffulli, N., Limongelli, F.M., 2007. Creatine Kinase Monitoring In Sport Medicine. *Br Med Bull*. 82:209-230.
- Brosnan, J.T., Jacobs, R.L., Stead, L.M., Brosnan, M.E., 2004. Methylation Demand: A Key Determinant Of Homocysteine Metabolism. *Acta Biochim Pol*. 51, 405-413.
- Brunsgaard, H., 2005. Physical Activity And Modulation Of Systemic Low-Level Inflammation. *J Leukoc Biol*. 78, 819-835.
- Cao, W.G., Morin, M., Metz, C., Maheux, R., Akoum, A., 2005. Stimulation Of Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression In Endometrial Stromal Cells By Interleukin 1, Beta Involving The Nuclear Transcription Factor Nfκappab. *Biol Reprod*. 73, 565-570.
- Caretti, A., Bianciardi, P., Sala, G., Terruzzi, C., Lucchina, F., Samaja, M., 2011. Supplementation Of Creatine And Ribose Prevents Apoptosis In Ischemic Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*. 26, 831-838.
- Carocho, M., Ferreira, I.C., 2013. A Review On Antioxidants, Prooxidants And Related Controversy: Natural And Synthetic Compounds, Screening And Analysis Methodologies And Future Perspectives. *Food Chem Toxicol*. 51, 15-25.
- Cartoni, R., Léger, B., Hock, M.B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., Ziltener, J.L., Luthi, F., Dériaz, O., Zorzano, A., Gobelet, C., Kralli, A., Russell, A.P., 2005. Mitofusins 1/2 And Erralpha Expression Are Increased In Human Skeletal Muscle After Physical Exercise. *J Physiol*. 567, 349-358.
- Chakraborty, H., Sen, P., Sur, A., Chatterjee, U., Chakrabarti, S., 2003. Age-Related Oxidative Inactivation Of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase In Rat Brain Crude Synaptosomes. *Exp Gerontol*. 38, 705-710.

- Chen, N.C., Yang, F., Capecci, L.M., Gu, Z., Schafer, A.I., Durante, W., Yang, X.F., Wang, H., 2010. Regulation Of Homocysteine Metabolism And Methylation In Human And Mouse Tissues. *The FASEB Journal*. 24, 2804–2817.
- Chen, Z., Karaplis, A.C., Ackerman, S.L., Pogribny, I.P., Melnyk, S., Lussier-Cacan, S., Chen, M.F., Pai, A., John, S.W., Smith, R.S., Bottiglieri, T., Bagley, P., Selhub, J., Rudnicki, M.A., James, S.J., Rozen, R., 2001. Mice Deficient In Methylenetetrahydrofolate Reductase Exhibit Hyperhomocysteinemia And Decreased Methylation Capacity, With Neuropathology And Aortic Lipid Deposition. *Hum Mol Genet*. 10, 433-443.
- Chinta, S.J., Andersen, J.K., 2006. Reversible Inhibition Of Mitochondrial Complex I Activity Following Chronic Dopaminergic Glutathione Depletion In Vitro: Implications For Parkinson's Disease. *Free Radic Biol Med*. 41:1442-1448.
- Chung, Y.L., Alexanderson, H., Pipitone, N., Morrison, C., Dastmalchi, M., Stahl-Hallengren, C., Richards, S., Thomas, E.L., Hamilton, G., Bell, J.D., Lundberg, I.E., Scott, D.L., 2007. Creatine Supplements In Patients With Idiopathic Inflammatory Myopathies Who Are Clinically Weak After Conventional Pharmacologic Treatment: 6-Month, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis & Rheumatism*. 57, 694–702.
- Colton, C.A., 2009. Heterogeneity Of Microglial Activation In The Innate Immune Response In The Brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 4, 399-418.
- Craft, S., Foster, T.C., Landfield, P.W., Maier, S.F., Resnick, S.M., Yaffe, K., 2012. Session III: Mechanisms Of Age-Related Cognitive Change And Targets For Intervention: Inflammatory, Oxidative, And Metabolic Processes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 67, 754-759.
- Cribb, P.J., Hayes, A., 2006. Effects Of Supplement Timing And Resistance Exercise On Skeletal Muscle Hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc*. 38, 1918-1925.
- Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., Da Cunha, M.J., Pederzoli, C.D., Becker, D.L., Coelho, J.G., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., 2011. Chronic Hyperhomocysteinemia Induces Oxidative Damage In The Rat Lung. *Mol Cell Biochem*. 358, 153-160.
- Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., Loureiro, S.O., Da Cunha, M.J., Schmitz, F., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2012. Chronic Hyperhomocysteinemia Increases Inflammatory Markers In Hippocampus And Serum Of Rats. *Neurochem Res*. 37, 1660-1669.
- Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., Wyse, A.T., 2010. Increased Inflammatory Markers In Brain And Blood Of Rats Subjected To Acute Homocysteine Administration. *Metab Brain Dis*. 25, 199-206.
- Das, U.N., 2007. Acetylcholinesterase And Butyrylcholinesterase As Possible Markers Of Low-Grade Systemic Inflammation. *Med Sci Monit*. 13, RA214-221.



- David, S., Shoemaker, M., Haley, B.E., 1998. Abnormal Properties Of Creatine Kinase In Alzheimer's Disease Brain: Correlation Of Reduced Enzyme Activity And Active Site Photolabeling With Aberrant Cytosol-Membrane Partitioning. *Brain Res Mol Brain Res.* 54, 276-287.
- De Bleecker, J.L., De Paepe, B., Vanwalleghem, I.E., Schröder J.M., 2002. Differential Expression Of Chemokines In Inflammatory Myopathies. *Neurology.* 58, 1779-1785.
- Delwing, D., Delwing, D., Chiarani, F., Kurek, A.G., Wyse, A.T., 2007. Proline Reduces Brain Cytochrome C Oxidase: Prevention By Antioxidants. *International Journal Of Developmental Neuroscience.* 25, 17-22.
- Delwing, D., Tagliari, B., Streck, E.L., Wannamacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003. Reduction Of Energy Metabolism In Rat Hippocampus By Arginine Administration. *Brain Research.* 983, 58-63.
- Deminice, R., Jordao, A.A., 2012. Creatine Supplementation Reduces Oxidative Stress Biomarkers After Acute Exercise In Rats. *Amino Acids.* 43, 709-15.
- Dencher, N.A., Frenzel, M., Reifschneider, N.H., Sugawa, M., Krause, F., 2007. Proteome Alterations In Rat Mitochondria Caused By Aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1100, 291-298.
- Desfrere, L., Karlsson, M., Hiyoshi, H., Malmersjo, S., Nanou, E., Estrada, M., Miyakawa, A., Lagercrantz, H., El Manira, A., Lal, M., Uhlen, P., 2009. Na,K-ATPase Signal Transduction Triggers CREB Activation And Dendritic Growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 2212-2217.
- Diaz-Arrastia, R., 2000. Homocysteine And Neurologic Disease. *Arch Neurol.* 57, 1422-1427.
- Distelmaier, F., Koopman, W.J., Testa, E.R., De Jong A.S., Swarts, H.G., Mayatepek, E., Smeitink, J.A., Willems, P.H., 2008. Life Cell Quantification Of Mitochondrial Membrane Potential At The Single Organelle Level. *Cytometry A.* 73, 129-138.
- Dolder, M., Walzel, B., Speer, O., Schlattner, U., Wallimann, T., 2003. Inhibition Of The Mitochondrial Permeability Transition By Creatine Kinase Substrates. Requirement For Microcompartmentation. *J Biol Chem.* 278, 17760-17766.
- Duan, H., Chai, J., Sheng, Z., Yao, Y., Yin, H., Liang, L., Shen, C., Lin, J., 2009. Effect Of Burn Injury On Apoptosis And Expression Of Apoptosis-Related Genes/Proteins In Skeletal Muscles Of Rats. *Apoptosis* 14, 52-65.
- Engelhart, M.J., Geerlings, M.I., Meijer, J., Kiliaan, A., Ruitenber, A., Van Swieten, J.C., Stijnen, T., Hofman, A., Witteman, J.C., Breteler, M.M., 2004. Inflammatory Proteins In Plasma And The Risk Of Dementia: The Rotterdam Study. *Arch Neurol.* 61, 668-672.
- Englund, P., Lindroos, E., Nennesmo, I., Klareskog, L., Lundberg, I.E., 2001. Skeletal Muscle Fibers Express Major Histocompatibility Complex Class

- II Antigens Independently Of Inflammatory Infiltrates In Inflammatory Myopathies. *Am J Pathol.* 159:1263-1273.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions And Energy In Mammalian Brain. *Progress In Neurobiology.* 43, 37-71.
- Esse, R., Florindo, C., Imbard, A., Rocha, MS., De Vriese, AS., Smulders, YM., Teerlink, T., Tavares De Almeida, I., Castro, R., Blom, HJ., 2013. Global Protein And Histone Arginine Methylation Are Affected In A Tissue-Specific Manner In A Rat Model Of Diet-Induced Hyperhomocysteinemia. *Biochim Biophys Acta.* 1832, 1708-1714.
- Faraci, F., Lentz, S.R., 2004. Hyperhomocysteinemia, Oxidative Stress, And Cerebral Vascular Dysfunction. *Stroke.* 35, 345-347.
- Ferreira, A.G., Stefanello, F.M., Cunha, A.A., Da Cunha, M.J., Pereira, T.C., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2011. Role Of Antioxidants On Na(+), K(+)-ATPase Activity And Gene Expression In Cerebral Cortex Of Hyperprolinemic Rats. *Metab Brain Dis.* 26, 141-147.
- Finkelstein, J.D., 2007. Metabolic Regulatory Properties Of S-Adenosylmethionine And S-Adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med.* 45, 1694-1699.
- Freitas, T.P., Rezin, G.T., Gonçalves, C.L., Jeremias, G.C., Gomes, L.M., Scaini, G., Teodorak, B.P., Valvassori, S.S., Quevedo, J., Streck, E.L., 2010. Evaluation Of Citrate Synthase Activity In Brain Of Rats Submitted To An Animal Model Of Mania Induced By Ouabain. *Mol Cell Biochem.* 341, 245-249.
- Gallowitsch-Puerta, M., Pavlov, V.A., 2007. Neuro-Immune Interactions Via The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *Life Sci.* 80, 2325-2329.
- Geering, K., 2008. Functional Roles Of Na,K-ATPase Subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 17, 526-532.
- Geyer, BC., Ben Ari, S., Barbash S., Kilbourne J., Mor, TS., Soreq, H., 2012. Nicotinic Stimulation Induces Tristetraprolin Over-Production And Attenuates Inflammation In Muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1823, 368-378.
- Goldstein, I., Levy, T., Galili, D., Ovadia, H., Yirmiya, R., Rosen, H., Lichtstein, D., 2006. Involvement Of Na(+), K(+)-ATPase And Endogenous Digitalis-Like Compounds In Depressive Disorders. *Biol Psychiatry.* 60, 491-499.
- Grieve, A., Butcher, S.P., Griffiths, R., 1992. Synaptosomal Plasma Membrane Transport Of Excitatory Sulphur Amino Acid Transmitter Candidates: Kinetic Characterisation And Analysis Of Carrier Specificity. *J Neurosci Res.* 32, 60-68.
- Gualano, B., Painelli, V.S., Roschel, H., Lugaresi, R., Dorea, E., Artioli, G.G., Lima, F.R., Da Silva, M.E., Cunha, M.R., Seguro, A.C., Shimizu, M.H., Otaduy, M.C., Sapienza, M.T., Leite, C.C., Bonfá, E., Junior, A.H.L., 2011. Creatine Supplementation Does Not Impair Kidney Function In Type 2 Diabetic Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Clinical Trial. *European Journal Of Applied Physiology.* 111, 749-756.

- Gutteridge, J.M.C., 2001. Free Radicals Inbiology And Medicine, Vol. Fourth, Oxford University Press, New York.
- Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Et Al., 2011.Systems Bioenergetics Of Creatine Kinase Networks: Physiological Roles Of Creatine And Phosphocreatine In Regulation Of Cardiac Cell Function. *Amino Acids*. 40, 1333-1348.
- Gwilt, C.R., Donnelly, L.E., Rogers, D.F., 2007. The Non-Neuronal Cholinergic System In The Airways: An Unappreciated Regulatory Role In Pulmonary Inflammation? *Pharmacol Ther*. 115, 208-222.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative Stress And Neurodegeneration: Where Are We Now? *J Neurochem*. 97, 1634-1658.
- Halliwell, B., 2011. Free Radicals And Antioxidants - Quo Vadis? *Trends Pharmacol Sci*. 32, 125-130.
- Halliwell, B., 2012. Free Radicals And Antioxidants: Updating A Personal View. *Nutr Rev*. 70, 257-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free Radicals In Biology And Medicine.,Vol., Oxford University., New York.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004.Measuring Reactive Species And Oxidative Damage In Vivo And In Cell Culture: How Should You Do It And What Do The Results Mean? *Br J Pharmacol*. 142, 231-255.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004.Measuring Reactive Species And Oxidative Damage In Vivo And In Cell Culture: How Should You Do It And What Do The Results Mean? *Br J Pharmacol*. 142, 231-255.
- Hamelet, J., Maurin, N., Fulchiron, R., Delabar, J.M., Janel, N., 2007. Mice Lacking Cystathionine Beta Synthase Have Lung Fibrosis And Air Space Enlargement.*Exp Mol Pathol*. 83, 249-253.
- Hammouda, O., Chtourou, H., Chaouachi, A., Chahed, H., Ferchichi, S., Kallel, C., Chamari, K., Souissi, N., 2012.Effect Of Short-Term Maximal Exercise On Biochemical Markers Of Muscle Damage, Total Antioxidant Status, And Homocysteine Levels In Football Players. *Asian Journal Ofsports Medicine*. 3, 239–246.
- Hazell, A. S., 2007. Excitotoxic Mechanisms In Stroke: An Update Of Concepts And Treatment Strategies. *Neurochemistry International*. 50, 941–953.
- Heales, S.J., Bolaños, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M., Clark, J.B., 1999. Nitric Oxide, Mitochondria And Neurological Disease. *Biochim Biophys Acta*. 1410, 215-28.
- Hehlgans, T., Pfeffer, K., 2005.The Intriguing Biology Of The Tumour Necrosis Factor/Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily: Players, Rules And The Games. *Immunology*. 115, 1-20.
- Hirano, T., 1992.Interleukin 6 And Autoimmunity And Plasma Cell Neoplasias. *Res Immunol*. 143, 759-763.
- Hirota, Y.,Osuga, Y., Hirata, T., Harada, M., Morimoto, C., Yoshino, O., Koga, K., Yano, T., Tsutsumi, O., Taketani, Y., 2005. Activation Of Protease-Activated Receptor 2 Stimulates Proliferation And Interleukin (IL)-6 And

- IL-8 Secretion Of Endometriotic Stromal Cells. *Hum Reprod.* 20, 3547-3553.
- Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E., Shea, T.B., 2001. Homocysteine Potentiates Beta-Amyloid Neurotoxicity: Role Of Oxidative Stress. *J Neurochem.* 78, 249-253.
- Ho, P.I., Ortiz, D., Rogers, E., Shea, T.B., 2002. Multiple Aspects Of Homocysteine Neurotoxicity: Glutamate Excitotoxicity, Kinase Hyperactivation And DNA Damage. *J Neurosci Res.* 70, 694-702.
- Huang, C.R., Chang, W.N., Tsai, N.W., Lu, C.H., 2011. Serial Nerve Conduction Studies In Vitamin B12 Deficiency-Associated Polyneuropathy. *Neurological Sciences.* 32, 183–186.
- Huang, R.F., Hsu, Y.C., Lin, H.L., Yang, F.L., 2001. Folate Depletion And Elevated Plasma Homocysteine Promote Oxidative Stress In Rat Livers. *J Nutr.* 13, 33-38.
- Ignarro, L.J., Fukuto, J.M., Griscavage, J.M., Rogers, N.E., Byrns, R.E., 1993. Oxidation Of Nitric Oxide In Aqueous Solution To Nitrite But Not Nitrate: Comparison With Enzymatically Formed Nitric Oxide From L-Arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 8103-8107.
- Iijima, T., 2006. Mitochondrial Membrane Potential And Ischemic Neuronal Death. *Neurosci Res.* 55, 234-243.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory Formation: The Sequence Of Biochemical Events In The Hippocampus And Its Connection To Activity In Other Brains Structures. *Neurobiol Learning And Memory.* 68, 285-316.
- Jacobs, R.A., Boushel, R., Wright-Paradis, C., Calbet, J.A., Robach, P., Gnaiger, E., Lundby, C., 2012. Mitochondrial Function In Human Skeletal Muscle Following High-Altitude Exposure. *Exp Physiol.* 98, 245-55.
- Jiang, H., Wang, X.F., Fang, L., Tang, C., Zhu, Y., Wang, X., 2005. Upregulation Of Aldose Reductase By Homocysteine In Type II Alveolar Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 337, 1084-1089.
- Jiang, H., Wang, X.F., Fang, L., Tang, C., Zhu, Y., Wang, X., 2005. Upregulation Of Aldose Reductase By Homocysteine In Type II Alveolar Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 337, 1084-1091.
- Jones, K.A., Thomsen, C., 2013. The Role Of The Innate Immune System In Psychiatric Disorders. *Mol Cell Neurosci.* 53, 52-62.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., Karlsh, S.J., 2003. Structure And Mechanism Of Na,K-ATPase: Functional Sites And Their Interactions. *Annu Rev Physiol.* 65, 817-849.
- Julve, J., Errico, T.L., Chen, X., Santos, D., Freixa, J., Porcel, I., Cubero, E., Escola-Gil, J.C., Blanco-Vaca, F., 2013. Alterations In The Protein Content And Dysfunction Of High-Density Lipoproteins From Hyperhomocysteinemic Mice. *Clin Investig Arterioscler.* 25, 164-173.
- Kang, S.S., 1996. Treatment Of Hyperhomocyst(E)inemia: Physiological Basis. *J Nutr.* 126, 1273S-1275S.

- Kaplan, J.H., 2002. Biochemistry Of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71, 511-535.
- Kerkeni, M1.,Tnani, M., Chuniaud, L., Miled, A., Maaroufi, K., Trivin, F., 2006. Comparative Study On In Vitro Effects Of Homocysteine Thiolactone And Homocysteine On HUVEC Cells: Evidence For A Stronger Proapoptotic And Proinflammatory Homocysteine Thiolactone. *Mol Cell Biochem.* 291, 119-126.
- Kley, RA., Tarnopolsky, MA.,Vorgerd, M., 2013. Creatinefor Treating Muscle Disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 6:CD004760.
- Koga, T., Claycombe, K., Meydani, M., 2002. Homocysteine Increases Monocyte Andt-Cell Adhesion To Human Aortic Endothelial Cells. *Atherosclerosis.* 161, 365-374.
- Kolling, J., Scherer, E.B., Da Cunha, A.A., Da Cunha, M.J., Wyse, A.T., 2011. Homocysteine Induces Oxidative-Nitrative Stress In Heart Of Rats: Prevention By Folic Acid. *Cardiovasc Toxicol.* 11, 67-73.
- Kolling, J., Wyse, A.T., 2010. Creatine Prevents The Inhibition Of Energy Metabolism And Lipid Peroxidation In Rats Subjected To GAA Administration. *Metab Brain Dis.* 2, 331–338.
- Kondera-Anasz, Z.,Sikora, J., Mielczarek-Palacz, A., Jonca, M., 2005. Concentrations Of Interleukin (IL)-1alpha, IL-1 Soluble Receptor Type II (IL-1 Srij) And IL-1 Receptor Antagonist (IL-1 Ra) In The Peritoneal Fluid And Serum Of Infertile Women With Endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 123, 198-203.
- Lanteaume, I., Khalfa, S., Regis, J., Marquis, P., Chauvel, P., Bartolomei, F. Emotion Induction After Direct Intracerebral Stimulations Of Human Amygdala. *Cerebral Cortex.* 17, 1307-1313.
- Lawler, J. M., Barnes, W. S., Wu, G., Song, W., Demaree, S., 2002. Direct Antioxidant Properties Of Creatine. *Biochemical And Biophysical Research Communication.* 290, 47-52.
- Lee, J.C., Herman, P., 2011.Structural And Functional Energetic Linkages In Allosteric Regulation Of Muscle Pyruvate Kinase. *Methods Enzymol.* 488, 185-217.
- Leishear, K., Ferrucci, L., Lauretani, F., Boudreau, R.M., Studenski, S.A., Rosano, C., Abbate, R.,Gori, A.M., Corsi, A.M., Di Iorio, A., Guralnik, J.M., Bandinelli, S., Newman, A.B., Strotmeyer, E.S., 2012. Vitamin B12 And Homocysteine Levels And 6-Year Change In Peripheral Nerve Function And Neurological Signs.The Journals Of Gerontology.Series A, Biological Sciences And Medical Sciences. 67, 537–543.
- Lentz, S.R., 2005. Mechanisms Of Homocysteine-Induced Atherothrombosis.*J Thromb Haemost.* 3, 1646-1654.
- Li Y, Wu X, Zhu J, Yan J, Owyang C., 2003.Hypothalamic Regulation Of Pancreatic Secretion Is Mediated By Central Cholinergic Pathways In The Rat. *J Physiol.* 552, 571-587.
- Linford, N.J., Schriener, S.E., Rabinovitch, P.S., 2006.Oxidative Damage And Aging: Spotlight On Mitochondria. *Cancer Research.* 66, 2497–2499.

- Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Rayudu, P.V., Arnelle, D.R., Stamler, J.S., 1997. Neurotoxicity Associated With Dual Actions Of Homocysteine At The N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 5923-5928.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free Radicals, Antioxidants And Functional Foods: Impact On Human Health. *Pharmacogn Rev.* 4, 118-126.
- Lopina, O.D., 2000. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-Atpase: Structure, Mechanism, And Regulation. *Membr Cell Biol.* 13, 721-744.
- Machado, F.R., Ferreira, A.G., Da Cunha, A.A., Tagliari, B., Mussulini, B.H., Wofchuk, S., Wyse, A.T., 2011. Homocysteine Alters Glutamate Uptake And Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Atpase Activity And Oxidative Status In Rats Hippocampus: Protection By Vitamin C. *Metab Brain Dis.* 26, 61-67.
- Margaritelis, N.V., Veskoukis, A.S., Paschalis, V., Vrabas, I.S., Dipla, K., Zafeiridis, A., Kyparos, A., Nikolaidis, M.G., 2015. Blood Reflects Tissue Oxidative Stress: A Systematic Review. *Biomarkers.* 13,1-12.
- Marino, M., Scuderi, F., Provenzano, C., Bartoccioni, E., 2011. Skeletal Muscle Cells: From Local Inflammatory Response To Active Immunity. *Gene Ther.* 18, 109-116.
- Marklund, S.L., Westman, N.G., Lundgren, E., Roos, G., 1982. Copper- And Zinc-Containing Superoxide Dismutase, Manganese-Containing Superoxide Dismutase, Catalase, Andglutathione Peroxidase In Normal And Neoplastic Human Cell Lines And Normal Human Tissues. *Cancer Res.* 42, 1955-1961.
- Martinez, P.F., Bonomo, C., Guizoni, D.M., Junior, S.A., Damatto, R.L., Cezar, M.D., Lima, A.R., Pagan, L.U., Seiva, F.R., Fernandes, D.C., Laurindo, F.R., Novelli, E.L., Matsubara, L.S., Zornoff, L.A., Okoshi, K., Okoshi, M.P., 2015. Influence Of N- Acetylcysteine On Oxidative Stress In Slow-Twitch Soleus Muscle Of Heart Failure Rats. *Cell Physiol Biochem.* 35, 148-159.
- Matte, C., Mackedanz, V., Stefanello, F.M., Scherer, E.B., Andrezza, A.C., Zanotto, C., Moro, A.M., Garcia, S.C., Goncalves, C.A., Erdtmann, B., Salvador, M., Wyse, A.T., 2009a. Chronic Hyperhomocysteinemia Alters Antioxidant Defenses And Increases DNA Damage In Brain And Blood Of Rats: Protective Effect Of Folic Acid. *Neurochem Int.* 54, 7-13.
- Matté, C., Scherer, EB., Stefanello, FM., Barschak, AG., Vargas, CR., Netto, CA., Wyse, AT., 2007. Concurrent Folate Treatment Prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Atpase Activity Inhibition And Memory Impairments Caused By Chronic Hyperhomocysteinemia During Rat Development. *Int J Dev Neurosci.* 25, 545-552.
- Matte, C., Stefanello, F.M., Mackedanz, V., Pederzoli, C.D., Lamers, M.L., Dutra-Filho, C.S., Dos Santos, M.F., Wyse, A.T., 2009b. Homocysteine Induces Oxidative Stress, Inflammatory Infiltration, Fibrosis And Reduces Glycogen/Glycoprotein Content In Liver Of Rats. *Int J Dev Neurosci.* 27, 337-344.

- Matté, C., Durigon, E., Stefanello, F.M., Cipriani, F., Wajner, M., Wyse, A.T., 2006. Folic Acid Pretreatment Prevents The Reduction Of Na(+),K(+)-ATPase And Butyrylcholinesterase Activities In Rats Subjected To Acute Hyperhomocysteinemia. *Int J Dev Neurosci.* 24, 3-8.
- Matté, C., Mussulini, B.H., Dos Santos, T.M., Soares, F.M., Simão, F., Matté, A., De Oliveira, D.L., Salbego, C.G., Wofchuk, S.T., Wyse, A.T., 2010. Hyperhomocysteinemia Reduces Glutamate Uptake In Parietal Cortex Of Rats. *Int J Dev Neurosci.* 28, 183-187.
- Matté, C., Pereira, L.O., Dos Santos, T.M., Mackedanz, V., Cunha, A.A., Netto, C.A., Wyse A.T., 2009a. Acute Homocysteine Administration Impairs Memory Consolidation On Inhibitory Avoidance Task And Decreases Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Immunocontent: Prevention By Folic Acid Treatment. *Neuroscience.* 163, 1039-1045.
- Mattevi, A., Bolognesi, M., Valentini, G., 1996. The Allosteric Regulation Of Pyruvate Kinase. *FEBS Lett.* 389, 15-19.
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., Cheng, A., 2008. Mitochondria In Neuroplasticity And Neurological Disorders. *Neuron.* 60, 748-766.
- Mccarty, M.F., 2001. Supplemental Creatine May Decrease Serum Homocysteine And Abolish The Homocysteine 'Gender Gap' By Suppressing Endogenous Creatine Synthesis. *Med Hypotheses.* 56, 5-7.
- Mccully, K.S., 1969. Vascular Pathology Of Homocysteinemia: Implications For The Pathogenesis Of Arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 56, 111-128.
- Mccully, K.S., 2011. Chemical Pathology Of Homocysteine. V. Thioretinamide, Thioretinaco, And Cystathionine Synthase Function In Degenerative Diseases. *Annals Of Clinical And Laboratory Science.* 41, 301-314.
- Mclean, J.B., Moylan, J.S., Andrade, F.H., 2014. Mitochondria Dysfunction In Lung Cancer-Induced Muscle Wasting In C2C12 Myotubes. *Front Physiol.* 5, 503.
- Messer, J.I., Jackman, M.R., Willis, W.T., 2004. Pyruvate And Citric Acid Cycle Carbon Requirements In Isolated Skeletal Muscle Mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286, C565-572.
- Milner, P.I., Wilkins, R.J., Gibson, J.S., 2007. The Role Of Mitochondrial Reactive Oxygen Species In Ph Regulation In Articular Chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 15, 735-742.
- Misiak, B., Frydecka, D., Slezak, R., Piotrowski, P., Kiejna A., 2014. Elevated Homocysteine Level In First-Episode Schizophrenia Patients--The Relevance Of Family History Of Schizophrenia And Lifetime Diagnosis Of Cannabis Abuse. *Metab Brain Dis.* 29, 661-670.
- Moro, M.A., Almeida, A., Bolaños, J.P., Lizasoain, I., 2005. Mitochondrial Respiratory Chain And Free Radical Generation In Stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1291-1304.
- Mudd, S., Levy, H., Kraus, J., 2001. Disorders Of Transsulfuration. In: *The Metabolic & Molecular Bases Of Inherited Disease.* . Vol., B.A. Scriver C, Sly W, Valle D, Ed. Eds., New York: Mcgraw-Hill., Pp. 1279-1327.

- Mudd, S.H., Poole, J.R., 1975. Labile Methyl Balances For Normal Humans On Various Dietary Regimens. *Metabolism*. 24, 721-735.
- Mudd, Sh., Ebert, Mh., Scriver, Cr., 1980. Labile Methyl Group Balances In The Human: The Role Of Sarcosine. *Metabolism*. 29, 707-720.
- Navarro, A., Boveris, A., 2007. The Mitochondrial Energy Transduction System And The Aging Process. *American Journal Of Physiology*. 292, 670-686.
- Nicastro, H., Gualano, B., De Moraes, WM., De Salles, Painelli. V., Da Luz, CR., Dos Santos Costa, A., De Salvi Guimarães, F., Medeiros, A., Brum, PC., Lancha, AH Jr., 2012. Effects Of Creatine Supplementation On Muscle Wasting And Glucose Homeostasis In Rats Treated With Dexamethasone. *Amino Acids*. 42, 1695-1701.
- Nicholls, DG1, Budd SL., 2000. Mitochondria And Neuronal Survival. *Physiol Rev*. 80, 315-360.
- Op't Eijnde, B1., Jijakli, H., Hespel, P., Malaisse, WJ., 2006. Creatine Supplementation Increases Soleus Muscle Creatine Content And Lowers The Insulinogenic Index In An Animal Model Of Inherited Type 2 Diabetes. *Int J Mol Med*. 17, 1077-1084.
- Orth, M., Schapira, A.H., 2001. Mitochondria And Degenerative Disorders. *American Journal Of Medical Genetics*. 106, 27-36.
- Packard, M.G., Wingard, J.C., 2004. Amygdala And "Emotional" Modulation Of The Relative Use Of Multiple Memory Systems. *Neurobiol Learn And Memory*. 82, 243-252.
- Pan, J. W., Takahashi, K., 2007. Cerebral Energetic Effects Of Creatine Supplementation In Humans. *American Journal Of Physiology: Regulatory Integrative And Comparative Physiology*. 292, 1745-1750.
- Parrish, W.R., Rosas-Ballina, M., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, M., Ochani, K., Yang, L.H., Hudson, L., Lin, X., Patel, N., Johnson, S.M., Chavan, S., Goldstein, R.S., Czura, C.J., Miller, E.J., Al-Abed, Y., Tracey, K.J., Pavlov, V.A., 2008. Modulation Of TNF Release By Choline Requires Alpha7 Subunit Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signaling. *Mol Med*. 14, 567-574.
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., 2000. A Detailed Interpretation Of OH Radical Footprints In A TBP-DNA Complex Reveals The Role Of Dynamics In The Mechanism Of Sequence-Specific Binding. *J Mol Biol*. 304, 55-68.
- Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2005. The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *Brain Behav Immun*. 19, 493-499.
- Pedersen, BK, Febbraio, MA., 2008. Muscle As An Endocrine Organ: Focus On Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev*. 88, 1379-1406.
- Perez-De-Arce, K., Foncea, R., Leighton, F., 2005. Reactive Oxygen Species Mediates Homocysteine-Induced Mitochondrial Biogenesis In Human Endothelial Cells: Modulation By Antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun*. 338, 1103-9.



- Perna, A.F., Ingrosso, D., De Santo, N.G., 2003. Homocysteine And Oxidative Stress. *Amino Acids*. 25, 409-417.
- Perry E, Walker M, Grace J, Perry R., 1999. Acetylcholine In Mind: A Neurotransmitter Correlate Of Consciousness? *Trends Neurosci*. 22, 273-280.
- Pierron, D., Wildman, D.E., Hüttemann, M., Markondapatnaikuni, G.C., Aras, S., Grossman, L.I., 2012. Cytochrome C Oxidase: Evolution Of Control Via Nuclear Subunit Addition. *Biochim Biophys Acta*. 1817, 590-597.
- Poddar, R., Sivasubramanian, N., Dibello, P.M., Robinson, K., Jacobsen, D.W., 2001. Homocysteine Induces Expression And Secretion Of Monocyte Chemoattractant Protein-1 And Interleukin-8 In Human Aortic Endothelial Cells: Implications For Vascular Disease. *Circulation*. 103, 2717-2723.
- Raichle, M.E., 2006. The Brain's Dark Energy. *Science*. 314, 1249-1250.
- Rauchova, H., Drahotka, Z., Koudelova, J., 1999. The Role Of Membrane Fluidity Changes And Thiobarbituric Acid-Reactive Substances Production In The Inhibition Of Cerebral Cortex Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity. *Physiol Res*. 48, 73-8.
- Ribeiro, CA., Leipnitz, G., Amaral, AU., De Bortoli, G., Seminotti, B., Wajner, M., 2009. Creatine Administration Prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Atpase Inhibition Induced By Intracerebroventricular Administration Of Isovaleric Acid In Cerebral Cortex Of Young Rats. *Brain Res*. 1262:81-88.
- Rich, M.M., 2006. The control of neuromuscular transmission in health and disease. *Neuroscientist*. 12, 134–142.
- Rinz CJ, Levine J, Minor KM, Humphries HD, Lara R, Starr-Moss AN, Guo LT, Williams DC, Shelton GD, Clark LA., 2014. A COLQ Missense Mutation In Labrador Retrievers Having Congenital Myasthenic Syndrome. *Plos One*. 9, E106425.
- Rosas-Ballina, M., Tracey, K.J., 2009. Cholinergic Control Of Inflammation. *J Intern Med*. 265, 663-679.
- S. Veeranki, S.C. Tyagi, 2013. Defective Homocysteine Metabolism: Potential Implications For Skeletal Muscle Malfunction. *Int J Mol Sci*. 15074–15091.
- Sachdev, P., 2004. Homocysteine And Neuropsychiatric Disorders. *Rev Bras Psiquiatr*. 26, 50-6.
- Safdar, A., Yardley, NJ., Snow, R., Melov, S., Tarnopolsky, MA., 2008. Global And Targeted Gene Expression And Protein Content In Skeletal Muscle Of Young Men Following Short-Term Creatine Monohydrate Supplementation. *Physiol Genomics*. 17, 32:219-228.
- Saks, VA., Javadov, SA., Pozin, E., Preobrazhensky, AN., 1986. Biochemical Basis Of The Protective Action Of Phosphocreatine On The Ischemic Myocardium. In: Saks VA, Bobkov, Strumia E, Eds. *Proceedings Of The Symposium "Creatine Phosphate-Biochemistry, Pharmacology And Clinical Efficiency"* Torino: Edizioni Minerva Medica. 1987, 95-111.

- Salerno, L., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Romeo, G., Siracusa, M.A., 2002. Progress In The Development Of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors. *Curr Pharm Des.* 8, 177-200.
- Sari, Y., Nakagami, G., Kinoshita, A., Huang, L., Ueda, K., Iizaka, S., Sanada, H., Sugama, J., 2008. Changes In Serum And Exudate Creatine Phosphokinase Concentrations As An Indicator Of Deep Tissue Injury: A Pilot Study. *Int Wound J.* 5, 674-680.
- Sarter M, Bruno JP., 1997. Cognitive Functions Of Cortical Acetylcholine: Toward A Unifying Hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 23, 28-46.
- Schnyder, T., Gross, H., Winkler, H., Eppenberger, H.M., Wallimann, T., 1991. Structure Of The Mitochondrial Creatine Kinase Octamer: High-Resolution Shadowing And Image Averaging Of Single Molecules And Formation Of Linear Filaments Under Specific Staining Conditions. *The Journal Of Cell Biology.* 112, 95-101
- Scholte, HR., Busch, HF., Luyt-Houwen, IE., Vaandrager-Verduin, MH., Przyrembel, H., Arts WF., 1987. Defects In Oxidative Phosphorylation. Biochemical Investigations In Skeletal Muscle And Expression Of The Lesion In Other Cells. *J Inherit Metab Dis.* 10, 81-97.
- Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A.M., Stocchi, V., 2006. Creatine Supplementation Affords Cytoprotection In Oxidatively Injured Cultured Mammalian Cells Via Direct Antioxidant Activity. *Free Radical Biology & Medicine.* 40, 837-849.
- Sestili, P., Martinelli, C., Colombo, E., Barbieri, E., Potenza, L., Sartini, S., Fimognari, C., 2011. Creatine As An Antioxidant. *Amino Acids.* 40, 1385–1396.
- Setnik, B., De Souza, F.G., D'almeida, V., Nobrega, J.N., 2004. Increased Homocysteine Levels Associated With Sex And Stress In The Learned Helplessness Model Of Depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 77, 155-161.
- Shaked, I., Meerson, A., Wolf, Y., Avni, R., Greenberg, D., Gilboa-Geffen, A., Soreq, H., 2009. MicroRNA-132 Potentiates Cholinergic Anti-Inflammatory Signaling By Targeting Acetylcholinesterase. *Immunity.* 31, 965-973.
- Shi, H., & Liu, K. J., 2007. Cerebral Tissue Oxygenation And Oxidative Brain Injury During Ischemia And Reperfusion. *Frontiers In Bioscience.* 12, 1318–1328.
- Shumyatsky, G.P., Tsvetkov, E., Malleret, G., Vronskaya, S., Hatton, M., Hampton, L., Et Al., 2002. Identification Of A Signaling Network In Lateral Nucleus Of Amygdala Important For Inhibiting Memory Appecifically Related To Learned Fear. *Cell.* 11, 905-918.
- Silverman, M.D., Tumuluri, R.J., Davis, M., Lopez, G., Rosenbaum, J.T., Lelkes, P.I., 2002. Homocysteine Upregulates Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression In Cultured Human Aortic Endothelial Cells And Enhances Monocyte Adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22, 587-592.

- Sipkens, JA., Hahn, N., Van Den Brand, CS., Meischl, C., Cillessen, SA., Smith, DE., Juffermans, LJ., Musters, RJ., Roos, D., Jakobs, C., Blom, HJ., Smulders, YM., Krijnen, PA., Stehouwer, CD., Rauwerda, JA., Van Hinsbergh, VW., Niessen, HW., 2013. Homocysteine-induced Apoptosis In Endothelial Cells Coincides With Nuclear NOX2 And Peri-Nuclear NOX4 activity. *Cell Biochem Biophys.* 67, 341-352.
- Sipkens, JA., Hahn, NE., Blom, HJ., Lougheed, SM., Stehouwer, CD., Rauwerda, JA., Krijnen, PA., Van Hinsbergh, VW., Niessen, HW., 2012. S- Adenosylhomocysteine Induces Apoptosis And Phosphatidylserine Exposure In Endothelial Cells independent Of Homocysteine. *Atherosclerosis.* 221, 48-54.
- Snow, R.J., Murphy, R.M., 2003. Factors Influencing Creatine Loading Into Human Skeletal Muscle. *Exercise And Sport Sciences Reviews.* 31, 154–158.
- Sora, I., Richman, J., Santoro, G., Wei, H., Wang, Y., Vanderah, T., Horvath, R., Nguyen, M., Waite, S., Roeske, WR., Et Al., 1994. The Cloning And Expression Of A Human Creatine Transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 204:419-427.
- Stanger, O., Herrmann, W., Pietrzik, K., Fowler, B., Geisel, J., Dierkes, J., Weger, M., 2004. Clinical Use And Rational Management Of Homocysteine, Folic Acid, And B Vitamins In Cardiovascular And Thrombotic Diseases. *Z Kardiol.* 93, 439-453.
- Stead, L.M., Au, K.P., Jacobs, R.L., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., 2001. Methylation Demand And Homocysteine Metabolism: Effects Of Dietary Provision Of Creatine And Guanidinoacetate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281, E1095-1100.
- Stead, L.M., Jacobs, R.L., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., 2004. Methylation Demand And Homocysteine Metabolism. *Adv Enzyme Regul.* 44, 321-333.
- Steenge, GR., Lambourne, J., Casey, A., Macdonald, IA., Greenhaff, PL., 1998. Stimulatory Effect Of Insulin On Creatine Accumulation In Human Skeletal Muscle. *Am J Physiol.* 275, E974-979.
- Stefanello, F.M., Ferreira, A.G., Pereira, T.C., Da Cunha, M.J., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Wyse, A.T., 2011. Acute And Chronic Hypermethioninemia Alter Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase Activity In Rat Hippocampus: Prevention By Antioxidants. *Int J Dev Neurosci.* 29, 483-488.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P.S., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003. Impairment Of Energy Metabolism In Hippocampus Of Rats Subjected To Chemically-Induced Hyperhomocysteinemia. *Biochim Biophys Acta.* 1637, 187-192.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P.S., Rombaldi, F., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2002. Reduction Of Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase Activity In Hippocampus Of Rats Subjected To Chemically Induced Hyperhomocysteinemia. *Neurochem Res.* 27, 1593-1598.

- Strumia, E., Pelliccia, F., D'Ambrosio, G., 2012. Creatine Phosphate: Pharmacological And Clinical Perspectives. *Adv Ther.* 29, 99-123.
- Suhail, M., 2010. Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein And Its Relevance To Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res.* 2, 1-17.
- Swapna, I., Sathya Sai Kumar, K.V., Murthy Ch, R., Senthilkumaran, B., 2006. Membrane Alterations And Fluidity Changes In Cerebral Cortex During Acute Ammonia Intoxication. *Neurotoxicology.* 27, 402-408.
- Swart, K.M., Van Schoor, N.M., Blom, H.J., Smulders, Y.M., Lips, P., 2012. Homocysteine And The Risk Of Nursing Home Admission And Mortality In Older Persons. *European Journal Of Clinical Nutrition.* 66, 188-195.
- Taes, Y.E., Delanghe, J.R., De Bacquer, D., Langlois, M., Stevens, L., Geerolf, I., Lameire, N.H., De Vriese, A.S., 2004. Creatine Supplementation Does Not Decrease Total Plasma Homocysteine In Chronic Hemodialysis Patients. *Kidney Int.* 66, 2422-2428.
- Taes, Y.E., Delanghe, J.R., De Vriese, A.S., Rombait, R., Vam Camp, J., Lameire, N.H., 2003. Creatine Supplementation Decrease Homocysteine In An Animal Model Of Uremia. *Kidney Int.* 64, 1331-1337.
- Taguchi, K., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Maekawa, S., 2006. Ouabain-Induced Isoform-Specific Localization Change Of The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Alpha Subunit In The Synaptic Plasma Membrane Of Rat Brain. *Neurosci Lett.* 413, 42-45.
- Tarnopolsky, M.A., 2007. Clinical Use Of Creatine In Neuromuscular And Neurometabolic Disorders. *Subcellular Biochemistry.* 46, 183-204.
- Terjung, R.L.; Clarkson, P.; Eichner, E.R.; Greenhaff, P.L.; Hespel, P.J.; Israel, R.G.; Kraemer, W.J.; Meyer, R.A.; Spriet, L.L.; Tarnopolsky, M.A.; Wagenmakers, A.J.; Williams, M.H., 2000. The Physiological And Health Effects Of Oral Creatine Supplementation. *Medicine And Science In Sports And Exercise. American College Of Sports Medicine Roundtable.* 32, 706-717.
- Tracey, K.J., 2007. Physiology And Immunology Of The Cholinergic Antiinflammatory Pathway. *J Clin Invest.* 117, 289-296.
- Troen, A.M., 2005. The Central Nervous System In Animal Models Of Hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29, 1140-1151.
- Tyagi, N., Sedoris, K.C., Steed, M., Ovechkin, A.V., Moshal, K.S., Tyagi, S.C., 2005. Mechanisms Of Homocysteine-Induced Oxidative Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289, H2649-2656.
- Tyagi, S.C., 1998. Homocysteine Redox Receptor And Regulation Of Extracellular Matrix Components In Vascular Cells. *Am J Physiol.* 274, C396-405.
- Valentino, F., Bivona, G., Butera, D., Paladino, P., Fazzari, M., Piccoli, T., Ciaccio, M., La Bella, V., 2010. Elevated Cerebrospinal Fluid And

- Plasma Homocysteine Levels In ALS. *European Journal Ofneurology*. 17, 84–89.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role Of Oxygen Radicals In DNA Damage And Cancer Incidence. *Mol Cell Biochem*. 266, 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39, 44-84.
- Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Sitta, A., Wayhs, C.A., Pereira, I.N., Rockenbach, F., Garcia, S.C., Wyse, A.T., Schwartz, I.V., Wajner, M., Vargas, C.R., 2011. Experimental Evidence Of Oxidative Stress In Plasma Of Homocystinuric Patients: A Possible Role For Homocysteine. *Mol Genet Metab*. 104, 112-117.
- Vasques, V., Brinco, F., Viegas, CM., Wajner, M., 2006. Creatine Prevents Behavioral Alterations Caused By Methylmalonic Acid Administration Into The Hippocampus Of Rats In The Open Field Task. *J Neurol Sci*. 244, 23-29.
- Veeranki, S., Tyagi, S.C., 2013. Defective Homocysteine metabolism: Potential Implications For Skeletal Muscle Malfunction. *International Journal Of Molecular Sciences*. 14, 15074–15091.
- Veeranki, S., Winchester, L.J., Tyagi, S.C., 2015. Hyperhomocysteinemia Associated Skeletal Muscle Weakness Involves Mitochondrial Dysfunction And Epigenetic Modifications. *Biochim Biophys Acta*. 1852, 732-741.
- Vitale, R.F., Ribeiro Fde, A., 2007. The Role Of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha) In Bone Resorption Present In Middle Ear Cholesteatoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 73, 117-121.
- Vitvitsky, V.M., Garg, S.K., Keep, R.F., Albin, R.L., Banerjee, R., 2012.  $\text{Na}^+$  And  $\text{K}^+$  Ion Imbalances In Alzheimer's Disease. *Biochim Biophys Acta*. 1822, 1671-1681.
- Walker, J.B.; Hannan, J.K., 1976. Creatine Biosynthesis During Embryonic Development. False Feedback Suppression Of Liver Amidinotransferase By N-Acetimidoysarcosine And 1-Carboxymethyl-2-Iminoimidazolidine (Cyclocreatine). *Biochemistry*. 15, 2519-2522.
- Wallimann, T., Schlattner, U., 2010. Creatine Kinases: A Cornerstone For Structural Research In The Phosphagen Kinase Family. *FASEB J*. 24, 7.
- Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Schlattner, U., 2011. The Creatine Kinase System And Pleiotropic Effects Of Creatine. *Amino Acids*. 40, 1271-1296.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., 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. *Biochemical Journal*. 28, 121-140.

- Wang, X.Q., Xiao, A.Y., Sheline, C., Hyrc, K., Yang, A., Goldberg, M.P., Choi, D.W., Yu, S.P., 2003. Apoptotic Insults Impair Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity As A Mechanism Of Neuronal Death Mediated By Concurrent ATP Deficiency And Oxidant Stress. *J Cell Sci.* 116, 2099-2110.
- Wang, X.Q., Yu, S.P., 2005. Novel Regulation Of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase By Src Tyrosine Kinases In Cortical Neurons. *J Neurochem.* 93, 1515-1523.
- Watanabe, M., Osada, J., Aratani, Y., Kluckman, K., Reddick, R., Malinow, M.R., Maeda, N., 1995. Mice Deficient In Cystathionine Beta-Synthase: Animal Models For Mild And Severe Homocyst(E)inemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 1585-1589.
- Weinberg, JM., Venkatachalam, MA., Roeser, NF., Nissim, I., 2000. Mitochondrial Dysfunction During Hypoxia/Reoxygenation And Its Correction By Anaerobic Metabolism Of Citric Acid Cycle Intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 2826-2831.
- Weiss, N., Heydrick, S.J., Postea, O., Keller, C., Keaney, J.F., Jr., Loscalzo, J., 2003. Influence Of Hyperhomocysteinemia On The Cellular Redox State--Impact On Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Clin Chem Lab Med.* 41, 1455-1461.
- Weston, A.R., Karamizrak, O., Smith, A., Noakes, T.D., Myburgh, K.H., 1985. African Runners Exhibit Greater Fatigue Resistance, Lower Lactate Accumulation, And Higher Oxidative Enzyme Activity. *J Appl Physiol.* 86, 915-923.
- Wiernsperger, N.F., 2003. Oxidative Stress: The Special Case Of Diabetes. *Biofactors.* 19, 11-18.
- Williams, K.T., Schalinske, K.L., 2010. Homocysteine Metabolism And Its Relation To Health And Disease. *Biofactors.* 36, 19-24.
- Wredenberg, A., Wibom, R., Wilhelmsson, H., Graff, C., Wiener, H.H., Burden, S.J., Oldfors, A., Westerblad, H., Larsson, N.G., 2002. Increased Mitochondrial Mass In Mitochondrial Myopathy Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 15066-15071.
- Wyse, A.T., Zugno, A.I., Streck, E.L., Matte, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., Wajner, M., 2002. Inhibition Of Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase Activity In Hippocampus Of Rats Subjected To Acute Administration Of Homocysteine Is Prevented By Vitamins E And C Treatment. *Neurochem Res.* 27, 1685-1689.
- Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R., 2000. Creatine And Creatinine Metabolism. *Physiol Ver.* 80, 1107-1213.
- Wyss, M., Schulze, A., 2002. Health Implications Of Creatine: Can Oral Creatine Supplementation Protect Against Neurological And Atherosclerotic Disease? *Neuroscience.* 112, 243-260.
- Yamada, T., Ivarsson, N., Hernández, A., Fahlström, A., Cheng, A.J., Zhang, S.J., Bruton, J.D., Ulfhake, B., Westerblad, H., 2012. Impaired Mitochondrial Respiration And Decreased Fatigue Resistance Followed By Severe Muscleweakness In Skeletal Muscle Of Mitochondrial DNA Mutator Mice. *J Physiol.* 590, 6187-6197.

- Yu, B.P., 1994. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol Rev.* 74, 139-162.
- Zhang, C., 2008. The Role Of Inflammatory Cytokines In Endothelial Dysfunction. *Basic Res Cardiol.* 103, 398-406.
- Zhu, X., Smith, M. A., Honda, K., Aliev, G., Moreira, P. I., Nunomura, A., Casadesus, G., Harris, P.L., Siedlak, S.L., Perry, G., 2007. Vascular Oxidative Stress In Alzheimer Disease. *Journal Of The Neurological Sciences.* 257, 240–246.
- Zieminska, E., Stafiej, A., Lazarewicz, J.W., 2003. Role Of Group I Metabotropic Glutamate Receptors And NMDA Receptors In Homocysteine-Evoked Acute Neurodegeneration Of Cultured Cerebellar Granule Neurones. *Neurochem Int.* 43, 481-492.
- Zimmerman, G., Soreq, H., 2006. Termination And Beyond: Acetylcholinesterase As A Modulator Of Synaptic Transmission. *Cell Tissue Res.* 326, 655-669.
- Zoccolella, S., Simone, I.L., Lamberti, P., Samarelli, V., Tortelli, R., Serlenga, L., Logroscino, G., 2008. Elevated Plasma Homocysteine Levels In Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology.* 70, 222–225.
- Zoccolella, S., Tortorella, C., Iaffaldano, P., Drenzo, V., D'Onghia, M., Paolicelli, D., Livrea, P., Trojano, M., 2012. Elevated Plasma Homocysteine Levels In Patients With Multiple Sclerosis Are Associated With Male Gender. *Journal Of Neurology.* 259, 2105–2110.
- Zou, C.G., Banerjee, R., 2005. Homocysteine And Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal.* 7, 547-559.