



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DIOGO FARIAS RIBEIRO

**HOMOCISTEÍNA APRESENTA COMPORTAMENTO
INTENSIDADE - DEPENDENTE EM RATOS *WISTAR*
SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO DE NATAÇÃO**

Londrina
2016

DIOGO FARIAS RIBEIRO

**HOMOCISTEÍNA APRESENTA COMPORTAMENTO
INTENSIDADE - DEPENDENTE EM RATOS *WISTAR*
SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO DE NATAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação associado em Educação Física – UEL/UEM, na área de concentração de Fisiologia do Exercício, para obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Deminice.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ribeiro, Diogo Farias.

Homocisteína apresenta comportamento intensidade-dependente em ratos wistar submetidos a exercício físico agudo de natação. / Diogo Farias Ribeiro. - Londrina, 2016.

51 f. : il.

Orientador: Rafael Deminice.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Educação Física e Esportes, Programa de Pós-Graduação em Educação Física, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Homocisteína - Teses. 2. Exercício físico agudo - Teses. 3. Metionina - Teses. I. Deminice, Rafael. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esportes. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. III. Título.

DIOGO FARIAS RIBEIRO

**HOMOCISTEÍNA APRESENTA COMPORTAMENTO INTENSIDADE-
DEPENDENTE EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
FÍSICO AGUDO DE NATAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação associado em Educação Física – UEL/UEM, na área de concentração de Fisiologia do Exercício, para obtenção do título de **Mestre** em Educação Física.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rafael Deminice
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 25 de Maio de 2016.

*Dedico este trabalho a Ademir Benedito
Gonçalves.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Deminice não só pela constante orientação neste trabalho, mas, sobretudo pela sua amizade, paciência e conhecimentos repassados. Por ter acreditado em mim e me dado todo o suporte para que esta jornada pudesse ser alcançada.

Aos professores membros da banca, Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa e Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres por terem me dado à honra de serem avaliadores e colaboradores deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Paola Cella, Camila Padilha, Fernando Frajacom, Donizete Xavier, Fernando Borges, Poliana Machado e Mayra Tardelli pela colaboração e ajuda em todos os processos deste trabalho e, sobretudo pela amizade adquirida ao longo dessa jornada.

- Prof. Dr. Fabrício Azevedo Voltarelli pela constante avaliação deste manuscrito e pelas conversas que me fizeram abrir a cabeça para muitas situações;

- Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão, Livia Simões Ambrósio e a Lilian Esleine Costa Mendes da Silva do laboratório de Nutrição e Metabolismo da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pela abertura do espaço para aprendizado e execução das técnicas necessárias das análises aqui realizadas.

- Todos os meus amigos da Crossfit Londrina, Ddo. Marcelo Vitor da Costa, Cristiane Iwama, Ms. Thiago Alfredo Pereira Siqueira, Ms. Larissa Medeiros, Ms. Gleyson Stabile, César Augusto, Clayton Fantin que além de mestres nesta modalidade, abriram as portas para que eu pudesse ser o profissional que sou hoje.

- Minha família, principalmente a minha esposa Marina Moreno de Oliveira Ribeiro que suportou todas as dificuldades ao longo desta jornada ao meu lado, me incentivando e me dando forças.

- Meus pais Edson Farias Ribeiro e Marcia Regina Batista Farias Ribeiro, irmãos Felipe Farias Ribeiro e Mariana Farias Ribeiro por todo apoio e base para que todo esse pudesse acontecer.

- Agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens, mas em ter
novos olhos” - Marcel Proust*

RIBEIRO, Diogo Farias. **Homocisteína apresenta comportamento intensidade-dependente em ratos *Wistar* submetidos a exercício físico agudo de natação.** 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Programa Associado UEL/UEM de Pós-graduação em Educação Física. Centro de Educação Física e Esporte. Universidade Estadual de Londrina, 2016.

RESUMO

A conversão do aminoácido metionina para S-adenosilmetionina (SAM) é passo fundamental nas reações de transmetilação que envolvem a doação de grupamentos metila requerida para diversas funções no organismo. A homocisteína (Hcy) é o principal subproduto dessas reações de transmetilação e sua formação pode refletir modulações no fluxo de reações de transmetilação. Nos últimos anos, elevada concentração de Hcy no sangue tem sido associada com uma série de doenças crônico-degenerativas. O exercício físico aumenta as demandas energéticas e metabólicas e podem modular o fluxo de metilação. Contudo, a atuação do exercício físico agudo sobre este metabolismo ainda é desconhecida. O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do exercício agudo de diversas intensidades sobre o metabolismo da Hcy em ratos *Wistar*. Foram utilizados 44 ratos *Wistar* pesando entre 250-300g, em dois experimentos distintos. No Experimento 1, 10 animais foram submetidos a 3 sessões de exercício de natação suportando 2, 4 e 6% do peso corporal (PC) atado ao tórax. As sessões foram separadas por 48h de descanso entre elas. Ao final do esforço, 500 µl de sangue foram retirados pré, 0h, 1h e 2h, 3h e 4h da veia caudal dos animais para posterior análise da concentração de Hcy. No Experimento 2, 34 animais foram submetidos a 60 min de natação suportando carga de 4% do PC. Os animais foram eutanasiados pré (n=7), 1h (n=7), 2h (n=6), 3h (n=7), 4h (n=7) após o exercício agudo para determinação de Hcy plasmática e expressão de genes chave do metabolismo da Hcy no fígado. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão. A análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido de *Post Hoc* de *Tukey* foram utilizados ($p < 0,05$). No Experimento 1, o exercício agudo promoveu aumento da concentração de Hcy intensidade-dependente. No Experimento 2, a Hcy apresentou elevação significativa ao longo do tempo e a análise da expressão gênica das enzimas deste metabolismo denotou aumento significativo na enzima MAT após 4h de exercício, indo de encontro com uma diminuição da concentração de SAM ($p < 0,01$). Em contrapartida, reduções significativas na expressão gênica das enzimas GNMT, MTRR e BHMT foram encontradas após 3h (-9,45%), a partir de 1h (-9,09%) e após 4h (-2,31%), respectivamente. Estes dados sugerem que o exercício agudo aumenta a Hcy de maneira intensidade-dependente e que esta elevação se dá, principalmente, pela alta requisição de compostos metilados provenientes da SAM. Tais mudanças, associadas à diminuição da expressão gênica das enzimas de remetilação MTRR e BHMT, nos mostram que a elevação da Hcy após sessão aguda de exercício se dá por estes motivos, uma vez que as vias relacionadas a estas enzimas são responsáveis pela renovação e catabolismo da Hcy.

Palavras-chave: Homocisteína. Exercício físico agudo. Metionina.

RIBEIRO, Diogo Farias. **Homocysteine has intensity dependent behavior in rats submitted to swimming acute exercise.** 2016. 50 p. Dissertation (Master's degree in Physical Education) Universidade Estadual de Londrina, 2016.

ABSTRACT

The conversion of the amino acid methionine to S-adenosylmethionine (SAM) is a crucial step in transmethylation reactions involving the donation of methyl groups required for various functions in the body. Homocysteine (Hcy) is the main by-product of these transmethylation reactions and their formation may reflect modulations in transmethylation reactions flow. In recent years, high concentration of Hcy in the blood has been associated with a number of chronic diseases. Physical exercise increases energy and metabolic demands and can modulate methylation flow. However, the performance of acute exercise on this metabolism is still unknown. The aim of this study was to investigate the effects of acute exercise of various intensities on the metabolism of Hcy in Wistar rats. 44 Wistar rats weighing 250-300g, in two separate experiments were used. In Experiment 1, 10 animals were submitted to 3 swimming exercise sessions supporting 2, 4 and 6% of body weight (BW) attached to the thorax. The sessions were separated by 48 hours of rest between them. At the end of the effort, 500 ml of blood were taken pre, 0h, 1h and 2h, 3h and 4h the tail vein of animals for analysis of the concentration of Hcy. In Experiment 2, 34 animals were subjected to 60 min of swimming supporting load of 4% of the PC. The animals were euthanized pre (n = 7), 1h (n = 7), 2h (n = 6), 3h (n = 7), 4h (n = 7) after the acute exercise for determination of plasma homocysteine levels and expression of key genes Hcy metabolism in the liver. The results are presented as mean \pm standard deviation. ANOVA one way (ANOVA) followed by Tukey post hoc were used ($p < 0.05$). In Experiment 1, the acute exercise promoted increased concentration of Hcy intensity-dependent. In Experiment 2, the Hcy increased significantly the logo of time and the analysis of gene expression of enzymes of this significant increase in MAT denoted metabolism enzyme after 4pm exercise, meeting with a decreased concentration of SAM ($p < 0.01$). In contrast, significant decreases in gene expression of GNMT enzyme MTRR BHMT and were found after 3h (-9.45%) from 1h (-9.09%) and after 4h (-2.31%), respectively. These data suggest that acute exercise intensity increases Hcy-dependent manner and that this increase is due mainly due to the high request methylated compounds from the SAM. Such changes associated with decreased gene expression of enzymes remethylation MTRR and BHMT, show us that the elevation of Hcy after acute session of exercise is given for these reasons, since the pathways related to these enzymes are responsible for the renewal and catabolism Hcy.

Key Words: Homocysteine. Acute exercise. Methionine.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Dados Descritivos do Experimento 1. Peso corporal, Sobrecarga no nado, concentração de lactato após exercício e tempo de exercício 30
- Tabela 2 -** Média e Desvio padrão dos Aminoácidos plasmáticos relacionados ao metabolismo da homocisteína derivados de cromatografia a gás 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo da Homocisteína e enzimas responsáveis pela transmetilação, remetilação e transulfuração	18
Figura A -	Desfecho dos trabalhos de baixa/moderada intensidade longa-duração inseridos na Meta-análise	22
Figura B -	Desfecho dos trabalhos de alta intensidade – curta duração inseridos na Meta-análise	22
Figura C -	Tamanho do Efeito do volume e intensidade sobre as concentrações plasmáticas de Hcy nos estudos incluídos na meta-análise	23
Figura 2 -	Delineamento do Experimento.....	25
Figura 3 -	Delineamento do Experimento 2.....	26
Figura 4 -	Desenho experimental das sessões de adaptação dos animais	27
Figura 5 -	Média e desvio-padrão das concentrações de Hcy nas diferentes intensidades testadas (controle, 2%, 4% e 6% do peso corporal) ao longo do tempo (P=Pré, 0h, 1h, 2h, 3h e 4h).	31
Figura 6 -	Média e desvio-padrão das concentrações de metionina nas diferentes intensidades testadas (controle, 2%, 4% e 6% do peso corporal) ao longo do tempo (P=Pré, 0h, 1h, 2h, 3h e 4h).....	31
Figura 7 –	Média e desvio-padrão Das Concentrações DE cisteína nas diferentes Intensidades testadas (Controle, 2%, 4% E 6% Do Peso Corporal) Ao Longo Do Tempo (P=Pré, 0h, 1h, 2h, 3h E 4h).....	32
Figura 8 -	Média e desvio padrão das concentrações de homocisteína (hcy) na intensidade escolhida (4% do peso corporal) ao longo do tempo (controle, 1h, 2h, 3h e 4h)	33
Figura 9 -	Média e desvio padrão dos valores de (a) s-adenosilmetionina (SAM) e (b) s-adenosilhomocisteína (SAH) e (C) razão entre SAM/SAH nos momentos pós-sessão aguda de natação com 4% do peso corporal	33
Figura 10 -	Média e desvio padrão dos valores de expressão gênica (MRNA) das enzimas responsáveis pelo metabolismo da homocisteína (MAT1A – Metionina adenosiltransferase; GNMT – GLICINA N-Metiltransferase; CBS – Cistationina-β-Sintase; BHMT - betaína-homocisteína metiltransferase; MTRR – 5-	

Metilenotetrahidrofolato-Homocisteína Metiltransferase Redutase.

* Diferença estatisticamente significativa entre os momentos..... 35

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Hcy	- Homocisteína
[Hcy]	- Concentração de Homocisteína
SAM	- S-adenosilmetionina
SAH	- S-adenosilhomocisteína
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
RNA	- Ácido Ribonucleico
MS	- Metionina Sintase
THF	- S-5-metiltetrahydrofolato
CBS	- Cistationina Beta Sintase
HHcy	- Hiper-homocisteinemia
MAT1a	- Metionina Adenosiltransferase
GNMT	- Glicina N-Metiltransferase
MTRR	- 5-Metilenotetrahydrofolato-Homocisteína Metiltransferase Redutase
BHMT	- Betaína-Homocisteína S-Metiltransferase
PSP	- Piridoxal 5-fosfato
MTHFR	- Metilenotetrahydrofolato redutase
FC _{Máx}	- Frequência Cardíaca Máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.2	OBJETIVOS	15
1.2.1	Objetivos Gerais.....	15
1.2.2	Objetivos Específicos.....	15
1.3	Hipóteses.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	METABOLISMO DA HCY	17
2.2	HOMOCISTEÍNA E EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO	20
3	MÉTODOS	24
3.1	ANIMAIS E TRATAMENTO.....	24
3.2	EXPERIMENTO 1 – CINÉTICA DA HCY.....	24
3.3	EXPERIMENTO 2 – METABOLISMO DA HCY	25
3.4	PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO – NATAÇÃO	26
3.4.1	Adaptação ao Meio líquido – Natação.....	26
3.4.2	Sessões Agudas de Exercício Físico – Natação.....	27
3.5	Eutanásia e Coleta de Materiais Biológicos.....	28
3.6	ANÁLISES DE HOMOCISTEÍNA – CROMATOGRAFIA À GÁS.....	28
3.7	ANÁLISE DE LACTATO SANGUÍNEO.....	28
3.8	ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR	29
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4	RESULTADOS	30
4.1	EXPERIMENTO 1 - CINÉTICA DA HCY	30
4.2	EXPERIMENTO 2 – METABOLISMO DA HCY.....	32
5	DISCUSSÃO	36
5.1	EXPERIMENTO 1 – CINÉTICA DA HCY	36
5.2	EXPERIMENTO 2 – METABOLISMO DA HCY.....	37

6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXOS	47
	ANEXO A – COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	48
	ANEXO B –	49
	ANEXO C -	50

1 INTRODUÇÃO

A metionina é um aminoácido semi-essencial e de grande importância nas reações que envolvem doações de grupamentos metila (CH₃) para o organismo, tendo a homocisteína (Hcy) como seu metabólito intermediário no processo de transmetilação da metionina. Níveis plasmáticos elevados de Hcy (Hiperhomocisteinemia (HHcy)) têm sido relacionados a várias doenças, tais como: doenças cardiovasculares (NEVES *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2015), diabetes *mellitus* tipo 2 (WIJEKOON *et al.*, 2007; HASSAN *et al.*, 2015), doenças neuro-degenerativas (OBEID *et al.*, 2006), má formação do tubo neural (CHENG *et al.*, 2015), além de disfunções renais crônicas (LAI *et al.*, 2014). Apesar de tais reações de metilação ocorrerem de forma natural no nosso organismo, essas podem sofrer alterações de acordo com a exigência metabólica, especialmente se induzidas por exercício físico agudo ou crônico (MAROTO-SÁNCHEZ *et al.*, 2013; DEMINICE, *et al.*, 2016), dietas e suplementações (CHEN *et al.*, 2005; VENTA *et al.*, 2009; DEMINICE, RAFAEL *et al.*, 2013), além de fatores genéticos (YAMADA *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2015). A partir dessa ótica, estudos vêm sendo conduzidos para melhor entender os mecanismos de ação deste complexo metabolismo.

O músculo estriado esquelético é uma “*máquina molecular*” capaz de transformar energia química em energia mecânica para gerar força e potência (ENOKA, 2002), possibilitando a execução de exercícios físicos bem como atividades físicas e esportivas. A inatividade física e o baixo nível de condicionamento físico vêm sendo considerados fatores de risco para a saúde, sendo estes tão importantes quanto a obesidade, tabagismo, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares (CIOLAC *et al.*, 2004; VASCONCELLOS *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado alterações nas concentrações plasmáticas de Hcy quando seres humanos (VINCENT *et al.*, 2006; DEMINICE, RAFAEL *et al.*, 2013) e roedores (DEMINICE, VANNUCCHI, *et al.*, 2011; NEUMAN *et al.*, 2013) foram submetidos a exercício físico de alta intensidade. Esta alteração está relacionada, em parte, à modificação na demanda energética causada pelo exercício que, por sua vez, pode refletir em uma modulação das reações de metilação e subsequente modificação nas concentrações plasmáticas de Hcy. Nesse sentido, estudos demonstraram que a concentração de Hcy plasmática é dependente do tipo, volume e intensidade de exercício, bem como da idade e do nível de condicionamento físico (HERRMANN *et al.*, 2003; KÖNIG *et al.*, 2003; GELECEK *et al.*, 2007; DEMINICE e JORDAO, 2011). Quando o exercício físico é realizado

agudamente, em intensidade baixa ou moderada e por um longo período, há aumento na concentração de Hcy após exercício. (HERRMANN *et al.*, 2003) Em relação ao exercício agudo de alta intensidade, as concentrações de Hcy também se elevaram ao fim do exercício. (STEENGE *et al.*, 2001; DEMINICE e JORDAO, 2011). Alguns autores sugerem que esta resposta se dá pelo aumento do catabolismo de proteínas, alterando o *turnover* proteico (DEMINICE, VANNUCCHI, *et al.*, 2011). Um dos aminoácidos responsáveis por estas alterações é a metionina devido ao fato de ser um aminoácido glicogênico, ou seja, atua na gliconeogênese. Por meio de sua degradação, ocorre à entrada da metionina no *Ciclo de Kreb's*, o que possibilita a continuidade do fornecimento de energia através da fosforilação oxidativa e a consequente disponibilidade de glicose para o organismo, necessária tanto durante como ao final do exercício, sendo isto extremamente necessário para a reposição dos estoques de glicogênio muscular. A partir disso, acredita-se que o exercício físico pode modular as concentrações de Hcy de acordo com a sua intensidade e o seu volume.

Em uma meta-análise publicada recentemente pelo nosso grupo (DEMINICE, RIBEIRO, *et al.*, 2016), nós discutimos os efeitos do exercício físico agudo e crônico sobre as concentrações plasmáticas de Hcy. Um dos desfechos encontrados foi que em exercícios realizados agudamente, seja em baixa/moderada intensidade por um longo período ou de alta intensidade e curta duração, houve elevação da Hcy plasmática, confirmando a hipótese previamente sugerida pelos autores. Entretanto, com a diversidade de metodologias aplicadas e a escassez de pontos de análise de Hcy pós-sessão aguda de exercício e, para o melhor entendimento deste metabolismo, estratégias que permitam respostas para perguntas de como e o por quê da Hcy se elevar ao fim destes estímulos precisam ser executadas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do exercício físico agudo de natação com diferentes intensidades sobre a concentração plasmática de Hcy e compostos chave, inerentes ao seu metabolismo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Estudar a influência de diferentes intensidades de exercício físico agudo de natação sobre a concentração plasmática de Hcy;
- 2) Estudar as modulações específicas causadas pelo exercício físico agudo de natação sobre o metabolismo da Hcy por meio de determinação da expressão genica de enzimas chave pertencentes a esse metabolismo.

1.3 HIPÓTESES (H)

H1 = O exercício físico agudo promove aumento da concentração de Hcy plasmática de maneira intensidade-dependente por meio do aumento da demanda por SAM e reações de transmetilação. Como consequência, a concentração de Hcy no plasma é aumentada após sessão aguda de exercício;

H0 = O exercício físico agudo não altera as concentrações plasmáticas de Hcy, bem como a expressão gênica das enzimas pertinentes a este metabolismo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 METABOLISMO DA HCY

A Hcy é o metabólito intermediário no processo de transmetilação da metionina, sendo esta proveniente da dieta e/ou do seu próprio catabolismo. As reações de transmetilação ocorrem em todas as células do organismo, quando grande parte da metionina é ativada por ATP para formar S-Adenosilmetionina (SAM). Esta ação é ativada pela enzima Metionina Adenosiltransferase (MAT), a qual utiliza a adenosina do ATP para formar SAM. Uma vez formada, a SAM pode ser ativada pela enzima Glicina N-metiltransferase (GNMT), a qual atuará quando houver, principalmente, alta disponibilidade de metionina no organismo decorrida, como por exemplo, pela alta ingestão deste aminoácido. A ação da enzima GNMT é de doar o grupamento metila da SAM para a formação de sarcosina, utilizando como produto a glicina. Esta reação tem função principal de regular a taxa de SAM/SAH (SELHUB, 1999) e, a partir de sua ativação, a SAM passa a ser S-Adosilhomocisteína (SAH), a qual será hidrolisada por meio da ação da enzima SAH-hidrolase que, quando inibida, gera o acúmulo de SAH, impossibilitando a continuação das reações de metilação (STIPANUK, 2004).

Uma vez sintetizada, a Hcy pode seguir duas vias: 1) a remetilação ou formação *de novo* de metionina a partir de Hcy; esta reação ocorre em todos os tecidos e em parte no fígado; 2) ser metabolizada no processo de transulfuração pelo fígado, rins, intestino delgado e pâncreas (BROSNAN *et al.*, 2004) (Figura1).

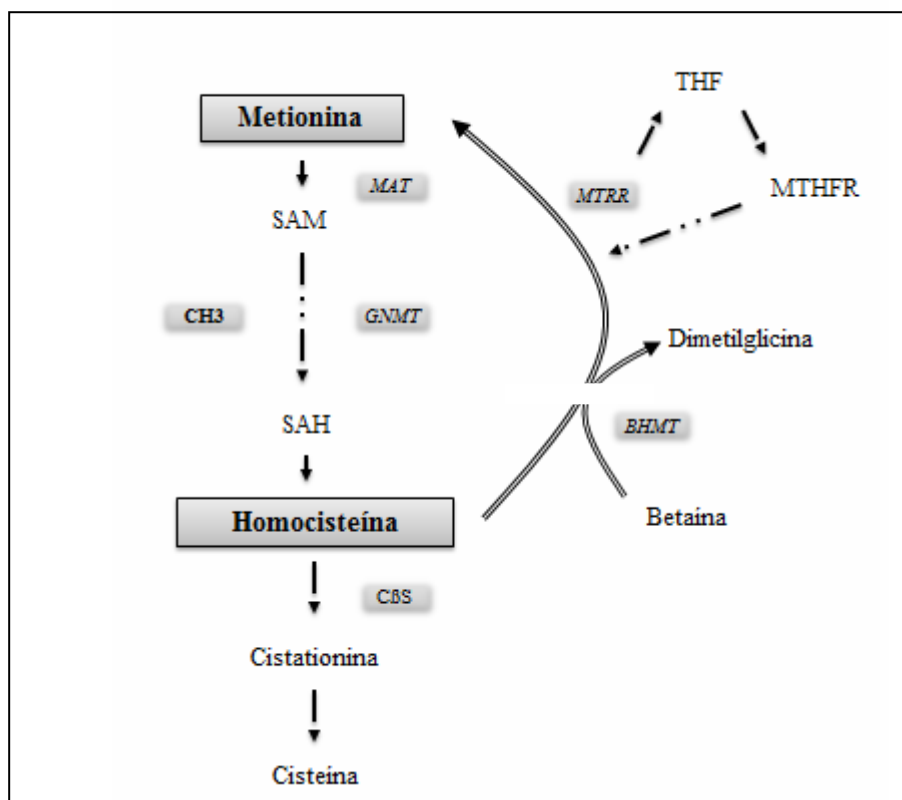
A remetilação é o processo pelo qual a Hcy recebe o grupamento metila de outros componentes para a ressíntese de metionina. Este processo ocorre quando a enzima metionina sintase (MS) utiliza o S-5-metiltetrahydrofolato (THF) como doador de metila. O THF doa seu grupamento metila por meio da ação da enzima Metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) ou pela via alternativa betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT) (STIPANUK, 2004). Esta via de remetilação que utiliza a THF é dependente de vitamina B₁₂, já a reação com betaína não é dependente de B₁₂.

A via de transulfuração é responsável por metabolizar a Hcy por meio da enzima Cistationina-β-sintase (CBS). Esta enzima cataliza a reação da serina com a Hcy formando cistanionina em uma reação irreversível ativada por Piridoxal 5-fosfato (PSP), mais conhecida como vitamina B₆. A cistationina é hidrolisada pela enzima γ- Cistationina sintase,

também ativada por vitamina B₆, para formar cisteína e α -Cetobutirato. O excesso de cisteína é oxidado em taurina e sulfatos inorgânicos e eliminado na urina.

A capacidade do organismo em discriminar quando utilizar a via de remetilação ou de transulfuração denota seu poder de adaptação às diferentes quantidades de metionina disponíveis no organismo, evidenciando uma regulação coordenada entre essas vias (SELHUB, 1999).

Figura 1 – Metabolismo da Homocisteína e enzimas responsáveis pela transmetilação, remetilação e transulfuração. (Criação do autor)



Estudos experimentais *in vitro* sugerem que essa coordenação se dá por pelo menos dois mecanismos:

1. Pela capacidade da SAM em agir como inibidor alostérico da Metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) bem como ativador da CBS (KUTZBACH *et al.*, 1967; 1971; KORÁČEVIĆ *et al.*, 1977; FINKELSTEIN *et al.*, 1984), pois suprime a síntese de N-5-metiltetrahydrofolato, substrato necessário para as reações de remetilação, promovendo, assim, as reações de transulfuração;

2. O segundo mecanismo é a regulação da concentração intracelular de SAM. No fígado, a SAM é regulado por uma reação catalizada pela enzima GNMT onde transfere um grupamento CH_3 da SAM para o grupamento amino da glicina, formando sarcosina. Abundantemente encontrada no fígado, a enzima GNMT é fortemente inibida pela N-5-metiltetrahydrofolato. Em pacientes recebendo dieta rica em proteínas animais contendo metionina, 70% da Hcy é catabolizada pela enzima C β S via transulfuração, enquanto naqueles com dieta hipoprotéica, ou em jejum, a via da remetilação é favorecida e apenas 10% é catabolizada pela C β S (NEVES *et al.*, 2004).

Possíveis deficiências na via de transulfuração devem ser levadas em consideração quando o organismo passa a não formar nenhum subproduto destas reações, como por exemplo: cistationia, cisteína ou taurina. A ausência desses aminoácidos pode ser ocasionada pelo polimorfismo do gene responsável pela transcrição e síntese da enzima C β S, promovendo, assim, quadro de hiperhomocisteinemia (NEVES *et al.*, 2004).

A via de remetilação também está suscetível a erros genéticos, sendo um dos principais aquele relacionado ao gene da MTHFR (C677T); este homozigoto é responsável por acometer 10-16% da população (GOYETTE *et al.*, 1995) e sua causa está relacionada com outros fatores, como a má formação do tubo neural (CHENG *et al.*, 2015), fatores nutricionais e ingestão exacerbada de álcool (JACQUES *et al.*, 2001; GANJI *et al.*, 2003). Este polimorfismo faz com que haja a diminuição das concentrações de N-5-metiltetrahydrofolato e uma sobrecarga na via de transulfuração (YAMADA *et al.*, 2001), prejudicando seu funcionamento.

O exercício físico é considerado um dos principais responsáveis por alterar a homeostasia do organismo, pois requer mudanças em todos os metabolismos e sistemas de transferência de energia responsáveis por realizarem este controle e consequente manutenção do exercício. Estas alterações causadas pelo exercício geram adaptações positivas, ao passo que estas são consideradas fatores de proteção contra várias doenças crônico-degenerativas. Sendo assim, a inatividade física e o baixo nível de condicionamento físico vêm sendo considerados fatores de risco tão importantes e determinantes quanto à obesidade, tabagismo, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares (CIOLAC *et al.*, 2004; VASCONCELLOS *et al.*, 2013). Como a Hcy é considerada fator independente para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas e vem recebendo atenção por parte dos pesquisadores devido a esta associação, estes estão empenhados a estudar os efeitos do

exercício físico sobre o seu metabolismo. Entretanto, as respostas sobre o efeito do exercício físico agudo ou crônico ainda geram certa confusão.

2.2 HOMOCISTEÍNA E EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO

Quando relacionamos Hcy e exercício físico agudo, um dos interesses da comunidade científica é o aumento súbito em suas concentrações plasmáticas, o qual pode promover disfunção endotelial devido ao efeito citotóxico que elevadas concentrações de Hcy podem gerar (BENEDINI *et al.*, 2010). Entretanto, alguns autores sugerem que este aumento é transitório, pois é requisitado pela alta demanda nas reações de metilação (IGLESIAS-GUTIERREZ *et al.*, 2012). Além disso, com a diversidade de modelos experimentais, tempo de coleta sanguínea, população estudada, a comparação entre os estudos dificultam a obtenção de dados consistentes e fidedignos.

Tentamos, aqui, agrupar os modelos experimentais para facilitar a comparação dos estudos. Quanto ao tipo de esforço, foram separados seis estudos que utilizaram exercícios em esteira rolante (WRIGHT *et al.*, 1998; GELECEK *et al.*, 2007; SUBASI *et al.*, 2009; MCANULTY *et al.*, 2011; MARYAM KOUSHKIE, 2012; MAROTO-SÁNCHEZ *et al.*, 2013); em todos estes estudos a intensidade foi moderada (70-80% Vo_{2Max}) e com diferentes tempos de permanência nos esforços. Em relação ao tempo de coleta sanguínea para análise de Hcy, quatro estudos (SUBASI *et al.*, 2009; MCANULTY *et al.*, 2011; MARYAM KOUSHKIE, 2012; MAROTO-SÁNCHEZ *et al.*, 2013) realizaram análises pré-testes e imediatamente após o exercício, sendo que em todos esses estudos houve aumento da concentração de Hcy pós-exercício agudo. Wright (1998) analisou a Hcy antes do teste, imediatamente após o término e 30min pós-teste e observou aumento de sua concentração plasmática do momento (pré) para o momento pós-teste, permanecendo elevada após 30min, mas sem diferença estatística para o pré-teste.

Quatro estudos realizaram simulações de competições (maratona, *mountain bike* e *triathlon*) (HERRMANN *et al.*, 2003; KÖNIG *et al.*, 2003; REAL *et al.*, 2005; BENEDINI *et al.*, 2010). Benedini *et al.* (2010) analisaram os efeitos da prova de meia maratona em atletas de elite e amadores, coletando amostras sanguíneas apenas pré-exercício e pós-exercício e encontrou diferença estatisticamente significativa ($p=0.026$) do momento pré para o pós em todos os corredores, ou seja, a Hcy se elevou após sessão aguda de exercício; contudo, os atletas de elite apresentaram concentrações plasmáticas de Hcy menores que os amadores, sugerindo que o nível de condicionamento físico afeta as

concentrações de Hcy. Corroborando estes achados, König et al (2003), em uma simulação de competição de *triathlon*, também mostraram aumento nas concentrações de Hcy após esforço agudo, mas, notaram também que quanto maior o volume semanal de treinamento, menores são os níveis basais de Hcy, enquanto que as concentrações de folato são maiores. Já Real et.al (2005) demonstraram que em atletas amadores de corrida (n=22) 20% dos sujeitos apresentavam valores de Hcy em repouso $> 10 \mu\text{mol/l}$ (ponto de corte para risco de doença cardíaca isquêmica) 24 hrs prévias a uma maratona. Por outro lado, 24hrs após a maratona, todos os atletas apresentaram aumento nas concentrações dessa substância.

Outros dois estudos realizaram testes específicos de corrida *RAST test* (*Running-based Anaerobic Sprint Test*) e *YoYo-Intermittent Recovery Test Level-1* (DEMINICE, RAFAEL *et al.*, 2013; HAMMOUDA *et al.*, 2013), sendo que em ambos os trabalhos a Hcy apresentou elevação após o final dos testes; no estudo de Deminice et.al (2013), as análises foram realizadas pré-teste, e 1hr pós-teste, ao passo que no estudo de Hammouda et.al (2013) as análises foram 5min pré-teste e 3min pós-teste.

Outro método muito utilizado é o de ciclo-ergômetro, sendo que separamos dez estudos que realizaram testes agudos e analisaram os níveis de Hcy. Destes dez, seis estudos utilizaram testes incrementais até a exaustão (CRÉE *et al.*, 1999; O'DOCHARTAIGH, 2004; GAUME *et al.*, 2005; SOTGIA *et al.*, 2007; ZINELLU *et al.*, 2007; VENTA *et al.*, 2009) e, ainda, destes seis estudos apenas dois (SOTGIA *et al.*, 2007; ZINELLU *et al.*, 2007) não encontraram aumento nas concentrações plasmáticas de Hcy pós-sessão aguda de exercício. Gaume et.al (2005) analisaram indivíduos sedentários e ativos e, em ambos, houve aumento nas concentrações de Hcy, sendo menor o aumento nos indivíduos fisicamente ativos. Já Venta et.al (2009) analisaram diferentes tipos de simuladores (ciclo, kayaker e remo) e observaram aumento na Hcy 30min pós-exercício em todos os tipos de esforços.

De Créé et.al (2000) aplicaram um teste submáximo constante de 1hr em um ciclo-ergômetro em indivíduos moderadamente treinados e também encontraram aumento de Hcy imediatamente após o término da sessão. Iglesias-Gutierrez et.al (2012) verificaram o efeito do exercício isocalórico (400kcal) em duas intensidades (baixa intensidade 40% $\text{Vo}_{2\text{peak}}$ e alta intensidade 80% $\text{Vo}_{2\text{peak}}$) em sedentários e observaram aumento transitório de Hcy, mas não ocorrência de HHcy após sessão aguda. Além disso, outros dois estudos (HAMMOUDA *et al.*, 2012; MURAWSKA-CIALOWICZ, 2014) utilizaram teste de Wingate, mas, somente o estudo de Murawska-Cialowicz et al. (2014) apresentou elevação das concentrações de Hcy.

Em recente meta-análise publicada pelo nosso grupo, descrevemos os efeitos do exercício físico agudo e crônico sobre a Hcy plasmática. Neste estudo, separamos os modelos de exercício pela intensidade e pelo volume. Os trabalhos que utilizaram exercícios agudos de baixa/moderada intensidade por um longo período apresentaram elevação de Hcy plasmática pós-sessão aguda de exercício (Figura A). O exercício realizado de forma aguda em alta intensidade também apresentou elevação da Hcy (Figura B) ao fim da sessão e, em um terceiro desfecho, onde ambas as intensidades foram analisadas em conjunto, houve aumento da Hcy plasmática pós-sessão aguda de exercício, independente do tipo de exercício executado.

Figura A – Desfecho dos trabalhos de baixa/moderada intensidade longa-duração inseridos na Meta-análise. (DEMINICE, *et al.*, 2016)

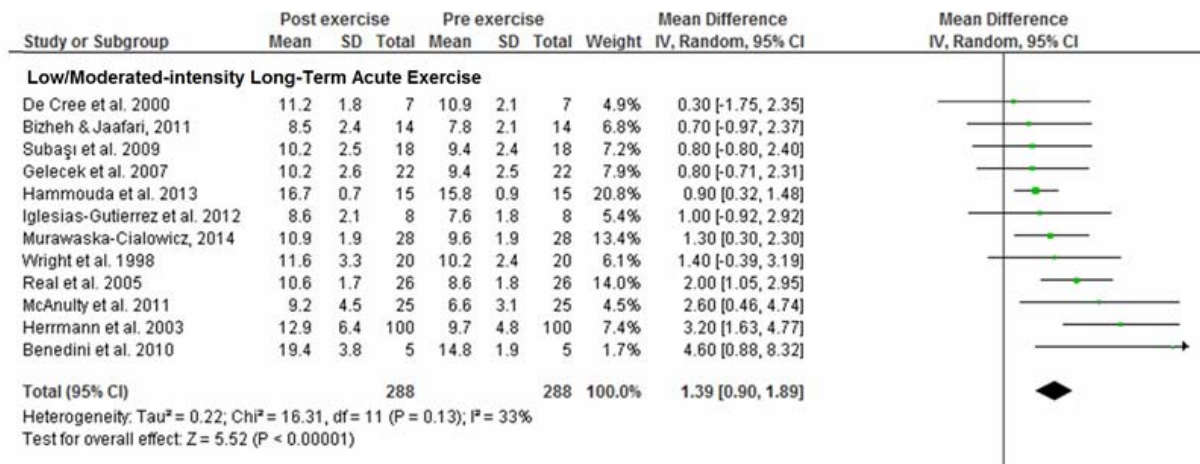
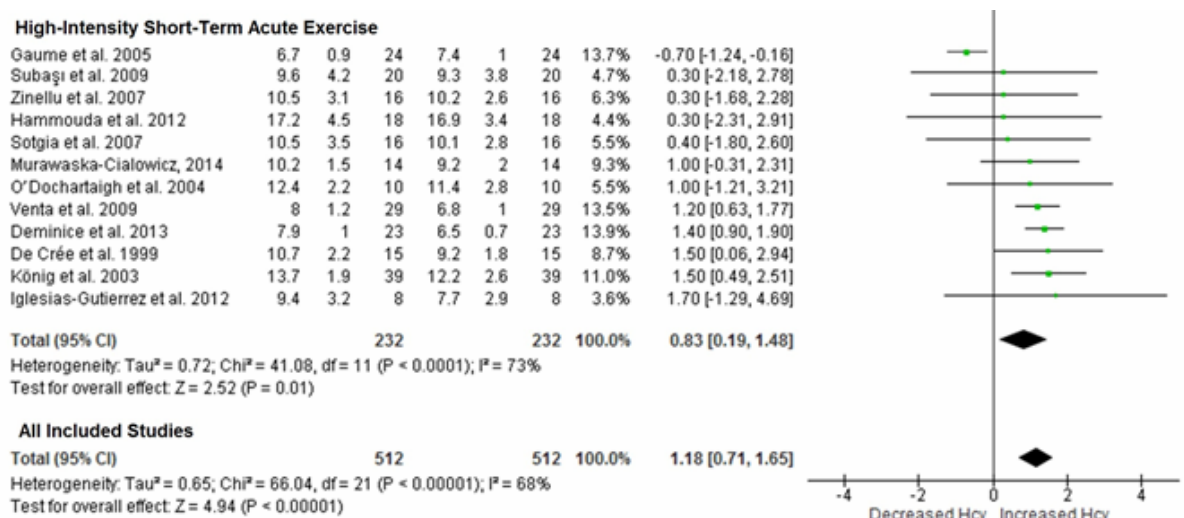
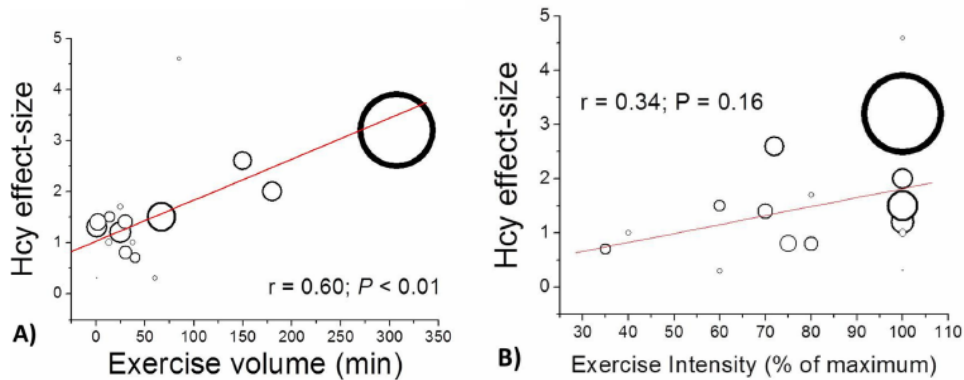


Figura B – Desfecho dos trabalhos de alta intensidade – curta duração inseridos na Meta-análise. (DEMINICE *et al.*, 2016)



Quando olhamos para o tamanho do efeito da intensidade e do volume sobre a concentração de Hcy, obtivemos $r = .60$ ($p < 0,01$) para volume e $r = .34$ ($p = 0,16$) para intensidade. (Figura C)

Figura C – Tamanho do Efeito do volume e intensidade sobre as concentrações plasmáticas de Hcy nos estudos incluídos na meta-análise. (DEMINICE, *et al.*, 2016)



Levando-se em consideração que a maioria dos estudos acima citados apresentou elevação na concentração plasmática de Hcy pós-sessão aguda de exercícios físicos, independentemente do tipo e do volume utilizados, acreditamos ser importante determinar os mecanismos pelos quais o exercício agudo promove tais elevações.

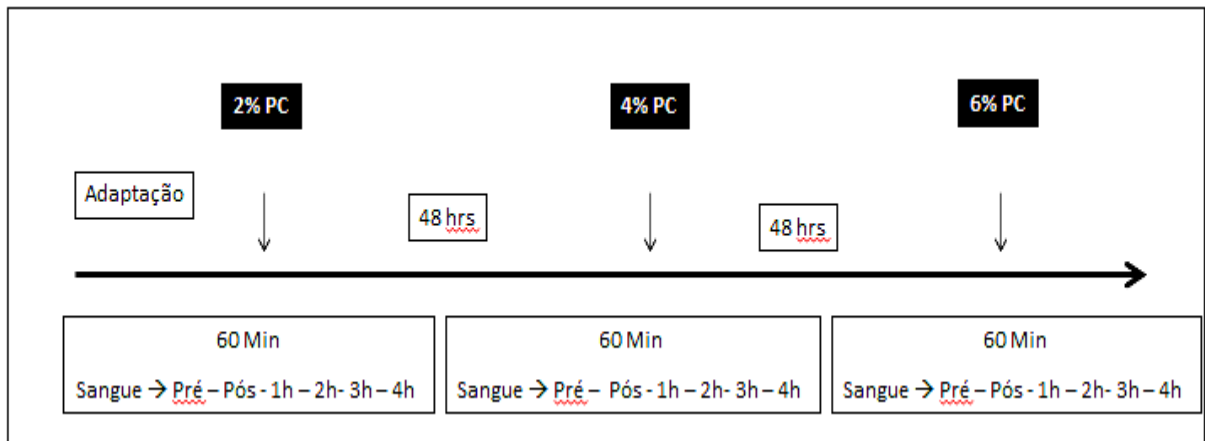
3 MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Este estudo foi conduzido em duas fases distintas, denominados experimento 1 e experimento 2, sendo que ambos foram realizados em dias distintos, mas, sendo executado no mesmo período do dia, a parte da manhã. Para o experimento 1, foram utilizados 20 ratos Wistar machos pesando 250-350g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física e Esporte da UEL. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas contendo 5 animais, com ração (Nuvilab CR-1, Nuvital) e água *ad libitum*. No experimento 2, foram utilizados 34 ratos Wistar machos pesando 250-350g, que foram divididos em 5 grupos (Controle, 1h, 2h, 3h e 4h). Este estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA-UEL), sob-registro de processo N° 15071.2014.60 (Anexo A).

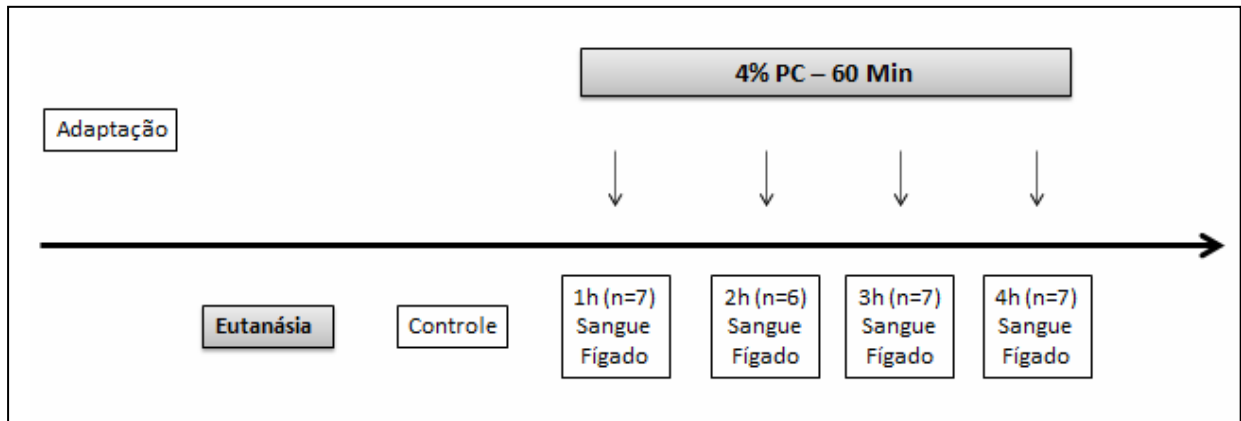
3.2 EXPERIMENTO 1 – CINÉTICA DA HCY

O experimento 1 foi realizado com o intuito de determinar a cinética da Hcy após sessão aguda de exercício de natação bem como analisar a relação intensidade do exercício e concentração plasmática de Hcy. Para tanto, 20 animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (n=10) e Grupo Exercício (n=10). Os animais realizaram três sessões de natação suportando sobrecargas equivalentes a 2%, 4% e 6% do peso corporal, atadas ao tórax (Anexo B, C), por um período de sessenta minutos. Ao final da sessão de exercício, foram coletados 500 µL de sangue por meio de um corte na proximidade distal da cauda do animal nos momentos Pré-exercício (pré), uma hora pós-exercício (1h), duas horas pós-exercício (2h), três horas pós-exercício (3h) e quatro horas pós-exercício (4h) (Figura 2). Previamente as sessões, os animais foram submetidos a quatro sessões de adaptação ao ambiente líquido descritas a seguir (Figura 4). Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical após serem anestesiados com uma dose de anestesia com Quetamina 0,02g e xilazina 0,004g por peso corporal.

Figura 2 – Delineamento do experimento 1.

3.3 EXPERIMENTO 2 – METABOLISMO DA HCY

O experimento 2 foi realizado com o objetivo de analisar os efeitos do exercício físico agudo de natação sobre o metabolismo da Hcy. Para tanto, foram utilizados 34 ratos *Wistar* machos, pesando entre 250-350g, separados em cinco grupos: Grupo Controle sem exercício (GC; n=7) e grupos exercitados que foram eutanasiados após 1 hora (G1h; n=7), 2 horas (G2h; n=6), 3 Horas (G3h; n=7) e 4 horas (G4h; n=7) de exercício. Após quatro sessões de adaptação ao meio líquido (Figura 4), os animais foram submetidos a sessenta minutos de natação suportando sobrecarga de 4% do peso corporal. Vale ressaltar que esta carga foi escolhida de acordo com os dados obtidos no Experimento 1. Ao final de cada sessão, os animais foram eutanasiados nos momentos acima descritos para a extração do fígado e coleta de sangue (Figura 3). O sangue foi utilizado para análise da Hcy plasmática e o fígado para a expressão dos genes chave das enzimas responsáveis pelo metabolismo da Hcy.

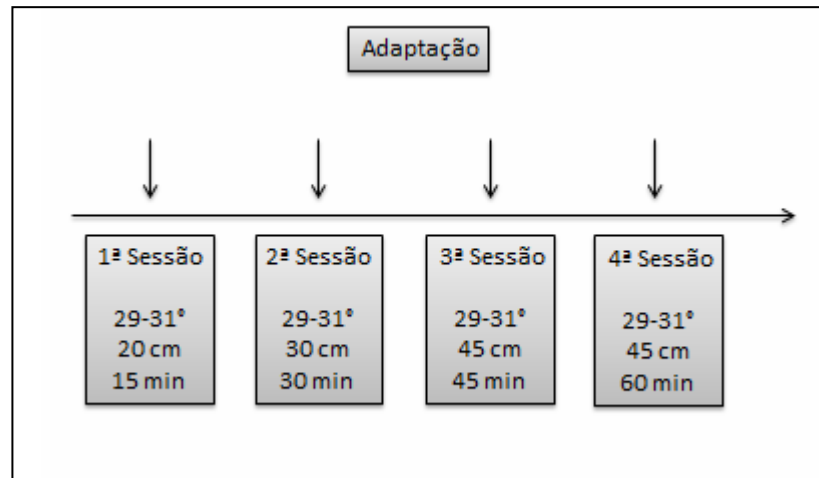
Figura 3 – Delineamento do experimento 2

3.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO - NATAÇÃO

3.4.1 Adaptação ao Meio Líquido - Natação

Anteriormente as sessões agudas de exercício de natação propriamente ditas, todos os animais incluídos nos experimentos 1 e 2 foram submetidos a quatro sessões de adaptação ao modelo de exercício, e ao meio líquido, com intervalo de quarenta e oito horas entre as sessões. A adaptação consistiu em inserir os animais na água de forma progressiva com relação ao tempo de exposição e quantidade de água. Na primeira sessão, os animais foram colocados em grupos de dez animais em um recipiente com 20 cm de altura de água por 15 minutos. Nas sessões subsequentes, foram aumentados a quantidade de água (30 cm, 40 cm e 40 cm) e o tempo de exposição (30min, 45min e 60min). Nesse período, os animais não suportaram qualquer sobrecarga. Em todos os casos, a temperatura da água foi mantida entre 29-31°C.

Figura 4 – Delineamento das sessões de adaptação dos animais.



3.4.2 Sessões Agudas de Exercício Físico - Natação

No experimento 1, foram realizadas três sessões agudas de natação com sobrecargas equivalentes a 2%, 4% e 6% do peso corporal. Durante os testes, os animais nadaram separados em tubos de PVC[®] com 50 cm de altura, inseridos dentro de um recipiente de plástico liso, de forma que ficassem isolados uns dos outros enquanto estivessem nadando. Estes tubos de PVC[®] eram lisos e não possuíam nenhuma ranhura ou suporte para que, de alguma forma, estes animais pudessem se agarrar a borda e descansar. A quantidade de água nas sessões foi mantida (45 cm de altura) e a temperatura da água controlada, variando entre 29-31°C.

Para a sessão aguda suportando sobrecarga, os animais foram pesados previamente e com base no peso corporal do dia, foi realizado o cálculo de sobrecarga conforme descrito por Manchado et. al (2006). A sobrecarga calculada foi atada ao tórax do animal e, após isso, os mesmos foram submetidos ao exercício de natação durante sessenta minutos ininterruptos. Após o término da sessão, os animais foram retirados da água, devidamente secados com toalhas de tecido de algodão e, então, aproximadamente 500 µL de sangue foram retirados e colocados em tubos de plástico (Eppendorf[®] 1,5mL) por meio de um corte na proximidade distal da cauda do animal para determinação das concentrações de Hcy. Para cada intensidade, o sangue foi coletado nos momentos pré-exercício (pré), uma hora pós-exercício (1h), duas horas pós-exercício (2h), três horas pós-exercício (3h) e quatro horas pós-exercício (4h). O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm, sendo o plasma separado e armazenado em freezer a -80°C para posteriores análises de Hcy.

3.5 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados com ketamina 0,02g e xilazina 0,004g/ Kg de peso corporal. Em seguida, procedeu-se com a abertura da cavidade abdominal e o sangue (aproximadamente 1mL) foi coletado da veia cava inferior na sua porção abdominal em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm e o plasma separado e armazenado a -80°C para posteriores análises. O fígado foi extraído e pesado, alíquotado e congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a -80C.

3.6 ANÁLISES DE HOMOCISTEÍNA – CROMATOGRAFIA A GÁS

A determinação das concentrações plasmáticas de Hcy, metionina e cisteína foram realizadas por Cromatografia a gás (GC-17A Shimadzu[®], Kyoto, Japan) pela derivação dos aminoácidos realizados com kit *EZ:Faast Amino Acid Analysis* (Phenomenex[®]). A amostra foi pré-tratada com ditriotretol (DTT) para determinação de Hcy total. Para a determinação de S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH), as amostras hepáticas congeladas foram homogeneizadas em 8% (peso/vol) com ácido tricloroacético e os homogenatos foram centrifugados a 13.000 g durante 5 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram analisados por HPLC utilizando coluna Phenomenex[®] C₁₈ e fase móvel de 96% de tampão A (50 mmol/L NaH₂PO₄ contendo 10 mmol/L a pH ácido heptasulfônico) e 4% de acetonitrila. SAM e SAH separados por meio de gradiente 96-80% de tampão A e 4-20% de acetonitrila durante 15 min. Os picos de SAM e SAH foram detectados a 258 nm.

3.7 ANÁLISE DO LACTATO SANGUÍNEO

As análises dos níveis de lactato foram realizadas a partir da retirada de 10µL de sangue por meio de um corte na proximidade distal da cauda do animal. O sangue foi depositado em tubos de plástico (Eppendorfe[®] 1,5ml) contendo 50µl de Fluoreto de sódio (NaF 1%). A análise foi realizada por meio de Kit Comercial Labtest[®] e leitora de microplacas (Epoch[®]). O comprimento de onda utilizado para a detecção foi de 550 nm.

3.8 ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR

Para análise de mRNA, foram isoladas amostras de 50 mg de fígado, as quais foram pré-tratadas com Trizol® (Invitrogen). O RNA total foi quantificado por meio de espectrofotômetro em OD 260/280 (NanoDrop2000c, Thermo Scientific, USA). A qualidade e integridade do RNA isolado foram avaliados utilizando gel de Agarose (1,2%). As amostras foram pré-tratadas com DNase I (DNA-free Kit, Ambion, part number AM1906, USA) para digestão de DNA genômico; em seguida, o cDNA foi transcrito reversamente a partir de 1000 ng do RNA total com cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, part number 4374966, USA). A quantificação em PCR tempo real foi realizada utilizando 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Os seguintes conjuntos *Probe - Taqman*® de Expressão dos genes (Applied Biosystems, USA) foram utilizados: Rn00578255_m1 (Bhmt), Rn00567215_m1 (Gnmt), Rn00560948_m1 (Cbs), Rn00563454_m1 (Mat1a), Rn01409369_m1 (Mtrr), Rn00690933_m1 (Ciclofilina A). Os ciclos de PCR foram os seguintes: um ciclo de 95°C por 20 segundos, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e Ciclofilina A foi utilizada como gene de referência para normalizar as reações. A quantificação relativa foi determinada pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em valores de média \pm desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) one-way seguido de *post-hoc* de *Tukey* foi utilizado para determinar possíveis diferenças entre os grupos experimentais. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os programas Origin 8.6® e GraphPad Prisma 5® foram utilizados para as devidas análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 – CINÉTICA DA HCY

Os dados descritivos do Experimento 1 estão apresentados na Tabela 1. O peso corporal dos animais não apresentou diferença estatística entre as diferentes sessões agudas de exercício de natação. A diferença significativa encontrada entre as sobrecargas de nado e na concentração de lactato sanguíneo demonstra que as diferentes intensidades escolhidas para as sessões de nado foram suficientes para gerar o estímulo desejado de progressão de carga. Como consequência, o nado com 6% de peso corporal resultou em tempo de permanência menor quando comparado às intensidades 2 e 4%.

Tabela 1 – Dados descritivos do Experimento 1. Peso corporal, sobrecarga no nado, concentração de lactato sanguíneo e tempo de permanência em exercício após sessão aguda de nado

	Controle	2%	4%	6%	P-valor
Peso Corporal (g)	264,8±23,39	256,8±16,14	261,7±12,57	267,5±20,24	0,311
Sobrecarga Nado (g)	-	5,136±0,32 ^a	10,468±0,50 ^b	16,016±1,19 ^c	0,01
Lactato (mmol/L)	3,18±0,35	6,29±1,09 [*]	8,14±1,07 ^{*¶}	15,10±4,61 ^{*¶#}	
Tempo de Exercício (min)	-	60	60	29,58±13,24	

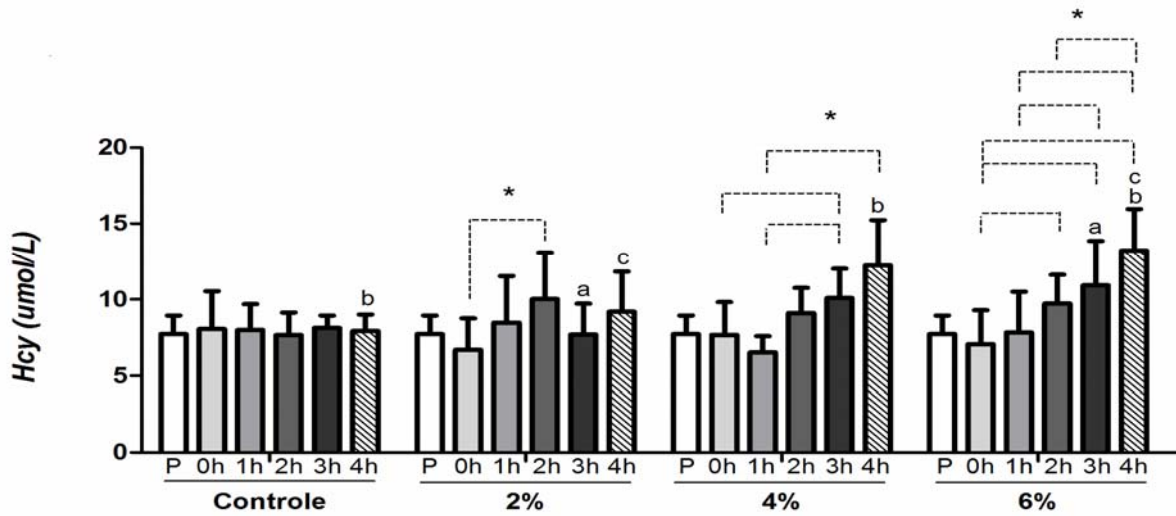
* Diferença para grupo controle p<0,05

¶ Diferença para o Grupo 2% do Peso Corporal p<0,05

Diferença para o Grupo 4% do peso corporal p<0,01.

A figura 5 demonstra a concentração de Hcy pós-sessão aguda de natação. A Hcy apresentou comportamento intensidade-dependente, semelhante ao lactato sanguíneo. O grupo exercitado com sobrecarga de 6% apresentou aumento da concentração de Hcy plasmática a partir de 2h, permanecendo aumentada até 4h após o esforço. Tais aumentos foram significativamente maiores quando comparado com as outras intensidades (Controle, 2%, 4% e 6%).

Figura 5 – Média e desvio-padrão das concentrações de Hcy nas diferentes intensidades testadas (controle, 2%, 4% e 6% do peso corporal) ao longo do tempo (P=Pré, 0h, 1h, 2h, 3h e 4h).



* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) intra-grupos.

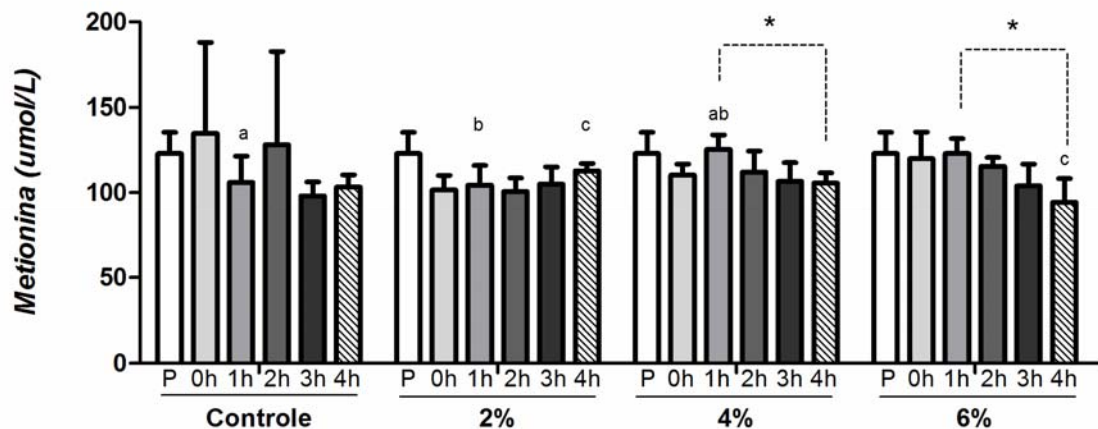
^a Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo 2% no momento 3h para 3h em 6%.

^b Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo controle no momento 4h para 4h em 6%.

^c Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo 2% no momento 4h para 4h em 6%.

A figura 6 apresenta diminuição estatisticamente significativa dos valores de metionina ao longo do tempo, especialmente nos esforços de maior intensidade (4 e 6%). Esse dado suporta a ideia de que houve um aumento do consumo de metionina e consequente aumento da Hcy pós-exercício; tal diminuição também demonstra ser intensidade dependente.

Figura 6 – Média e desvio-padrão das concentrações de metionina nas diferentes intensidades testadas (controle, 2%, 4% e 6% do peso corporal) ao longo do tempo (P=Pré, 0h, 1h, 2h, 3h e 4h).



* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) intra-grupos.

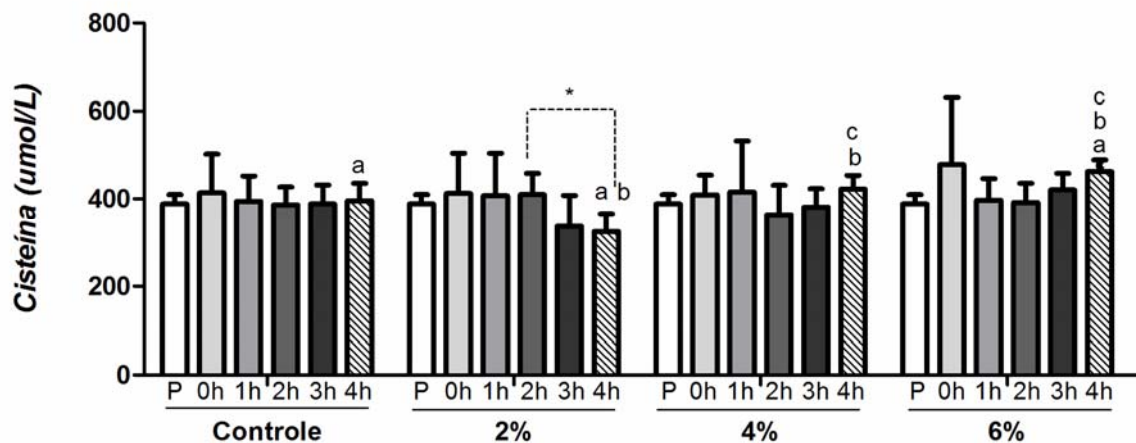
^a Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo controle no momento 1h para 1h em 4%.

^b Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo 2% no momento 1h para 1h em 4%.

^c Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo 2% no momento 4h para 4h em 6%.

A análise de variância aplicada aos dados de cisteína apresentados na figura 7 nos mostra diferenças entre as intensidades (2%, 4% e 6%) no momento 4h; é possível observar que quanto maior a intensidade, maior a concentração de cisteína proveniente da transulfuração da Hcy.

Figura 7 – Média e desvio-padrão das concentrações de cisteína nas diferentes intensidades testadas (controle, 2%, 4% e 6% do peso corporal) ao longo do tempo (P=Pré, 0h, 1h, 2h, 3h e 4h).



* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) intra-grupos.

^a Diferença estatisticamente significativa do grupo controle no momento 4h para 4h em 2% e 6%.

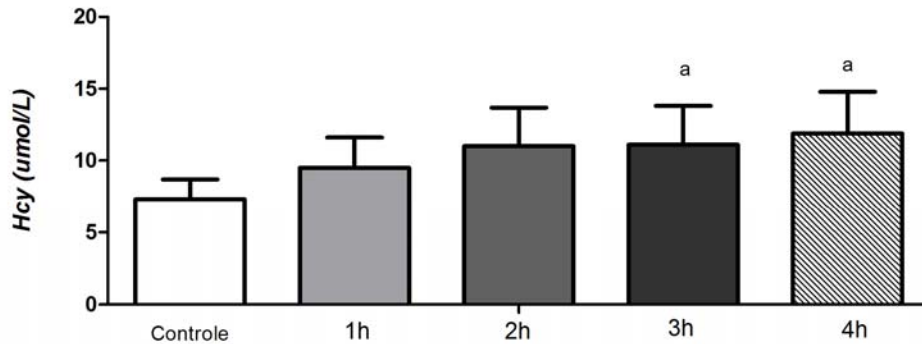
^b Diferença estatisticamente significativa do grupo 2% no momento 4h para 4h em 4% e 6%.

^c Diferença estatisticamente significativa do grupo 4% no momento 4h para 4h em 6%.

4.2 EXPERIMENTO 2 – METABOLISMO DA HCY

A intensidade para este experimento (4% do peso corporal) foi escolhida com base nos resultados encontrados no experimento 1. Esta intensidade, apesar de não ter apresentado as maiores diferenças, foi a que os animais permaneceram nadando pelo mesmo período (60 min), o que facilitou o controle tanto do volume como da intensidade do exercício. Esta intensidade foi eficiente para promover a elevação da Hcy plasmática ao longo do tempo, como mostra a Figura 8. Tal elevação coincide com a diminuição e elevação das concentrações hepáticas de SAM e SAH, respectivamente (figura 9) e diminuição da razão SAM/SAH ao longo do tempo (Figura 9C). Além disso, a análise de expressão gênica demonstrou elevação de MAT1a a qual codifica a enzima MAT, sendo esta responsável pela ativação do aminoácido metionina, transformando-o em SAM. (Figura 10)

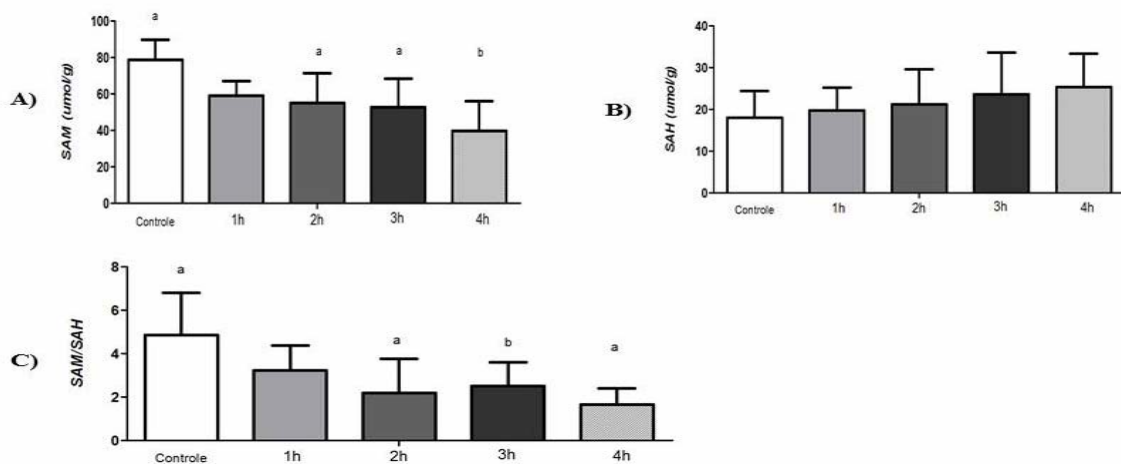
Figura 8 – Média e desvio padrão das concentrações de Homocisteína (Hcy) na intensidade escolhida (4% do peso corporal) ao longo do tempo (Controle, 1h, 2h, 3h e 4h).



^a Diferença estatisticamente significativa do controle (ANOVA) $p < 0,05$.

A tabela 2 apresenta os aminoácidos relacionados ao metabolismo da Hcy. A serina apresentou diferença entre os momentos 1h e 3h. Não foram encontradas mudanças significativas na concentração de cisteína, aminoácido proveniente da transulfuração, em complemento aos dados da enzima CBS, a qual não se alterou em sua expressão ao longo do tempo (Figura 10). Também não foram encontradas mudanças significativas nas concentrações plasmáticas de metionina, glicina e ornitina após o exercício agudo.

Figura 9 – Média e desvio padrão dos valores de (A) S-adenosilmetionina (SAM) e (B) S-adenosilhomocisteína (SAH) e (C) razão entre SAM/SAH nos momentos pós-sessão aguda de natação com 4% do peso corporal.



A) Valores de SAM umol/g de tecido.

^a Diferença estatisticamente significativa para o Controle (ANOVA) $p < 0,05$.

B) Valores de SAH umol/g de tecido.

C) Valores de razão SAM/SAH.

^a Diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$).

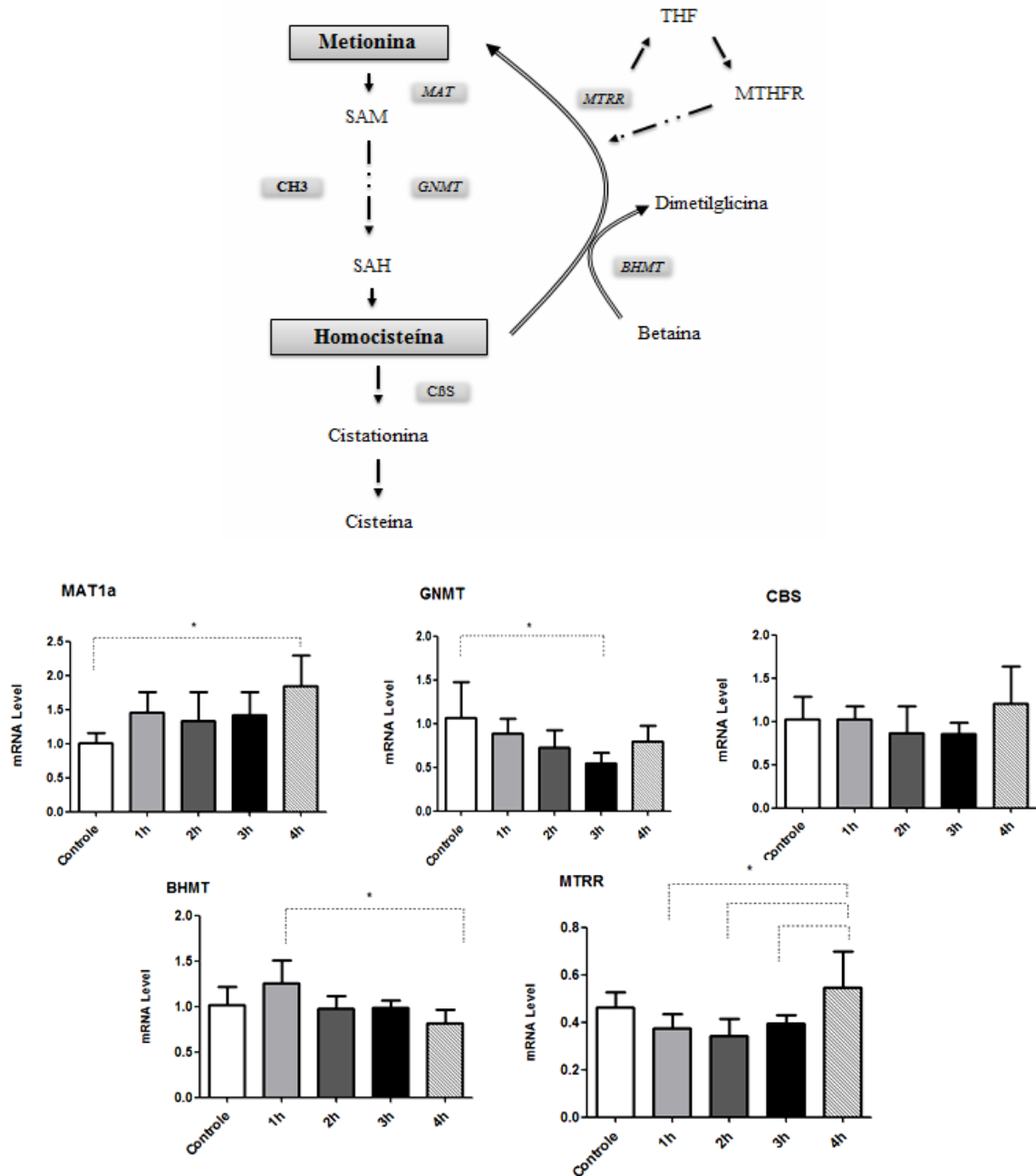
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos aminoácidos plasmáticos relacionados ao metabolismo da homocisteína derivados de cromatografia a gás.

	Controle	1h	2h	3h	4h
Metionina (µmol/L)	30,32 ± 5,21	31,99 ± 7,64	38,28 ± 5,98	36,07 ± 12,40	32,14 ± 5,39
Cisteína (µmol/L)	383,33 ± 63,56	388,61 ± 90,99	418,21 ± 48,19	387,95 ± 41,41	392,99 ± 78,78
Serina (µmol/L)	438,94 ± 173,56	415,57 ± 106,1 ^a	562,05 ± 94,81	662,7 ± 145,40 ^a	504,15 ± 96,72
Glicina (µmol/L)	861,29 ± 217,95	681,4 ± 144,04	802,57 ± 154,14	786,07 ± 195,02	766,95 ± 168,11
Ornitina (µmol/L)	224,65 ± 70,43	197,71 ± 56,48	249,01 ± 143,24	141,84 ± 61,45	168,1 ± 42,57

Valores apresentados em média e desvio padrão. ^aDiferença estatisticamente significativa do momento 1h para 4h. $p < 0,05$.

A figura 10 apresenta a expressão gênica de enzimas chave do metabolismo da Hcy após exercício agudo. O exercício promoveu aumentos significativos na expressão de MAT1a 4h após o esforço e BHMT 1h após o esforço. Redução significativa na expressão de GNMT foi encontrada após 3h de esforço agudo. A expressão de MTRR apresentou diminuição discreta durante as primeiras horas, seguida de aumento 4h após o exercício.

Figura 10 – Média e desvio padrão dos valores de expressão gênica (mRNA) das enzimas responsáveis pelo metabolismo da homocisteína (MAT1a – Metionina adenosiltransferase; **GNMT** – Glicina N-metiltransferase; **CBS** – Cistationina-β-Sintase; **BHMT** - betaína-homocisteína metiltransferase; **MTRR** – 5-Metilenotetrahidrofolato-Homocisteína Metiltransferase Redutase. * Diferença estatisticamente significativa entre os momentos



5 DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 – CINÉTICA DA HCY

A hipótese inicial desse estudo foi confirmada quando demonstrado que a concentração plasmática de Hcy aumenta de forma intensidade-dependente após o exercício agudo. Tal comportamento corrobora com os achados de Herrmann et al. (2003), os quais concluíram que o aumento das concentrações de Hcy pós sessão de exercício físico agudo é dependente da intensidade do exercício. A progressiva elevação na concentração de lactato sanguíneo, observada após os esforços, demonstra que o protocolo de exercício físico agudo proposto foi efetivo em utilizar a relação intensidade/volume como variável dependente.

Prada et al. (2004) sugeriram que a intensidade de 4% do peso corporal para ratos *Wistar* como sendo próximo do limiar de lactato, caracterizando esse esforço como predominantemente aeróbio, o que permitiu que os animais permanecessem nadando por todo o tempo de pré-determinado (60 minutos). Em contrapartida, quando expostos ao esforço suportando 6% do peso corporal, os animais permaneceram metade do tempo realizando o exercício. Ainda segundo Prada et al. (2004), essa sobrecarga (6%) pode ser considerada como acima da máxima fase estável de lactato, portanto, há maior predominância do metabolismo anaeróbio e, conseqüentemente, maiores valores de lactato sanguíneo, tal como observado em nosso estudo.

Deminice et al. (2016), em recente meta-análise, a qual abordou a relação entre a concentração plasmática de Hcy, volume e intensidade de esforço, demonstraram que há relação positiva e significativa entre volume de exercício e a concentração de Hcy; entretanto, o mesmo não foi encontrado com relação à intensidade, não corroborando com nossos achados. No entanto, informações a respeito da intensidade e volume de exercício e seus efeitos sobre a concentração de Hcy são escassos, além de serem variáveis pouco controladas em diversos estudos (DEMINICE, *et al.*, 2016). Por outro lado, de forma positiva, nosso estudo prezou pelo controle minucioso das variáveis volume e intensidade de esforço, o que reforça nossos principais achados.

Faz-se importante notar que o aumento da concentração plasmática de Hcy após sessão aguda de exercício parece ter um comportamento transitório, o qual é de fácil verificação em esforços de baixa intensidade (2%), onde a concentração de Hcy retorna aos níveis de repouso após 4h da sessão aguda (figura 5). Contudo, quando as intensidades são maiores (4 e 6%), não foi possível observar este fenômeno. Iglesias-Gutierrez et al. (2012)

demonstraram aumento transitório da Hcy após sessão aguda de exercício isocalórico (400 Kcal) de baixa intensidade (40% do VO_{2peak}) e alta intensidade (80% do VO_{2peak}), neste estudo de Iglesias-Gutierrez et al. os indivíduos permaneceram em exercício até que as calorias fossem atingidas, contudo, ao fim da sessão aguda de exercício os valores de Hcy já cessaram em subir e após 19hrs do término da sessão, os níveis de Hcy já se encontravam em valores basais.

A partir dos resultados obtidos no experimento 1, podemos perceber que todas as intensidades testadas promoveram aumento da concentração de Hcy plasmática, a qual permaneceu elevada até 4h após o esforço. Por outro lado, vale ressaltar que 4h não foi suficiente para demonstrar tal transição no nosso estudo; sugere-se, a partir disso, que o momento escolhido de 4h ainda não foi o suficiente para esclarecer todo o comportamento deste metabólito. Com exceção da intensidade de 2%, onde após o momento de 4h, indicam que os valores de Hcy parecem retornar aos níveis pré-sessão, as outras intensidades (4% e 6%) parecem que ainda não atingiram seu pico de concentração e, ainda, não denotam para uma queda dos valores, tendo a curva apresentado tendência de elevação em sua concentração.

5.2 EXPERIMENTO 2 – METABOLISMO DA HCY

A elevação da Hcy plasmática no Experimento 2 está associado à diminuição das concentrações hepáticas de SAM por até 4h após o esforço e aumento da expressão gênica da MAT1a. A SAM é a maior doadora de grupamento metila em mamíferos (STIPANUK, 2004). A metionina, proveniente da dieta ou do *pool* de aminoácidos, é ativada por ATP via ação da enzima MAT, culminando na formação de SAM para a metilação de diversos compostos requisitados no organismo. O aumento da expressão gênica de MAT1a demonstra elevação da sinalização para formação de SAM via MAT, provavelmente em resposta a alta demanda de compostos metilados requerida pelo exercício, como, creatina, adrenalina, coenzima Q10, e, como consequência, elevação de seu consumo. Por sua vez, este maior consumo de SAM pode ter refletido no aumento de SAH hepático e na diminuição na taxa SAM/SAH (Figura 9). Como consequência, há significativa elevação na formação de Hcy pelos hepatócitos, sendo esta uma explicação plausível para elevação da Hcy induzida pelo esforço agudo em nosso estudo.

A diminuição de SAM ao longo do tempo com consequente aumento de seu subproduto, a SAH, nos remete a análise da expressão gênica de GNMT, uma vez que este

gene codifica para a síntese de glicina N-metiltransferase, enzima que remove o excesso de SAM por meio da formação de um produto não-tóxico, denominada sarcosina (MARTÍNEZ CHANTAR et al., 2008). Sendo assim, em condições onde há a diminuição de SAM, a enzima GNMT pode diminuir a metilação da glicina para manutenção dos níveis de SAM bem como da razão SAM/SAH. Rowling et al. (2002) demonstraram que a degradação, com perda de atividade, da enzima GNMT, em camundongos, gerou acúmulo de SAM hepático. Em contrapartida, a ativação da enzima GNMT por ácido retinóico, em ratos, reduziu a concentração de SAM (MARTÍNEZ CHANTAR et al., 2008). No presente estudo foram encontrados menores valores de GNMT mRNA ao longo do tempo (3h) após sessão aguda de exercício. Esses dados sugerem que, apesar da alta demanda de reações de transmetilação, as mesmas são específicas e de acordo com seus produtos e/ou subprodutos. Stead et al. (2006) demonstraram em humanos que os dois maiores consumidores de SAM são a formação de creatina, via GAMT, e de fosfatidilcolina, via feniletanolaminaN-metiltransferase (PEMT). Esses autores relatam que essas duas vias juntas são responsáveis por aproximadamente 70% do consumo de SAM e, como consequência, pela formação de Hcy.

Na formação da creatina, o grupamento amino da arginina é transferido para glicina para a formação do ácido guanidinoacético e ornitina em uma reação catalisada pela enzima Arginina:glicina amidinotransferase, presente nos rins. Em seguida, ocorre a transferência do grupamento metil da SAM para o ácido guanidinoacético para formação de creatina e SAH no fígado (TAES *et al.*, 2003). A creatina exerce função de fornecimento de energia rápida no músculo estriado esquelético (WYSS *et al.*, 2002), sendo que aproximadamente 95% da creatina é encontrada nesse tecido e, dessa quantidade, 60% se apresenta em sua forma fosforilada (GUALANO *et al.*, 2010). Estudos comprovam que a suplementação de creatina aumenta o tempo em esforço (VOLEK *et al.*, 1999; DANGOTT *et al.*, 2000; VOLEK *et al.*, 2004), reduz o aumento de Hcy induzida por exercício físico agudo (DEMINICE, VANNUCCHI, *et al.*, 2011), além de prevenir HHcy em modelos animais com câncer (DEMINICE, *et al.*, 2016). Assim, podemos especular que a alta demanda de creatina promovida pelo exercício, especialmente de alta intensidade, promove aumento do consumo de SAM e da formação de Hcy como consequência.

A via de transulfuração, responsável por catabolizar ~30% da Hcy com serina para formar cistationina, que por sua vez será hidrolisada pela enzima Cistationina- γ -liase em cisteína e α -cetoglutarato, não se alterou ao longo do tempo. A menor expressão da enzima CBS explica o aumento da concentração de Hcy, corroborando o fato de que a via responsável por 70% da formação *de novo* da Hcy é a via de remetilação, pois pode ocorrer

em todas as células do organismo, enquanto a transulfuração é realizada apenas em alguns tecidos, tais como fígado e pâncreas, os quais contêm as enzimas CBS e γ -Cistationina- γ -liase (STIPANUK, 2004).

O processo de formação de metionina *de novo* por meio da remetilação da Hcy pode explicar o motivo pelo qual a Hcy permaneceu elevada ao longo do tempo. De forma importante, nesse sentido, houve diminuição da expressão gênica de MTRR e BHMT, ambas enzimas de remetilação. A remetilação através da via da betaína apresentou diminuição de sua atividade do momento 1h para 4h, e isso pode ser devido, pelo menos em partes, a utilização dos estoques de betaína nos momentos iniciais ao término do exercício. Esta via de remetilação faz o uso, preferencialmente, de grupamentos metilas proveniente da ingestão de betaína por meio da dieta (SAKAMOTO *et al.*, 2002) ou da betaína derivada da colina (ZEISEL *et al.*, 2003). Entretanto, a via de BHMT é considerada, por muitos autores, como sendo uma via alternativa de remetilação, pois depende da disponibilidade de betaína no organismo (STIPANUK, 2004; BROSNAN *et al.*, 2007; DEMINICE, R *et al.*, 2013) e isso se dá pelo fato de que a via de remetilação que utiliza a metionina sintase (MS) é responsável pela maior parte da doação dos grupamentos metila para a remetilação hepática de Hcy (MARTINOV *et al.*, 2000).

A via de remetilação da Hcy em metionina (MTRR) que utiliza a MS como catalisadora da reação da doação do grupamento metila do THF para formação *de novo* em metionina, nos mostra que houve aumento na expressão ao longo do tempo; 1h após o final da sessão aguda de exercício, todos os momentos subsequentes foram diferentes para o momento 4h. A diminuição da expressão gênica da enzima MTRR nos momentos 1h, 2h e 3h explicam o fato da Hcy estar em acúmulo progressivo nestes momentos, contudo, o aumento após 4h nos dão indícios que, a partir deste ponto, há maior sinalização para remetilação da Hcy em metionina. A MS apresenta comportamento dependente da biodisponibilidade de SAM e SAH, ou seja, quando houver disponibilidade de SAM a THF será inibida e não ocorrerá a conversão do $N^{5,10}$ -metileno-THF pela enzima $N^{5,10}$ -metileno-THF redutase, aqui analisada pelo seu gene MTRR, ocasionando o acúmulo de Hcy. Este passo da reação parece estar sendo modulado pela disponibilidade de SAM, uma vez que sua diminuição imediatamente após o exercício e sua elevação após 4h coincide com o momento onde há a menor concentração de SAM.

6 CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

- 1) O exercício físico agudo aumenta a concentração de Hcy no plasma de maneira intensidade-dependente em ratos *Wistar* submetidos à natação. Em intensidades menores (2%), tal aumento, apresenta comportamento transitório retornando ao seu estado basal após o término do exercício. Em contrapartida, pontos de análise de Hcy até 4h após exercício não nos permitem afirmar o mesmo comportamento para as intensidades maiores (4% e 6%). Apesar dos aumentos na concentração de Hcy causados pelo exercício, nenhuma intensidade estudada promoveu hiperhomocisteinemia ($> 15 \mu\text{mol/L}$).
- 2) O aumento da demanda de compostos metilados e a diminuição da expressão genica de enzimas chave das vias de remetilação e transulfuração, parecem ser a principal causa do aumento da concentração plasmática de Hcy induzida pelo exercício físico agudo.
- 3) A partir destes achados, novos estudos devem ser conduzidos, para que o entendimento deste metabolismo seja atingido sob efeito do exercício agudo; para tanto, tempos maiores de análise de Hcy pós-sessão aguda de exercício (6h, 8h, 10h, 12h, 24h) são necessários;

REFERÊNCIAS

- BENEDINI, S.; CAIMI, A.; ALBERTI, G.; TERRUZZI, I.; DELLERMA, N.; LA TORRE, A.; LUZI, L. Increase in homocysteine levels after a half-marathon running: a detrimental metabolic effect of sport? **Sport Sciences for Health**, v. 6, n. 1, p. 35-41, 2010.
- BROSNAN, J. T.; DA SILVA, R.; BROSNAN, M. E. Amino acids and the regulation of methyl balance in humans. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, n. 1, p. 52-57, 2007.
- BROSNAN, J. T.; JACOBS, R. L.; STEAD, L. M.; BROSNAN, M. E. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION**-, v. 51, p. 405-414, 2004.
- CHEN, C.-Y.; BAKHIET, R. M.; HART, V.; HOLTZMAN, G. Isoflavones improve plasma homocysteine status and antioxidant defense system in healthy young men at rest but do not ameliorate oxidative stress induced by 80% VO₂pk exercise. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 49, n. 1, p. 33-41, 2005.
- CHENG, H.; LI, H.; BU, Z.; ZHANG, Q.; BAI, B.; ZHAO, H.; LI, R.-K.; ZHANG, T.; XIE, J. Functional variant in methionine synthase reductase intron-1 is associated with pleiotropic congenital malformations. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 407, n. 1-2, p. 51-56, 2015.
- CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 319-24, 2004.
- CRÉE, C.; MALINOW, M. R.; KRANENBURG, G.; GEURTEN, P. G.; LONGFORD, N. T.; KEIZER, H. A. Influence of exercise and menstrual cycle phase on plasma homocysteine levels in young women—a prospective study*. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 9, n. 5, p. 272-278, 1999.
- DANGOTT, B.; SCHULTZ, E.; MOZDZIAK, P. E. Dietary creatine monohydrate supplementation increases satellite cell mitotic activity during compensatory hypertrophy. **International journal of sports medicine**, v. 21, n. 1, p. 13-16, 2000.
- DE CRÉE, C.; WHITING, P. H.; COLE, H. Interactions between homocyst(e)ine and nitric oxide during acute submaximal exercise in adult males. **International journal of sports medicine**, v. 21, n. 4, p. 256-262, 2000.
- DEMINICE, R.; CELLA, P. S.; PADILHA, C. S.; BORGES, F. H.; DA SILVA, L. E. C. M.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; JORDAO, A. A.; ROBINSON, J. L.; BERTOLO, R. F.; CECCHINI, R. Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. **Amino acids**, p. 1-10, 2016.
- DEMINICE, R.; JORDAO, A. A. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. **Amino Acids**, v. 43, n. 2, p. 709-715, 2011.

DEMINICE, R.; RIBEIRO, D. F.; FRAJACOMO, F. T. T. The Effects of Acute Exercise and Exercise Training on Plasma Homocysteine: A Meta-Analysis. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151653, 2016.

DEMINICE, R.; ROSA, F.; JORDAO, A. Methionine and methylation balance: pathways for the production and removal of homocysteine. **Methionine: Biosynthesis, Chemical Structure and Toxicity**. Edited by A. Snegursky. Nova Science Publishers, New York, NY, USA, p. 9-26, 2013.

DEMINICE, R.; ROSA, F. T.; FRANCO, G. S.; JORDAO, A. A.; DE FREITAS, E. C. Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. **Nutrition**, v. 29, n. 9, p. 1127-1132, 2013.

DEMINICE, R.; VANNUCCHI, H.; SIMÕES-AMBROSIO, L. M.; JORDAO, A. A. Creatine supplementation reduces increased homocysteine concentration induced by acute exercise in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 11, p. 2663-2670, 2011.

ENOKA, R. **The neuromechanical basis of human movement**: Champaign, IL: Human Kinetics 2002.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. J. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 15, p. 9508-9513, 1984.

GANJI, V.; KAFAI, M. R. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 4, p. 826-833, 2003.

GAUME, V.; MOUGIN, F.; FIGARD, H.; SIMON-RIGAUD, M.; N'GUYEN, U.; CALLIER, J.; KANTELIP, J.; BERTHELOT, A. Physical training decreases total plasma homocysteine and cysteine in middle-aged subjects. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 49, n. 2, p. 125-131, 2005.

GELECEK, N.; TEOMAN, N.; OZDIRENC, M.; PınAR, L.; AKAN, P.; BEDIZ, C.; KOZAN, O. Influences of acute and chronic aerobic exercise on the plasma homocysteine level. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 51, n. 1, p. 53-58, 2007.

GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D. S.; ROZEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **American journal of human genetics**, v. 56, n. 5, p. 1052, 1995.

GUALANO, B.; ACQUESTA, F. M.; UGRINOWITSCH, C.; TRICOLI, V.; SERRÃO, J. C.; LANCHÁ JUNIOR, A. H. Effects of creatine supplementation on strength and muscle hypertrophy: current concepts. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 3, p. 219-223, 2010.

HAMMOUDA, O.; CHTOUROU, H.; ALOUI, A.; CHAHED, H.; KALLEL, C.; MILED, A.; CHAMARI, K.; CHAOUACHI, A.; SOUISSI, N. Concomitant effects of Ramadan fasting and time-of-day on apolipoprotein AI, B, Lp-a and homocysteine responses during aerobic exercise in Tunisian soccer players. **PlosOne**, v. 11, n. 11 p. 8, 2013.

- HAMMOUDA, O.; CHTOUROU, H.; CHAOUACHI, A.; CHAHED, H.; FERCHICHI, S.; KALLEL, C.; CHAMARI, K.; SOUISSI, N. Effect of short-term maximal exercise on biochemical markers of muscle damage, total antioxidant status, and homocysteine levels in football players. **Asian journal of sports medicine**, v. 3, n. 4, p. 239, 2012.
- HASSAN, M. H.; ABD-ALLAH, G. M. Effects of metformin plus gliclazide versus metformin plus glimepiride on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 5, 2015.
- HERRMANN, M.; SCHORR, H.; OBEID, R.; SCHARHAG, J.; URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W.; HERRMANN, W. Homocysteine increases during endurance exercise. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 41, n. 11, p. 1518-1524, 2003.
- IGLESIAS-GUTIERREZ, E.; EGAN, B.; DÍAZ-MARTÍNEZ, Á. E.; PENALVO, J. L.; GONZALEZ-MEDINA, A.; MARTÍNEZ-CAMBLOR, P.; O'GORMAN, D. J.; UBEDA, N. Transient increase in homocysteine but not hyperhomocysteinemia during acute exercise at different intensities in sedentary individuals. **PlosOne**, v. e37887. doi: 10.1371/journal.pone.0037887, 2012.
- JACQUES, P. F.; BOSTOM, A. G.; WILSON, P. W.; RICH, S.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 3, p. 613-621, 2001.
- KÖNIG, D.; BISSE, E.; DEIBERT, P.; MÜLLER, H.-M.; WIELAND, H.; BERG, A. Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B12. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 47, n. 3-4, p. 114-118, 2003.
- KORAČEVIĆ, D.; DJORDJEVIĆ, V. Effect of trypsin, S-adenosylmethionine and ethionine on L-serine sulfhydrase activity. **Experientia**, v. 33, n. 8, p. 1010-1011, 1977.
- KUTZBACH, C.; STOKSTAD, E. Feedback inhibition of methylene-tetrahydrofolate reductase in rat liver by S-adenosylmethionine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 139, n. 1, p. 217-220, 1967.
- KUTZBACH, C.; STOKSTAD, E. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 250, n. 3, p. 459-477, 1971.
- LAI, S.; DIMKO, M.; GALANI, A.; COPPOLA, B.; INNICO, G.; FRASSETTI, N.; MAZZEI, E. D.; MARIOTTI, A. Early markers of cardiovascular risk in chronic kidney disease. **Renal failure**, v. 37, n. 2, p. 254-261, 2014.
- LI, J.; LI, B.; QI, J.; SHEN, B. [Meta-analysis of clinical trials of folic acid, vitamin B12 and B6 supplementation on plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease]. **Zhonghua xin xue guan bing za zhi**, v. 43, n. 6, p. 554-561, 2015.
- MANCHADO, F. D. B.; GOBATTO, C. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M.; MELLO, M. A. R. D. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 5, p. 259-262, 2006.

MAROTO-SÁNCHEZ, B.; VALTUEÑA, J.; ALBERS, U.; BENITO, P. J.; GONZÁLEZ-GROSS, M. El ejercicio agudo aumenta las concentraciones de homocisteína en varones físicamente activos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 2, p. 325-332, 2013.

MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L.; VÁZQUEZ-CHANTADA, M.; ARIZ, U.; MARTÍNEZ, N.; VARELA, M.; LUKA, Z.; CAPDEVILA, A.; RODRÍGUEZ, J.; ARANSAY, A. M.; MATTHIESEN, R. Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*, v. 47, n. 4, p. 1191-1199, 2008.

MARTINOV, M. V.; VITVITSKY, V. M.; MOSHAROV, E. V.; BANERJEE, R.; ATAULLAKHANOV, F. I. A substrate switch: a new mode of regulation in the methionine metabolic pathway. **Journal of Theoretical Biology**, v. 204, n. 4, p. 521-532, 2000.

MARYAM KOUSHKIE, J. The Influence of acute morning and evening exercise on homocysteine, fibrinogen and platelet. **International Journal of Cardiovascular Research**, v. 10.4172/2324-8602.1000109, 2012.

MCANULTY, L. S.; NIEMAN, D. C.; DUMKE, C. L.; SHOOTER, L. A.; HENSON, D. A.; UTTER, A. C.; MILNE, G.; MCANULTY, S. R. Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 h of running. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 36, n. 6, p. 976-984, 2011.

MURAWSKA-CIALOWICZ, E. The impact of wingate and progressive tests on homocysteine, vitamin B6, B12 and folic acid levels in athletes' blood. **Central European Journal of Sport Sciences and Medicine**, v. 2, n. 4, 2014.

NEUMAN, J. C.; ALBRIGHT, K. A.; SCHALINSKE, K. L. Exercise prevents hyperhomocysteinemia in a dietary folate-restricted mouse model. **Nutrition Research**, v. 33, n. 6, p. 487-493, 2013.

NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocysteine. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 311-320, 2004.

O'DOCHARTAIGH, C. Changes in pulmonary vascular function after acute methionine loading in normal men. **Clinical Science**, v. 106, p. 413-419, 2004.

OBEID, R.; HERRMANN, W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. **FEBS letters**, v. 580, n. 13, p. 2994-3005, 2006.

PRADA, F. J. A.; VOLTARELLI, F. A.; OLIVEIRA, C.; GOBATTO, C. A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Rev Bras Cien Mov**, v. 12, p. 29-34, 2004.

REAL, J.; MERCHANTE, A.; GOMEZ, J.; CHAVES, F.; ASCASO, J.; CARMENA, R. Effects of marathon running on plasma total homocysteine concentrations. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 15, n. 2, p. 134-139, 2005.

ROWLING, M. J.; MCMULLEN, M. H.; SCHALINSKE, K. L. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 3, p. 365-369, 2002.

- SAKAMOTO, A.; NISHIMURA, Y.; ONO, H.; SAKURA, N. Betaine and homocysteine concentrations in foods. **Pediatrics international**, v. 44, n. 4, p. 409-413, 2002.
- SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 19, n. 1, p. 217-246, 1999.
- SOTGIA, S.; CARRU, C.; CARIA, M. A.; TADOLINI, B.; DEIANA, L.; ZINELLU, A. Acute variations in homocysteine levels are related to creatine changes induced by physical activity. **Clinical Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 444-449, 2007.
- STEAD, L. M.; BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E.; VANCE, D. E.; JACOBS, R. L. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 1, p. 5-10, 2006.
- STEENGE, G. R.; VERHOEF, P.; GREENHAFF, P. L. The effect of creatine and resistance training on plasma homocysteine concentration in healthy volunteers. **Archives of internal medicine**, v. 161, n. 11, p. 1455-1457, 2001.
- STIPANUK, M. H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 539-577, 2004.
- SUBASI, S. S.; GELECEK, N.; OZDEMIR, N.; ORMEN, M. Influences of acute resistance and aerobic exercises on plasma homocysteine level and lipid profiles. **TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI**, v. 34, n. 1, p. 9-14, 2009.
- TAES, Y. E.; DELANGHE, J. R.; DE VRIESE, A. S.; ROMBAUT, R.; VAN CAMP, J.; LAMEIRE, N. H. Creatine supplementation decreases homocysteine in an animal model of uremia. **Kidney international**, v. 64, n. 4, p. 1331-1337, 2003.
- VASCONCELLOS, F. V.; KRAEMER-AGUIAR, L. G.; LIMA, A. F. P.; PASCHOALINO, T. M.; MONTEIRO, W. D. Exercício físico e síndrome metabólica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 12, n. 4, 2013.
- VENTA, R.; CRUZ, E.; VALCARCEL, G.; TERRADOS, N. Plasma vitamins, amino acids, and renal function in postexercise hyperhomocysteinemia. **Medicine Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 8, p. 1646, 2009.
- VINCENT, H. K.; BOURGUIGNON, C.; VINCENT, K. R. Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults. **Obesity**, v. 14, n. 11, p. 1921-1930, 2006.
- VOLEK, J. S.; DUNCAN, N. D.; MAZZETTI, S. A.; STARON, R. S.; PUTUKIAN, M.; GOMEZ, A.; PEARSON, D. R.; FINK, W. J.; KRAEMER, W. J. Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, p. 1147-1156, 1999.
- VOLEK, J. S.; RAWSON, E. S. Scientific basis and practical aspects of creatine supplementation for athletes. **Nutrition**, v. 20, n. 7, p. 609-614, 2004.
- WIJEKOON, E.; BROSNAN, M.; BROSNAN, J. Homocysteine metabolism in diabetes. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. Pt 5, p. 1175-1179, 2007.

WRIGHT, M.; FRANCIS, K.; CORNWELL, P. Effect of acute exercise on plasma homocysteine. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 38, n. 3, p. 262-265, 1998.

WYSS, M.; SCHULZE, A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 243-260, 2002.

YAMADA, K.; CHEN, Z.; ROZEN, R.; MATTHEWS, R. G. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 14853-14858, 2001.

ZEISEL, S. H.; MAR, M.-H.; HOWE, J. C.; HOLDEN, J. M. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1302-1307, 2003.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; CARIA, M. A.; TANGIANU, F.; CASU, G.; DEIANA, L.; CARRU, C. Effect of acute exercise on low molecular weight thiols in plasma. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 17, n. 4, p. 452-456, 2007.

ANEXOS

ANEXO A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 033/2015

Londrina, 01 de Abril de 2015

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 02 de Dezembro de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Metabolismo da homocisteína em ratos: influência do exercício físico agudo**", registrado sob o processo CEUA nº15071.2014.60, pesquisa do Centro de Educação Física e Esporte, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 50 ratos Wistar machos, com 1 mês de idade, pesando entre 120 e 150 g e provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo investigar os efeitos do exercício físico agudo sobre a concentração e o metabolismo da Homocisteína (Hcy). Para tanto, os animais serão submetidos a dois experimentos, no primeiro, serão submetidos à esteira ergométrica e escalada com peso para determinar a cinética da concentração de Hcy e será retirado sangue da cauda do animal antes e após os exercícios que posteriormente será centrifugado a 3000 g, terá o plasma separado e armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas. No segundo, com os animais divididos em grupos, serão seguidos os protocolos GCOR, GESC, que consistem na submissão à um teste de esteira para determinação das concentrações das enzimas relacionadas ao metabolismo da Hcy e na submissão dos animais à uma sessão aguda de escalada, respectivamente. Será realizada a abertura da cavidade abdominal e a coleta de sangue pela aorta abdominal em tubos heparinizados dos animais anestesiados no momento da eutanásia, o fígado será retirado e pesado, alíquotado e congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posteriores análises de enzimas relativas ao metabolismo da Hcy. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 12 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Rafael Deminice

Coordenador do Projeto

Departamento de Educação Física

Centro de Educação Física e Esporte

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Educação Física e Diretor(a) do Centro de Educação Física e Esporte.

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 390 - Fone (541) 3371-4900 FAX - Fax 3328-4448 - Caixa Postal 19.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANA - BRASIL

ANEXO B



ANEXO C

