

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Adilson Santos Andrade de Sousa

Efeitos da Suplementação com Creatina na Asma

São Paulo, SP

2014

Adilson Santos Andrade de Sousa

Efeitos da Suplementação com Creatina na Asma

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho, para obtenção do Título de Mestre em Medicina.

Linha de concentração: Fisiopatologia das Doenças Crônicas não transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira

São Paulo, SP

2014

Sousa, Adilson Santos Andrade de.

Efeitos da Suplementação com Creatina na Asma. / Adilson Santos Andrade de Sousa. 2014.

50 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

Orientador (a): Profa. Dr. Rodolfo de Paula Vieira.

1. Asma. 2. Creatina. 3. Sistema vascular pulmonar.

I. Vieira, Rodolfo de Paula. II. Título

CDU 616

São Paulo, 17 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

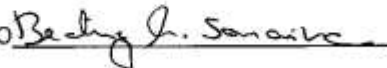
Aluno (a): ADILSON SANTOS ANDRADE DE SOUSA

Título da Dissertação: "Efeitos da suplementação com creatina na asma".

Presidente: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



Membro: PROFA. DRA. BEATRIZ MANGUEIRA SARAIVA ROMANHOLO



Membro: PROF. DR. LUIS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as quatro pessoas mais importantes na minha vida, sem as quais não conseguiria chegar até aqui, finalizando este ciclo de aprendizado tão importante. Dedico aos meus pais Afonso e Maria, que sempre me ajudaram em todas as etapas da vida, me apoiam em cada decisão e me dão sábios conselhos. Ao meu irmão Ailton, que me ajudou e me incentivou, ao meu grande amor, Eliete, que esta sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando.

Agradecimentos

Ninguém faz nada sozinho, e eu, não cheguei até aqui sozinho, sou grato pelas pessoas que ao longo desses dois anos passaram em minha vida, deixando conhecimentos e alegrias.

Agradeço a Deus, por colocar pessoas maravilhosas em minha vida, pela oportunidade de cursar o mestrado e pelas forças que me deste nos momentos difíceis durante esses dois anos.

Agradeço a minha namorada Eliete, pela paciência e incentivo, por cuidar de mim, ser tão amorosa, atenciosa e compreensiva.

Ao meu grande pai Afonso, minha querida mãe Maria e meu grande irmão Ailton por me ajudarem a medida do possível e por terem me ensinado muito, por cuidarem de mim e se preocuparem comigo.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira, ao qual sou imensamente grato por me aceitar de braços aberto como seu orientando, pela paciência, dedicação e pelos ensinamentos que levarei pela vida inteira.

A minha Co-orientadora, Profa. Dra Ana Paula, por transmitir conhecimentos, ser incentivadora, por ser tão amiga.

As técnicas do laboratório de pesquisa, Ângela e Samara, pela amizade e ensinamentos.

Ao técnico do biotério, Rodrigo, por transmitir conhecimentos e pela amizade.

Quero agradecer aos meus amigos de laboratório, ao quais sou imensamente grato, pelo conhecimento adquirido nas conversas entre um experimento e outro, pela amizade que levarei pra vida inteira, Nicole Rigonato, Vanessa Roza, Auriléia Brito, Flávia Greiffo, Paulo Rogério, Manoel Carneiro, Ricardo Wesley, Ana Roberta, Jefferson, Gabriel Moraes. Aos amigos dos programas de mestrado e dos alunos de

iniciação científica, Adriano Silvio, Gabriela Cardoso, Lucas, José Antônio, Otavio, Regiane, Yves, Fábio, Mozania, Guilherme Baldivia, Rodrigo, Thomas, Cidinei.

Quero agradecer aos meus amigos, que mesmo longe me incentivaram e me parabenizaram por dar continuidade aos estudos: José Bento, Cícero Bento, Valdirei, Eliane, Ailton Martiniano, João Paulo, Anderson Pereira, Elisângela Pessoa

Quero agradecer a UNINOVE pela oportunidade e pela bolsa de mestrado concedida e também à CAPES pela bolsa de mestrado concedida durante o meu mestrado.

Resumo

Nos últimos anos têm havido um crescente aumento do número de estudos relacionados com a suplementação da creatina não só para atletas e esportistas, mas também para diversas patologias. O seu uso é muito comum entre atletas, com a finalidade de ganho de força e massa muscular livre de gordura. Alguns estudos também apontam que a creatina tem ação anti-inflamatória e ação antioxidante sobre a musculatura esquelética. Por outro lado, alguns estudos demonstram que a suplementação com creatina, quando não acompanhada de exercício físico, pode piorar a resposta inflamatória alérgica pulmonar, como na asma. Entretanto, os possíveis mecanismos dos efeitos da suplementação da creatina sobre a inflamação alérgica pulmonar ainda não foram completamente elucidados. Por esse motivo, o presente estudo avaliou os possíveis efeitos da suplementação da creatina em um modelo experimental de asma utilizando ovalbumina como antígeno em camundongos BALB/c. Estudamos os efeitos anti-inflamatórios da suplementação da creatina no infiltrado de leucócitos no espaço perivascular e na ativação dos leucócitos perivasculares, além da ativação das células da parede vascular pulmonar. O estudo foi realizado com 48 camundongos BALB/c divididos em 4 grupos contendo 12 animais em cada grupo, sendo grupos: Controle (Controle), Creatina (Cr), Ova (OVA) e Ova+Creatina (OVA+Cr).

A creatina demonstrou redução do infiltrado de células inflamatórias no espaço perivascular bem como a redução da expressão de alguns marcadores inflamatórios na parede vascular pulmonar. Entretanto para alguns marcadores a expressão apresentou elevação quando comparado com os grupos OVA e Controle. A creatina reduziu a expressão de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em alguns marcadores. Concluímos que a suplementação da creatina auxilia na redução do processo inflamatório da asma em alguns marcadores inflamatórios, assim como reduz a expressão de alguns marcadores de estresse oxidativo. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos.

Palavra-chaves: Asma, Creatina, Sistema vascular pulmonar

Abstract

In the recent years, an increasing number of studies investigating the effects of creatine supplementation not only for athletes and sportsmen, but also for various diseases have emerged. Its use is very common among athletes, in order to gain strength and fat free muscle mass. Some studies also suggested that creatine has anti-inflammatory and antioxidant action on skeletal muscle. On the other hand, some studies have shown that creatine supplementation, when not accompanied by physical exercise, may worsen lung allergic inflammatory response, such as asthma. However, the possible mechanisms mediating the effects of creatine supplementation on pulmonary allergic inflammation has not been fully elucidated. Therefore, the present study evaluated the possible effects of creatine supplementation in an experimental model of asthma using ovalbumin as antigen in BALB/c mice. It was studied the effects of creatine supplementation on leukocyte infiltration in the perivascular space and the activation of perivascular leukocytes, beyond the activation of cells of the pulmonary vascular wall. The study was conducted using 48 BALB/c mice divided into 4 groups of 12 animals in each group, as follow: Control (Co), Creatine (Cr), OVA (OVA) and Creatine+OVA (OVA+Cr). The creatine supplementation showed a reduction in the inflammatory infiltrate in the perivascular space as well as the reduction in the expression of some markers in inflammatory mediators in the vascular wall. However, for some markers an opposite effect was observed, since that the expression of these markers displayed increased compared with OVA and Control groups. Also, creatine supplementation reduced the expression of reactive oxygen and nitrogen species. We conclude that creatine supplementation reduces the inflammatory process of asthma by reduction of oxidative stress. However, more studies are needed to elucidate the mechanisms involved.

Key-words: Asthma, Creatine, Pulmonary vascular system

SUMÁRIO

1-	Introdução	1
1.1	Asma – Definição	1
1.2	Asma – Epidemiologia	1
1.3	Asma – Fisiopatologia	1
1.4	Asma – Inflamação	2
1.5	Asma – Vasculatura Pulmonar	3
1.6	Creatina	3
2.	Objetivos Gerais	5
2.1	Objetivos específicos	5
3.	Material e Métodos	6
3.1	Comissão de Ética	6
3.2	Animais	6
3.3	Protocolo Experimental	6
3.3.1	Grupos Experimentais	6
3.3.2	Protocolo de Asma (inflamação pulmonar alérgica crônica)	7
3.3.3	Protocolo de Suplementação com Creatina	7
3.4	Anestesia	7
3.5	Coleta de Sangue e Eutanásia	7
3.6	Lavado Broncoalveolar	8
3.7	Imunohistoquímica	8
3.8	Análise Histomorfométrica	8
3.9	Análise Estatística	9
4	Resultados	10
5	Discussão	32
6	Conclusão	36
7	Referências	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Expressão de 3-nitrotirosina pelos leucócitos perivasculares
- Figura 2 – Expressão de GP91phox pelos leucócitos perivasculares
- Figura 3 – Expressão de SOD-1 pelos leucócitos perivasculares
- Figura 4 – Expressão de SOD-2 pelos leucócitos perivasculares
- Figura 5 – Expressão de GPx pelos leucócitos perivasculares
- Figura 6 – Expressão de NF-kB pelos leucócitos perivasculares
- Figura 7 – Expressão de MMP-9 pelos leucócitos perivasculares
- Figura 8 – Expressão de MMP-12 pelos leucócitos perivasculares
- Figura 9 – Expressão de TIMP-1 pelos leucócitos perivasculares
- Figura 10 – Expressão de TIMP-2 pelos leucócitos perivasculares
- Figura 11 – Fotomicrografias representativas da expressão de NF-kB
- Figura 12 – Expressão de 3-nitrotirosina pelas células vasculares pulmonares
- Figura 13 – Expressão de GP91phox pelas células vasculares pulmonares
- Figura 14 – Expressão de SOD-1 pelas células vasculares pulmonares
- Figura 15 – Expressão de SOD-2 pelas células vasculares pulmonares
- Figura 16 – Expressão de GPx pelas células vasculares pulmonares
- Figura 17 – Expressão de NF-kB pelas células vasculares pulmonares
- Figura 18 – Expressão de MMP-9 pelas células vasculares pulmonares
- Figura 19 – Expressão de MMP-12 pelas células vasculares pulmonares
- Figura 20 – Expressão de TIMP-1 pelas células vasculares pulmonares
- Figura 21 – Expressão de TIMP-2 pelas células vasculares pulmonares
- Figura 22 – fotomicrografias representativas da expressão de 3-Nitrotirosina pelas células vasculares pulmonares

ABREVIATÖES

Cr – Creatina

GINA – Global Initiative for Asthma

GPx – Glutathione Peroxidase

H/E - hematoxilina eosina

IgE – Immunoglobulina E

LBA – Lavado Broncoaveolar

MMP-9 – Matriz Metaloproteinase-9

MMP-12 – Matriz Metaloproteinase-12

NaCl – Cloreto de Sódio

NF-κB – Fator Nuclear-kappa B

OVA – Ovalbumina

RPM – Rotação por minuto

SLC6 – *solute carrier Family 6* – carreador soluto família 6

SOD – Superóxido Dismutase

TIMP-1 – Inibidor Tecidual de Metaloproteinase-1

TIMP-2 – Inibidor Tecidual de Metaloproteinase-2

1 – Introdução

1.1– Asma – Definição

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, que também apresenta o remodelamento das vias aéreas, podendo envolver o sistema vascular pulmonar e o parênquima.^{1,2,3} A doença é caracterizada pela obstrução ao fluxo aéreo e pela hiper-reatividade brônquica.⁴ Seus principais sintomas respiratórios são, chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse, que variam de intensidade e duração.^{5,6} A crise asmática pode ser desencadeada por muitos fatores, como: exercício (particularmente exercício intenso), exposição a alérgenos, mudança de temperatura e humidade, infecções virais ou exposição a agentes irritantes.⁶ Os sintomas são parcialmente reversíveis espontaneamente ou com tratamento farmacológico.⁵

1.2 – Asma – Epidemiologia

A asma é uma doença de prevalência crescente no mundo, afeta pessoas de todas as faixas etárias e de todas as etnias, geralmente tem início na infância. Atualmente estima-se que 300 milhões de pessoas sofram de asma no mundo.^{6,7}

Pela IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, as hospitalizações no Brasil giram em torno de 300 mil a 350 mil internações anuais. Estimativas da *Global Initiative for Asthma* (GINA) é que a asma ocasiona 1 morte a cada 250 mortes no mundo, sendo que muitas delas poderiam ser evitadas.^{5,6}

A asma continua a ser uma causa importante de morbidade e mortalidade pulmonar, causando ônus a saúde pública, além de prejudicar a qualidade de vida dos pacientes.^{8,9}

1.3 – Asma – Fisiopatologia

A patogênese da asma alérgica envolve vários fatores desencadeantes, dependentes da ativação das células dendríticas presentes nas vias aéreas, responsáveis em apresentar o antígeno aos linfócitos T auxiliares.^{5,7,10} Estes fazem

com que os linfócitos B sejam estimulados, produzindo imunoglobulina E (IgE), que funcionam como receptor de antígeno na superfície de mastócitos e basófilos por meio da sua ligação a receptores de alta afinidade.^{4,5,10} Assim, nos próximos contatos com os antígenos o paciente asmático em sua grande maioria desenvolve uma fase imediata e uma fase tardia. A fase imediata inicia-se em poucos minutos após o contato com o alérgeno, ocorrendo a obstrução imediata das vias aéreas, tendo máxima intensidade do quadro asmático em torno de dez a vinte minutos, reversível entre uma a duas horas da exposição ao alérgeno. Descrita por vários autores como sendo a causa principal da obstrução das vias aéreas nesta fase, encontra-se a contração da musculatura lisa brônquica, mediada por histaminas, prostaglandinas D₂ e leucotrienos.^{1,10,11,12} A fase tardia caracteriza-se por obstrução brônquica prolongada, a iniciar entre 4 a 5 horas da exposição ao alérgeno, que pode persistir por horas ou dias, seguida de um processo inflamatório crônico.^{4,7,12,13}

1.4 – Asma – Inflamação

Autopsias realizadas em pacientes que morreram de mal asmático mostravam a inflamação como elemento importante do comprometimento das vias aéreas. Este conceito foi estabelecido há mais de 100 anos e vários estudos *post-mortem* forneceram evidências que a inflamação das vias aéreas é um processo chave da asma.¹² O processo inflamatório das vias aéreas resulta na participação de várias células e elementos celulares. Participam desse processo as células do sistema hematopoiético e também do aparelho respiratório, mesmo as células constitutivas (célula epitelial brônquica, célula epitelial, célula muscular lisa e também a célula endotelial vascular).^{13,14,15,16}

O processo inflamatório da asma apresenta predomínio de infiltrado de eosinófilos, mastócitos e linfócitos.¹⁵ Estes produzem um padrão de citocinas típicas da resposta alérgica, denominada de Th2, que desempenham um papel importante na manutenção da inflamação e no remodelamento das vias aéreas.^{2,3,4} As citocinas são proteínas que regulam e determinam a resposta imunitária, que estimulam as células do sistema hematopoiético e as células estruturais a produção de quimiocinas e outras proteínas, como fatores de crescimento, proteases, anti-

proteases, etc.^{2,3,4,16,17} As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular, que exercem efeitos no tráfego, ativação e diferenciação de células leucocitárias. Entre as quimiocinas mais comuns na asma, temos as eotaxinas, que compreende um grupo de proteínas quimiotáticas.^{4,16,17,18}

1.5 – Asma – Vasculatura Pulmonar

Investigações recentes têm revelado que a vasculatura das vias aéreas em doenças pulmonares, incluindo a asma, são acompanhadas de disfunção endotelial e o remodelamento vascular.^{19,20} As vias aéreas dos pacientes asmáticos são caracterizadas pela hiperpermeabilidade microvascular, a qual é atribuída aos mediadores inflamatórios, resultando em aumento da permeabilidade vascular, produzindo lacuna intercelular e induzindo ao edema intersticial. Esse processo leva também à disfunção endotelial da circulação pulmonar.²¹

Disfunções ou alterações estruturais das células endoteliais levam o endotélio a perda de suas funções fisiológicas. Entre as principais funções fisiológicas das células endoteliais, temos a regulação do tônus vascular, mediada por fatores parácrinos, que atuam localmente na parede dos vasos sanguíneos e no lúmen.^{18,21,22} Em condições fisiológicas normais, estes fatores atuam na vasoconstrição, vasodilatação e na fluidez do sangue. O endotélio também atua no controle da agregação plaquetária, na inibição ou estímulo do crescimento neovascular e é responsável pela modulação da inflamação. Na inflamação crônica as células endoteliais são ativadas por moléculas de adesão resultando em extravasamento contínuo de células inflamatórias e de fluido para o tecido inflamado.^{22,23}

1.6 – Creatina

A creatina é sintetizada pelo organismo principalmente pelos rins, pâncreas e fígado, utilizando-se como substrato, os aminoácidos arginina, glicina e metionina.^{24,25} Entretanto, a maior fonte de creatina é obtida através da alimentação, principalmente carne vermelha e peixes.^{24,25} Assim, podemos dizer que 2% da creatina total do

corpo é obtida através da síntese endógena, enquanto que 98% é adquirida através da alimentação.^{26,27} Uma outra forma de obtenção de creatina é a suplementação com creatina, muito utilizada por atletas e pessoas fisicamente ativas.^{27,28} A creatina ingerida através da suplementação é transportada para dentro das células exclusivamente através do transportador de creatina SLC6 (*solute carrier Family 6*).^{27,28,29}

A absorção da creatina é regulada por vários mecanismos, como por exemplo, a glicosilação e a fosforilação, assim como os níveis extracelulares e intracelulares de creatina são regulados por diferentes mecanismos.²⁹ Leland et al, têm sugerido que a suplementação de creatina pode ser uma auxiliar efetiva para a prática de exercícios físicos. Sua utilização por atletas se dar devido sua melhora no desempenho atlético, na redução da inflamação muscular e recuperação mais rápida após a prática de atividade física.²⁹

Alguns estudos tem demonstrado possíveis efeitos antioxidantes da suplementação com creatina, levando a pesquisadores a estudarem a suplementação da creatina e seus possíveis efeitos sobre a ação oxidante.^{30,31} Os possíveis efeitos da creatina pode derivar de diferentes mecanismos de ação, tais como os envolvidos na estabilização da membrana celular e melhora da capacidade de energia celular ou das suas próprias propriedades antioxidante.²⁴ Por fim, um estudo recente demonstrou que a creatina pode regular também a resposta imunológica de macrófagos, abrindo uma nova área de investigação no campo da suplementação com a creatina.³²

2. – Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da suplementação com creatina sobre a inflamação perivascular em um modelo experimental de asma e também os efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação de leucócitos perivasculares e sobre a ativação das células da parede vascular em um modelo experimental de asma.

2.1 – Objetivos específicos

Avaliar a expressão dos marcadores 3-Nitrotirosina, 8-isoprostano, GP91Phox, MMP-12, MMP-9, NF-KB, SOD-1, SOD-2, GPX, TIMP-1 e TIMP-2 pelos leucócitos perivasculares e a respectiva expressão desses marcadores na parede dos vasos pulmonares em um modelo experimental de asma suplementados com creatina.

3 – Material e Métodos

3.1 – Comissão de Ética

O presente estudo foi realizado utilizando-se as lâminas histológicas coradas com H/E e também através da técnica de imunohistoquímica para diversos anticorpos, não analisados da tese de doutorado do Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira. Dessa forma, nenhum experimento adicional foi realizado, senão somente a análise de lâminas já prontas e anteriormente previstas no projeto que foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-FMUSP), protocolo nº 503/05.

3.2 – Animais

Foram utilizados 48 animais machos da linhagem BALB/c adultos jovens (18-20g), obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, os quais foram mantidos sobre condições controladas de temperaturas (22º-25ºC) e luminosidade (ciclo circadiano) e 70% de umidade relativa. A alimentação constou de água e ração, “*ad libitum*”.

3.3 – Protocolo Experimental

3.3.1 – Grupos Experimentais

Cada um dos 04 grupos experimentais foi constituído por 12 animais sendo:

Controle (Controle) – Submetidos à inalação com soro fisiológico 0,9%.

Creatina (Cr) – Submetidos à suplementação oral com creatina e à inalação com soro fisiológico 0,9%.

Ovalbumina (OVA) – Sensibilizados e desafiados com solução de OVA.

Ovalbumina + Creatina (OVA+Cr) – Sensibilizados e desafiados com solução de OVA e submetidos à suplementação oral com creatina.

3.3.2 – Protocolo de Asma (inflamação pulmonar alérgica crônica)

Foram realizadas 04 administrações intra-peritoniais (i.p) de OVA (20µg/animal) diluída em soro fisiológico (NaCl 0,9%), na proporção de 1g/10mL, correspondendo a 20µg/OVA/animal, no primeiro dia do protocolo, após 14, 28 e 48 dias do início do protocolo experimental. A partir do dia 21 do experimento, foi iniciada a inalação com solução de OVA 1% diluída em soro fisiológico 0,9%, realizada 03 vezes por semana, 30 minutos cada sessão, até o dia 51 do protocolo experimental. Para a realização da inalação, os camundongos foram colocados numa caixa de acrílico, acoplada a um nebulizador ultrassônico, e submetidos à inalação de um aerossol de (OVA 1%) preparado conforme descrito acima. Os animais não sensibilizados foram submetidos à inalação com soro fisiológico 0,9%.

3.3.3 – Suplementação com Creatina

A Creatina foi diluída em água potável e administrada por via oral, através do processo de gavagem. Durante todo o protocolo experimental, foram utilizados 0,5gr/Kg/Creatina administrados de segunda a sexta-feira. A administração de creatina foi realizada logo após a inalação com OVA ou soro fisiológico.

3.4 – Anestesia

Setenta e duas horas após a última inalação com OVA e 24 horas após a última gavagem os animais foram anestesiados com tiopental sódico (6mg/Kg i.p).

3.5 – Coleta de Sangue e Eutanásia

Com os animais anestesiados, foi realizada a laparotomia onde foi realizada uma incisão de aproximadamente 2cm e a aorta abdominal foi exposta. Foram coletados 1ml de sangue via aorta abdominal seguido da eutanásia por exsanguinação. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 7 minutos a 4°C e o soro foi armazenado para possíveis análises posteriores.

3.6 – Lavado Broncoalveolar

Após traqueostomia, através da inserção de uma cânula de 18G, os pulmões foram lavados com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%), com o volume de 3 x de 0,5ml. O material recuperado do lavado foi centrifugado a 1000 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para possíveis análises posteriores. O botão celular foi ressuspensionado em 1 ml de PBS e a determinação do número de células totais no LBA foi realizada por meio de contagem na Câmara de *Neubauer*. Alíquotas do material ressuspensionado foram utilizadas para preparação de lâminas de *cytospin* as quais foram coradas com May-Grunwald-Giemsa para a contagem diferencial de células.^{13,22,24}

3.7 – Imunohistoquímica

Após a coleta do lavado broncoalveolar, os pulmões foram perfundidos com 0,3ml de formol 10% para uma pré-fixação e a traquéia foi obstruída. A caixa torácica foi aberta e o sistema cardiopulmonar foi coletado inteiramente e imediatamente imerso em formol 10% por 24 horas. Após esse período, os pulmões foram submetidos à rotina histológica, onde os cortes foram colocados em lâminas silanizadas (previamente preparadas com poly-L-lisina-Silane) para que os seguintes anticorpos fossem aplicados (todos provenientes da empresa Santa Cruz®, CA, EUA): anti-NF- κ B, anti-8-isoprostano, anti-3-nitrotirosina, anti-GP91phox, anti-SOD-1, anti-SOD2, anti-GPX, anti-MMP-9, anti-MMP-10, anti-TIMP-1, anti-TIMP-2.

3.8 – Análise Histomorfométrica

As lâminas foram observadas através de um microscópio da marca Nikon®, Modelo Eclipse E-200, as imagens fotografadas através de uma câmera digital da marca Photometrics®, Modelo Cool Snap cf, devidamente acoplada ao microscópio.

A coleta e análise das imagens foram realizadas através do software Image ProPlus, versão 4.11.

Primeiramente, foram realizadas a medida da densidade de eosinófilos no compartimento perivascular conforme previamente descrito³. Utilizando a mesma técnica histomorfométrica, foram avaliadas também o número de leucócitos positivos para as proteínas marcadas com os anticorpos descritos no item 3.6. Assim, o infiltrado de células inflamatórias positivas para os diversos marcadores imunohistoquímicos citados acima no compartimento perivascular foram expressas em células positivas por mm².³ Em seguida foram fotografados 5 vasos pulmonares por lâmina e por animal, onde a área total da parede do vaso foi determinada e então avaliada a expressão pela parede do vasão de cada uma das proteínas marcadas com anticorpos descritos no item 3.6.

A positividade das áreas para cada marcador foi estabelecida previamente através de um gradiente de cor (denominada macro), a qual foi utilizada para a análise de todas as lâminas, evitando dessa forma qualquer interferência do pesquisador na determinação das áreas positivas em cada uma das lâminas analisadas. Foram medidas as áreas totais dos 5 vasos por lâmina por animal e as respectivas áreas positivas para os marcadores utilizados. Dessa forma, estabelecemos uma proporção de volume (porcentagem) da parede do vaso que esteja expressando as proteínas que serão estudadas.

3.9 – Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad Prism 5.0, utilizando-se ANOVA de um fator, seguido do *poshoc test Newman Keuls* para dados paramétricos e *poshoc test Dunn's* para dados não paramétricos. Os valores foram considerados significantes para $p < 0.05$.

5 – Resultados

Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação de leucócitos perivasculares: estresse nitrosativo (3-nitrotirosina) e estresse oxidativo (Gp91phox).

Os resultados apresentados na Figura 1 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de 3-nitrotirosina pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$). De maneira similar a sensibilização e desafio inalatório com a OVA também aumentou a expressão de 3-nitrotirosina pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$). Entretanto, não houve diferença quando comparados os grupos Cr x OVA x OVA+Cr ($p > 0.05$).

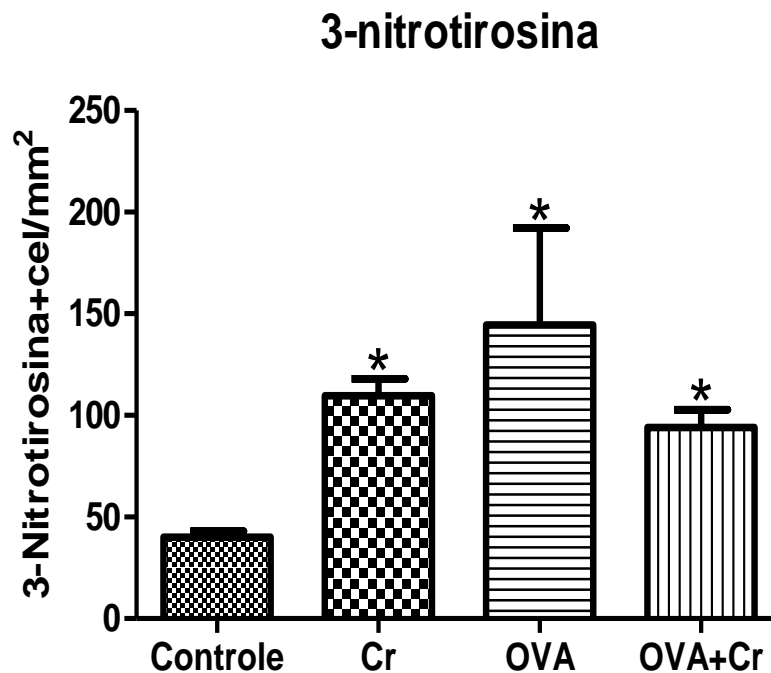


Figura 1 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da 3-Nitrotirosina pelos leucócitos perivasculares. Valores expressos como média e desvio padrão. * $p < 0.05$ comparado com o grupo controle.

Os resultados apresentados na Figura 2 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de Gp91Phox pelos leucócitos perivascularares quando comparado ao grupo controle e ao grupo OVA ($p < 0.05$).

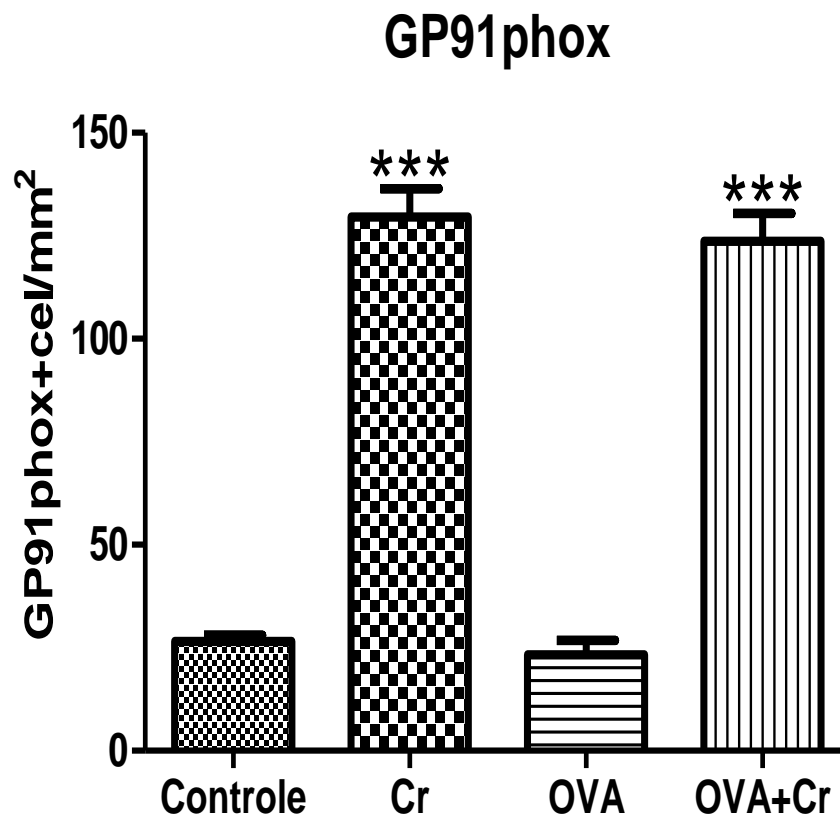


Figura 2 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da Gp91phos pelos leucócitos perivascularares. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação de leucócitos perivasculares: enzimas antioxidantes (SOD-1, SOD-2, GPX).

Os resultados apresentados na Figura 3 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de superóxido dismutase 1 (SOD-1) pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle e ao grupo OVA ($p<0.001$).

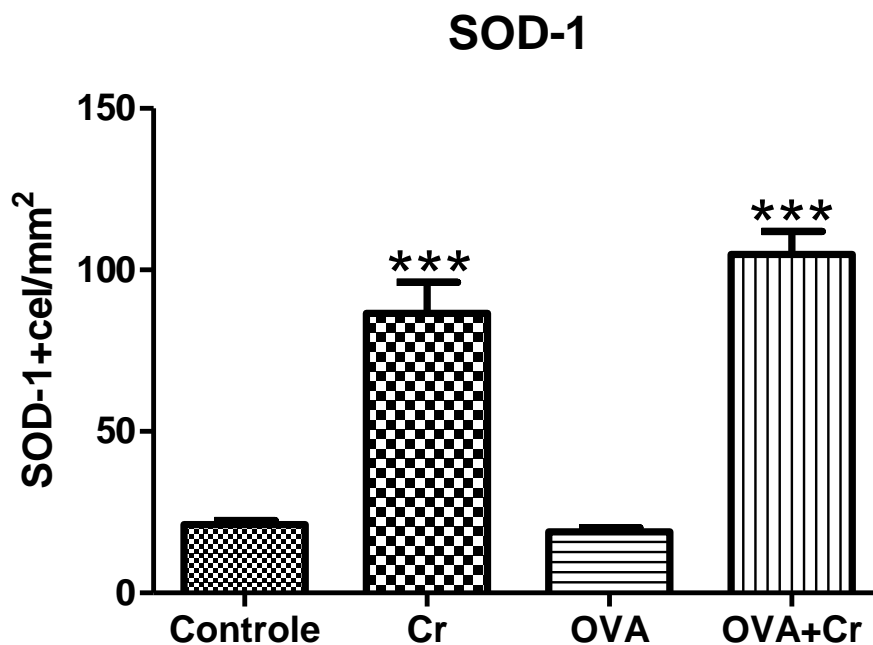


Figura 3 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da SOD-1 pelos leucócitos perivasculares. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p<0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de superóxido dismutase 2 (SOD-2) pelos leucócitos perivascularres quando comparado ao grupo controle e ao grupo OVA ($p<0.001$).

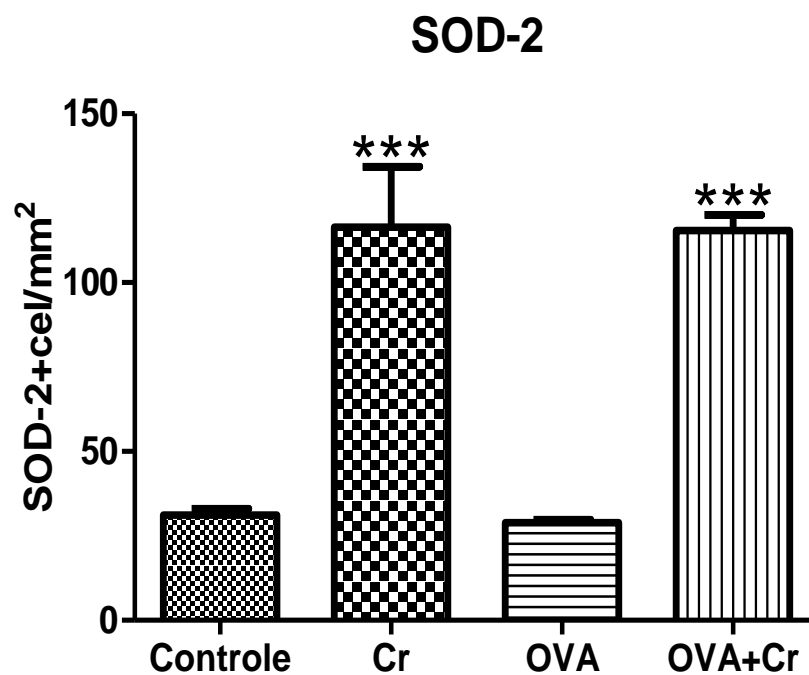


Figura 4 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da SOD-2 pelos leucócitos perivascularres. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p<0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de glutathione peroxidase (GPx) pelos leucócitos perivascularres quando comparado ao grupo controle e ao grupo OVA ($p<0.001$).

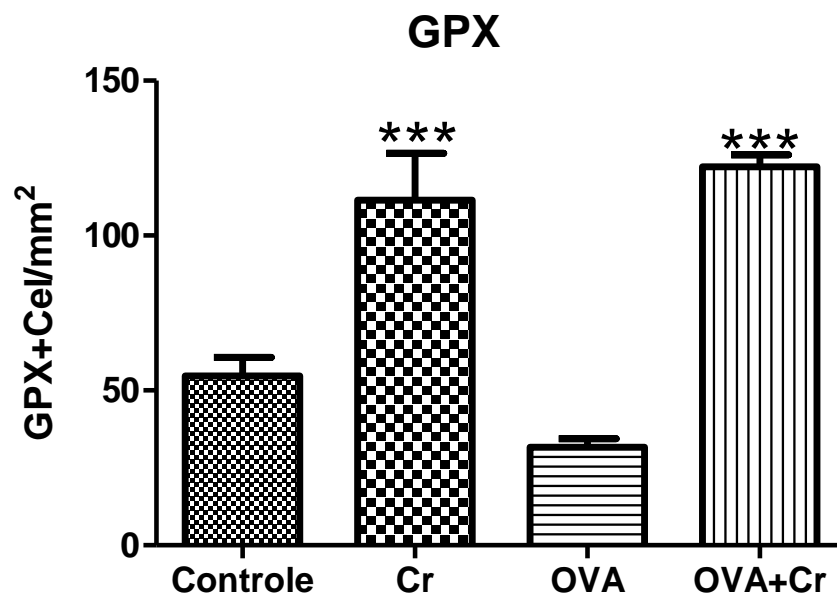


Figura 5 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da GPX pelos leucócitos perivascularres. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p<0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação de leucócitos perivasculares: ativação do NF-kB.

Os resultados apresentados na Figura 6 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de NF-kB pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle e OVA ($p<0.001$). Os resultados também demonstram que a sensibilização e desafio inalatório com a OVA também aumentou a expressão de NF-kB pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle ($p<0.05$).

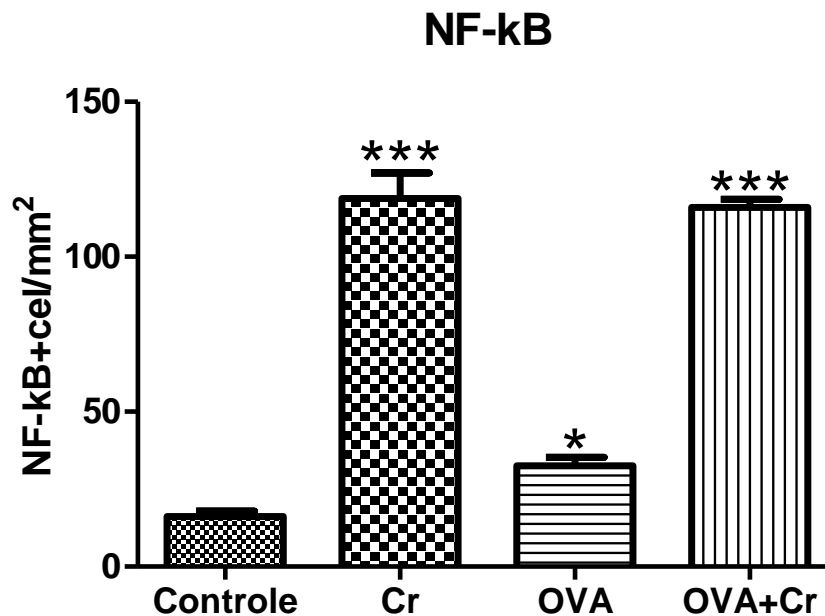


Figura 6 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão do NF-kB pelos leucócitos perivasculares. Valores expressos como média e desvio padrão. * $p<0.05$ comparado ao grupo Controle. *** $p<0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação de leucócitos perivascularres: ativação das matriz metaloproteases (MMP-9, MMP-12) e inibidores das matriz metaloproteases (TIMP-1, TIMP-2).

Os resultados apresentados na Figura 7 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de MMP-9 pelos leucócitos perivascularres quando comparado ao grupo controle e OVA ($p<0.001$). Os resultados também demonstram que a sensibilização e desafio inalatório com a OVA também aumentou a expressão de MMP-9 pelos leucócitos perivascularres quando comparado ao grupo controle ($p<0.01$).

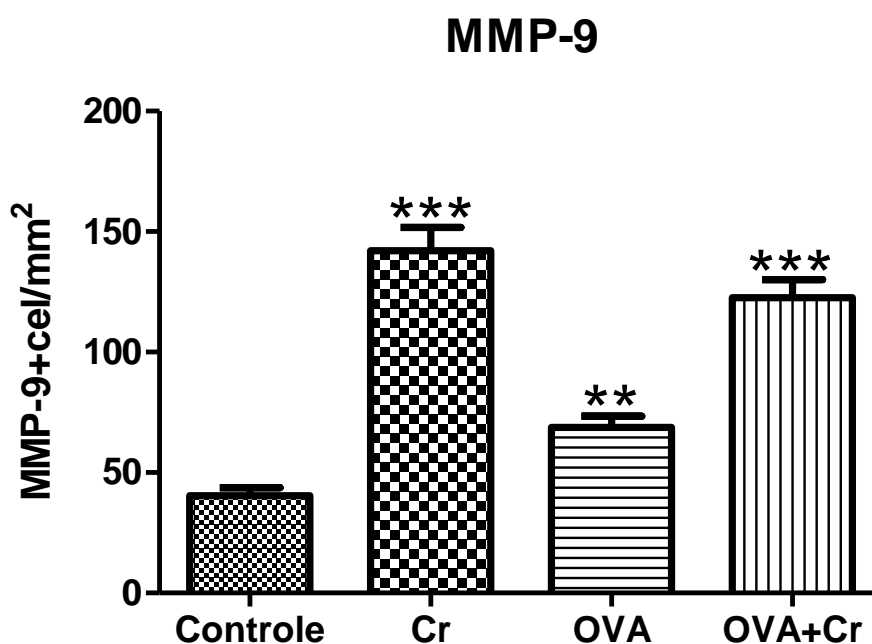


Figura 7 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da MMP-9 pelos leucócitos perivascularres. Valores expressos como média e desvio padrão. ** $p<0.01$ comparado ao grupo Controle. *** $p<0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 8 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados aumentou significativamente a expressão de MMP-12 pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle ($p<0.05$) e também em camundongos sensibilizados quando comparado ao grupo OVA ($p<0.01$). Os resultados também demonstram que a sensibilização e desafio inalatório com a OVA também aumentou a expressão de MMP-12 pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle ($p<0.05$).

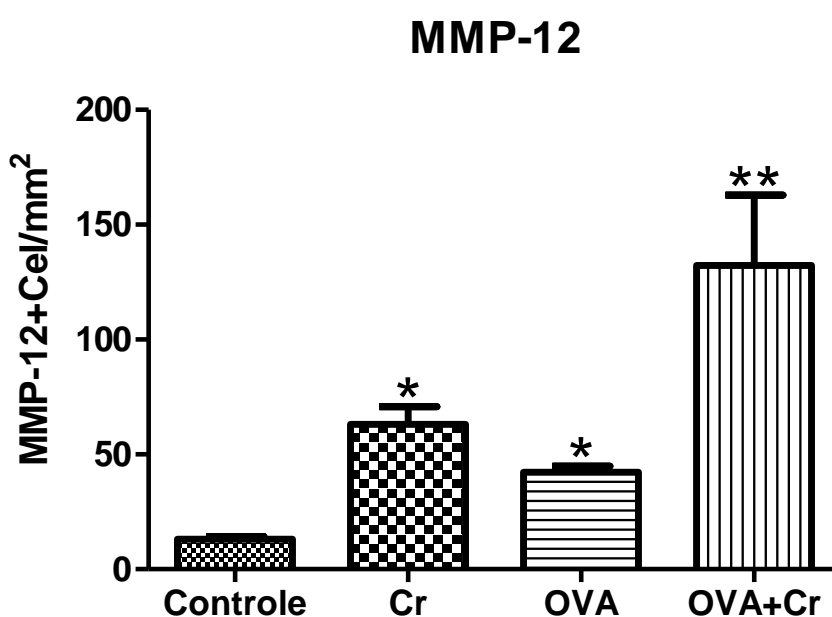


Figura 8 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da MMP-12 pelos leucócitos perivasculares. Valores expressos como média e desvio padrão. * $p<0.05$ comparado ao grupo Controle. ** $p<0.01$ comparado a todos os demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 9 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de TIMP-1 pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle e ao grupo OVA ($p < 0.001$).

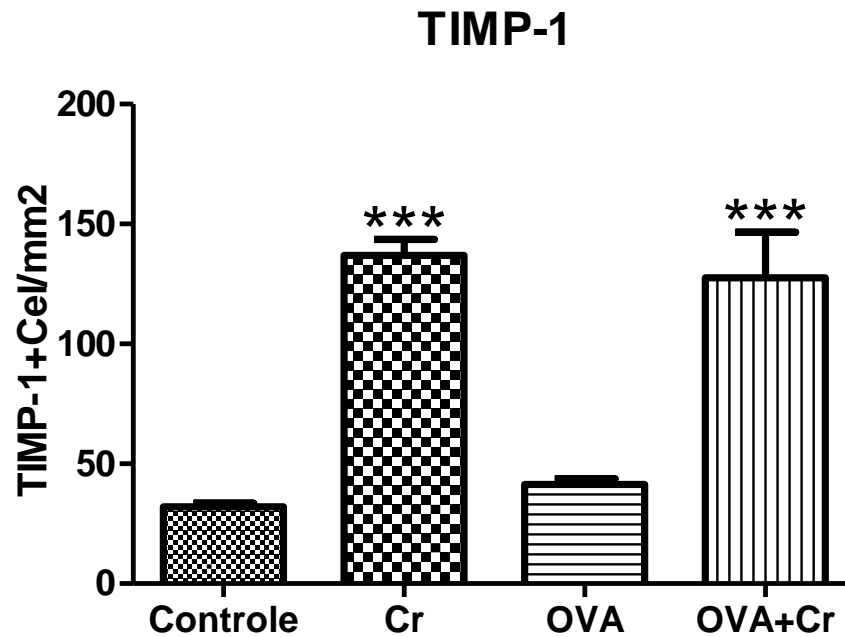


Figura 9 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da TIMP-1 pelos leucócitos perivasculares. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 10 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de TIMP-2 pelos leucócitos perivascularres quando comparado ao grupo controle e ao grupo OVA ($p < 0.01$).

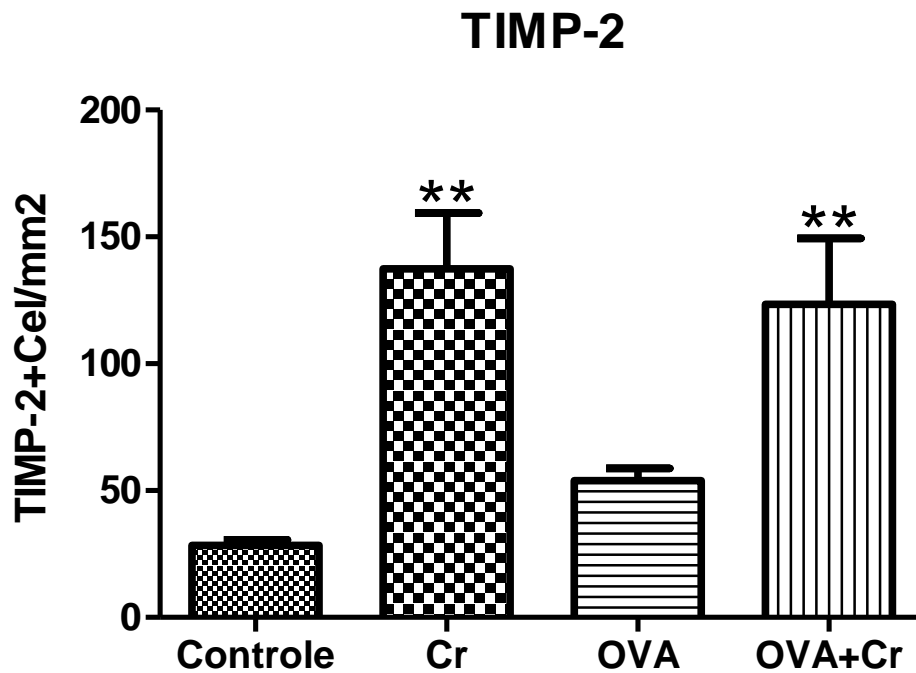
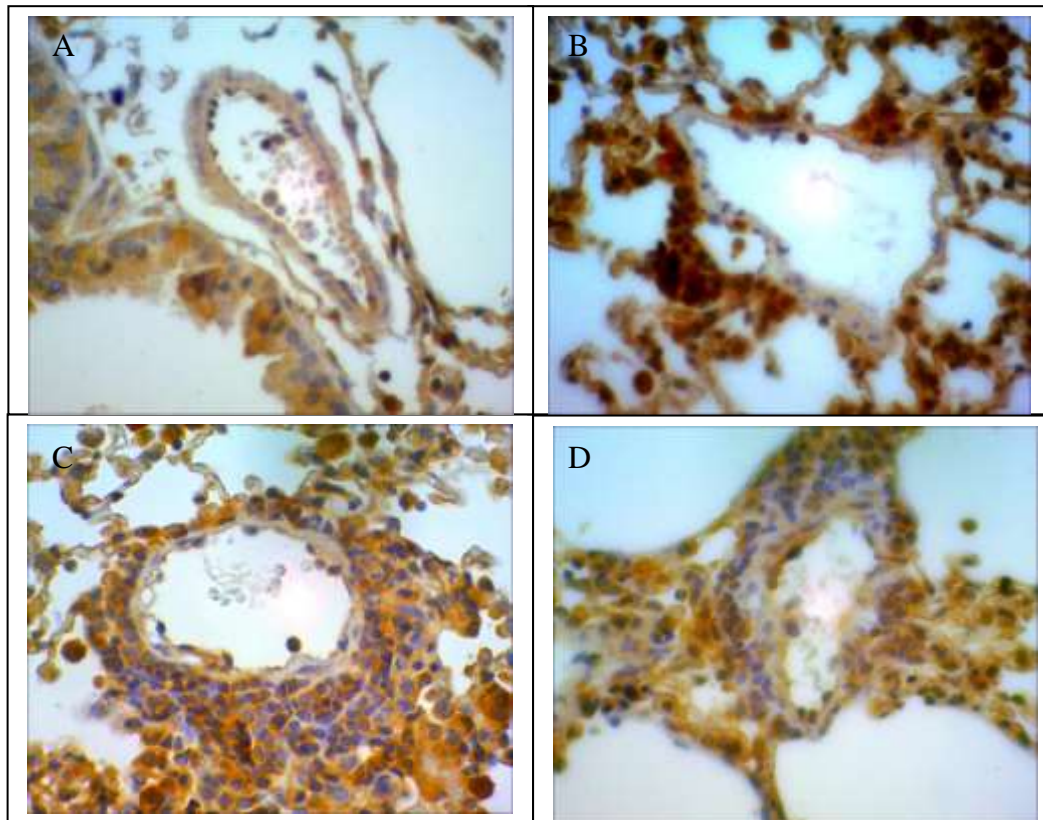


Figura 10 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da TIMP-2 pelos leucócitos perivascularres. Valores expressos como média e desvio padrão. ** $p < 0.01$ comparado a todos os demais grupos.

A Figura 11 apresenta fotomicrografias representativas da expressão de NF- κ B pelos leucócitos perivascularares pulmonares dos grupos Controle (A), Cr (B), OVA (C) e OVA+Cr (D). Aumento de 400x.



Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação das células vasculares pulmonares: estresse nitrosativo (3-nitrotirosina) e estresse oxidativo (Gp91phox).

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados diminuiu significativamente a expressão de 3-nitrotirosina pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado ao grupo controle e ao grupo OVA ($p < 0.001$).

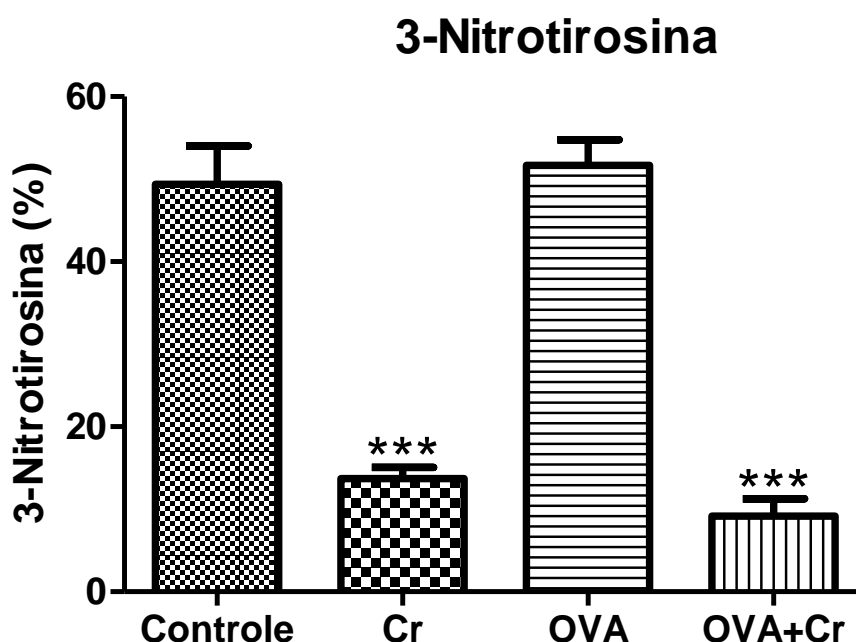


Figura 12 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da 3-Nitrotirosina pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0.001$ comparado a todos os demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 13 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados diminuiu significativamente a expressão de Gp91Phox pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado ao grupo Controle e ao grupo OVA ($p < 0.001$). Os resultados também demonstraram que a sensibilização e desafio inalatório com OVA diminuiu significativamente a expressão de Gp91Phox quando comparado ao grupo Controle ($p < 0.05$).

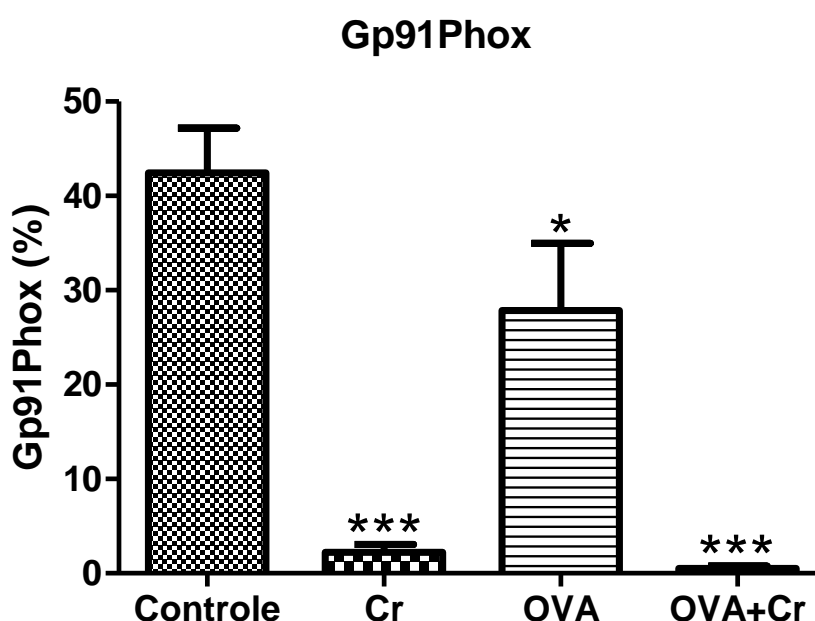


Figura 13 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da Gp91Phox pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0.001$ comparado a todos os demais grupos. * $p < 0.05$ comparado a todos os demais grupos.

Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação das células da parede vascular pulmonar: enzimas antioxidantes (SOD-1, SOD-2, GPx).

Os resultados apresentados na Figura 14 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de superóxido dismutase-1 (SOD-1) pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado ao grupo Controle e ao grupo OVA ($p<0.001$).

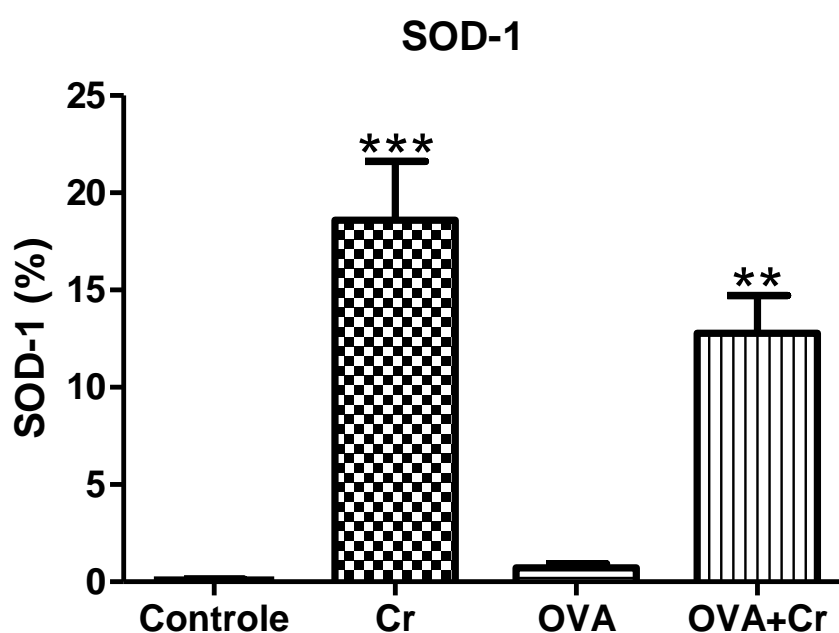


Figura 14 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da SOD-1 pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p<0.001$ comparado aos grupos Controle e OVA. * $p<0.05$ comparado a todos os demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 15 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de superóxido dismutase-2 (SOD-2) pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado ao grupo Controle e ao grupo OVA ($p<0.001$)

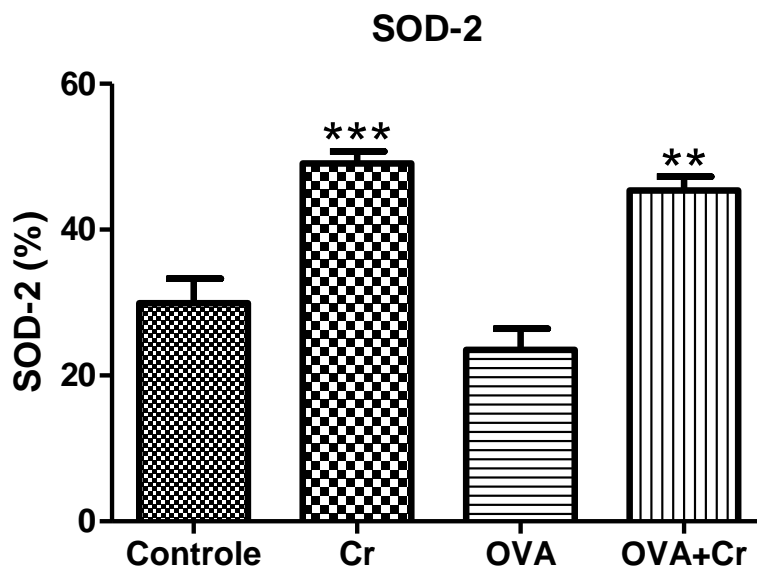


Figura 15 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da SOD-2 pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p<0.001$ comparado aos grupos Controle e OVA. ** $p<0.01$ comparado aos grupos Controle e OVA.

Os resultados apresentados na Figura 16 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de glutathiona peroxidase (GPx) pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado ao grupo Controle e ao grupo OVA ($p<0.001$).

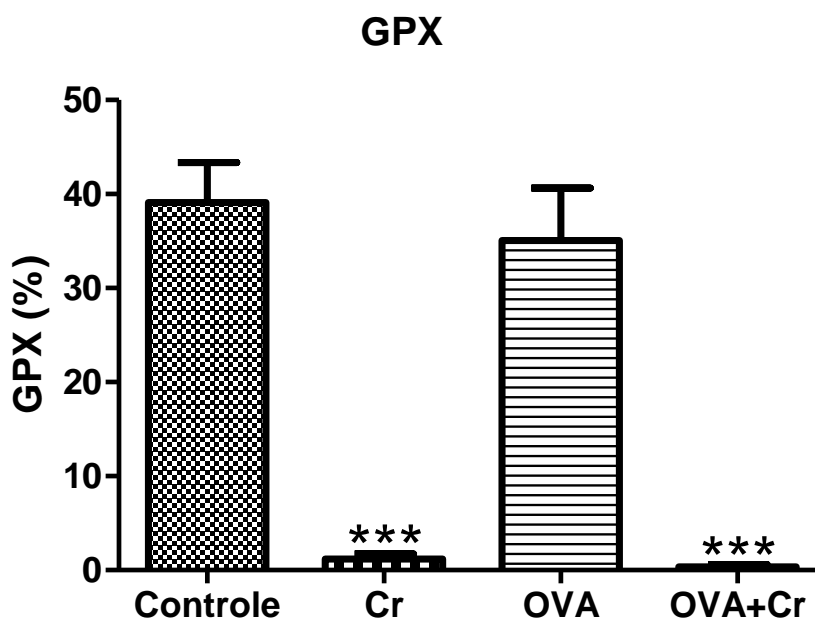


Figura 16 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão da GPX pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p<0.001$ comparado aos demais grupos.

Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação das células da parede vascular pulmonar: ativação do NF- κ B.

Os resultados apresentados na Figura 17 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados aumentou significativamente a expressão de NF- κ B pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado aos demais grupos ($p < 0.01$).

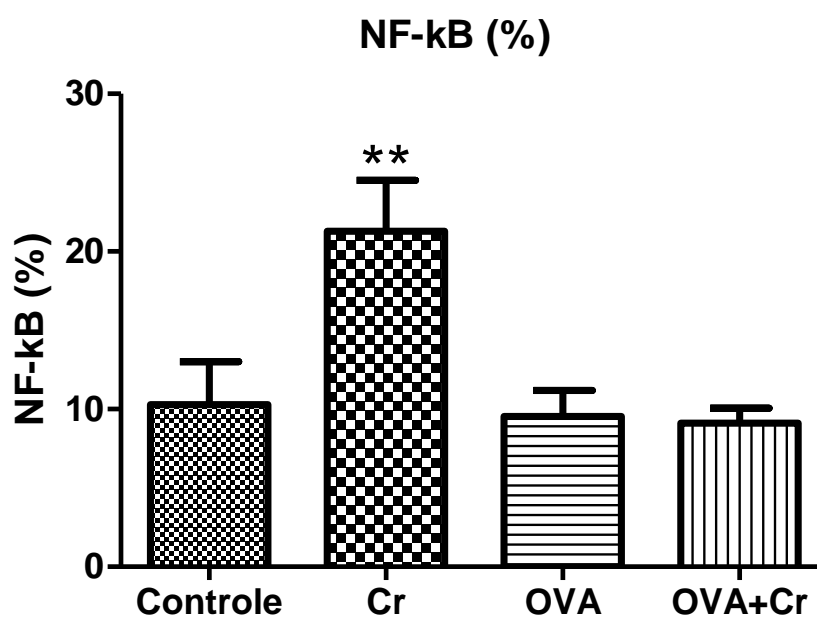


Figura 17 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão de NF- κ B pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. ** $p < 0.01$ comparado aos demais grupos.

Efeitos da suplementação com creatina sobre a ativação das células da parede vascular pulmonar: ativação das matriz metaloproteases (MMP-9, MMP-12) e inibidores das matriz metaloproteases (TIMP-1, TIMP-2).

Os resultados apresentados na Figura 18 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados diminuiu significativamente a expressão de MMP-9 pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado ao grupo controle ($p<0.001$). Os resultados também demonstram que a sensibilização e desafio inalatório com a OVA também diminuiu a expressão de MMP-9 pelos leucócitos perivasculares quando comparado ao grupo controle ($p<0.01$).

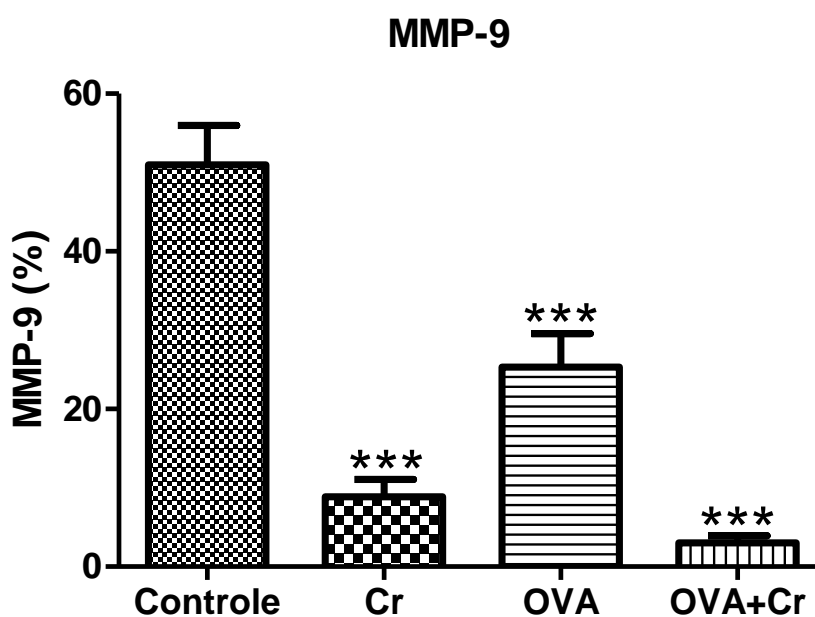


Figura 18 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão de MMP-9 pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p<0.001$ comparado ao grupo Controle.

Os resultados apresentados na Figura 19 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a expressão de MMP-12 pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado aos grupos Controle, Cr e OVA ($p < 0.001$).

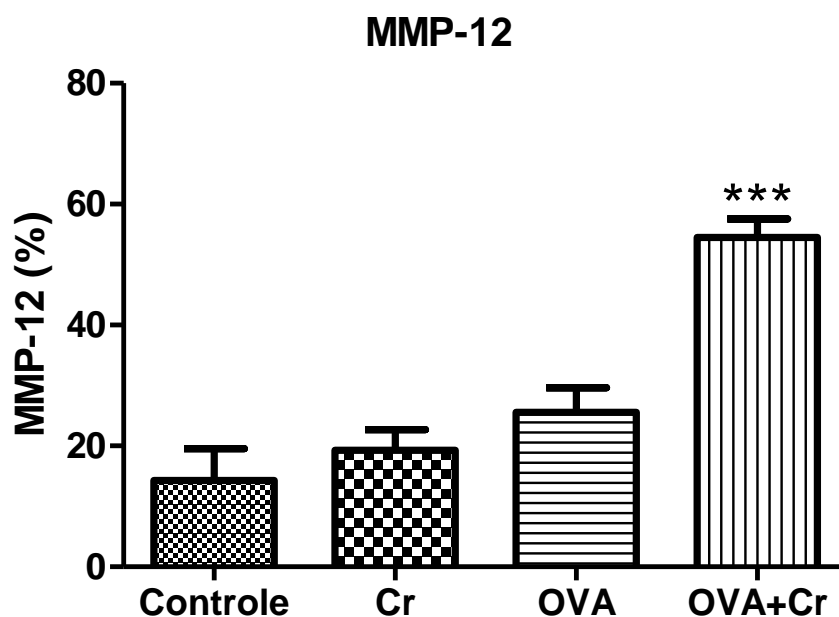


Figura 19 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão de MMP-12 pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão.

*** $p < 0.001$ comparado aos demais grupos.

Os resultados apresentados na Figura 20 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados diminuiu significativamente a expressão de TIMP-1 pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado aos grupos Controle e OVA ($p < 0.001$).

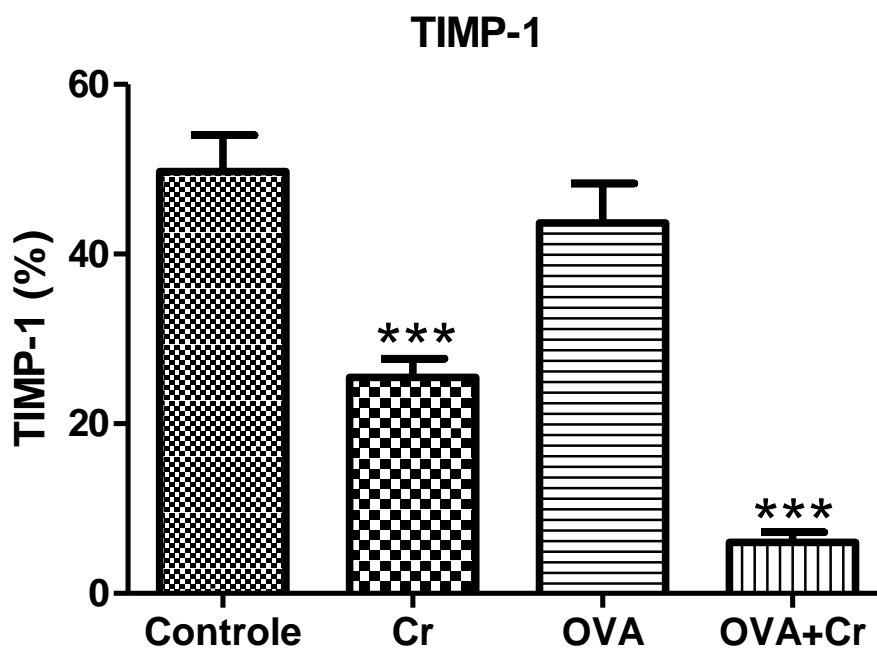
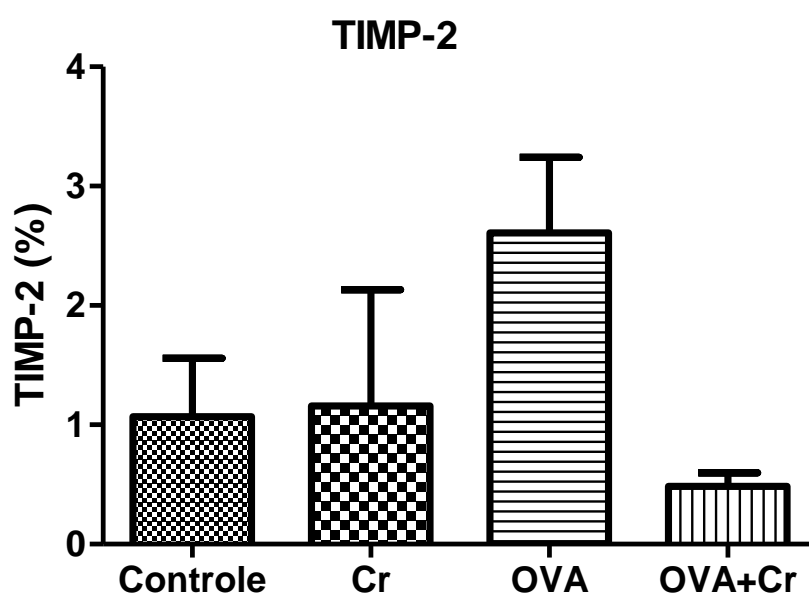


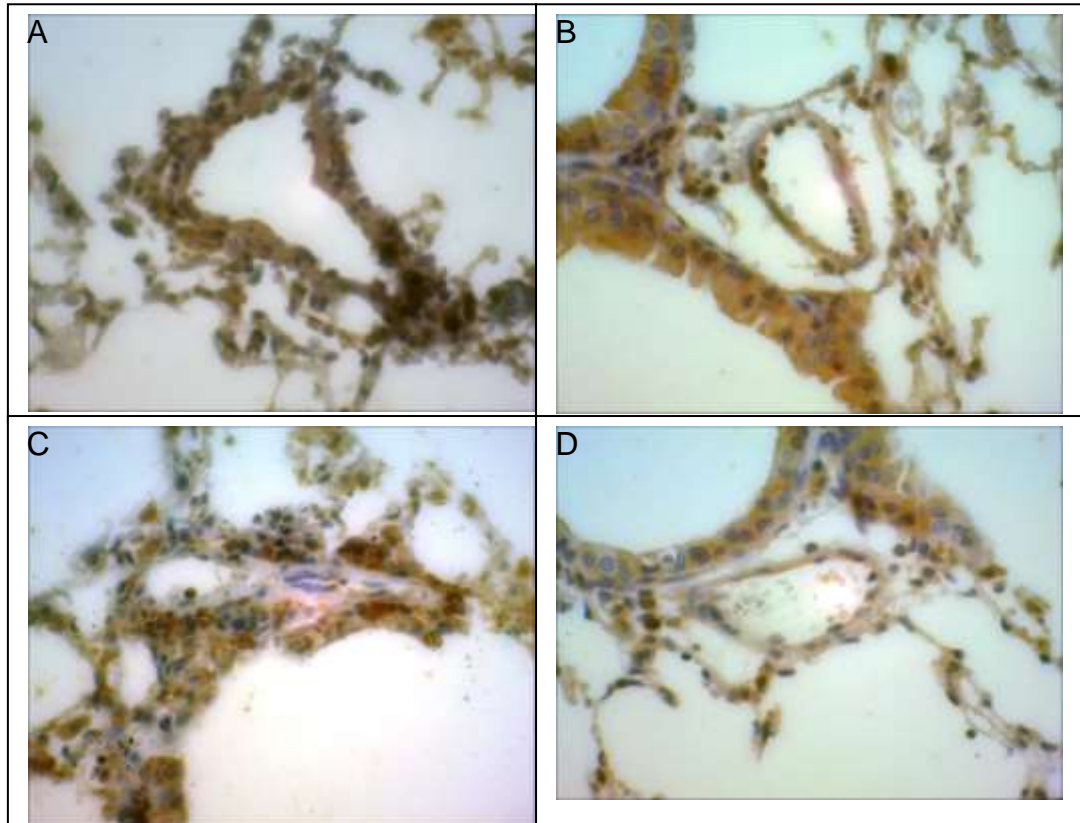
Figura 20 – Efeitos da suplementação com creatina em um modelo experimental de inflamação crônica induzida por OVA. Expressão de TIMP-1 pelas células da parede vascular pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0.001$ comparado aos grupos Controle e OVA.

Os resultados apresentados na Figura 21 demonstraram que a suplementação com creatina em camundongos não sensibilizados e em camundongos sensibilizados e também a sensibilização com OVA não alteraram a expressão de TIMP-2 pelas células da parede vascular pulmonar quando comparados todos os grupos experimentais ($p>0.05$).



Não foram observadas diferenças estatísticas significantes quando comparados todos os grupos experimentais ($p>0.05$).

A Figura 22 apresenta fotomicrografias representativas da expressão de 3-Nitrotirosina pelas células vasculares pulmonares dos grupos Controle (A), Cr (B), OVA (C) e OVA+Cr (D). Aumento de 400x.



6 – Discussão

O nosso estudo encontrou alterações estatisticamente significante na expressão da 3-Nitrotirosina no infiltrado celular no espaço perivascular nos animais do grupo, Cr, OVA e OVA+Cr quando comparados com o grupo controle, mas os mesmo não apresentaram alterações estatisticamente significante entre eles. Acreditamos que mais estudos devem ser realizados. Os nossos dados vão de acordo com estudos já publicados, que encontraram efeitos antioxidante em algumas espécies reativas de oxigênio H_2O_2 e nitrogênio $ONOO^-$.^{28,32}

A GP91phox, apresentou aumento estatisticamente significante da sua expressão nas células inflamatórias no espaço perivascular nos grupos que receberam suplementação da creatina grupo Cr e grupo OVA+Cr quando comparando com os grupos Controle e OVA, mas não apresentaram alterações estatisticamente diferente entre eles. Entretanto nosso estudo vem contra os possíveis efeitos antioxidante da creatina no marcador GP91phox, já que a creatina que demonstraram a redução de algumas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.^{28,32,33}

O presente trabalho apresentou aumento da expressão de superóxido dismutase-1 e da superóxido dismutase-2 pelos leucócitos perivascular nos animais que receberam suplementação da Creatina, grupos Cr e OVA+Cr quando comparado com os animais que não receberam a suplementação da creatina, grupos Controle e OVA. Os nossos dados vão contra o estudo de Michel B Araújo et al que relatam a diminuição da expressão das superóxido dismutase nos grupo creatina. Com isso mais estudos se fazem necessários para avaliar quais os possíveis efeitos da creatina sobre esse importante antioxidante endógeno.²³

Alguns estudos relatam os possíveis efeitos antioxidante da creatina, com o aumento da expressão da GPx.^{23,28} Os nossos dados vão a favor desses estudos, que demonstra aumento da expressão da GPx pelo leucócitos perivascular nos animais do grupo Cr e OVA+Cr quando comparado com os grupo Controle e OVA, sendo a GPx um importante antioxidante.

O Fator-nuclear-Kappa B, apresentou aumento da sua expressão nos grupos que receberam suplementação da Creatina, grupo Cr e OVA+Cr pelos leucócitos perivascular quando comparado com os grupos Controle e OVA. O grupo OVA apresentou elevação do infiltrado perivascular quando comparado com o grupo Controle, demonstrando os efeitos inflamatórios causados pela exposição a OVA. Estes dados vão contra os estudos que demonstram que a creatina tem efeito antiinflamatório, já que o Nf-kB atua como um fator pró-inflamatório. ^{28,30}

O presente estudo demonstrou aumento estatisticamente significativo da expressão MMP-9 nos leucócitos perivascular nos animais que receberam suplementação da creatina, grupo Cr e OVA+Cr quando comparado com os grupos Controle e OVA. Os animais do grupo OVA apresentaram redução da expressão da MMP-9 quando comparado com os animais dos grupos Cr e OVA+Cr e aumento da expressão quando comparado com o grupo controle. Assim como os dados apresentando por Vieira et al, que apresentou aumento da expressão no sistema epitelial pulmonar nos grupos que receberam suplementação de creatina. ³⁴

O presente estudo demonstrou aumento da expressão da MMP-12 pelos leucócitos perivascular no grupo Cr e OVA quando comparado com o grupo controle e uma redução quando comparado com o grupo OVA+Cr. O grupo OVA+Cr apresentou aumento quando comparado com todos os demais grupos, porém o maior aumento no grupo OVA+Cr devido a suplementação e a sensibilização de OVA. Os dados vão de acordo com o estudo já publicado, onde foi demonstrado aumento da expressão da MMP-12 em animais sensibilizado e que receberam suplementação da creatina. ³⁴

A creatina apresentou aumento da expressão da TIMP-1 pelos leucócitos perivascular nos grupos que receberam a suplementação da creatina, grupos Cr e OVA+Cr, quando comparado com os grupos Controle e OVA. A TIMP-2 também apresentou elevação da sua expressão das células inflamatórias no espaço perivascular, no grupo Cr quando comparado com todos os grupos, o grupo Cr+OVA, apresentou um aumento da sua expressão em relação aos grupos controle e OVA, os resultados corroboram com dados já publicados onde relatam os possíveis mecanismos antiinflamatórios da creatina, mas não entanto não há dados da creatina com esses marcadores. ^{26,27}

Nos animais que não receberam a suplementação de creatina, grupo Controle e OVA, a expressão da 3-Nitrotirosina foi aumentada pelas células da parede vascular pulmonar quando comparado com os grupos Cr e OVA+Cr. Os animais que receberam a suplementação de creatina os níveis da 3-Nitrotirosina apresentaram redução, indo a favor de estudos que relatam os possíveis efeitos antioxidante da creatina em algumas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.²⁹

A suplementação de creatina no modelo experimental de inflamação crônica, apresentou redução da expressão da GP91phox pelas células da parede vascular pulmonar em comparação aos outros grupos que não receberam suplementação, grupo Controle e OVA. O grupo OVA Apresentou redução em comparação ao grupo controle e aumento em comparação aos grupos Cr e OVA+Cr. Este dados vem a favor dos estudos que falaram sobre os efeitos antioxidante da creatina em alguns marcadores.^{29,32,33}

Um dos principais antioxidante presente no pulmão é SOD nas suas 3 formas (Esra Birben PhD), estudamos a SOD-1 e a SOD-2 com suplementação da creatina. A SOD-1 apresentou elevação da sua expressão pelas células da parede vascular pulmonar no grupo Cr quando comparado com todos os grupos. O grupo OVA+Cr apresentou aumento quando comparado com os grupos Controle e OVA, e uma redução quando comparado com o grupo Cr, os nossos dados vão a favor com estudo de Michel B Araújo et al que relatam a diminuição da expressão das superóxido dismutase nos grupo creatina^{23,35}

A SOD-2 apresentou aumento da sua expressão no grupo Cr e OVA+Cr pelas células da parede vascular quando comparado com o grupo Controle e OVA. Nossos dados reforçam os efeitos antioxidante da creatina, mas vai contra os dados apresentados no estudos de Michel B Araújo.^{23,31}

Os animais dos grupos Cr e OVA+Cr apresentaram redução da expressão da GPx nas células da parede vascular pulmonar quando comparado com os demais grupos, entretanto não apresentaram diferença estatisticamente significante entre eles. Os

dados obtidos no presente estudo não demonstraram os possíveis efeitos antioxidantes da creatina, como relatar alguns estudos.^{23,28}

Os possíveis efeitos antiinflamatórios da creatina não foram notados na expressão do NF-kB, que é um importante mediador inflamatório.²⁸ O grupo que recebeu a suplementação da creatina grupo Cr apresentou aumento da expressão de NF-kB pelas células na parede vascular pulmonar quando comparado com os demais grupos.^{28,32}

O nosso estudo apresentou redução da expressão MMP-9 pelas células na parede vascular pulmonar nos grupos Cr e OVA+Cr quando comparado com o grupo controle e OVA. O grupo OVA apresentou redução da sua expressão quando comparado com o grupo Controle aumento quando comprado com os grupos Cr e Cr+OVA. Estudos demonstraram um aumento da expressão desse marcador após a suplementação de creatina^{27,29} Mais estudos se fazem necessário para elucidar os possíveis efeitos nas células na parede vascular pulmonar.

Entretanto, a MMP-12 apresentou aumento da sua expressão pelas células da parede vascular pulmonar no grupo OVA+Cr, quando comparado com todos os outros grupos, a creatina na MMP-12 demonstrou efeitos contrários na MMP-9. estes dados vão a favor de dados já publicados, onde há um aumento da expressão da MMP-12 em animais que receberam suplementação de creatina.^{27,29}

A TIMP-1 apresentou dados estatisticamente significante entre os grupos. O grupo que só recebeu suplementação da creatina, grupo Cr apresentou aumento da expressão da TIMP-1 pelas células na parede vascular pulmonar em comparação ao grupo OVA+Cr e uma redução em comparação aos grupos Controle e OVA. O grupo OVA+Cr apresentou redução da expressão quando comparado com todos os demais grupos . Esses dados vão contra os apresentados por Vieira et al.³⁴

A TIMP-2 não apresentou alterações estatisticamente significante entre os grupos, com uma variável alta. Mais estudos são necessários para avaliar os efeitos da suplementação da creatina e dos efeitos da OVA.

7 – Conclusão:

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstrou que a suplementação da creatina em um modelo experimental de asma em alguns marcadores aumentou sua expressão nos leucócitos perivasculares, SOD-1, SOD-2, GPx, NF-KB, TIMP-1, TIMP-2. Entretanto a suplementação da creatina aumentou a expressão do marcador do estresse nitrosativo (3-Nitrotirosina) e do estresse oxidativo (GP91phox) nos leucócitos perivasculares. A suplementação da creatina na ativação das células vasculares pulmonares, apresentou diminuição da expressão do marcador 3-Nitrotirosina e do GP91phox, e aumento da expressão dos marcadores SOD-1, SOD-2, NF-kB.

Com os resultados concluímos que a suplementação da creatina exerce efeitos antiinflamatórios e antioxidantes em alguns marcadores. Mas como os seus efeitos não foram positivos para todos os marcadores, mais estudos se fazem necessários para elucidar os mecanismos antiinflamatórios e antioxidantes da creatina, assim como entender os efeitos contrários do esperado.

8 – Referências

1. Rodrigo GJ, Rodrigo C, Hall JB. Acute Asthma in Adults. A review. Am. Col. of Chest. Phys. J. 2004 march, 125, 3.
2. Silva RA, Vieira RP, Duarte ACS, Lopes FD, Perini A, T Mauad, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in na asthma murine model. Eur. Respir J. 2010. May; 35(5) 994-11002.
3. Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2008 Oct, 295(4):L670-9.
4. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of Asthma. Front. in Micr. J. 2013 sep, vol 4, 263(1).
5. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. J. Bras. Pneumol. 2006; 32 (Supl 7):S 447-S 474.
6. GINA – Global Initiative for Asthma [on line] .ed. 2012. [acessado em 15 de dezembro de 2014]. Disponível em [http: www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
7. King, Jr TE. A new look at the pathophysiology of asthma. J. of the Nat. Med. ass. Vol 91, no 8, 9-15.
8. Ferry-Rooney R. Asthma in Primary Care A case-based Review of Pharmacotherapy. Nurs. Clin. N. Am. J. 48 (2013) 25-34.
9. Oliveira DC, Rizzo JA, Sarinho ESC. Asma e doença cardiovasculares. Rev. Bras. Clin. Med. São Paulo, 2011; jan-fev; 9(1):62-66.
10. Kato G, Takahashi k, Tashiro H, Kurata K, Shirai H, Kimura S, Hayashi S. $\beta 2$ adrenergic agonist attenuates house dust mite-induced allergic airway inflammation through dendritic cells. B.M.C. Immunology. 2014 oct, vol15, 39.
11. Poter PC, Onger VBS, Luong A, Kheradmand F, Corry DB. Seeking Common Pathophysiology in Asthma, Atopy, and Sinusitis. Tren. in Im. 2011 Feb, 32(2), 43-39.
12. Hamid Q, Canção Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR Hegele RG, Hogg JC. Inflammation of small airways in asthma. The J. of Alleg. Clin. Im. Canada; jul; 1997, 100(1) 44-51.
13. Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2003 jul, 28(6), 648-654.
14. Campos HS. Asthma: Its origins, inflammatory mechanisms and the role of the corticosteroid. Rev. Bras. Pneumol. Sanit. 2007 dez, 15 (1), 47-60.

15. Gundel RH, Wegner CD, Torcellini et al. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 Mediate Antigen-Induced Acute Airway Inflammation and Late-phase Airway Obstruction in Monkeys. *J. Clin. Invest.* 1991 Oct, Vo 88 (4), 1407-1411.
16. Gong JH, Shin D, Han SY, et al. Blockade of Airway Inflammation by Kaempferol via Disturbing Tyk-STAT Signaling in Airway. *eCAM J.* 2013 apr, Vol 2013; 13p.
17. Ghisi GL, Dirieux A, Pinho R, Benetti M. Physical exercise and endothelial dysfunction. *Arq. Bras. Cardiol. São Paulo*, out 2010, vol.95 no.5.
18. Wanner A, Mendes ES. Airway Endothelial Dysfunction in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Challenge for Future Research. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010 Dec, vol 182 (11), 1344-1351.
19. Zraggen S, Ochsenbein AM, Detmar M. An Important Role of Blood and Lymphatic Vessels in Inflammation and Allergy. *J. of Al.* 2012 dec, vol 2013, 9p.
20. Giribela CRG, Gengo R, Hong V, Consolim-Colombo FM. Função e disfunção endotelial: da fisiopatologia às perspectivas de uso em pesquisa e na prática clínica. *Rer. Bra. de Hip.* vol.18(1):27-32, 2011.
21. Vita JA, Keaney Jr JF. Endothelial Function A Barometer for Cardiovascular Risk? *J. Am. As.* 2002 aug; 106(6), 640-642.
22. Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revi.Bras. de Hiper.* 2001dez; 8 (1), 78-88.
23. Araújo MB, Moura LP, Junior RCV, Junior MC, Dalia RU, Sponton AC, Ribeiro C, Mello MAR. Creatine supplementation and oxidative stress in rat liver. *J.Int. Soc. of Sports. Nutr.* 2013 dec, 10(1), 10:54.
24. Iqbal S, Nazir N, Gillani Q, Akbar F. Effect of creatine monohydrate supplementation on various hematological and serum biochemical parameters on male albino mice following neonatal hypoxia-ischemia encephalopathy. *The Scie. W. J.* 2013 sep, Vol 2013 , 6 p.
25. Alves CRR, Filho CAAM, Benatti FB, Bruki S, Pereira RMR, Pinto ANS, Lima FR, Roschel H, Gualano. Creatine Supplementation Associated or Not with Strength Training upon Emotional and Cognitive Measures in Older Women: A Randomized Double-Blind Study. *J. PLoS ONE.* 2013 oct, 8(10): e76301.
26. Percário S, Domingues SPT, Teixeira LFM, Vieira JLF, Vasconcelos F, Ciarrocchi DM, Almeida ED, Conte M. Effects of creatine supplementation on oxidative stress profile of athletes. *J. Int. Soc. of Sports Nutr.* 2012 dec, 9(1):56.
27. Aksentijevic D, Zervou S, Faller KME, McAndrew DJ, Schneider JE, Neubauer S, Lygate CA. Myocardial Creatine Levels Do Not Influence Response to Acute Oxidative Stress in Isolated Perfused Heart. *J. PLOS ONE.* 2014 Nov: Vol 9 Issue 10. e109021.

28. Cooper R, Naclerio, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2012 jul, 9(1):33.
29. Leland KM, McDonald TL, Drescher KM. Effect of creatine, creatinine, and creatine ethyl ester on TLR expression in macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2011 sep, 11(9): 1341-1347.
30. Yang YG, Tian WM, Zhang H, Li M, Shang YX. Nerve growth factor exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in a rat model of chronic asthma. *Exp. Med. Ther.* 2013 nov, 6(5), 1251-1258.
31. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Ann. Thorac. Med.* 2012 Oct, 7 (4) 226-232.
32. Stefani GP, Nunes RB, Dornelles AZ, Alves JP, Piva MO, Domenico M, Rhoden CR, Lago P. Effects of creatine supplementation associated with resistance training on oxidative stress in different tissues of rats. *J.Int. Soc. Sports Nutr.* 2014 mar, 11(1):11.
33. Banerjee ER, Henderson Jr WR. Role of T cells in a gp91phox knockout murine model of acute allergic asthma. *A.A.C.I.J.* 2013 feb, 9:6.
34. Vieira RP, Duarte AC, Santos AB, Medeiros MC, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Exercise reduces effects of creatine on lung. *Int J Sports Med.* 2009 Sep;30(9):684-90
35. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J.* 2012 jan, 5:9-19.