

# Papel do sistema da fosfocreatina na homeostase energética das musculaturas esquelética e cardíaca

Role of the phosphocreatine system on energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles

Lucas Guimarães-Ferreira<sup>1</sup>

## RESUMO

A adenosina trifosfato é a moeda corrente de energia no organismo, sendo utilizada em diversos processos celulares e indispensável para a manutenção da homeostase celular. Mecanismos de regeneração da adenosina trifosfato, a partir de seu produto de hidrólise – a adenosina difosfato – são, dessa forma, necessários. A fosfocreatina é conhecidamente sua fonte mais rápida de regeneração, por meio da enzima creatina quinase. Assim, a principal função desse sistema é atuar como um tampão temporal de energia. Entretanto, ao longo dos anos, diversas outras funções foram atribuídas à fosfocreatina. Isso ocorreu à medida que foram identificadas diversas isoformas da creatina quinase com localização subcelular distinta e acopladas de forma funcional aos sítios geradores e utilizadores de energia, na mitocôndria e citosol, respectivamente. O presente trabalho discutiu o papel central e complexo que o sistema da fosfocreatina desempenha na homeostase energética nas células musculares, bem como suas alterações em quadros patológicos.

**Descritores:** Fosfocreatina; Homeostase; Células musculares; Miócitos cardíacos

## ABSTRACT

Adenosine triphosphate is the present energy currency in the body, and is used in various cellular and indispensable processes for the maintenance of cell homeostasis. The regeneration mechanisms of adenosine triphosphate, from the product of its hydrolysis – adenosine diphosphate – are therefore necessary. Phosphocreatine is known as its quickest form of regeneration, by means of the enzyme creatine kinase. Thus, the primary function of this system is to act as a temporal energy buffer. Nevertheless, over the years, several other functions were attributed to phosphocreatine. This occurs as various isoforms of creatine kinase isoforms have been identified with a distinct subcellular location and functionally coupled with the sites that generate and use energy, in the mitochondria and cytosol, respectively. The present study discussed the central and complex

role that the phosphocreatine system performs in energy homeostasis in muscle cells, as well as its alterations in pathological conditions.

**Keywords:** Phosphocreatine; Homeostasis; Muscle cells; Cardiac myocytes

## INTRODUÇÃO

A adenosina trifosfato (ATP) é a principal forma de energia química, sendo sua hidrólise altamente exergônica. A manutenção da homeostase celular depende de mecanismos que ajustem os processos de geração de ATP de acordo com a demanda energética. Assim, o funcionamento dos sistemas bioenergéticos celulares requer que a ATP produzida e encaminhada aos sítios de utilização – as ATPases – seja finamente acoplada à remoção dos produtos de sua hidrólise – adenosina difosfato (ADP), Pi e H<sup>+</sup> – de forma a evitar a inibição das ATPases, possibilitando a continuidade dos processos biológicos.

A fosfocreatina (PCr) foi descoberta em 1927 no tecido muscular. A creatina livre (Cr) foi gerada a partir de sua quebra, durante a contração muscular.<sup>(1,2)</sup> Em 1962, Cain e Davies inibiram a enzima responsável pela transformação da PCr em Cr, a creatina quinase (CK), e verificaram que os níveis de ATP eram reduzidos rapidamente, até que as contrações musculares não mais podiam ocorrer.<sup>(3)</sup> Hoje, está claro que o sistema da PCr é fundamental na promoção da rápida ressíntese da ATP, por meio da ação da CK (Equação 1).



Uma vez que o sistema PCr/CK possui elevada taxa de geração de ATP, ele é particularmente importante

<sup>1</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.

Autor correspondente: Lucas Guimarães-Ferreira – Avenida Fernando Ferrari, 514 – Goiabeiras – CEP: 29075-810 – Vitória, ES, Brasil – Tel.: (27) 4009-7882 – E-mail: lucas@cefd.ufes.br

Data de submissão: 26/5/2013 – Data de aceite: 12/12/2013

DOI: 10.1590/S1679-45082014RB2741

em situações de alta demanda metabólica, como o exercício físico de alta intensidade, quando a taxa de utilização de ATP excede sua capacidade de geração por outras vias metabólicas.

### O sistema de “lançadeira” de fosfocreatina

Em 1970, Gudbjarnason et al. verificaram que, no músculo esquelético submetido à isquemia, a atividade contrátil é interrompida quando a PCr encontrava-se exaurida, apesar de os níveis de ATP apresentarem-se reduzidos em somente cerca de 20%.<sup>(4)</sup> Os autores sugeriram que a ATP intracelular pode não estar homogeneamente distribuída nas células musculares ou ser capaz de se difundir de forma rápida e eficiente.

Foram identificadas quatro diferentes isoformas de CK com localizações subcelulares distintas: as isoformas citosólicas CK-M e CK-B (de *muscle* e *brain*, devido aos tecidos em que foram identificadas primeiramente) e duas mitocondriais (CKmit sarcomérica, encontrada no músculo, e CKmit ubíqua, no restante dos tecidos). *In vivo*, as isoformas citosólicas se combinam em dímeros, formando a CK-BB, CK-MB e CK-MM, sendo essa última a predominante no músculo esquelético.<sup>(5)</sup> Esses achados, somados aos primeiros experimentos demonstrando que o suprimento com Cr promovia um estímulo à respiração mitocondrial, mostraram que os compartimentos mitocondriais e citoplasmáticos eram interconectados por um sistema organizado de transferência de energia, constituído de diferentes isoformas da CK. Assim, fundaram-se as bases da chamada teoria da “lançadeira” de PCr, proposta formalmente por Bessman, em 1972.<sup>(6)</sup>

No sistema de “lançadeira” de PCr (Figura 1), o fosfato de alta energia é transferido da ATP formada por meio da fosforilação oxidativa, na mitocôndria (sítio de produção), para a Cr, via ação da CKmit, geran-

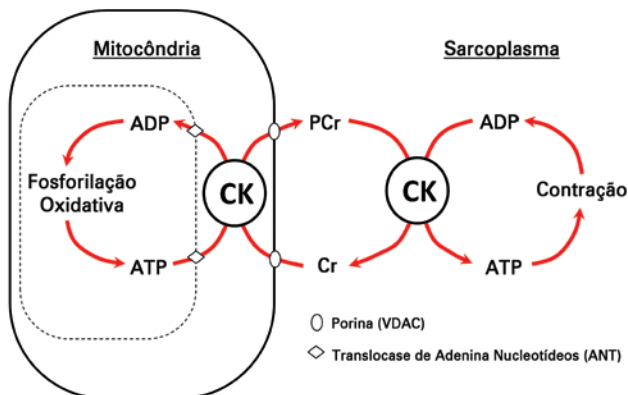
do, assim, PCr e ADP. A PCr se difunde para o citoplasma, no qual, via ação das isoformas citosólicas de CK, gera ATP e Cr. A ATP é, então, utilizada pelas ATPases (sítios de utilização), enquanto a Cr retorna para o interior da mitocôndria. Esta atravessa mais facilmente a membrana mitocondrial que os nucleotídeos de adenina, além de estar presente em níveis mais altos no meio intracelular. Por meio desse sistema de “lançadeira”, a PCr desempenha outra importante função: ela participa da transferência do fosfato de alta energia, presente na ATP, da mitocôndria para o citosol.<sup>(7,8)</sup>

As principais reações químicas que utilizam ATP, nos músculos esquelético e cardíaco, estão associadas ao acoplamento excitação-contração: a miosina ATPase, nas miofibrilas, e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, no retículo sarcoplasmático (SERCA). Além disso, boa parte da ATP é hidrolisada pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no sarcolema. Foi demonstrado que a CK encontra-se localizada nesses sítios, acoplada, de forma funcional, às ATPases.<sup>(8)</sup> Assim, é possível notar que a localização das isoformas da CK é de fundamental importância para que o sistema funcione de forma adequada, ou seja, para que a ATP produzida na mitocôndria seja efetivamente utilizada pelas ATPases citosólicas.

### Função dos sistemas de acoplamento funcional para a homeostase energética celular

Conforme discutido, os dados apontavam para a existência de fatores limitantes para a difusão livre da ATP pelo citoplasma. Hoje, sabemos que a primeira barreira à difusão de moléculas no meio intracelular é a aglomeração macromolecular, que se refere às altas concentrações de macromoléculas no interior das células. A concentração de proteínas no citoplasma é de cerca de 200 a 300mg/mL, o que corresponde a 20 a 30% do volume intracelular.<sup>(9,10)</sup> Na mitocôndria, essa densidade é ainda maior, fazendo com que as proteínas mitocondriais ocupem cerca de 60% do volume da matriz.<sup>(11)</sup> Esse meio de alta viscosidade pode provocar uma diminuição do volume disponível para a difusão livre de substratos,<sup>(12)</sup> determinando, assim, a atividade de muitos processos celulares.<sup>(13)</sup> É por essa razão que resultados de estudos enzimáticos que utilizam soluções diluídas com enzimas isoladas (sistemas *cell free*) podem não condizer com a condição da célula intacta.

Outra barreira à mobilidade de metabólitos no microambiente celular é a ligação destes a macromoléculas.<sup>(14)</sup> Szent-Györgyi e Prior<sup>(15)</sup> demonstraram que a maior parte da ADP permanece firmemente ligada a unidades de actina do citoesqueleto da célula, evidenciando, mais uma vez, a importância da rede de transfe-



ADP: adenosina difosfato; CK: creatina quinase; PCr: fosfocreatina; ATP: adenosina trifosfato; Cr: creatina livre.

**Figura 1.** Sistema de “lançadeira” de fosfocreatina

Adaptado de: Neubauer S. Influence of left ventricular pressures and heart rate on myocardial high-energy phosphate metabolism. *Basic Res Cardiol.* 1998;93 Suppl 1:102-7. Review.

rência de fosfato, já que a ADP citosólica não pode se mover até a mitocôndria, no qual exerce controle sobre a taxa de respiração mitocondrial. Esse problema é contornado pelo sistema de acoplamento funcional desempenhado pela “lançadeira” de PCr.

Cr e PCr são moléculas menores, que possuem nenhuma ou pequena carga negativa quando comparadas aos nucleotídeos de adenina. Experimentos com ressonância nuclear magnética demonstraram que a distância média de difusão (indicador da capacidade de difusão das moléculas) da PCr e Cr (57 e 37 $\mu\text{m}$ ) é muito superior à da ADP e da ATP (1,8 e 22 $\mu\text{m}$ , respectivamente).<sup>(16)</sup> Fica claro que a ADP é, dentre esses metabólitos, a limitante, no que diz respeito ao potencial de difusão pelo citosol. Wallimann et al. reportam que esse potencial, apesar de baixo, ainda é suficiente para manter a capacidade metabólica em células pequenas ou quando a distância entre a mitocôndria e as ATPases citosólicas não é alta, o que não condiz com as propriedades dos músculos esquelético e cardíaco, tornando o sistema de transferência de energia pela CK importante nessas células.<sup>(8)</sup>

Enquanto a aglomeração de macromoléculas parece ser o principal mecanismo de restrição da mobilidade de solutos de maior tamanho, a ligação pode ser o mecanismo mais importante no caso de solutos menores.<sup>(14)</sup> Uma vez que o sítio de produção de ATP no metabolismo oxidativo ocorre no interior da mitocôndria, e que os sítios de utilização estão no citosol, os mecanismos de sobreposição das barreiras impostas pelos baixos coeficientes de difusão dos nucleotídeos de adenina e pela pequena disponibilidade de ADP livre são importantes. Obstáculos oriundos da ligação e da aglomeração macromoleculares podem ser superados graças a um mecanismo de controle e regulação finos do metabolismo, baseados na microcompartimentalização e no acoplamento funcional.<sup>(10)</sup>

O sistema de organização espacial, que permite a interação de enzimas, transportadores e de seus substratos de forma supramolecular, é denominado acoplamento funcional. Esse sistema é determinado por dois mecanismos que atuam de forma sinérgica no acúmulo e na transferência de metabólitos em pequenos espaços intracelulares, conferindo maior eficiência aos processos metabólicos: a canalização metabólica e a microcompartimentalização celular.

Por definição, compartimento é uma região subcelular em que reações bioquímicas são cineticamente isoladas umas das outras.<sup>(17)</sup> No interior das células, o metabolismo depende da organização estrutural das enzimas, formando microcompartimentos. Como as células contêm microambientes distintos, a mensuração

da concentração de metabólitos nas células inteiras ou em determinados tecidos nos dá uma média da concentração celular, mas não da concentração do metabólito em questão que está efetivamente disponível no sítio ativo de determinada enzima. Assim, a compartimentalização celular pode prover um mecanismo adicional de controle da atividade de vias metabólicas.

Por sua vez, por meio da canalização metabólica, um intermediário é transferido entre enzimas adjacentes, dependendo menos da difusão pelo citosol. Por exemplo, foi verificado que a concentração média de oxaloacetato na matriz mitocondrial é muito inferior à necessária para sustentar o funcionamento do ciclo de Krebs. Entretanto, a alta concentração de oxaloacetato, no mesmo microambiente em que se localiza a enzima citrato sintase, permite a manutenção da velocidade desse ciclo.<sup>(13)</sup> Isso ilustra a importância da canalização metabólica e como o metabolismo celular depende da organização estrutural das enzimas e intermediários, formando microcompartimentos.

No sistema da PCr/CK, o acoplamento funcional atua de modo que as diferentes isoformas de CK ajam em duas direções distintas. Enquanto que a CKmit atua na direção da síntese de PCr, as isoformas citosólicas da CK atuam na direção da formação local de ATP, nas intermediações das ATPases. Isso foi demonstrado primeiramente por cálculos matemáticos<sup>(18)</sup> e, então, confirmado experimentalmente por meio de técnicas de ressonância nuclear magnética com fósforo marcado radioativamente.<sup>(19)</sup>

### **Implicações de alterações no sistema fosfocreatina/creatina quinase**

Alguns estudos demonstram que o comprometimento do sistema da PCr/CK está relacionado a algumas alterações funcionais, especialmente no miocárdio. Por exemplo, camundongos transgênicos que não expressam a enzima guanidinoacetato-N-metiltransferase (GAMT), necessária para a síntese de Cr, apresentaram reserva inotrópica reduzida e aumento da suscetibilidade de lesão por isquemia/reperfusão, em razão da deficiência de Cr e PCr.<sup>(20)</sup> Além disso, o miocárdio de camundongos *knock-out* para as isoformas CKmit e CK-M é incapaz de manter os níveis de ATP quando os animais são submetidos a um protocolo de exercício intenso, apesar dos níveis basais não se mostrarem modificados. Além disso, esses camundongos exibem valor de energia livre ( $\Delta G$ ) para a hidrólise da ATP significativamente diminuída durante o esforço.<sup>(21)</sup> Isso demonstra que, nesses animais, para os quais a atividade total da CK é quase nula, o aumento da carga imposta

ao miocárdio torna mais custosa a geração de trabalho, reduzindo a energia livre disponível com a hidrólise da ATP. Entretanto, trabalhos recentes levantam questionamentos quanto à importância do sistema PCr/CK no miocárdio em repouso ou durante exercício de intensidade leve a moderada. Por exemplo, Lygate et al.<sup>(22)</sup> demonstraram que camundongos *knock-out* para a GAMT não apresentaram declínio da atividade locomotora voluntária e da capacidade de se exercitar até a exaustão, quando comparados a animais controle, apesar da deficiência de Cr. Ainda, Branovets et al.,<sup>(23)</sup> utilizando cardiomiócitos de animais deficientes de GAMT, concluíram que a PCr não é essencial para a função cardíaca em repouso. É possível que a deficiência de PCr acarrete prejuízo contrátil somente em exercícios supramáximos, mas pesquisas adicionais são necessárias para elucidar essa questão.

Demonstrou-se também que quadros patológicos que levam à hipertrofia cardíaca, no homem e em modelos animais, são caracterizados pela diminuição das concentrações de Cr e PCr.<sup>(24-29)</sup> Em humanos, um estudo demonstrou que a magnitude da diminuição desse conteúdo está diretamente relacionada ao grau de insuficiência observado.<sup>(26)</sup> Dessa forma, o comprometimento do sistema da PCr parece preceder o desenvolvimento da disfunção contrátil, levando à redução das reservas energéticas disponíveis para regeneração da ATP e tornando o miocárdio mais propenso a desenvolver insuficiência.<sup>(30)</sup>

Os mecanismos que resultam na diminuição da concentração de PCr incluem a menor expressão do transportador de Cr<sup>(27)</sup> e modificações no padrão de expressão das isoformas de CK, que levam à redução dos níveis totais de Cr e da razão PCr/Cr.<sup>(21)</sup> Corroborando esses achados, Ye et al.,<sup>(31)</sup> utilizando um modelo de insuficiência cardíaca congestiva em porcos, verificaram diminuição da razão PCr/ATP e do fluxo através da CK com uma redução importante na expressão da CK-M e CKmit. Estes e outros estudos demonstram que o prejuízo do sistema PCr/CK parece preceder o desenvolvimento da disfunção contrátil, levando à diminuição da reserva energética.<sup>(32)</sup> A superexpressão do transportador de Cr resultou em aumento moderado nos níveis de Cr e glicogênio, e protegeu o miocárdio dos animais do infarto agudo do miocárdio, com redução de 27% da necrose do tecido, além de recuperação funcional melhorada após dano por isquemia/reperfusão.<sup>(33)</sup> De forma similar, a superexpressão da isoforma miofibrilar da CK (CK-M) resultou no aumento do fluxo de ATP pela CK e na função contrátil melhorada em modelo de insuficiência cardíaca.<sup>(34)</sup>

Animais suplementados com ácido  $\beta$  guanidil-propiónico ( $\beta$ -GPA, um competidor pelo transporte de Cr),

que, portanto, apresentam depleção significativa da Cr no miocárdio, também exibem prejuízo na função cardíaca, especialmente em altas cargas de trabalho. Em animais tratados com  $\beta$ -GPA, o aumento da concentração de ADP livre torna o  $\Delta G$  para hidrólise da ATP menos negativo, tornando essa reação menos eficiente em termos energéticos.<sup>(32)</sup> Uma vez que o sequestro de cálcio depende de um  $\Delta G$  altamente negativo e que a CK encontra-se no retículo sarcoplasmático funcionalmente acoplada à SERCA, a queda dos níveis de Cr no miocárdio parece explicar parte das alterações cardíacas observadas em indivíduos e animais que apresentam diminuição das reservas de Cr em condições patológicas ou experimentais.

Esse é o caso do hipertireoidismo, no qual observa-se uma queda acentuada nos estoques de Cr.<sup>(35)</sup> Sabe-se que, nessa condição, o coração apresenta uma limitação na capacidade máxima de trabalho, com acentuada redução nos níveis de ATP à medida que a demanda energética é aumentada.<sup>(36,37)</sup> Talvez a diminuição da oferta de Cr para o miocárdio seja responsável por essa limitação. Foi demonstrado que, em baixas e altas taxas de trabalho impostas ao coração (mensurada pela pressão sistólica de pico *versus* frequência cardíaca), o miocárdio de animais hipertireoideos apresenta níveis diminuídos de ATP e níveis elevados de ADP livre<sup>(35)</sup>, o que sugere que o excesso de hormônios tireoideanos tenha afetado a capacidade de trabalho do coração, em parte em razão da diminuição do estoque de Cr no miocárdio, em paralelo à queda acentuada da expressão do transportador de Cr. Um estudo com ratos hipofisectomizados demonstrou que o hormônio tireoideano promove aumento dos níveis de PCr e da relação PCr/Cr no músculo esquelético, além de acelerar a regeneração da PCr após contrações musculares.<sup>(38)</sup>

Em contrapartida, na indução do estado hipotireoideo em ratos por 3 semanas, Athéa et al.<sup>(39)</sup> verificaram que não afetou a atividade total da CK, bem como a expressão gênica e a atividade da CKmit. Entretanto, as mitocôndrias desses animais apresentaram diminuição da sensibilidade à ADP e à Cr, evidenciada pelo aumento da constante de Michaelis-Menten ( $K_{m_{ADP}}$  de  $189 \pm 12 \mu M$  para  $228 \pm 12 \mu M$  e  $K_{m_{ADP+Cr}}$  de  $65 \pm 5 \mu M$  para  $101 \pm 8 \mu M$ ). Em termos fisiológicos, isso significa que mais ADP e Cr são necessárias, nessa condição experimental, para o estímulo da função mitocondrial. Esse efeito pode ter ocorrido pela diminuição do conteúdo de cardiolipina na membrana mitocondrial, cuja síntese é estimulada pelos hormônios tireoideanos.<sup>(40)</sup> Esse fosfolípido é importante para a ligação da CKmit à membrana mitocondrial.<sup>(41)</sup> Dessa forma, assume-se que, em condições de hipotireoidismo, o sistema de “lança-

deira” de PCr atua em menor ritmo que nas condições de eutireoidismo,<sup>(22)</sup> o que resulta na menor disponibilidade da ATP gerada na mitocôndria para os sítios de utilização no citoplasma. Khushu et al.<sup>(42)</sup> demonstram que, apesar de pacientes com hipotireoidismo apresentarem níveis intramusculares de PCr similares aos de indivíduos eutireoideos, a ressíntese da PCr, após o exercício, é reduzida, indicando redução da capacidade oxidativa no músculo esquelético.

Estudo recente de nosso grupo demonstrou que a suplementação com Cr promove redução das espécies reativas de oxigênio (EROs) no músculo esquelético.<sup>(43)</sup> O aumento da produção de EROs ocorre em diversas doenças metabólicas, neurológicas, endócrinas, dentre outras, e o tratamento com Cr tem se mostrado uma estratégia eficiente em boa parte destas doenças.<sup>(44)</sup> Pesquisas adicionais determinarão o real potencial terapêutico da suplementação com Cr.

## CONCLUSÃO

A compreensão do fenômeno de acoplamento funcional, envolvendo a microcompartimentalização celular e a canalização metabólica, pode ajudar na melhor compreensão da integração entre os diversos sistemas celulares de geração da adenosina trifosfato, que atuam de forma a manter a homeostase das células musculares esqueléticas e cardíacas. Nesse sentido, evidenciamos aqui que a regulação do metabolismo energético celular está intimamente relacionada à organização estrutural dos componentes celulares. Tais evidências trazem à tona algumas funções, por vezes ignoradas, do sistema da fosfocreatina/creatina quinase, que contribuem para o melhor entendimento da fisiologia do músculo, bem como de aspetos clínicos relevantes. Além disso, apontam para questões relevantes que ainda merecem mais investigações multidisciplinares no campo da bioenergética celular.

## REFERÊNCIAS

1. Fiske CH, Subbarow Y. The nature of the “inorganic phosphate” in voluntary muscle. *Science*. 1927;65(1686):401-3.
2. Eggleton P, Eggleton GP. The Inorganic Phosphate and a Labile Form of Organic Phosphate in the Gastrocnemius of the Frog. *Biochem J*. 1927;21(1):190-5.
3. Cain DF, Davies RE. Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1962;8:361-6.
4. Gudbjarnason S, Mathes P, Ravens KG. Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1970;1(3):325-39.
5. Jacobs H, Heldt HW, Klingenberg M. High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1964;16(6):516-21.
6. Bessman SP. Hexokinase acceptor theory of insulin action. New evidence. *Isr J Med Sci*. 1972;8(3):344-52.
7. Bessman SP, Geiger PJ. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science*. 1981;211(4481):448-52. Review.
8. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem J*. 1992;281(Pt 1):21-40. Review.
9. Ellis RJ. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(1):114-9. Review.
10. Saks V, Beraud N, Wallimann T. Metabolic compartmentation - a system level property of muscle cells: real problems of diffusion in living cells. *Int J Mol Sci*. 2008;9(5):751-67.
11. Scalettar BA, Abney JR, Hackenbrock CR. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(18):8057-61.
12. Fulton AB. How crowded is the cytoplasm? *Cell*. 1982;30(2):345-7. Review.
13. Ovádi J, Saks V. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol Cell Biochem*. 2004;256-257(1-2):5-12. Review.
14. Verkman AS. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(1):27-33. Review.
15. Szent-Györgyi AG, Prior G. Exchange of adenosine diphosphate bound to actin in superprecipitated actomyosin and contracted myofibrils. *J Mol Biol*. 1966;15(2):515-38.
16. Yoshizaki K, Watari H, Radda GK. Role of phosphocreatine in energy transport in skeletal muscle of bullfrog studied by <sup>31</sup>P-NMR. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1051(2):144-50.
17. Papadopoulos S, Jürgens KD, Gros G. Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction. *Biophys J*. 2000;79(4):2084-94.
18. Saks VA, Chernousova GB, Gukovsky DE, Smirnov VN, Chazov EI. Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: kinetic properties and regulatory action of Mg<sup>2+</sup> ions. *Eur J Biochem*. 1975;57(1):273-90.
19. Joubert F, Mazet JL, Mateo P, Hoerter JA. <sup>31</sup>P NMR detection of subcellular creatine kinase fluxes in the perfused rat heart: contractility modifies energy transfer pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(21):18469-76.
20. ten Hove M, Lygate CA, Fischer A, Schneider JE, Sang AE, Hulbert K, et al. Reduced inotropic reserve and increased susceptibility to cardiac ischemia/reperfusion injury in phosphocreatine-deficient guanidinoacetate-N-methyltransferase-knockout mice. *Circulation*. 2005;111(19):2477-85.
21. Saupe KW, Spindler M, Hopkins JC, Shen W, Ingwall JS. Kinetic, thermodynamic, and developmental consequences of deleting creatine kinase isoenzymes from the heart. Reaction kinetics of the creatine kinase isoenzymes in the intact heart. *J Biol Chem*. 2000;275(26):19742-6.
22. Lygate CA, Aksentijevic D, Dawson D, ten Hove M, Phillips D, de Bono JP, et al. Living without creatine: unchanged exercise capacity and response to chronic myocardial infarction in creatine-deficient mice. *Circ Res*. 2013;112(6):945-55.
23. Branovets J, Sepp M, Kotlyarova S, Jepihina N, Sokolova N, Aksentijevic D, et al. Unchanged mitochondrial organization and compartmentation of high-energy phosphates in creatine-deficient *GAMT*<sup>-/-</sup> mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(4):H506-20.
24. Seppet EK, Adoyan AJ, Kallikorm AP, Chernousova GB, Lyulina NV, Sharov VG, et al. Hormone regulation of cardiac energy metabolism. I. Creatine transport across cell membranes of euthyroid and hyperthyroid rat heart. *Biochem Med*. 1985;34(3):267-79.
25. Tian R, Ingwall JS. The molecular energetics of the failing heart from animal models—small animal models. *Heart Failure Rev*. 1999;4:235-53.
26. Zhang J, Bache RJ. The molecular energetics of the failing heart from animal models—large animal models. *Heart Failure Rev*. 1999;3(4):255-67.
27. Neubauer S, Remkes H, Spindler M, Horn M, Wiesmann F, Prestle J, et al. Downregulation of the Na<sup>(+)</sup>-creatine cotransporter in failing human myocardium and in experimental heart failure. *Circulation*. 1999;100(18):1847-50.

28. Nakae I, Mitsunami K, Omura T, Yabe T, Tsutamato T, Matsuo S, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy can detect creatine depletion associated with the progression of heart failure in cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(9):1587-93.
29. Nakae I, Mitsunami K, Matsuo S, Horie M. Creatine depletion and altered fatty acid metabolism in diseased human hearts: clinical investigation using <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy and <sup>123</sup>I BMIPP myocardial scintigraphy. *Acta Radiol*. 2007;48(4):436-43.
30. Horn M, Remkes H, Strömer H, Dienesch C, Neubauer S. Chronic phosphocreatine depletion by the creatine analogue beta-guanidinopropionate is associated with increased mortality and loss of ATP in rats after myocardial infarction. *Circulation*. 2001;104(15):1844-9.
31. Ye Y, Gong G, Ochiai K, Liu J, Zhang J. High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model. *Circulation*. 2001;103(11):1570-6.
32. Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res*. 2004;95(2):135-45. Review.
33. Lygate CA, Bohl S, ten Hove M, Faller KM, Ostrowski PJ, Zervou S, et al. Moderate elevation of intracellular creatine by targeting the creatine transporter protects mice from acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2012;96(3):466-75.
34. Gupta A, Akki A, Wang Y, Leppo MK, Chacko VP, Foster DB, et al. Creatine kinase-mediated improvement of function in failing mouse hearts provides causal evidence the failing heart is energy starved. *J Clin Invest*. 2012;122(1):291-302.
35. Queiroz MS, Shao Y, Berkich DA, Lanoue KF, Ismail-Beigi F. Thyroid hormone regulation of cardiac bioenergetics: role of intracellular creatine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(6):H2527-33.
36. Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med*. 1994;331(13):847-53. Review.
37. Polikar R, Burger AG, Scherrer U, Nicod P. The thyroid and the heart. *Circulation*. 1993;87(5):1435-41. Review.
38. Kaminsky P, Walker PM, Deibener J, Barbe F, Jeannesson E, Escanye JM, et al. Growth hormone potentiates thyroid hormone effects on post-exercise phosphocreatine recovery in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res*. 2012;22(6):240-4.
39. Athéa Y, Garnier A, Fortin D, Bahi L, Veksler V, Ventura-Clapier R. Mitochondrial and energetic cardiac phenotype in hypothyroid rat. Relevance to heart failure. *Pflugers Arch*. 2007;455(3):431-42.
40. Mutter T, Dolinsky VW, Ma BJ, Taylor WA, Hatch GM. Thyroxine regulation of monolysocardiolipin acyltransferase activity in rat heart. *Biochem J*. 2000;346 Pt 2:403-6.
41. Schlattner U, Wallimann T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J Biol Chem*. 2000;275(23):17314-20.
42. Khushu S, Rana P, Sekhri T, Sripathy G, Tripathi RP. Bio-energetic impairment in human calf muscle in thyroid disorders: a <sup>31</sup>P MRS study. *Magn Reson Imaging*. 2010;28(5):683-9.
43. Guimarães-Ferreira L, Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Vitzel KF, Nachbar RT, Curi R, et al. Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(11):3905-11.
44. Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S, et al. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids*. 2011;40(5):1385-96.