

AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA COM CREATINA

Mônica N. Ozaki¹, Vanessa C. G. Matos¹, Wellington Ribeiro², Erika F. Ferrar²

¹Faculdade de Ciências da Saúde, ²Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica – Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, CEP 12.244-000, São José dos Campos – SP, Fone: (12) 3947-1000, monica.ozaki@hotmail.com, van19_matos@hotmail.com, gton@univap.br, ferrarierika@yahoo.com.br

Resumo: A Creatina (Cr) quando utilizada como recurso ergogênico, tem demonstrado benefícios fisiológicos. Entretanto há evidências de que a Cr, assim como o LPS, aumentam a hiperresponsividade pulmonar, promovendo inflamação local e aumento de fibras colágenas. O estudo tem como objetivo comparar o índice de colágeno no tecido pulmonar, após tratamento crônico com Cr e indução de hiperreatividade com LPS em camundongos imunossuprimidos da linhagem Balb/C. A quantificação do colágeno foi realizada através de histomorfometria, utilizando-se o programa Image Pro Plus® em lâminas coradas com Tricrômio de Masson. A análise demonstrou que o tecido pulmonar do grupo controle permaneceu íntegro e com suas características morfológicas preservadas, entretanto todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas na quantidade de colágeno quando comparados ao grupo controle. Os grupos suplementados com Cr apresentaram maior quantidade de colágeno quando comparado ao grupo LPS, demonstrando resultados significativos de lesão tecidual pulmonar.

Palavras Chave: Suplementação, Creatina, Hiperreatividade Pulmonar, LPS.

Área de Concentração: Biomedicina

Introdução

O Sistema Respiratório tem a função de manter um fluxo adequado de gases respiratórios na microcirculação pulmonar e assim contribuir para a manutenção da homeostase. As alterações ou patologias do sistema respiratório podem ocorrer pela ação de diversos fatores, tanto intrínsecos, por exemplo, devido a alterações genéticas do sistema imune, quanto por alterações extrínsecas como o contato com poluição, tabagismo e contato com microorganismos (BERNE et al., 2004).

O LPS é um componente da parede de células bacterianas gram-negativas que pode ser encontrada no ambiente (como na poeira doméstica) capaz de ativar a imunidade inata e modificar a expressão da alergia respiratória induzindo efeitos inflamatórios intensos nas vias aéreas assim como hiperreatividade brônquica; Nos últimos anos a severidade da asma tem sido correlacionada com o índice de LPS na poeira doméstica (MICHEL et al., 1996).

A creatina é um constituinte nutricional que pode ser adquirido de forma endógena, a partir dos aminoácidos arginina, glicina e metionina; e exógena, através de alimentos de origem animal. Recentemente, houve um grande interesse entre consumidores e pesquisadores a respeito da aplicação terapêutica da creatina e os benefícios da utilização da creatina como um suplemento dietético (ANVISA, 2010).

A Creatina (Cr), utilizada como recurso ergogênico, tem demonstrado benefícios fisiológicos tanto em atletas, como também na experimentação animal, em pacientes apresentando doenças musculares, neurológicas e neuromusculares (DOHERTY et al., 2001; HESPEL et al., 2001). Entretanto há evidências de que a Cr, assim como o LPS, aumentam a hiperresponsividade pulmonar, promovendo inflamação local e aumento de fibras colágenas, as quais vão substituindo progressivamente os tecidos pulmonares, causando uma perda irreversível da habilidade destes em transferir oxigênio para a corrente sanguínea via alvéolos pulmonares (WALDMAN, et al., 2003; VIEIRA et al., 2007).

Metodologia

O presente trabalho foi elaborado através de análise morfométrica em lâminas de pulmões, as quais foram anteriormente, coletados, pré-fixados em 0,3 ml de formol a 10%, armazenados por 24 – 48 horas em formol a 10%, emblocados inteiros, cortados em micrótomo Spencer 820 com 5 µm de espessura e montados sob lâminas para microscopia após tratamento por 30 dias com creatina monohidratada (0,5g/Kg e 2,0g/Kg) e com salina (grupos controle e LPS) por via oral (v.o.) e após instilação intranasal (i.n.) com LPS 24 horas

antes da eutanásia (FERRARI, 2009). Foi realizada a coloração por Tricrômio de Masson e e fotografada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) sistema Cool Pix 5400, seguindo a ampliação dos padrões comerciais de 400x.

A classificação através do método de Massom, conquistado pela coloração de Tricrômico de Masson, nos proporcionou resultados descritos na tabela 1:

Tabela 1: Relação estrutura e coloração obtidas através do Tricrômico de Masson

Estrutura celular	Coloração
Núcleos	Pretos
Citoplasma, Queratina, Fibras intercelulares	Vermelho
Colágeno e Muco	Azul

Assim foi realizada a análise da concentração de fibras colágenas presentes nos pulmões dos seguintes grupos:

Grupo Controle Salina – tratado somente com salina (v.o.);

Grupo LPS – tratado com salina (v.o.) e instilados com LPS (i.n.);

Grupo Creatina 0,5 g/kg – tratado com creatina na dose de 0,5 g/kg (v.o.);

Grupo Creatina 2 g/kg – tratado com creatina na dose de 2 g/kg (v.o.);

Grupo Creatina 0,5 g/kg + LPS – tratado com creatina na dose de 0,5 g/kg (v.o.) e instilados com LPS (i.n.);

Grupo Creatina 2 g/kg + LPS – tratado com creatina na dose de 2 g/kg (v.o.) e instilados com LPS (i.n.);

A quantificação de colágeno foi realizada por meio do programa Image Pro Plus®, o qual nos proporcionou a área total do corte e a área de colágeno, ambas em pixel e convertidas em μm , obtendo assim a concentração de fibras colágenas presentes em cada corte.

Ao final foi elaborada a análise estatística, através do teste de variância Anova, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, procurando desse modo, avaliar e comparar as alterações morfológicas adquiridas pela indução de LPS e as alterações adquiridas pela indução de creatina.

Resultados

A análise demonstrou que o tecido pulmonar do grupo controle permaneceu íntegro e com suas características morfológicas preservadas.

Constatou-se que todos os grupos analisados têm apresentado diferenças significativas na quantidade de colágeno quando comparados ao

grupo Controle.

Os grupos suplementados com Cr (0,5 e 2g/kg, com ou sem indução por LPS) apresentaram maior quantidade de colágeno quando comparados aos grupos controle e LPS.

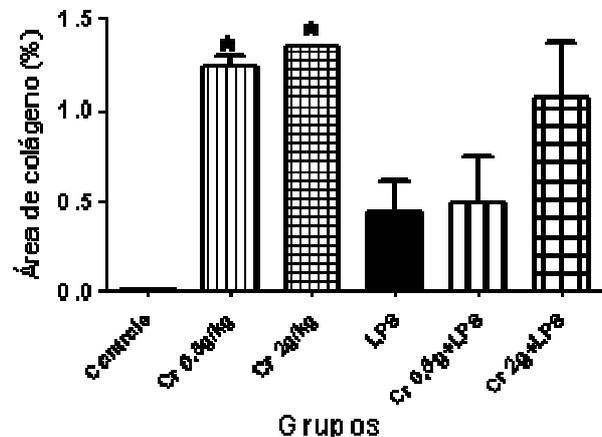


Figura 1: Porcentagem de área de colágeno no tecido pulmonar de camundongos após 30 dias de tratamento com salina (grupos controle e LPS) ou creatina (grupos Cr 0,5g/kg; Cr 2g/kg; Cr 0,5g+LPS; Cr 2g+LPS) e 24 horas da instilação intranasal de LPS (grupos LPS; Cr 0,5g+LPS; Cr 2g+LPS). Os dados representam a média \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

A análise da concentração de fibras colágenas realizada pela média \pm SEM de 3 grupos experimentais através do programa Image Pro Plus®, nos proporcionou resultados descritos na tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de área de colágeno no tecido pulmonar de camundongos após 30 dias de tratamento com salina (grupos controle e LPS) ou creatina (grupos Cr 0,5g/kg; Cr 2g/kg; Cr 0,5g+LPS; Cr 2g+LPS) e 24 horas da instilação intranasal de LPS (grupos LPS; Cr 0,5g+LPS; Cr 2g+LPS). Os dados representam as porcentagens em μm de área de colágeno.

	Contro le	Cr0,5g /Kg	Cr2g/ Kg	LPS	Cr0,5g +LPS	Cr2g +LPS
1	0,005	1,307	1,354	0,764	0,220	0,447
2	0,000	1,159	*	0,412	0,747	1,202
3	0,000	*	*	0,117	*	1,536

* Não foi possível quantificar a área de colágeno devido ao intenso aglomerado de células inflamatórias na região peribroncovascular.

Discussão

A Creatina, assim como o LPS, aumentam a

hiperresponsividade pulmonar, promovendo inflamação local e aumento de fibras colágenas (VIEIRA et al., 2007). A inflamação crônica provoca destruição tecidual, acometendo células teciduais e estroma. Este processo faz com que os tecidos pulmonares sejam progressivamente substituídos por fibroblastos e colágenos, causando uma perda irreversível destes tecidos em transferir oxigênio para a corrente sanguínea via alvéolos pulmonares (LEE, et al., 2002; WALDMAN, et al., 2003). Com base nesses estudos, analisamos a concentração de fibras colágenas presentes no tecido pulmonar de camundongos imunossuprimidos, visando enfatizá-los.

Os resultados demonstrou que os grupos suplementados com Cr (0,5 e 2g/kg, com ou sem indução por LPS) apresentaram maior quantidade de colágeno quando comparados aos grupos controle e LPS. A Creatina juntamente com o LPS não proporcionou uma potencialização na concentração de fibras colágenas, sugerindo um forte efeito tóxico na administração crônica de creatina.

Vários trabalhos têm sugerido uma explicação para a toxicidade apresentada na suplementação com creatina. Yu e Deng (2000) propuseram uma via de conversão química da molécula de creatina em uma molécula de formaldeído. Também é possível que a suplementação com creatina promova um aumento do armazenamento de creatina fosfato pelas células inflamatórias, resultando em um período mais prolongado de ativação ou retardando o processo de apoptose, perpetuando o estado inflamatório (PUCAR et al., 2001). Vieira e colaboradores (2007) sugerem que a toxicidade possa estar parcialmente relacionada com o aumento da disponibilidade de L-arginina.

Assim, estes resultados enfatizam os estudos prévios de Vieira e colaboradores (2007) que analisaram o efeito da suplementação via oral de creatina na resposta inflamatória pulmonar em camundongos previamente sensibilizados com ovoalbumina, via intraperitoneal e aerosolizada, verificando que a administração de creatina induz inflamação das vias aéreas, remodelamento e hiperresponsividade, aumento de fibras colágenas e espessamento da musculatura lisa.

Conclusão

Através da avaliação histomorfológica realizada em nosso estudo, observamos que a creatina promoveu, mesmo isoladamente sem indução com LPS, alterações morfológicas características da inflamação pulmonar crônica,

sugerindo um forte efeito tóxico na administração crônica de creatina.

Agradecimentos

À Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) e à Instituição de fomento CAPES.

Bibliografia

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Visalegis. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=3477word=CREATINA%20MONOIDRATAD A%20EM%20PO>. Acesso em: 03 de maio de 2010.

BERNE, R. M. et al **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DOHERTY, T. J., et al. Creatine monohydrate does not increase strength in patients with hereditary neuropathy. **Neurology**, v.57, n.3, p.559-560, 2001.

FERRARI, E. F. **Ação da suplementação crônica com creatina na hiperratividade pulmonar induzida por LPS em camundongos**. São José dos Campos, SP, 2009. Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2009.

HESPEL, P., et al. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. **J. Physiol.**, v.536, n.2, p.625-633, 2001

LEE J.S., et al. The major histopathologic pattern of pulmonary fibrosis in scleroderma is nonspecific interstitial pneumonia. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung.**, v.19:p.121-127, 2002.

MICHEL, O., et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.154, n.6, p.1641-1646, 1996.

WALDMAN J, et al. The role of microvascular injury in the evolution of idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Clin Pathol.**,v.119, p.556-67, 2003.