

FRANCINE MARIA DE ALMEIDA

**Efeitos da suplementação com creatina na lesão de isquemia e
reperfusão após transplante pulmonar unilateral em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Dr. Rogerio Pazetti

São Paulo

2017

FRANCINE MARIA DE ALMEIDA

**Efeitos da suplementação com creatina na lesão de isquemia e
reperfusão após transplante pulmonar unilateral em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Dr. Rogerio Pazetti

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Francine Maria de
Efeitos da suplementação com creatina na lesão de
isquemia e reperfusão após transplante pulmonar
unilateral em ratos / Francine Maria de Almeida. --
São Paulo, 2017.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Rogerio Pazetti.

Descritores: 1. Transplante de pulmão 2. Lesão de
isquemia e reperfusão 3. Creatina/metabolismo
4. Inflamação 5. Respiração artificial 6. Antioxidantes
7. Ratos Spangue-Dawley

USP/FM/DBD-453/17

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Waldemar Quirino de Almeida e Maria Sonia Silva de Almeida, meus maiores incentivadores e apoiadores de todos os meus projetos.

Aos meus queridos irmãos Joyce Carolina de Almeida e Julius Alberto Quirino de Almeida, pelo carinho e amor constante.

E aos meus grandes amigos, que me fazem rir nos momentos estressantes...

Agradecimentos

A Deus, a quem procuro para me apontar o melhor caminho, principalmente nos momentos mais estressantes do dia a dia, e para agradecer todas as minhas conquistas e os momentos de alegrias e descontração.

Ao meu pai Waldemar Quirino de Almeida, que continua a olhar, guiar e me proteger, agora ao lado de Deus Pai, e à minha mãe Maria Sonia Silva de Almeida, que me dá força e incentivo constantemente para eu alcançar meus ideais. Queridos pais, obrigada por todo amor e confiança em mim.

Aos meus irmãos Joyce e Julius, por acreditarem e viverem todas as minhas conquistas ao meu lado, me incentivando fisicamente, psicologicamente e financeiramente... Fui bolsista CAPES durante toda a pós-graduação!

A todos os familiares que incentivaram de perto ou de longe e vibraram com cada novo aprendizado e conquista.

Aos meus amigos queridos da vida toda, que graças a Deus são muitos!!! Obrigada por todos os momentos descontraídos, sem o apoio de vocês teria sido tudo mais difícil.

Aos meus queridos “amigos de pós-graduação” que estiveram sempre ao meu lado incentivando e ouvindo todas as minhas lamentações, às vezes reclamar é necessário para desabafar todas as frustrações – só vocês entendem! Apenas nós sabemos o quanto é difícil fazer ciência neste Brasil.

Aos amigos “funcionários” e às “secretárias” do complexo FMUSP-HC-INCOR, sem o apoio de vocês nada seria possível.

A todos os amigos Professores e Orientadores que fiz nestes 16 anos na FMUSP, obrigada por todo aprendizado, companheirismo e confiança no meu trabalho ao longo destes anos.

Em especial aos amigos orientadores Rodolfo de Paula Vieira e Beatriz Manguiera Saraiva-Romanholo, que não cansam de me incentivar a crescer todos os dias.

Ao meu orientador Rogerio Pazetti por compartilhar sua experiência profissional comigo e por toda a confiança depositada em mim na última década.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada!!!

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de siglas e abreviações

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução	01
2. Objetivos	15
3. Métodos	17
4. Resultados	27
5. Discussão	39
6. Conclusões	51
7. Referências bibliográficas	53

Lista de siglas e abreviações

A180	Controle/água + 180 minutos de isquemia
A90	Controle/água + 90 minutos de isquemia
ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ATP	Adenosina trifosfato
BALF	Brochoalveolar lavage fluid
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CINC1	Citocina quimiotática de neutrófilos
Cr	Creatina
Cr180	Creatina + 180 minutos de isquemia
Cr90	Creatina + 90 minutos de isquemia
DP	Desvio padrão
DPE	Disfunção primária do enxerto
eNOS	Síntese de óxido nítrico endotelial
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GTIS	Resistência de tecido
HTIS	Elastância de tecido
IFN-	Interferon gama
IL1 beta	Interleucina 1 beta
IL10	Interleucina 10
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
iNOS	Síntese de óxido nítrico indutivo
IR	Isquemia e reperfusão
IRI	Ischemia and reperfusion injury
ISHLT	The Internacional Society for Heart & Lung Transplantation
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeos
LTx	Lung transplantation
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
NO	Óxido nítrico
NOex	Óxido nítrico exalado
PBS	Tampão fosfato-salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PCr	Fosfocreatina
PEEP	Pressão positiva expiratória final

pO_2	Pressão parcial de oxigênio
RAW	Resistência de vias aéreas
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR7	Toll-like receptor 7
TLRs	Toll-like receptors
TNF alfa	Fator de necrose tumoral alfa

Lista de tabelas

Tabela 1. Peso do animal, pulmão e coração.....	28
Tabela 2. Mecânica pulmonar.....	30

Lista de figuras

Figura 1. Procedimento cirúrgico	20
Figura 2. Concentração de óxido nítrico no ar exalado, em partes por bilhão	31
Figura 3. Dosagem de creatinina no plasma	31
Figura 4. Gasometria arterial	32
Figura 5. Número total de leucócitos e contagem diferencial no esfregaço sanguíneo ($\times 10^4$ células/mililitro)	33
Figura 6. Número total de leucócitos e contagem diferencial do lavado broncoalveolar ($\times 10^4$ células/mililitro)	34
Figura 7. Número de células mononucleares e polimorfonucleares no parênquima pulmonar ($\times 10^4$ células/micrômetro quadrado)	35
Figura 8. Índice de edema vascular	36
Figura 9. Coloração de células por imunohistoquímica no parênquima pulmonar ($\times 10^5$ células/micrômetro quadrado)	37
Figura 10. Citocinas pró e anti-inflamatórias dosadas no LBA por método ELISA (picrogramas/mililitro)	38

Resumo

Almeida FM. *Efeitos da suplementação com creatina na lesão de isquemia e reperfusão após transplante pulmonar unilateral em ratos* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

A lesão de isquemia e reperfusão (IR) é um evento que pode elevar o risco de morte após o transplante pulmonar, por ativar o sistema imune inato a induzir a inflamação. Em situação de isquemia, a oferta de oxigênio se encontra abaixo das necessidades metabólicas, resultando na depleção das reservas celulares de ATP e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Adicionalmente, a IR desencadeia um processo inflamatório intenso, caracterizado principalmente pela presença de neutrófilos e macrófagos ativados, os quais liberam inúmeros mediadores inflamatórios, perpetuando a inflamação. Nossa hipótese inicial era que a suplementação com creatina (Cr) poderia atenuar a lesão de IR pelo aumento dos níveis de fosfocreatina (PCr) nas células, o que facilitaria a formação de adenosina trifosfato (ATP), promovendo a manutenção dos níveis de Ca^{2+} intracelular, desestimulando assim a formação de EROs e, conseqüentemente, diminuindo o processo inflamatório. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da suplementação com creatina na atenuação da lesão de IR em ratos submetidos ao transplante pulmonar, segundo aspectos inflamatórios, estruturais e funcionais do tecido pulmonar. Foram utilizados 64 ratos machos da raça Sprague Dawley distribuídos em quatro grupos: A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia;

Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. Os animais doadores receberam creatina (0,5g/kg/dia) diariamente durante cinco dias antes do transplante pulmonar. Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo. Após a extração, os pulmões permaneceram em isquemia fria por 90 ou 180 minutos sendo, a seguir, implantados e reperfundidos por 120 minutos. Ao final da reperfusão, foram coletados os dados de mecânica respiratória, além de amostras de ar exalado, sangue arterial e periférico, lavado broncoalveolar e tecido pulmonar. Os parâmetros avaliados foram: resistência das vias aéreas, resistência e elastância do tecido pulmonar, óxido nítrico exalado, pressão parcial de oxigênio e de dióxido de carbono, creatinina sérica, células inflamatórias, índice de edema, PCNA, Caspase-3, TLR 4 e 7, IL1-beta, IL6, TNF-alfa, IL10 e CINC1. Os animais tratados com creatina apresentaram melhora da mecânica pulmonar, dos níveis de creatinina sérica, da gasometria arterial, além da diminuição da fração exalada de óxido nítrico e da inflamação verificada no sangue periférico, no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar. Estes animais também apresentaram diminuição da proliferação e da apoptose de células inflamatórias, de TLR4, dos níveis de IL6 e CINC1, além de aumento de IL10. Concluímos que o pré-tratamento com creatina tem efeito protetor na lesão de IR após transplante pulmonar unilateral em ratos.

Descritores: transplante de pulmão; lesão de isquemia e reperfusão; creatina/metabolismo; inflamação; respiração artificial; antioxidantes; ratos Sprague-Dawley.

Abstract

Almeida FM. *Effects of creatine supplementation in the ischemia-reperfusion injury after unilateral lung transplantation in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Ischemia and reperfusion injury (IRI) is an event that can increase the risk of death after lung transplantation (LTx) by activating the innate immune system to induce inflammation. In ischemia events, oxygen supply is below metabolic requirements, resulting in depletion of ATP cellular reserves and increased production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS). In addition, IRI triggers an intense inflammatory process characterized mainly by the presence of activated neutrophils and macrophages, which release innumerable inflammatory mediators, perpetuating the inflammation. Our initial hypothesis was that creatine supplementation (Cr) could attenuate IRI by increasing phosphocreatine (PCr) levels in cells, which would facilitate the formation of adenosine triphosphate (ATP), promoting the maintenance of intracellular Ca²⁺ levels, thus discouraging the formation of ROS and, consequently, decreasing the inflammatory process. Therefore, the objective of this study was to evaluate the role of Cr supplementation in the attenuation of IRI in rats underwent to LTx in according to inflammatory, structural and functional aspects of the lung tissue. Sixty Sprague Dawley male rats were distributed into four groups: A90, control / water + 90 minutes of ischemia; Cr90, creatine + 90 minutes of ischemia; A180, control / water + 180 minutes of ischemia; Cr180, creatine + 180 minutes of ischemia. Donor animals received creatine (0.5g/kg/day) daily for five days prior to LTx. Animals in the

control group received only the vehicle. The donor`s lung remained in cold ischemia for 90 or 180 minutes and then, were implanted and reperfused during 120 minutes. After reperfusion, respiratory mechanics data were performed and collected samples of exhaled air, arterial and peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary tissue. The parameters evaluated were: airway resistance, resistance and elastance of the pulmonary tissue, exhaled nitric oxide, partial pressure of oxygen and carbon dioxide, serum creatinine, inflammatory cells, edema index, PCNA, Caspase-3, TLR 4 and 7, IL1-beta, IL6, TNF-alpha, IL10, and CINC1. The animals treated with Cr showed an improvement in pulmonary mechanics, serum creatinine levels, and arterial blood gases. In addition, there was a decrease in the exhaled fraction of nitric oxide and in the inflammation in the peripheral blood, BALF, and pulmonary parenchyma in creatine-treated animals. These rats also had a decrease in the proliferation and apoptosis of inflammatory cells, TLR4, IL6, and CINC1. Moreover, there was an increase in the IL10 levels after Cr treatment. We conclude that pre-treatment with Cr has a protective effect on IRI after LTx in rats.

Descriptors: lung transplantation; ischemia and reperfusion injury; creatine/metabolism; inflammation; respiration, artificial; antioxidants; rats, Sprague-Dawley.

1. INTRODUÇÃO

Francine Maria de Almeida – Tese de doutorado

Transplante pulmonar

O transplante pulmonar é uma opção de tratamento para pacientes cuja função pulmonar, a capacidade de exercício e a qualidade de vida estão drasticamente limitadas, e cujo prognóstico de sobrevida em cinco anos seja inferior a 50% do esperado (Hartert et al., 2014).

O número cada vez maior de pessoas que necessitam de transplante de pulmão e a melhoria progressiva da sobrevida do pós-transplante sugerem a necessidade de uma parceria efetiva entre profissionais de saúde envolvidos com o transplante - médicos, fisioterapeutas, nutricionistas e psicólogos, entre outros - para haver um contínuo progresso dos resultados da cirurgia e da qualidade de vida dos pacientes. Em longo prazo, o cuidado com o receptor do transplante é focado na prevenção de complicações, principalmente infecciosas, no reconhecimento de cuidados médicos emergentes, na otimização da imunossupressão e no retorno às atividades normais da vida diária de maneira independente (Adegunsoye et al., 2017).

A seleção dos candidatos começa com um pneumologista ou médico de cuidados primários que, geralmente, tem uma relação já bem estabelecida com o paciente e pode fornecer os dados do histórico do paciente e detalhes da aderência ao tratamento e suporte social. O momento da consulta do paciente é de extrema importância e permite a avaliação, identificação e otimização das condutas, melhorando o estado nutricional e funcional, e preparando o paciente e sua família para as alterações de vida pós-transplante (Weill et al., 2015).

A avaliação para o transplante pulmonar inclui a verificação completa da história nutricional, dados antropométricos, e marcadores bioquímicos de nutrição. O

estado nutricional do paciente no período pré-transplante varia de acordo com a doença pulmonar, que pode levar o paciente a estar abaixo do peso, com excesso de peso ou obeso. O índice de massa corpórea é utilizado para classificar esses pacientes (Adegunsoye et al., 2017). A terapia de imunossupressão no pós-operatório exacerba o risco pré-existente de infecção, principalmente daqueles pacientes com marcadores positivos de desnutrição (González-Castro et al., 2006).

A identificação e encaminhamento de potenciais candidatos para o transplante devem ocorrer o mais breve possível para que o paciente tenha tempo suficiente para permanecer na lista de espera (Lahzami et al., 2010).

Atualmente, o transplante pulmonar é uma opção terapêutica bem estabelecida para o tratamento de diversas doenças. Segundo o relatório da Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão (ISHLT) até 30 de junho de 2016, foram realizados 60.107 transplantes de pulmões e 3.992 transplantes de coração-pulmão em adultos nos 256 centros de transplante de pulmão e 180 centros de transplante de coração e pulmão. Estima-se que os dados enviados ao Registro representam aproximadamente 75% da atividade mundial de transplante (Chambers et al., 2017; Lund et al., 2017).

No Brasil, o número de transplantes vem crescendo a cada ano, assim como a qualidade dos resultados (Jatene & Pego-Fernandes, 2008). O transplante de pulmão no Brasil é menos frequente do que outros órgãos sólidos, como rim e fígado, embora os resultados de sobrevivência sejam comparáveis aos relatados na literatura internacional (Afonso Junior et al., 2015). Segundo dados da Associação Brasileira de

Transplante de Órgãos (ABTO) já foram realizados 1.015 transplantes de pulmão no Brasil até dezembro de 2016 (ABTO, 2017).

As principais doenças que levam os pacientes ao transplante pulmonar são: doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquiectasia, hipertensão pulmonar primária e síndrome de Eisenmenger (Camargo et al., 2011). Os casos mais indicados são os que têm a doença pulmonar obstrutiva crônica com e sem deficiência de alfa-1 antitripsina (31% e 5%, respectivamente), totalizando mais de um terço de todos os transplantes. A segunda indicação mais comum é por doença pulmonar intersticial ou fibrose pulmonar (30%), principalmente consistindo de pneumonia intersticial idiopática (24%) e não idiopática (5%) (Travis et al., 2013; Yusen et al., 2016). A terceira causa mais comum são as bronquiectasias, associadas ou não com fibrose cística (16% e 2,7%, respectivamente). A hipertensão arterial pulmonar idiopática corresponde a 2,9% das indicações, representando uma pequena parte dos transplantes (Simonneau et al. 2013; Yusen et al., 2016). São causas menos comuns de transplantes pulmonares a linfangioleiomiomatose, a sarcoidose e a silicose (Camargo et al., 2011).

Adultos transplantados de janeiro de 1990 a junho de 2014 apresentaram uma sobrevida média de 5,8 anos, com índices de sobrevivência de 89% aos três meses, 80% após um ano, 65% aos três anos, 54% aos cinco anos e 32% aos dez anos. Os receptores que sobreviveram ao primeiro ano pós-transplante primário tiveram uma sobrevida média de 8 anos (Yusen et al., 2016). Já a média de sobrevida para quem realizou o retransplante no mesmo período é de 2,8 anos, sendo o índice de sobrevivência de 79% nos três primeiros meses, 66% no primeiro ano, 49% em três

anos, 39% em cinco anos e 21% em 10 anos. Receptores que sobreviveram ao primeiro ano de retransplante tiveram uma sobrevida menor que aqueles que passaram por transplante pulmonar primário (Yusen et al., 2016).

Dentre os critérios gerais adequados para a realização do transplante de pulmão estão: alto risco de morte por doença pulmonar (>50%) dentro de dois anos se o transplante não for realizado; alta probabilidade de sobreviver (>80%) pelo menos 90 dias após o transplante; alta probabilidade de sobreviver (>80%) em cinco anos após o transplante, a partir de uma perspectiva médica geral, desde que haja função adequada do enxerto (Weill et al., 2015).

O retransplante de pulmão tem sido responsável por uma pequena porcentagem de transplantes realizados anualmente. No entanto, sua frequência tem aumentado muito nos últimos anos. Os critérios usados para o retransplante são os mesmos utilizados para a seleção do transplante. Atenção particular deve ser dada à presença de disfunção renal significativa, pois, se presente, pode aumentar consideravelmente o índice de risco para mortalidade (Novik et al., 1998; Kawut et al., 2008; Eberlein et al., 2011; Weill et al., 2015).

As maiores causas de morte pós-transplante nos 30 primeiros dias e no primeiro ano são, respectivamente, por insuficiência do enxerto e por infecções. Outras causas incluem falência múltipla de órgãos e cardiovascular, e falhas técnicas relacionadas ao procedimento do transplante, além de síndrome da bronquiolite obliterante (Yusen et al., 2016).

Fatores importantes que devem ser considerados no tratamento pós-transplante de pulmão incluem: alterações do sistema imunológico, denervação do enxerto, e alto potencial para interações medicamentosas (Adegunsoye et al., 2017).

O pulmão tem sua própria competência imunológica, transporta o débito cardíaco e, portanto, possui uma grande área de interação imunoativa, particularmente para a supressão imunológica intensiva necessária após o transplante de pulmão (Witt & Hachem, 2013). A supressão imune é conseguida com uma combinação tripla de: um inibidor da calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus); um inibidor do ciclo celular (azatioprina ou micofenolato de mofetil); e um corticóide, normalmente a prednisona (Floreth & Bhorade, 2010; Penninga et al., 2013).

Alterações modestas nas doses dos medicamentos podem levar a insuficiência terapêutica ou a reações adversas severas. Tais consequências podem ser irreversíveis e podem resultar na perda do enxerto, na insuficiência de outros órgãos ou mesmo na morte do paciente. Os medicamentos utilizados rotineiramente para minimizar estes riscos são os inibidores de calcineurina (Adegunsoye et al., 2017).

Apesar dos avanços na preservação do enxerto, no manejo cirúrgico e na imunossupressão, devido ao fato dos pulmões serem extremamente suscetíveis à lesão de isquemia e reperfusão, os resultados para os transplantes pulmonares continuam sendo os piores dentre os transplantes de órgãos sólidos. O sucesso do transplante de pulmão é limitado por altos índices de disfunção primária do enxerto devido à lesão de isquemia-reperfusão, caracterizada por inflamação resistente, dano alveolar e permeabilidade vascular aumentada (Laubach & Shama, 2016).

A inflamação geralmente ocorre em resposta à infecção, para a eliminação de patógenos e reparação de tecidos. No entanto, pode ocorrer a “inflamação estéril” em condições não infecciosas, incluindo traumatismo, lesão induzida quimicamente ou isquemias (Chen & Nunes, 2010; Laubach & Sharma, 2016). Nestes casos, a ativação do sistema imune inato promove a inflamação. No transplante de pulmão, a isquemia do órgão e a reperfusão subsequente são inevitáveis e, geralmente, conduzem à inflamação aguda e estéril após o transplante, chamada de lesão de isquemia e reperfusão (Laubach & Sharma, 2016).

Lesão de isquemia e reperfusão

De fato, um grande obstáculo ao sucesso dos transplantes pulmonares é a lesão de isquemia-reperfusão (IR) que, em sua forma clínica grave, é também conhecida como disfunção primária do enxerto (DPE). A DPE está associada à elevada morbimortalidade nos primeiros 30 dias após o transplante (Christie et al., 2012; Suzuki et al., 2013) e, a médio e longo prazo, ao desenvolvimento da síndrome da bronquiolite obliterante, como forma de rejeição crônica. Sua ocorrência está relacionada a fatores que envolvem o doador, o receptor e o ato cirúrgico propriamente dito. A maioria dos casos de DPE é causada por lesão de IR. Mais raramente, infecções e reações de rejeição podem agir como gatilhos (Suzuki et al., 2013).

Não existem, ainda, agentes terapêuticos utilizados para prevenir a lesão de IR, sendo que as estratégias de tratamento estão limitadas aos cuidados de suporte (Laubach & Sharma, 2016).

A lesão pulmonar severa pela IR manifesta-se como hipoxemia e desenvolvimento de infiltrados pulmonares nas radiografias. Um estudo recente demonstrou que a lesão de IR após o transplante de pulmão afeta a sobrevivência tanto a curto quanto a longo prazo (Kreisel et al, 2011). A DPE é associada com maiores índices de síndrome da bronquiolite obliterante, uma manifestação de rejeição crônica, caracterizada por distúrbio ventilatório obstrutivo progressivo, secundário à oclusão das vias aéreas distais por fibrose (Kreisel & Goldstein, 2013).

Comparados com outros órgãos, os pulmões são mais resistentes à isquemia devido à disponibilidade de oxigênio a partir da troca gasosa alveolar, bem como a entrega de oxigênio através do sangue do sistema circulatório duplo, composto de artérias brônquicas pulmonares (Frazier et al., 2000; den Hengst et al., 2010; Weyker et al., 2013).

A isquemia pulmonar pode ocorrer em qualquer situação em que os suplementos de oxigênio não conseguem atender as demandas metabólicas do parênquima pulmonar devido ao fluxo sanguíneo limitado e/ou diminuição da ventilação. Devido aos subprodutos da isquemia celular, a perfusão é prejudicada pela produção de moléculas tóxicas. Clinicamente, existem dois cenários comuns para a lesão de IR: primeiro, quando o fornecimento de sangue é interrompido e a ventilação continua, a difusão de oxigênio através do tecido alveolar continua criando uma isquemia ventilada (Templeton & Garrotto, 1967; Babiker et al., 1985). Exemplos: situações trombóticas, hipertensão pulmonar primária ou síndrome torácica aguda; segundo, quando ocorre a interrupção completa do fluxo sanguíneo e da ventilação, conhecido como isquemia anóxica. Exemplos: tempo de isquemia fria que ocorre no

transplante e de circulação extracorpórea (Apostolakis et al., 2010; Weyker et al., 2013).

A lesão de IR é um processo patológico multifacetado que dificulta o manejo perioperatório de pacientes submetidos a qualquer procedimento que interrompe a perfusão dos órgãos. A isquemia do órgão começa com um desequilíbrio entre a oferta e a demanda metabólica e termina com a hipóxia tecidual, levando a danos celulares ou mesmo à morte das células. Se por um lado, a etapa final do transplante inclui a restauração adequada da perfusão do órgão, por outro, isso muitas vezes agrava a lesão tecidual, pois a reperfusão induz uma sobrecarga celular, seguida de grande aumento de mediadores inflamatórios, além de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), promovendo um ciclo de não resolução das lesões teciduais e celulares (Weyker et al., 2013).

A lesão de IR após o transplante pulmonar é a principal causa de disfunção do órgão e está associada com inúmeras alterações estruturais e funcionais (Dreyer et al., 2008), como, por exemplo, edema intra-alveolar e intersticial e diminuição da integridade da barreira alvéolo-capilar (Novick et al., 1991; Mühlfeld et al., 2007; Dreyer et al., 2008).

Isquemia é uma condição de interrupção no suprimento de substratos energéticos, como oxigênio e glicose, para um determinado tecido ou órgão, durante um período, e se instala toda vez que o aporte sanguíneo é menor que as necessidades básicas do órgão, sendo causa de disfunção e posterior morte de tecidos (Semenza, 2000).

Durante a isquemia ocorre o aumento da permeabilidade ao cálcio Ca^{2+} , favorecendo sua entrada na célula. Este aumento de Ca^{2+} intracelular, potencializado pela diminuição de seu transporte ativo para o meio extracelular, dependente de ATP, apresenta vários efeitos deletérios: alteração do citoesqueleto, ativação de fosfolipases, com consequente liberação de metabólitos do ácido araquidônico a partir da membrana celular e das organelas, e produção de radicais livres. Todos estes efeitos contribuem para a morte celular (Waxman, 1996).

Diversos mediadores parecem participar do controle da inflamação local e sistêmica interferindo com o estado funcional dos leucócitos, devido à formação de radicais livres no desencadeamento das lesões teciduais impostas pela IR, sendo a infiltração de neutrófilos o evento essencial para o desenvolvimento da lesão tecidual (Grace, 1994). Este evento ocorre pela liberação de radicais livres, enzimas proteolíticas e peroxidase, ação que é iniciada e potencializada por diversos mediadores, como IL1 beta, IL6, IL8 e TNF-alfa, entre outros (Marchant et al., 1995; Ikai et al., 1996; Koike et al., 2000).

Apesar da complexa fisiopatologia da lesão de IR, vários relatos apontam para o papel fundamental dos macrófagos alveolares como orquestradores de respostas imunes inatas dentro do pulmão. Os macrófagos alveolares expressam vários receptores de reconhecimento padrão, que podem desempenhar um papel crítico na formulação de respostas imunes nos aloenxertos do pulmão em resposta a infecções respiratórias (Naidu et al., 2003). Por exemplo, já foi relatado que a produção de TNF-alfa por macrófagos alveolares aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células epiteliais alveolares (Sharma et al., 2007).

A IR durante o transplante pulmonar, ativa múltiplos caminhos de uma cascata de lesões. Algumas citocinas pró e anti-inflamatórias como a IL6, IL8 e a IL10 dirigem estes caminhos (de Perrot et al., 2003).

Diversos estudos examinaram a importância dos *toll-like receptors* (TLRs) em diferentes modelos experimentais de IR. TLR4 é um receptor que é ativado por componentes das bactérias gram-negativas, tais como lipopolissacarídeos (LPS). No entanto, os TLRs, incluindo TLR4, foram relatados como sendo ativados por substâncias endógenas que são liberadas durante a necrose celular. Em modelos experimentais de IR cardíaca, ambos os TLRs 2 e 4 têm sido implicados na indução da lesão e na inflamação subsequente (Oyama et al., 2004).

Vários trabalhos têm usado modelos de oclusão pulmonar como modelos de lesão de IR. Alguns grupos têm observado que a lesão por IR é atenuada em camundongos deficientes em TLR4 (Shimamoto et al., 2006; Zanotti et al., 2009).

Existem algumas terapias usadas com o objetivo de minimizar os efeitos da IR, como: pré-condicionamento, terapia de gases, terapia de surfactante, oxigenoterapia hiperbárica, prostaglandinas (Weyker et al., 2013) e agentes antioxidantes (Jackson et al., 1988; Lu et al., 1998), sendo alguns testados em diferentes modelos experimentais (Haverich & Karck, 1994; Zhao et al., 1997; Inci et al., 2007). Entre esses agentes encontra-se a creatina (Lawler et al., 2002; Almeida et al., 2016).

Creatina

Desde a descoberta da creatina fosfato (PCr), em 1927, e das reações da creatina quinase, em 1934, os esforços de investigação concentram-se principalmente nos aspectos bioquímicos, fisiológicos e patológicos da própria reação de creatina quinase e no seu envolvimento no metabolismo de fosfato de alta energia das células e tecidos de alta demanda energética.

Apesar da menor atenção, em geral, que tem sido dada ao metabolismo da creatina, novas importantes descobertas foram feitas nas últimas décadas. Por exemplo, análogos da creatina provaram ser potentes agentes anticarcinogênicos, que atuam sinergicamente com o uso de agentes quimioterápicos. A ciclocreatina, um dos análogos da creatina, assim como a PCr, protege os tecidos de danos isquêmicos e pode, portanto, ter um impacto sobre o transplante de órgãos (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

A creatina monohidratada, o suplemento mais usado na indústria do esporte, tem recebido maior atenção por causa dos seus efeitos benéficos em um grande número de doenças degenerativas. Estes efeitos são explicados com base no seu papel ergogênico do sistema Cr/PCr (Sestili et al., 2011).

A creatina tornou-se um dos alimentos mais populares no mercado de nutrição esportiva. A creatina monohidratada é a forma mais estudada e utilizada em suplementos alimentares. Estudos têm indicado que a suplementação com creatina monohidratada aumenta as concentrações de fosfato no músculo em cerca de 15-40%, melhora a capacidade de exercício anaeróbio e aumenta o volume de treinamento, levando a maiores ganhos de força, potência e massa muscular (Jager et al., 2011).

A creatina é uma amina sintetizada endogenamente principalmente pelos rins, pâncreas e fígado a partir dos aminoácidos L-arginina, L-glicina e L-metionina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Lawler et al., 2002). Os órgãos produzem 1 a 2 g de creatina por dia, enquanto 1 a 5 g por dia são obtidas a partir dos alimentos ingeridos (carne e peixe), sendo que 95% desta creatina são transportados para o músculo esquelético, cérebro e testículos (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

Desde meados dos anos 80, a creatina passou a ser comercializada como suplemento dietético, sendo utilizada principalmente por atletas que necessitam aumentar massa, força e explosão muscular (Lawler et al., 2002). A creatina monohidratada na forma mais comumente encontrada hoje em dia passou a ser comercializada no início dos anos 1990; desde então tem sido frequentemente citada na literatura científica. Muitas outras formas também surgiram na tentativa de melhorar a solubilidade em água a fim de melhorar a biodisponibilidade e aumento no desempenho. A creatina monohidratada contém 87,9% de creatina, enquanto que os conteúdos de outras formas de creatina são inferiores (Jager et al., 2011).

Segundo alguns autores, os efeitos antioxidantes da creatina podem derivar de diferentes mecanismos indiretos de ação, como na estabilização de membranas celulares e melhora na capacidade energética da célula (Persky & Brazeau, 2001; Wyss & Schulze, 2002), e mecanismos diretos, devido às propriedades antioxidantes atribuídas à creatina (Lawler et al., 2002; Sestili et al., 2006).

A suplementação com creatina pode atenuar danos oxidativos induzidos pelo exercício nas células musculares, através da manutenção da homeostase energética mitocondrial (Rawson et al., 2001). Além de considerar seu uso no auxílio ergogênico,

estudos acerca da suplementação com creatina têm tido mais atenção desde que foi sugerido que a mesma tem efeitos benéficos na prevenção e/ou tratamento de algumas doenças musculares, neurológicas e cardiovasculares (Matthews et al., 1998; Heinanen et al., 1999; Klivenyi et al., 1999; Andreassen et al., 2001). Os benefícios da creatina nessas doenças são atribuídos à sua ação nos níveis de ATP celular, cuja queda causaria a acumulação de Ca^{2+} intracelular, estimulando a formação de EROs e causando, conseqüentemente, danos ao metabolismo oxidativo (Persky & Brazeau, 2001).

Em casos de isquemia temporária, a capacidade de gerar ATP pelo metabolismo oxidativo é reduzida, causando danos celulares. Entretanto, o aumento nas concentrações de creatina fosfato, através da suplementação com creatina, pode facilitar a geração de ATP, além de promover a manutenção da homeostase de Ca^{2+} intracelular, mecanismos esses que também podem ser considerados importantes ações antioxidantes geradas pela ingestão de creatina (Wyss & Schulze, 2002).

Em estudo prévio, usando um modelo animal de oclusão total do hilo pulmonar esquerdo (artéria, veia e brônquio), avaliamos os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da creatina monohidratada e observamos sua capacidade de atenuar os efeitos da IR no tecido pulmonar (Almeida et al., 2016). Contudo, outra importante pergunta surgiu: a suplementação com creatina também teria efeitos benéficos na atenuação da lesão de IR em um modelo mais complexo e mais próximo da prática cirúrgica, como o transplante pulmonar?

2.OBJETIVO

Avaliar o papel da suplementação com creatina na atenuação da lesão de isquemia e reperfusão em ratos submetidos a transplante pulmonar, com relação a aspectos inflamatórios, estruturais e funcionais do tecido pulmonar.

|

3.MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 64 ratos (32 doadores e 32 receptores) machos adultos (10 semanas) da linhagem Sprague Dawley, pesando entre 360 e 415 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram utilizados segundo as regras da Comissão de Ética em Experimentação Animal desta instituição (CEP 376/13).

Grupos

Os animais receptores foram distribuídos em quatro grupos conforme (i) a substância dada aos animais doadores (água ou creatina) e (ii) o tempo de isquemia fria do pulmão a ser implantado (90 ou 180 minutos):

- *A90 (n = 8)*: controle/água + 90 minutos de isquemia;
- *Cr90 (n = 8)*: creatina + 90 minutos de isquemia;
- *A180 (n = 8)*: controle/água + 180 minutos de isquemia;
- *Cr180 (n = 8)*: creatina + 180 minutos de isquemia.

Suplementação com creatina

Os animais doadores receberam creatina (Sigma®, 0,5g/kg/dia) (Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Almeida et al., 2016) diluída em 1 mL de água filtrada, por gavagem (figura 1A), durante 5 dias antes do procedimento cirúrgico. Os animais dos grupos Controle receberam apenas o veículo (água filtrada).

Procedimento cirúrgico

Animais doadores

Vinte e quatro horas após a última gavagem, os doadores foram anestesiados com isoflurano 5% (Isothane, Baxter) e entubados orotraquealmente com cânula de polietileno com auxílio de um laringoscópio pediátrico adaptado para roedores. A seguir, a cânula foi conectada a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, CA). Os animais foram mantidos em decúbito dorsal e ventilados com volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 80 ciclos/min e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 3 cmH₂O. O pico máximo de pressão traqueal foi mantido em 12 cmH₂O. A anestesia geral foi mantida com isoflurano (2%) distribuído através de um vaporizador de gases (K. Takaoka, mod. 1223).

Após laparotomia mediana, os animais receberam heparina sódica (50 UI) injetada diretamente na veia cava inferior. A seguir, procedeu-se a abertura da caixa torácica através de esternotomia mediana. Imediatamente antes da perfusão dos pulmões com a solução de preservação (Perfadex[®], Vitrolife), a veia cava inferior foi seccionada para diminuir o retorno venoso, e a aurícula esquerda foi amputada para facilitar a drenagem da solução de preservação. Ambos os procedimentos levaram o animal a óbito. Em seguida, foi realizada uma pequena incisão na parede anterior do ventrículo direito, próximo à emergência do tronco da artéria pulmonar, através da qual foi introduzida uma sonda plástica conectada ao reservatório da solução de preservação. Teve início, então, a perfusão anterógrada dos pulmões com 20 mL de solução a 4°C sob pressão de 20 cm H₂O (figura 1B) (Abreu et al., 2014).

Após os pulmões estarem completamente perfundidos com a solução de preservação, procedeu-se a retirada do bloco cardiopulmonar com os pulmões mantidos insuflados por meio da oclusão da traqueia ao final da inspiração. O objetivo de manter a insuflação pulmonar foi proporcionar certa reserva de oxigênio, além de prevenir a atelectasia do órgão. O bloco cardiopulmonar foi colocado em placa de Petri contendo gaze umedecida com a mesma solução de preservação a 4°C. O pulmão esquerdo foi coberto com parte dessa gaze para manter a umidade e a temperatura do órgão, bem como para facilitar a dissecação do hilo pulmonar e colocação dos manguitos na artéria, veia e brônquio, conforme técnica descrita previamente (figura 1C) (Xavier et al., 2007). Os manguitos foram confeccionados a partir de dispositivos para acesso venoso periférico número 16 Gauge (G). Após a colocação dos manguitos, o pulmão foi mantido em solução de preservação em recipiente fechado e acondicionado em geladeira a 4°C por 90 ou 180 minutos.

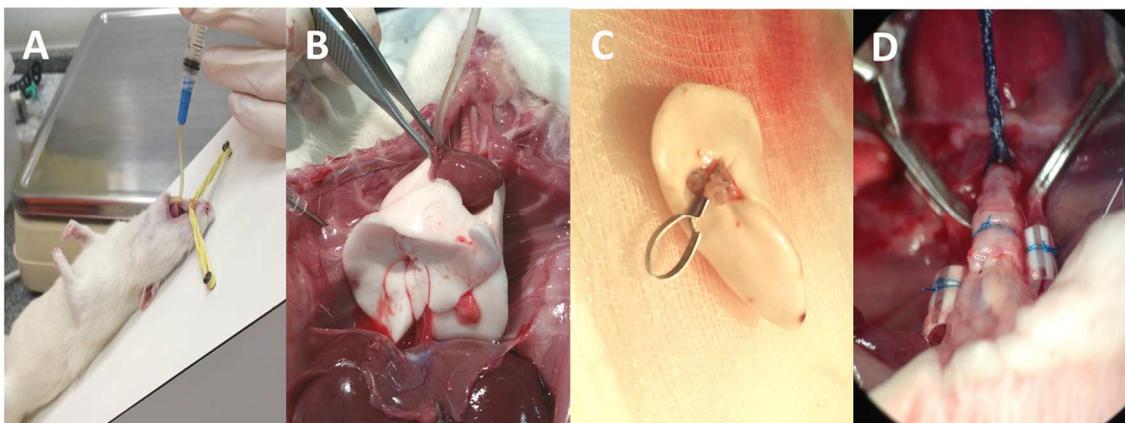


Figura 1. Procedimento cirúrgico. A, gavagem do animal doador com água ou creatina durante 5 dias antes do Tx; B, perfusão anterógrafa dos pulmões com solução de preservação; C, manguitos inseridos na artéria, veia e brônquio do pulmão esquerdo do doador; D, manguitos do enxerto do doador inseridos e fixados nos vasos do animal receptor.

Animais receptores

Os animais foram anestesiados, entubados e ventilados conforme descrito anteriormente para os doadores. A seguir, foram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos à toracotomia esquerda por meio de incisão no 5º espaço intercostal. O ligamento inferior foi cuidadosamente rompido para facilitar a exposição do hilo pulmonar pela tração do pulmão. Após a dissecação e clameamento das estruturas hilares com o auxílio de microscópio estereoscópico (Olympus, mod. SZ61), o enxerto foi posicionado sobre o pulmão nativo e o implante foi iniciado com uma secção parcial da parede da artéria pulmonar esquerda, progredindo-se o manguito da artéria do doador para o interior da artéria receptora, seguido por fixação das estruturas com fio monofilamentar 7.0. Este mesmo procedimento foi realizado para a veia e brônquio, nesta ordem (figura 1D) (Xavier et al., 2007). Após a colocação e fixação dos manguitos, a ligadura do brônquio foi removida e a ventilação lentamente restabelecida, desfazendo-se as atelectasias. A seguir, o clamp da veia pulmonar foi aberto, permitindo a circulação retrógrada e, por fim, o clamp da artéria foi aberto, restabelecendo a circulação anterógrada e a perfusão do enxerto.

Imediatamente antes do fechamento da ferida cirúrgica, foi feita a injeção de cloridrato de lidocaína 2% (4mg/kg). O fechamento do tórax foi realizado por planos separados com fio monofilamentar 2.0. Os animais receberam analgesia (dipirona sódica, 400 mg/kg) por via orogástrica e foram mantidos por 120 minutos no ventilador mecânico.

Avaliação da mecânica pulmonar

Imediatamente no início e após 120 minutos de reperfusão do enxerto, foi calculada a impedância do sistema respiratório dos animais. A ventilação mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações. Foram medidos os dados de resistência de vias aéreas (RAW), elastância de tecido (HTIS) e resistência de tecido (GTIS) pelo modelo de oscilação forçada (Hantos et al., 1992).

Coleta do ar exalado e análise dos níveis de óxido nítrico

Após a coleta de dados da mecânica, o sistema de anestesia foi desligado e a ventilação passou a ser feita com ar ambiente. Após um minuto, um balão de Mylar foi conectado à saída do ventilador por três minutos para a coleta do óxido nítrico exalado (NO_{ex}). Para evitar a contaminação ambiental, um filtro de NO foi anexado ao circuito de ventilação (Prado et al., 2006; Olivo et al., 2012; Almeida et al., 2016). As concentrações de NO_{ex} foram medidas por quimioluminescência usando-se o analisador NOA 280 (Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO). Antes de cada medição, o analisador foi calibrado com NO na concentração de 47 ppb (White Martins) e um filtro de NO zero (Sievers Instruments, Inc.).

Gasometria

Após a coleta da amostra de NO_{ex}, o sistema de anestesia foi novamente ligado e foi realizada uma laparotomia mediana para coleta de sangue por punção da artéria aorta abdominal, utilizando-se seringa heparinizada. A análise das amostras de sangue foi processada no aparelho Stat Profile 10 (Nova Biomedical).

Contagem de células no sangue periférico

Logo em seguida, foram coletados 5 mL de sangue da veia cava inferior para determinação do número total de leucócitos. O material foi processado conforme descrito a seguir para o lavado broncoalveolar. Antes, porém, uma gota do sangue coletado foi usada para a realização de esfregaço sanguíneo e contagem diferencial de leucócitos.

Eutanásia

Logo após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados, pela secção total da artéria aorta abdominal e, a seguir, o bloco cardiopulmonar foi extraído da caixa torácica.

As carcaças dos animais foram descartadas conforme as normas da FMUSP, sendo colocadas em sacos brancos, devidamente identificados com a etiqueta própria, lacrados e acondicionados em freezer no laboratório. O descarte final da carcaça foi de responsabilidade da empresa limpadora contratada pela FMUSP.

Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi utilizado para avaliação do número total e diferencial de células e também para avaliação dos níveis de citocinas nos pulmões.

Coleta do LBA e contagem total e diferencial de células

O pulmão foi removido em bloco, seco com papel absorvente e pesado em balança analítica (Mettler Toledo, mod. AG204). A seguir, o pulmão esquerdo foi dissecado e isolado do restante do conjunto para realização do LBA seletivo, por instilação de 5 mL de solução PBS com cateter 16G. O material foi centrifugado a 300g por 10 minutos a 5°C. Depois da centrifugação e retirada do sobrenadante, o pellet celular foi ressuscitado com 5 mL de PBS para a contagem do número total de células por mL, realizada em câmara de Neubauer. Foram confeccionadas lâminas de cytopspin (modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA), que foram posteriormente coradas com Diff-Quik para a contagem diferencial celular (300 células/lâmina).

Medida de citocinas no LBA por ELISA

O sobrenadante do LBA foi utilizado para dosagem das citocinas inflamatórias IL1-beta, IL6, CINC1, IL10 e TNF-alfa pelo método ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante. Neste método, o anticorpo para um antígeno específico, chamado de anticorpo de captura é inicialmente absorvido pelo poço da placa. Depois, a amostra com o antígeno é adicionada e se liga a este anticorpo. Logo após, é adicionado outro anticorpo específico de detecção para o antígeno. Finalmente, um terceiro anticorpo ligado à enzima é adicionado à estreptavidina. Esta enzima irá reagir no substrato adicionado, gerando cor. A intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente, determinado por densidade óptica (RD Systems, CA, EUA).

Coleta do tecido pulmonar para análise por histologia e imunohistoquímica

Histologia

Após o LBA, o pulmão esquerdo foi instilado intratraquealmente com paraformaldeído 4%, a uma pressão de 20 cm de H₂O; a traqueia foi ocluída e o pulmão submerso em recipiente contendo a mesma solução para a fixação do tecido por 24hs. A seguir, a peça foi submetida a processamento de rotina para emblocamento em parafina e confecção de lâminas histológicas. As lâminas contendo cortes histológicos de 5 µm foram submetidas às colorações de Hematoxilina-Eosina e analisadas em microscópio ótico com ocular reticulada (50 retas e 100 pontos), onde foram quantificados o índice de edema e o número de células mono e polimorfonucleares (Gonçaves et al., 2012; Olivo et al., 2012; Almeida et al., 2016).

Imunohistoquímica

As lâminas previamente preparadas com silane contendo os cortes histológicos dos pulmões para imunohistoquímica (Almeida et al., 2016) foram utilizadas para verificar a apoptose e proliferação celular pela expressão de células positivas para Caspase-3 e PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*). Além disso, foram realizados os ensaios de imunohistoquímica para avaliar a expressão de TLR4 e TLR7.

Análise estatística

As análises descritivas para os dados quantitativos que apresentaram distribuição normal foram realizadas apresentando-se as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (DP). Já os dados quantitativos sem distribuição normal

foram expressos através das medianas e intervalo interquartil 25-75%. Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados com o teste de Shapiro-Wilk. Foi realizada a comparação entre controle versus tratamento. Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste “t de student”. Quando a variável não apresentou distribuição normal, recorreremos ao teste “Mann-Whitney Rank”. Todas as análises foram realizadas no software SigmaPlot 12.0, com nível de significância de $\alpha=0,05\%$.

|

4.RESULTADOS

Foram utilizados 32 animais doadores e 32 receptores distribuídos nos quatro grupos. Assim, todos os dados apresentados são referentes a oito animais por grupo.

Para simplificar e facilitar a descrição dos resultados, sempre que os animais tratados com creatina ou água forem citados, entenda-se que são os animais que receberam o pulmão esquerdo de animais doadores, estes sim, tratados com creatina ou água, cujos pulmões foram submetidos a 90 ou 180 minutos de isquemia fria.

O peso médio dos animais receptores foi de 394 ± 40 g, enquanto o peso do pulmão e do coração foi de 3081 ± 599 e 1208 ± 104 mg, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos (tabela 1).

Tabela 1. Peso do animal, pulmão e coração.

Peso	A 90 Média (\pm DP)	Cr 90 Média (\pm DP)	p	A 180 Média (\pm DP)	Cr 180 Média (\pm DP)	p
Animal (g)	395,6 (\pm 38,6)	397,6 (\pm 35,7)	0,869	390,4 (\pm 55,5)	394,5 (\pm 32,3)	0,884
Pulmão (mg)	3040,7 (\pm 732,9)	3064,3 (\pm 733,3)	0,930	3176,8 (\pm 378,8)	3069 (\pm 474,1)	0,540
Coração (mg)	1203,0 (\pm 99,8)	1212,9 (\pm 119,0)	0,807	1216,5 (\pm 103,8)	1202,7 (\pm 101,3)	0,724

A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. Dados expressos em média e desvio padrão.

Os dados de mecânica pulmonar foram avaliados em dois momentos, sendo o primeiro logo após o início da reperfusão do enxerto, que chamamos de “reperfusão

imediatas”, e após duas horas de reperfusão do mesmo, que chamamos de “reperfusão final”.

Houve aumento da RAW, e diminuição da GTIS e da HTIS nos animais tratados com creatina na reperfusão imediata. Entretanto, não houve a alteração de RAW e GTIS (90 minutos) na reperfusão final (tabela 2).

A concentração de NOex foi menor nos animais tratados com creatina nos dois diferentes tempos de isquemia, 90 e 180 minutos (figura 2).

Houve aumento da concentração de creatinina no plasma dos animais tratados com creatina nos dois tempos de isquemia avaliados (figura 3).

Tabela 2. Mecânica pulmonar.

Mecânica Pulmonar	A 90 Mediana (25-75%)	Cr 90 Mediana (25-75%)	p	A 180 Mediana (25-75%)	Cr 180 Mediana (25-75%)	p
Reperusão imediata						
RAW (cmH ₂ O.s/mL)	0,071 (0,06-0,11)	0,089 (0,08-0,12)	0,009*	0,089 (0,07-0,10)	0,101 (0,08-0,11)	0,044*
GTIS (cmH ₂ O/mL)	0,329 (0,31-0,37)	0,322 (0,29-0,33)	0,038*	0,372 (0,31-0,38)	0,299 (0,27-0,31)	0,001*
HTIS (cmH ₂ O/mL)	1,974 (1,80-2,04)	1,650 (1,56-1,80)	0,003*	1,881 (1,66-2,31)	1,717 (1,58-1,84)	0,021*
Reperusão final						
RAW (cmH ₂ O.s/mL)	0,098 (0,07-0,15)	0,092 (0,08-0,12)	0,674	0,096 (0,07-0,15)	0,103 (0,09-0,11)	0,554
GTIS (cmH ₂ O/mL)	0,359 (0,32-0,41)	0,325 (0,29-0,35)	0,060	0,361 (0,35-0,37)	0,334 (0,29-0,35)	0,003*
HTIS (cmH ₂ O/mL)	2,312 (1,79-3,11)	1,741 (1,60-2,32)	0,021*	2,033 (1,69-2,51)	1,739 (1,63-1,85)	0,049*

A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. RAW, resistência das vias aéreas; GTIS, elastância de tecido; HTIS, resistência de tecido * grupo creatina diferente de controle. Dados expressos em mediana e 25-75%.

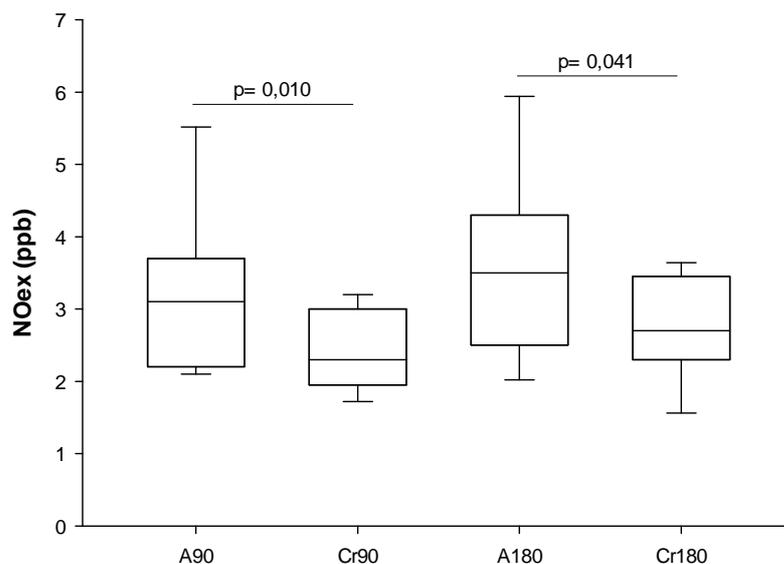


Figura 2. Concentração de óxido nítrico no ar exalado, em partes por bilhão. A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. Dados expressos em mediana e 25-75%.

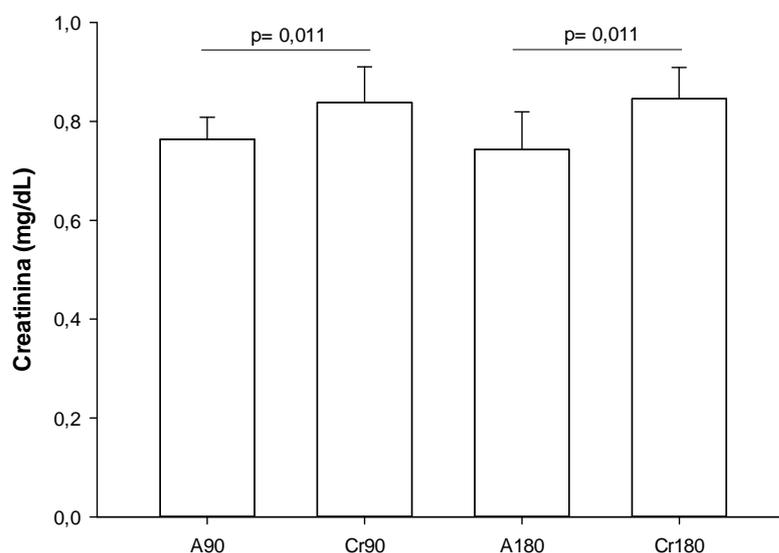


Figura 3. Dosagem de creatinina no plasma. A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. Dados expressos em média e desvio padrão.

Dentre os parâmetros de gasometria arterial das amostras de sangue coletadas dos animais receptores após três minutos da interrupção do fornecimento de oxigênio e sedação, foram considerados os dados de pressão parcial de CO₂ e O₂, e concentração de lactato. Houve melhora na oxigenação dos animais tratados com creatina e submetidos a 90 minutos de isquemia, com diminuição de CO₂ e aumento de O₂ (figura 4 A-B). Nos animais submetidos a 180 minutos de isquemia foi observado apenas o aumento da concentração de O₂ (figura 4 B). Não houve diferença entre a concentração de lactato nos diferentes tempos de isquemia (figura 4 C).

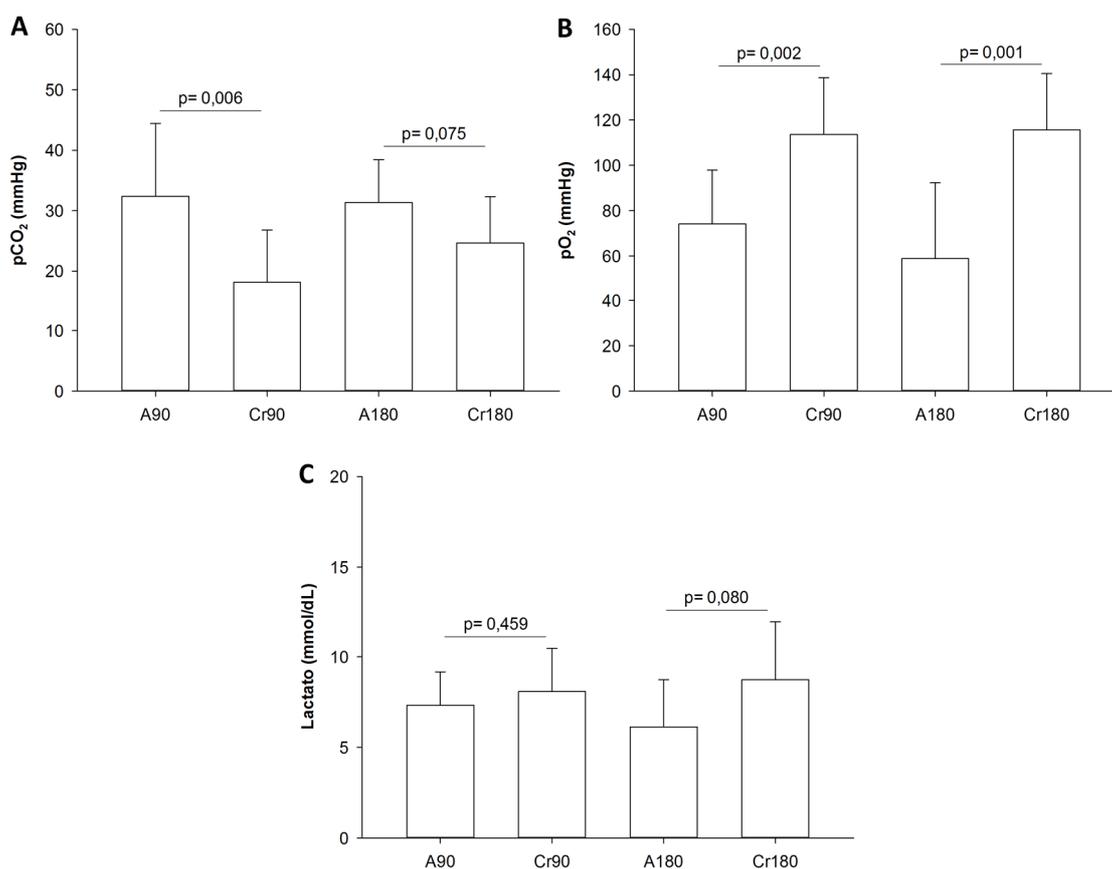


Figura 4. Gasometria arterial. A, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$); B, pressão parcial de oxigênio ($p\text{O}_2$) e C, concentração de lactato. A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. Dados expressos em média e desvio padrão.

Houve diferença entre os grupos creatina comparados aos seus respectivos grupos controle para o número total de leucócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos contados nos esfregaços sanguíneos, exceto no número de linfócitos no tempo de 90 minutos (figura 5 A-D).

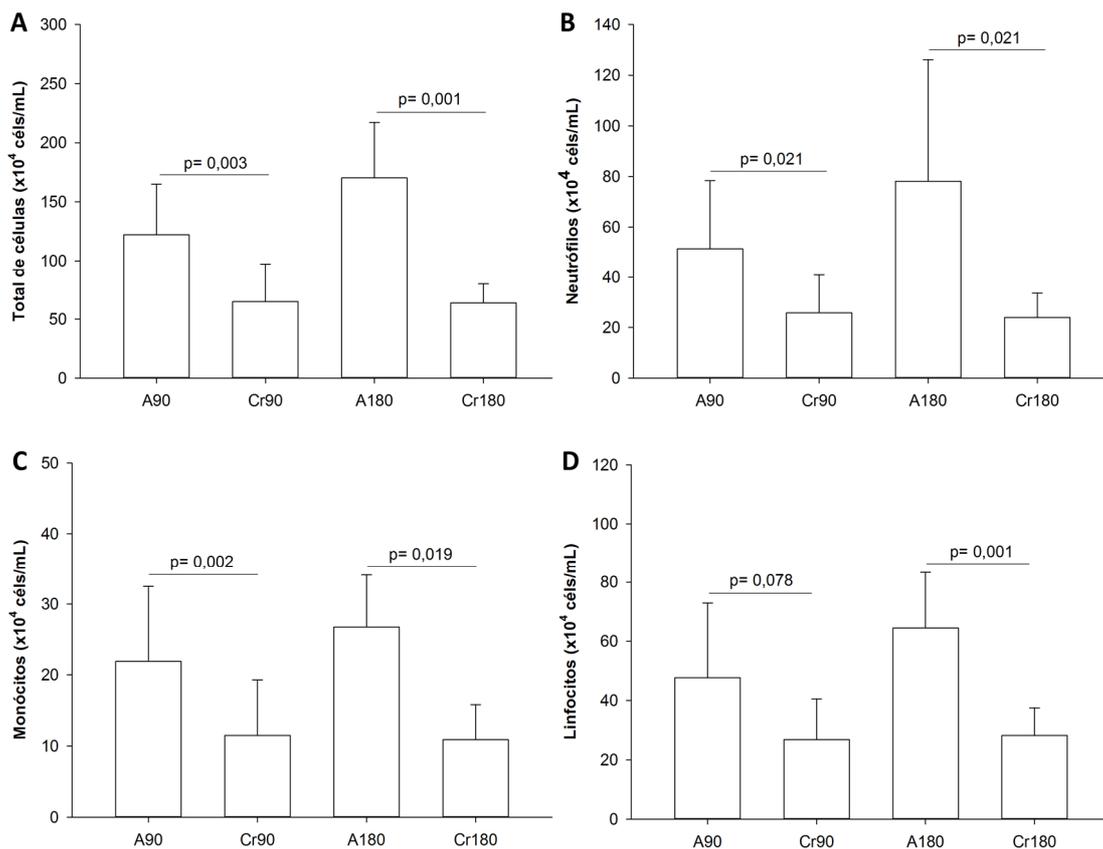


Figura 5. Número total de leucócitos e contagem diferencial no esfregaço sanguíneo (10^4 células/mililitro). A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia; A, contagem total de leucócitos no sangue; B, número de neutrófilos no esfregaço sanguíneo; C, número de monócitos no esfregaço sanguíneo; D, número de linfócitos no esfregaço sanguíneo. Dados expressos em média e desvio padrão.

No LBA, houve diminuição no número total de leucócitos, neutrófilos e macrófagos nos grupos creatina comparados aos respectivos controles (figura 6 A-C). Entretanto, não houve diferença no número de linfócitos (figura 6 D).

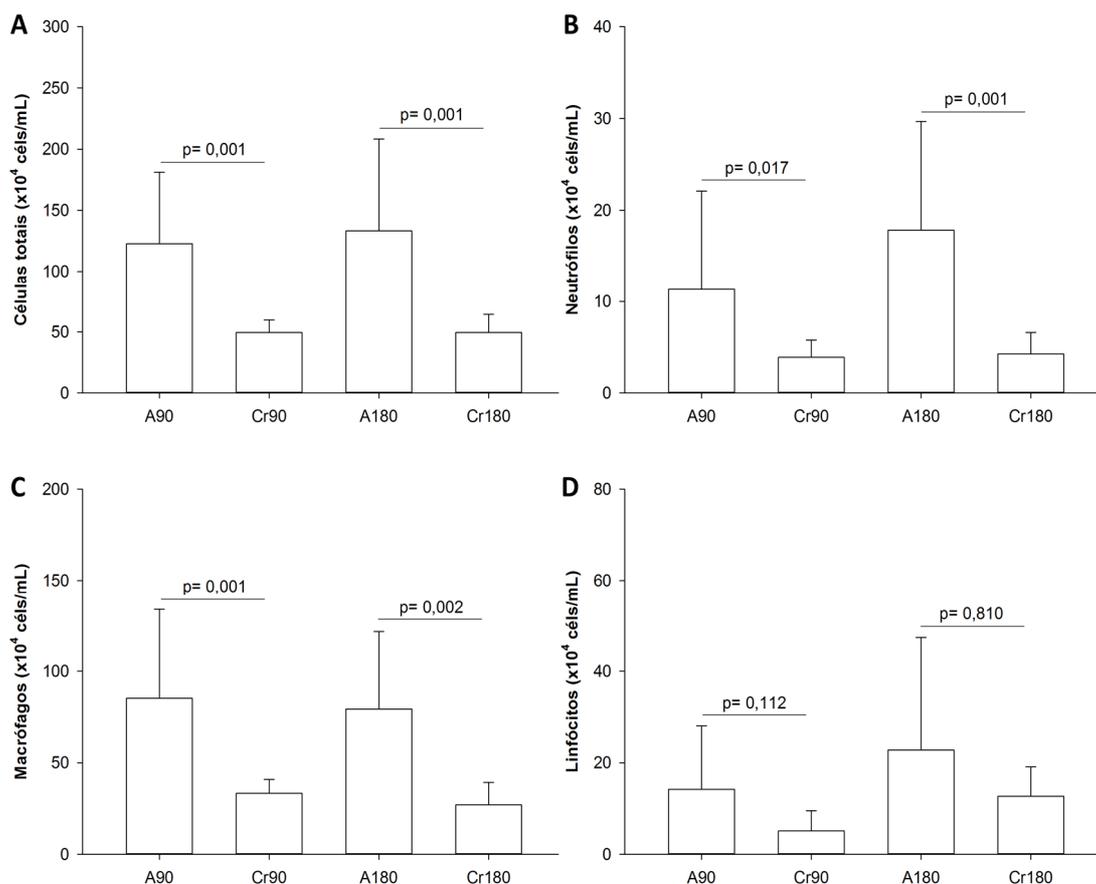


Figura 6. Número total de leucócitos e contagem diferencial do lavado broncoalveolar ($\times 10^4$ células/mililitro). A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia; A, contagem total de leucócitos no LBA; B, número de neutrófilos no LBA; C, número de monócitos no LBA; D, número de linfócitos no LBA. Dados expressos em média e desvio padrão.

O número de células mononucleares e polimorfonucleares no tecido pulmonar foi menor nos animais tratados com creatina nos dois tempos de isquemia comparados aos controles (figura 7 A-B). Foi observada a mesma diminuição para a avaliação do índice de edema vascular (figura 8).

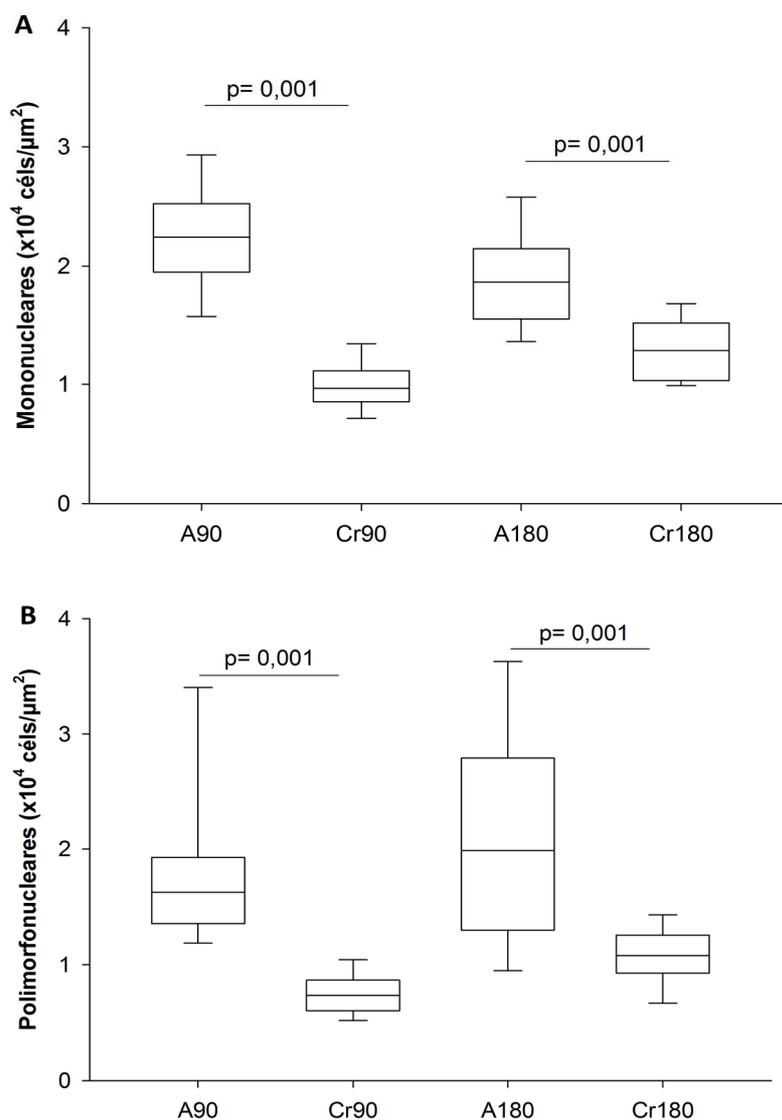


Figura 7. Número de células mononucleares e polimorfonucleares no parênquima pulmonar ($\times 10^4$ células/micrômetro quadrado). A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia; A, células mononucleares; B, células polimorfonucleares. Dados expressos em mediana e 25-75%.

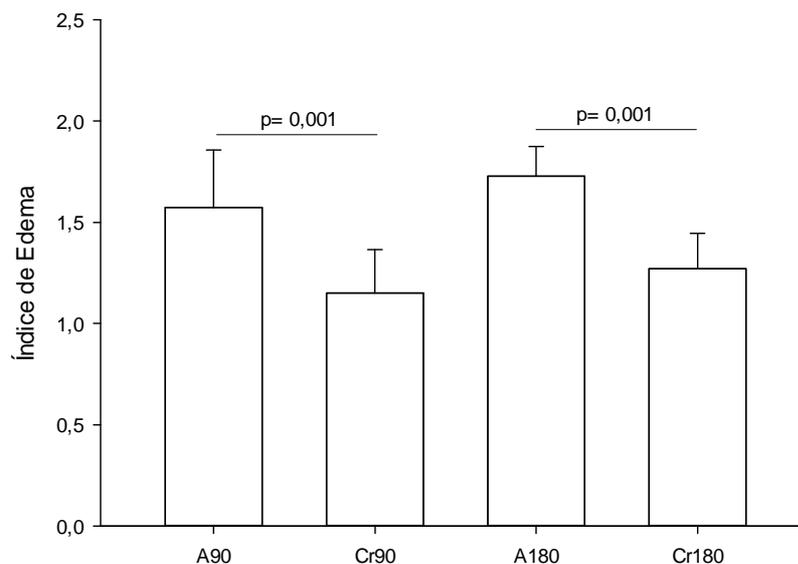


Figura 8. Índice de edema vascular. A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. Dados expressos em média e desvio padrão.

Houve diminuição da proliferação celular, da apoptose e dos receptores de toll like 4 nos animais tratados com creatina, independentemente do tempo de isquemia, comparados aos respectivos controles (figura 9 A-C). Entretanto, não houve alteração no número de células imunopositivas para os receptores de toll like 7 em ambos os tempos de isquemia (figura 9 D).

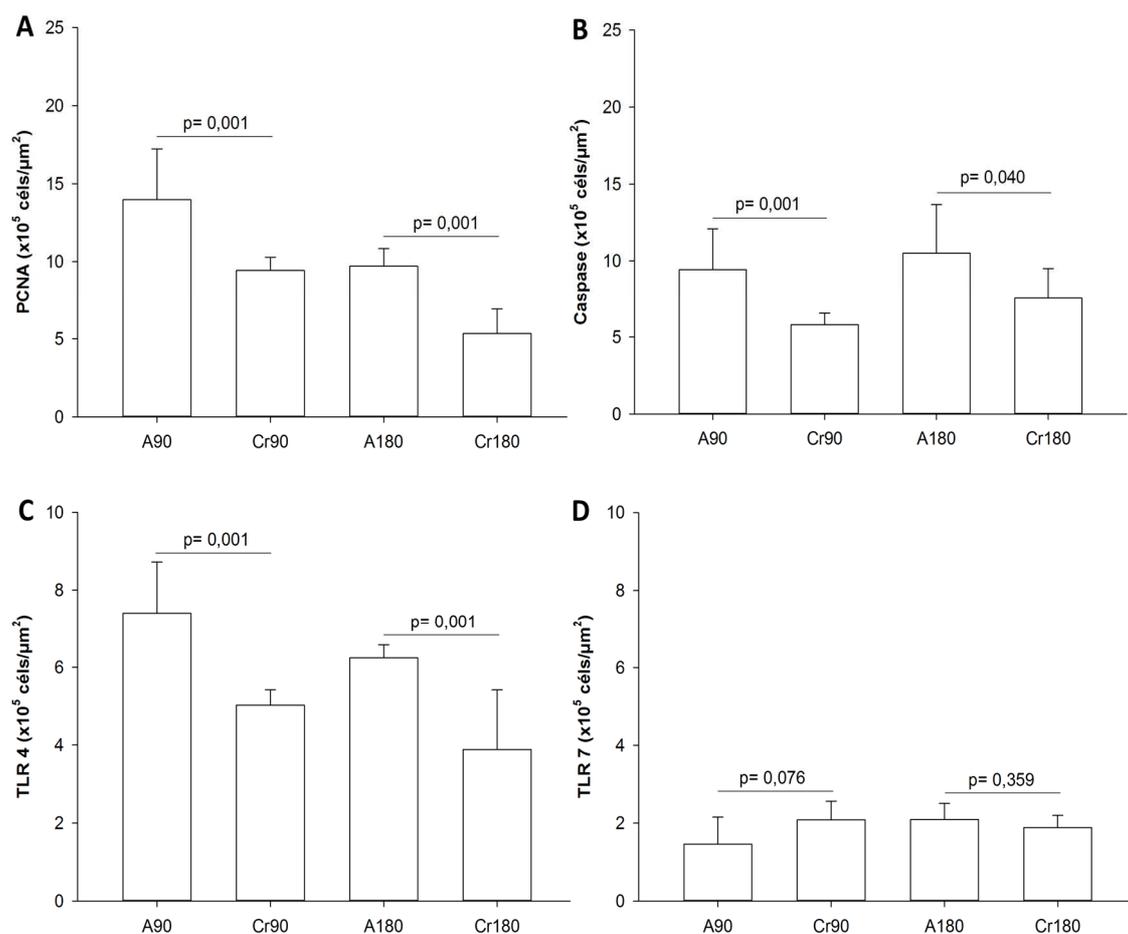


Figura 9. Coloração de células por imunohistoquímica no parênquima pulmonar ($\times 10^5$ células/micrômetro quadrado). A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia. A, células imuno-positivas para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA); B, células imuno-positivas para Caspase-3; C, células imuno-positivas para receptores toll like 4 (TLR4); D, células imuno-positivas para receptores toll like 7 (TLR7). Dados expressos em média e desvio padrão.

Os níveis da interleucina IL1 beta no LBA foram maiores nos animais tratados com creatina comparados aos seus receptivos controles. Entretanto, houve a diminuição dos níveis de IL6, outra interleucina pró-inflamatória. Não houve diferença entre os grupos para o nível de TNF alfa. Os níveis da interleucina anti-inflamatória IL10 apresentaram-se maiores nos animais tratados com creatina, porém com significância estatística apenas em 180 minutos de isquemia. Estes animais também

apresentaram a diminuição dos níveis da citocina quimiotática de neutrófilos (CINC1) em ambos os tempos de isquemia (Figura 10 A-E).

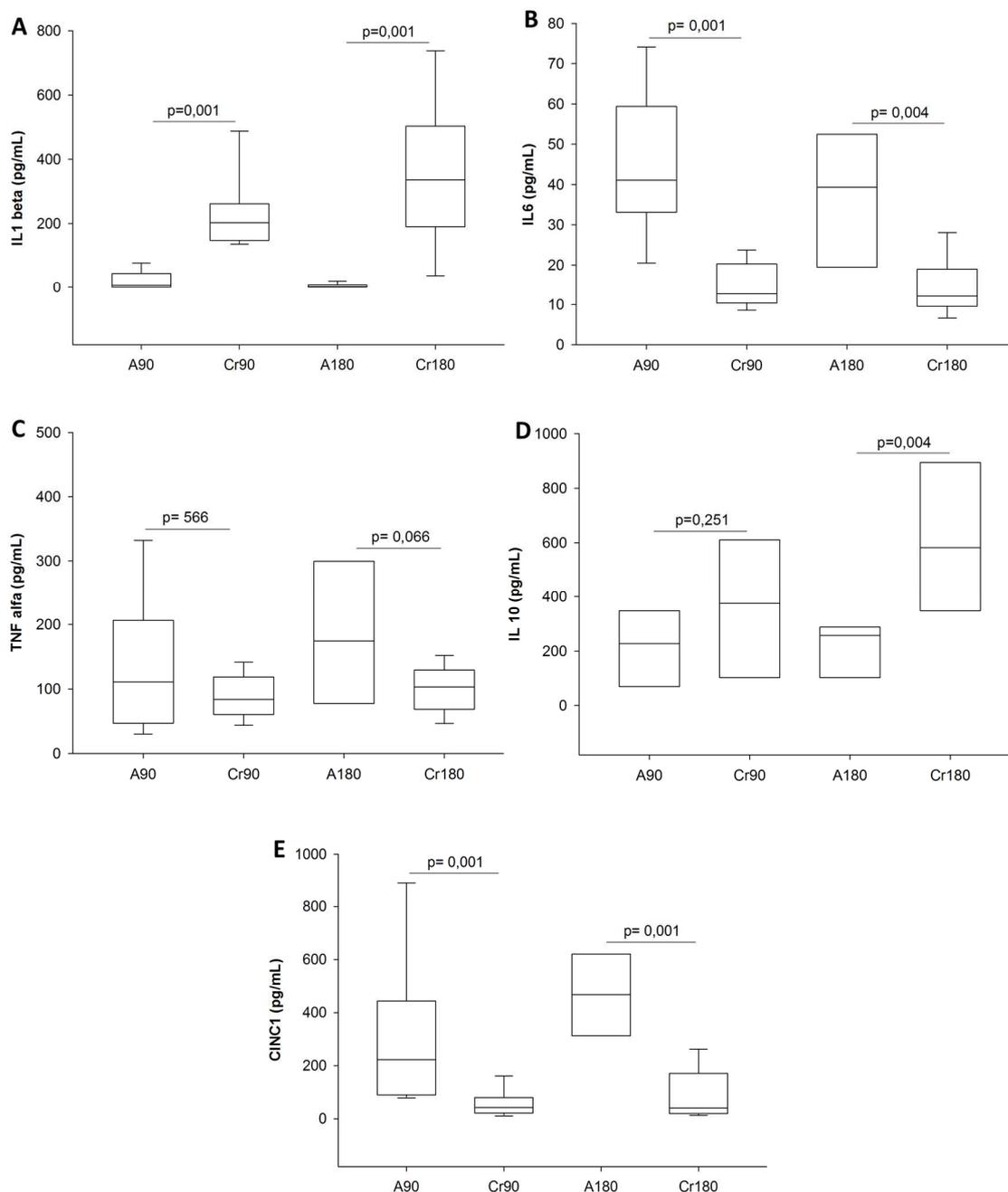


Figura 10. Citocinas pró e anti-inflamatórias dosadas no LBA por método ELISA (picrogramas/mililitro). A90, controle/água + 90 minutos de isquemia; Cr90, creatina + 90 minutos de isquemia; A180, controle/água + 180 minutos de isquemia; Cr180, creatina + 180 minutos de isquemia; A, interleucina 1 beta (IL1 beta); B, interleucina 6 (IL6); C, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa); D, interleucina 10 (IL10); E, citocina quimiotática de neutrófilos (CINC1). Dados expressos em mediana e 25-75%.

5.DIUSSÃO

O escopo principal deste trabalho foi verificar se a creatina pode ser considerada um agente atenuador da lesão de IR visando sua aplicação clínica numa etapa posterior. Para isso, usamos um modelo animal de transplante de pulmão unilateral bastante consagrado na literatura e já utilizado em outros trabalhos do nosso grupo (Xavier et al., 2007; Abreu et al. 2014).

No presente estudo, mostramos que a suplementação com creatina dos animais doadores, durante cinco dias antes do transplante, atenuou os efeitos da lesão de isquemia e reperfusão. Os principais achados foram: melhora da função pulmonar e da gasometria arterial; diminuição da fração exalada de óxido nítrico e da inflamação verificada no sangue periférico, no LBA, e no parênquima pulmonar; diminuição de proliferação e apoptose de células inflamatórias; diminuição da expressão de TLR4, IL6 e CINC1; e aumento de IL10.

Embora sejam necessários outros estudos para estabelecer a causalidade desses achados, tanto os estudos pré-clínicos como clínicos fornecem evidências de que as alterações energéticas e a desregulação da via creatina/creatina quinase (Cr/CK) estão intimamente ligadas à etiologia de distúrbios hipóxicos e inflamatórios.

O sistema Cr/CK define um importante e altamente conservado circuito fosfato, que promove suporte para a respiração mitocondrial e retorno energético celular por atenuar os desequilíbrios temporais e espaciais na oferta e demanda de ATP (Ellington, 1989; Kitzenberg et al., 2016). Todas as isoenzimas catalisam a transferência reversível da gama-fosfato do ATP para o grupo guanidino da creatina para gerar fosfocreatina e ADP, mediando assim um armazenamento eficiente no citosol de fosfatos de alta

energia para o reabastecimento rápido e focal de ATP (Wallimann et al., 1992; Walliman et al., 2011; Kitzenberg et al., 2016).

De fato, estudos clínicos apontam as propriedades neuroprotetoras da creatina e os efeitos benéficos da fosfocreatina na atenuação do estresse cardiovascular (Kitzenberg et al., 2016). Sendo assim, acreditamos que o uso da creatina na dieta seja um candidato promissor no tratamento profilático independente ou como complemento de terapias convencionais para doenças isquêmicas, ou ainda para procedimentos cirúrgicos que necessitem que algum órgão seja submetido a uma isquemia temporária, como é o caso dos transplantes.

O número anual de transplantes de pulmão continua crescendo e os principais esforços de pesquisa são direcionados para: (i) preservar melhor os pulmões dos doadores, (ii) expandir o número de doadores de pulmão, (iii) recondicionar os pulmões dos doadores marginais através da perfusão pulmonar ex vivo, e (iv) desenvolver técnicas e ou substâncias para prevenir ou tratar lesões por IR. Assim, a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da lesão IR pulmonar é fundamental para a tradução desses esforços de pesquisa em aplicação clínica (Laubach & Sharma, 2016).

A lesão de IR, que pode ocorrer logo após o transplante pulmonar, é a principal causa de disfunção do enxerto e está associada com um alto índice de morbidade e mortalidade dos pacientes receptores nos primeiros dias após a cirurgia (Dreyer et al., 2008). Diversas alterações estruturais e funcionais estão entre as possíveis explicações para este fato, como, por exemplo, a diminuição da integridade da barreira alvéolo-capilar e o consequente edema intra-alveolar e intersticial (Novick et al., 1991;

Mühlfeld et al., 2007; Dreyer et al., 2008). Por outro lado, a lesão de IR é marcadamente atenuada quando macrófagos alveolares estão reduzidos, o que ocorre, em grande parte, devido à redução da expressão das citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Zhao et al., 2006).

Em nossos resultados, observamos números elevados de células inflamatórias nos animais controles. Porém, os animais tratados previamente com creatina apresentaram diminuição do número total de células, de neutrófilos e de monócitos/macrófagos avaliados no sangue periférico, no LBA e no tecido pulmonar após o transplante unilateral. Este efeito protetor da creatina sobre as células inflamatórias já foi observado previamente por Almeida et al. (2016) em modelo de oclusão em bloco do hilo pulmonar esquerdo por 90 minutos, seguido de reperfusão por 120 minutos.

Considerando ainda os eventos que ocorrem durante o período de isquemia e que podem alterar a estrutura e, conseqüentemente, o funcionamento do tecido pulmonar, sabe-se que as células do parênquima pulmonar liberam substâncias quimiotáticas (den Hengst et al., 2010), resultando na adesão maciça de células inflamatórias, tais como, macrófagos, neutrófilos e células T, que estão conectadas a arteríolas, vênulas e capilares alveolares (Kuhle et al., 1998; den Hengst et al., 2010). O edema de tecido induzido por isquemia, com inchaço subsequente de células endoteliais, produz novo estreitamento dos capilares (Kloner et al., 1974), que pode resultar na acumulação de hemácias nestes capilares.

O papel da acumulação de hemácias na IR pulmonar não está totalmente compreendido (den Hengst et al., 2010). Na fase inicial de reperfusão, estas mudanças

nos pequenos vasos sanguíneos podem contribuir para o inchaço celular e subsequente fenômeno de não refluxo (Hearse et al., 1993). Wolf et al. (2009) estudaram um modelo de anoxia/reoxigenação em pulmão em normotermia e mostraram aumento significativo na acumulação de glóbulos vermelhos no pulmão. Esse estudo também mostrou um aumento no acúmulo de hemácias no pulmão não isquêmico colateral depois de 30 minutos de reperfusão, sugerindo um papel para sinalização quimiotática a partir do pulmão isquêmico reperfundido para o pulmão não isquêmico (Eppinger et al., 1997).

Todo esse processo de congestão vascular pode resultar em edema agudo e comprometimento da função de troca gasosa no nível da membrana alvéolo-capilar. No presente estudo, verificamos que houve alteração nos níveis de oxigênio e gás carbônico nas amostras colhidas dos animais após a reperfusão do enxerto por 2 horas, com melhora destes parâmetros nos animais tratados com creatina.

Um estudo já relatou que, após a reperfusão, a resistência vascular pulmonar também pode ser aumentada em até três vezes em relação aos níveis normais. E que este aumento é devido, principalmente, à vasoconstrição do sistema pré-capilar pulmonar depois da IR de pulmão (Lockinger et al., 2001).

Além disso, o aumento da resistência vascular pulmonar em conjunto com o aumento da permeabilidade vascular (Allison et al., 1990) resulta em edema pulmonar tanto no período de isquemia (Bhabra et al., 1997) quanto no de reperfusão do enxerto (Jurmann et al., 1990). Em consequência, o aumento no conteúdo total e extravascular de água no pulmão provoca uma má troca gasosa e uma piora na mecânica pulmonar, o que leva a uma menor pressão parcial de oxigênio (pO_2)

(Jurmann et al., 1990), aumento da pressão de pico das vias aéreas, e um elevado gradiente de oxigênio alveolar-arterial (Qayumi et al., 1990; den Hengst et al., 2010).

Nossos resultados revelaram que, após o transplante unilateral, foi possível observar a atenuação do edema vascular nos animais tratados com creatina em relação aos que foram tratados somente com água. Em modelo de IR com oclusão das estruturas hilares em bloco (brônquio, artéria e veia), a creatina também foi capaz de diminuir estes efeitos deletérios na mecânica pulmonar e na formação de edema. Observou-se que após 90 minutos de isquemia e 120 minutos de reperfusão houve uma melhora da resistência e da elastância do tecido pulmonar nos animais suplementados com creatina (Almeida et al., 2016).

No entanto, no presente estudo, estes efeitos benéficos da creatina na mecânica pulmonar foram observados parcialmente. Os pulmões tratados com creatina apresentaram-se preservados na reperfusão imediata, porém após a reperfusão por 2 horas somente a elastância de tecido apresentou-se diminuída em ambos os grupos creatina (90 e 180 minutos) e a resistência de tecido após 180 minutos.

Julgamos que a ausência de diferença dos demais parâmetros na mecânica pulmonar, como observados no trabalho anterior, deve-se ao fato do modelo de transplante pulmonar unilateral ser muito mais complexo. Por exemplo, este modelo implica em diversas interações fisiológicas entre o enxerto e o novo organismo. Além disso, o enxerto permaneceu em isquemia fria por 90 ou 180 minutos, o que não é isento de danos para as células e tecidos. De fato, Fernandes (2015) relatou que a

isquemia fria pode desencadear uma sucessão de eventos que propiciam a ativação de mediadores inflamatórios, edema celular e indução à morte celular.

Segundo Lockinger et al. (2001), após isquemia fria no transplante pulmonar, a apoptose é apenas observada durante a reperfusão e é influenciada pela duração da isquemia fria. Um tempo moderado de isquemia fria de 6 a 12 h antes da reperfusão resulta em mais apoptose no tecido pulmonar do que a necrose. Enquanto que, um tempo de isquemia fria mais longo (24 h antes da reperfusão) resulta na morte celular dominada por necrose (Fisher et al., 2000; den Hengst et al., 2010).

Em nosso estudo, onde os animais permaneceram em isquemia por 90 ou 180 minutos, foi observado, em ambos os tempos nos animais controles, o aumento da apoptose e da proliferação celular, indicando que o dano ocorre mesmo em tempos menores. Por outro lado, os animais tratados com creatina apresentaram a atenuação destes danos celulares resultantes da IR.

A lesão de IR é marcadamente atenuada quando macrófagos alveolares estão reduzidos, o que ocorre, em grande parte, devido à redução da expressão das citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Relatos apontam para o papel fundamental dos macrófagos alveolares como orquestradores de respostas imunes inatas dentro do pulmão. (Naidu et al., 2003; Zhao et al., 2006). Já a produção de TNF-alfa por macrófagos alveolares aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células epiteliais alveolares (Sharma et al., 2007).

A expressão de TNF-alfa e IL1 é regulada positivamente na reperfusão, conforme o aumento dos níveis de expressão de RNAm. Esses níveis de citocinas estão correlacionados com o grau de sequestro precoce de neutrófilos pulmonares, edema

pulmonar e permeabilidade vascular, sugerindo que essas citocinas são importantes moduladores da lesão de IR precoce (Palace et al., 1993; Chang et al., 1997).

A fase inicial da lesão de IR é independente de neutrófilos e caracterizada por uma predominância TNF-alfa e IL1-beta, enquanto que a fase tardia é dependente do recrutamento e ativação de neutrófilos e é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular e por meio de quimiocinas e citocinas heterogêneas (Merry et al., 2015).

Em nosso estudo houve aumento da IL1 beta e não houve alteração de TNF-alfa nos animais tratados com creatina. Se relacionarmos estes dados com a inflamação do tecido pulmonar e LBA, podemos observar que em nosso modelo houve inflamação mediada pelo aumento de células mononucleares/macrófagos, o que não explica o aumento da produção de IL1-beta nos grupos creatina. A via de produção das interleucinas pró-inflamatórias precisa ser melhor investigada em modelo de LTx em ratos.

A IL6 é produzida por inúmeras células, incluindo células brônquicas e células do epitélio pulmonar, enquanto que a IL10 é liberada principalmente pelas células T-helper do tipo 2. O nível elevado destes dois marcadores significa um estado inflamatório aumentado e pode ter um potencial prognóstico (Hamilton, et all. 2017).

Strieter et al. (2002) verificaram que a expressão do gene da IL10 aumenta quando as citocinas pró-inflamatórias são regulamentadas nas respostas inflamatórias agudas. Em nosso modelo, observamos a diminuição da produção da IL-6 e aumento da produção da IL-10 (em 180 minutos) nos grupos tratados com creatina, sugerindo o equilíbrio da regulação de interleucinas na proteção celular.

Allen & Lee (2012) estudaram o nível de citocinas pró e anti-inflamatórias no pré-operatório, supondo que poderiam estar associadas ao risco do desenvolvimento da DPE. Após a avaliação de 28 pacientes transplantados, verificaram que o desenvolvimento da DPE de grau 2 ou 3 estava associado a níveis mais elevados de IL6, IL8, IL10 e MCP1 na pré-reperfusão. Esses dados reforçam a atenção que deve ser dada aos níveis de interleucinas antes mesmo do transplante pulmonar, para uma melhor avaliação e prevenção no desenvolvimento de comorbidades no pós-operatório.

Existem dois sistemas imunológicos complementares nos vertebrados que reconhecem e eliminam agentes patológicos: sistema imunológico inato e sistema imunológico adaptativo. O sistema imunológico inato, ao encontrar agentes patogênicos, provoca resposta aguda, que é acompanhada por vasodilatação sistêmica, extravazamento vascular e migração de leucócitos (Clarck & Kupper, 2005; Mitall et al., 2014).

Dentro de um pequeno período de ativação do sistema imune inato, a resposta inflamatória aguda é iniciada por células imunes que permitem a secreção de várias citosinas e quimiocinas, que recrutam células imunes para o local da infecção. Os neutrófilos são os primeiros a aderir às células endoteliais e começam a migrar através da parede vascular no local da infecção para absorver os patógenos invasores e também secretar mediadores vasoativos e pró-inflamatórios (Kolaczkowska & Kubes, 2013; Mitall et al., 2014).

O sistema imune inato reconhece uma grande variedade de patógenos como vírus, bactérias e fungos por receptores de reconhecimento padrão. Estes receptores podem estar ligados à membrana, como os receptores toll-like ou os receptores de

lectina do tipo C, bem como os receptores citoplasmáticos, semelhantes aos receptores nod-like. Os receptores de reconhecimento padrão são expressos por uma variedade de células imune: macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos. Eles reconhecem precocemente os agentes patológicos (Takeuchi & Akira, 2010; Mitall et al., 2014).

Estímulos inflamatórios, como lesões térmicas (Patterson et al., 2003) e lesões por IR (Wolfs et al., 2002), foram associados ao aumento da expressão e ativação de TLRs (Andrade et al., 2006). No nosso estudo, houve diminuição da expressão das células imunocoradas para TLR4 nos grupos creatina e tendência de aumento da expressão de TLR7 no grupo creatina 90 minutos. Assim como no trabalho anterior, (Almeida et al., 2016) a creatina foi capaz de modular a resposta do sistema imune inato.

Em estudo de IR de miocárdio, Oyama et al. (2004) observaram que camundongos deficientes de TLR4 apresentaram redução significativa das áreas de infarto do miocárdio, de infiltrado de neutrófilos, de peroxidação lipídica e de deposição de complemento nos tecidos cardíacos.

Entretanto, o papel exato dos TLRs nos transplantes de órgãos não está completamente esclarecido. Os TLRs têm sido investigados em relação a alguns dos principais aspectos dos transplantes de órgão: lesão de IR; rejeição aguda e crônica; e infecção após o Tx (Andrade et al., 2005).

Andrade et al. (2006) examinaram os níveis de expressão de RNAm de TLR no tecido pulmonar coletado durante IR no transplante de pulmão humano e descobriram que os níveis de RNAm da maioria dos TLRs correlacionam-se com os níveis de RNAm

das citocinas (IL1-beta, IL6, IL8, IL10, e IFN-gama) nos pulmões dos doadores durante o armazenamento hipotérmico. Essas observações sugerem que as respostas inflamatórias no órgão doador podem afetar a expressão e a atividade dos genes TLR; alternativamente, os níveis de expressão e ativação de TLRs podem contribuir para a regulação da expressão gênica das citocinas. Além disso, foi encontrada uma estreita correlação entre TL4 e IL8 antes e após a reperfusão, sugerindo que esta citocina pode estar envolvida na regulação da expressão do gene TLR4 na configuração do transplante pulmonar.

Outro parâmetro indicativo de processo inflamatório é o nível de NO, que pode ser facilmente medido no ar exalado.

O óxido nítrico endógeno é um vasodilatador que age no revestimento endotelial de vasos sanguíneos e é produzido a partir da L-arginina e oxigênio pela NO sintase. Em condições normais, o NO é predominantemente produzido pela síntese endotelial (eNOS) (Marczin, 2005). Uma isoforma alternativa, síntese indutível (iNOS), é estimulada por citocinas e endotoxinas bacterianas e podem produzir uma quantidade excessiva de NO durante a inflamação e estresse (Marczin, 2005; Yamashita et al., 2004; Pasero et al., 2010).

O NO também é um mediador biológico chave produzido por vários tipos de células, incluindo o endotélio vascular, é um inibidor da agregação plaquetária e adesão de neutrófilos e modula a permeabilidade vascular. Além disso, NO atua como broncodilatador e neurotransmissor (Matsuzaki et al., 1993).

Estudos anteriores mostraram que o NOex pode ser usado como um marcador indireto de inflamação pulmonar e está correlacionado com a gravidade e resposta aos

tratamentos (Chatkin et al., 2000). Além disso, o NO é um gás radical livre altamente reativo que reage com uma grande variedade de biomoléculas para produzir ERNs (Fink, 2002).

Almeida et al. (2016) mostraram que a creatina é capaz de amenizar os danos oxidativos causados pela IR pulmonar pela diminuição dos níveis de NOex. Neste trabalho com a aplicação de uso da creatina em modelo de IR em Tx, também observamos a diminuição dos danos oxidativos nos diferentes tempos de isquemia.

A produção de EROs é fundamental para a progressão de muitas doenças inflamatórias. As EROs são produzidas por células que estão envolvidas na resposta de defesa do hospedeiro, como os neutrófilos polimorfonucleares e promovem a disfunção endotelial por oxidação de proteínas de sinalização celulares cruciais, como as tirosina-fosfatases. As EROs atuam como moléculas de sinalização e mediadoras da inflamação (Beckman, 1996). Apesar da compreensão do papel dos oxidantes na progressão inflamatória, os tratamentos que utilizam uma variedade de abordagens antioxidantes ainda não foram bem sucedidos. A falha de alguns ensaios clínicos com antioxidantes indica uma lacuna em nosso entendimento geral se o estresse oxidativo é salutar ou prejudicial na inflamação (Katsiki & Manes, 2009; Mitall et al., 2014). São necessários mais estudos que utilizem estes agentes antioxidantes e diversos modelos experimentais a fim de afirmar sua eficácia, seja em modelos simples de inflamação ou em modelos mais complexos como de IR em Tx.

|

6.CONCLUSÃO

A suplementação da creatina em ratos submetidos a transplante pulmonar unilateral atenuou os efeitos deletérios causados pela lesão de isquemia e reperfusão, confirmados pela diminuição da inflamação e pela conservação da estrutura e do funcionamento do tecido pulmonar.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Francine Maria de Almeida – Tese de doutorado

- Abreu MM, Pazetti R, Almeida FM, Correia AT, Parra ER, Silva LP, Vieira RP, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Methylene blue attenuates ischemia--reperfusion injury in lung transplantation. *J Surg Res*. 2014 Dec;192(2):635-41.
- Adegunsoye A, Strek ME, Garrity E, Guzy R, Bag R. Comprehensive Care of the Lung Transplant Patient. *Chest*. 2017 Jul;152(1):150-64.
- Afonso Júnior JE, Werebe Ede C, Carraro RM, Teixeira RH, Fernandes LM, Abdalla LG, Samano MN, Pêgo-Fernandes PM. Lung transplantation. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015 Apr-Jun;13(2):297-304.
- Allen JG1, Lee MT, Weiss ES, Arnaoutakis GJ, Shah AS, Detrick B. Preoperative recipient cytokine levels are associated with early lung allograft dysfunction. *Ann Thorac Surg*. 2012 Jun;93(6):1843-9.
- Allison RC, Kyle J, Adkins WK, Prasad VR, McCord JM, Taylor AE. Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J Appl Physiol*. 1990;69:597-603.
- Almeida FM, Oliveira-Junior MC, Souza RA, Petroni RC, Soto SF, Soriano FG, de Carvalho PT, Albertini R, Damaceno-Rodrigues NR, Lopes FD, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Dolhnikoff M, Pazetti R, Vieira RP. Creatine supplementation attenuates pulmonary and systemic effects of lung ischemia and reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Feb;35(2):242-50.
- Andrade CF, Kaneda H, Der S, Tsang M, Lodyga M, Chimisso Dos Santos C, Keshavjee S, Liu M. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006 Nov;25(11):1317-23.

Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant*. 2005 May;5(5):969-75.

Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Jenkins BG, Ferrante KL, Thomas M, Friedlich A, Browne SE, Schilling G, Borchelt DR, Hersch SM, Ross CA, Beal MF. Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 2001;8(3):479-91.

Apostolakis E, Filos KS, Koletsis E, Dougenis D. Lung dysfunction following cardiopulmonary bypass. *J Card Surg*. 2010 Jan-Feb;25(1):47-55.

Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Registro Brasileiro de Transplante. Direcionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado 2016 [Internet]. São Paulo: ABTO; 2017 [citado 17 Out. 2017]. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2016/RBT2016-leitura.pdf>.

Babiker MA, Obeid HA, Ashong EF. Acute reversible pulmonary ischemia. A cause of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *Clin Pediatr (Phila)*. 1985;24(12):716-8.

Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 1996 Jul-Aug;9(5):836-44.

Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. Attenuation of lung graft reperfusion injury by a nitric oxide donor. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997; 113:327-33.

Camargo JJ, Schio SM, Sanches L. Transplante de pulmão: conceitos e rotinas. In: Camargo JJ, Pinto Filho DR. *Tópicos de atualização em cirurgia torácica*. São Paulo: FMO; 2011. p.394-401.

Chambers DC, Yusen RD, Cherikh WS, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Khusch K, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Rossano JW, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-

- fourthAdult Lung And Heart-Lung Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Oct;36(10):1047-59
- Chang DM, Hsu K, Ding YA, Chiang CH. Interleukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Oct;156(4 Pt 1):1230-4
- Chatkin M, Menezes AM, Albernaz E, Victora CG, Barros FC Asthmatic children's risk factors for emergency room visits, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2000 Oct;34(5):491-8.
- Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10:826–37.
- Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2012. *J Heart Lung Transplant*. 2012; 31(10):1073-86.
- Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*. 2005 Oct;125(4):629-37.
- De Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusioninduced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:490–511,.
- den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(5):H1283-99.
- Dreyer N, Muhlfeld C, Fehrenbach A, Pech T, Von Berg S, Nagib R, Richter J, Wittwer T, Wahlers T, Ochs M. Exogenous surfactant application in a rat lung ischemia reperfusion injury model: effects on edema formation and alveolar type II cells. *Respir Res*. 2008;9(1):5.
- Eberlein M, Garrity ER, Orens JB. Lung allocation in the United States. *Clin Chest Med*. 2011;32(2):213:22.

Ellington WR. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other musclephosphagens. *J Exp Biol.* 1989 May;143:177-94.

Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia- reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol.* 1997;150: 1773-84.

Fernandes LM. *Comparação entre duas soluções de recondicionamento pulmonar em pulmões humanos não-aceitos para transplante em modelo de avaliação e recondicionamento pulmonar ex vivo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo; 2015.

Ferreira SC, Toledo AC, Hage M, Santos ABG, Medeiros MC, Martins MA, Carvalho CRF, Dolhnikoff M, Vieira RP. Creatine activates airway epithelium in asthma. *Int J Sports Med.* 2010; 31:906-12.

Fink MP. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8:6-11.

Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Nov;162(5):1932-9.

Floreth T, Bhorade SM. Current trends in immunosuppression for lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med.* 2010;31(2):172-8.

Frazier AA, Galvin JR, Franks TJ, Rosado-De-Christenson ML. From the archives of the AFIP: pulmonary vasculature: hypertension and infarction. *Radiographics.* 2000;20(2):491-524.

Gonçalves CTR, Gonçalves CGR, Almeida FM, Lopes FDTQS, Silva LFF, Marcourakis T, Castro-Faria-Neto HC, Vieira RP, Dolhnikoff M. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care.* 2012; 16(5):R199.

- González-Castro A, Llorca J, Suberviola B, Díaz-Regañón G, Ordóñez J, Miñambres E. Influence of nutritional status in lung transplant recipients. *Transplant Proc.* 2006;38(8):2539-40
- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994;81(5):637-47.
- Hamilton BC, Kukreja J, Ware LB, Matthay MA. Protein biomarkers associated with primary graft dysfunction following lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017 Apr 1;312(4):L531-L41.
- Hantos Z, Adamicza A, Govaerts E, Daróczy B. Mechanical impedances of lungs and chest wall in the cat. *J Appl Physiol.* 1992;73 427-33.
- Hartert M, Senbaklavacin O, Gohrbandt B, Fischer BM, Buhl R, Vahld CF. Lung transplantation: a treatment option in end-stage lung disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2014 Feb 14;111(7):107-16.
- Haverich A, Karck M. Role of calcium channel blockers in postischemic lungs. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;723:51-8.
- Hearse DJ, Maxwell L, Saldanha C, Gavin JB. The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:759-800.
- Heinänen K, Näntö-Salonen K, Komu M, Erkintalo M, Heinonen OJ, Pulkki K, Valtonen M, Nikoskelainen E, Alanen A, Simell O. Muscle creatine phosphate in gyrate atrophy of the choroid and retina with hyperornithinaemia-clues to pathogenesis. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(5):426-31.
- Ikai I, Morimoto T, Yamamoto Y, Takada Y, Nakamura Y, Higashiyama H, Kitai T, Egawa H, Tanaka A, Tanaka K, Yamaoka Y. Left lobectomy of the donor: operation for larger recipients in living related liver transplantation. *Transplant Proc.* 1996;28(1):56-8.
- Inci I, Zhai W, Arni S, Hillinger S, Vogt P, Weder W. N-acetylcysteine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2007;84(1):240-6.

- Jackson NC, Taylor SH, Fraiss MA. Hemodynamic comparison of dopexamine hydrochloride and dopamine in ischemic left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol.* 1988;62(5):73C-7C.
- Jager R, Purpura M, Shao A, Inoue T, Kreider RB. Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino Acids.* 2011;40(5):1369-83.
- Jatene FB, Pego-Fernandes PM. Desafios do transplante pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2008;34(5):249-50.
- Jurmann MJ, Dammenhayn L, Schaefer HJ, Haverich A. Pulmonary reperfusion injury: evidence for oxygen-derived free radical mediated damage and effects of different free radical scavengers. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1990;4:665-70.
- Katsiki N, Manes C Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? *Clin Nutr.* 2009 Feb;28(1):3-9.
- Kawut SM, Lederer DJ, Keshavjee S, Wilt JS, Daly T, D'Ovidio F, Sonett JR, Arcasoy SM, Barr ML. Outcomes after lung retransplantation in the modern era. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(1):114:20.
- Kitzenberg D, Colgan SP, Glover LE. Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clin Transl Med.* 2016 Dec;5(1):31.
- Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med.* 1999;5(3):347-50.
- Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974; 54:1496-508.
- Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg.* 2000;232(1):90-7.

- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75.
- Kreisel D, Goldstein DR. Innate immunity and organ transplantation: focus on lung transplantation. *Transpl Int*. 2013;26(1):2-10.
- Kreisel D, Krupnick AS, Puri V, Guthrie TJ, Trulock EP, Meyers BF, Patterson GA. Short and longterm outcomes of 1000 adult lung transplant recipients at a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011; 141: 215.
- Kuhnle GE, Reichenspurner H, Lange T, Wagner F, Groh J, Messmer K, Goetz AE. Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115:937-44.
- Lahzami S, Bridevaux PO, Soccal PM, et al. Survival impact of lung transplantation for COPD. *Eur Respir J*. 2010;36(1):74-80.
- Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016 Jun;21(3):246-52.
- Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(1):47-52.
- Lu C, Dabrowski P, Fragasso G, Chierchia SL. Effects of trimetazidine on ischemic left ventricular dysfunction in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998;82(7):898-901.
- Lund LH, Khush KK, Cherikh WS, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, Meiser B, Rossano JW, Chambers DC, Yusen RD, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Oct;36(10):1037-1046.

- Marchant CL, Warley A, Chambers DJ. Element changes measured by X-ray microanalysis after cold ischemia and reperfusion: relation to recovery of function. *Transplant Proc.* 1995;27(5):2802-3.
- Marczin N. The biology of exhaled nitric oxide (NO) in ischemia-reperfusion-induced lung injury: a tale of dynamism of NO production and consumption. *Vascul Pharmacol.* 2005;43:415-24.
- Matsuzaki Y, Waddell TK, Puskas JD, Hirai T, Nakajima S, Slutsky AS, Patterson GA. Amelioration of post-ischemic lung reperfusion injury by prostaglandin E1. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Oct;148(4 Pt 1):882-9.
- Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci.* 1998;18(1):156-63.
- Merry HE, Phelan P, Doaks M, Zhao M, Mulligan MS. Functional roles of tumor necrosis factor- α and interleukin 1-Beta in hypoxia and reoxygenation. *Ann Thorac Surg.* 2015 Apr;99(4):1200-5.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Mar 1;20(7):1126-67.
- Mühlfeld C, Müller K, Pallesen L-P, Richter J, Wittwer T, Wahlers T, Ochs M: Impact of preservation solution on the extent of edema formation and blood-air barrier damage in experimental lung transplantation. *Anat Rec.* 2007;290: 491-500.
- Naidu BV, Krishnadasan B, Farivar AS, Woolley SM, Thomas R, Van Rooijen N, Verrier ED, Mulligan MS. Early activation of the alveolar macrophage is critical to the development of lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126:200.

- Novick RJ, Possmayer F, Veldhuizen RA, Menkis AH, McKenzie FN. Surfactant analysis and replacement therapy: a future tool of the lung transplant surgeon? *Ann Thorac Surg.* 1991;52: 1194-1200.
- Novick RJ, Stitt LW, Al-Kattan K, Klepetko W, Schäfers HJ, Duchatelle JP, Khaghani A, Hardesty RL, Patterson GA, Yacoub MH. Pulmonary retransplantation: predictors of graft function and survival in 230 patients. Pulmonary Retransplant Registry. *Ann Thorac Surg.* 1998 Jan;65(1):227-34.
- Olivo CR, Vieira RP, Arantes-Costa FM, Perini A, Martins MA, Carvalho CRF. Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. *Resp Physiol Neurobiol.* 2012;182:81-7.
- Oyama J, Blais C, Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004;109(6):784-9.
- Palace GP, Del Vecchio PJ, Horgan MJ, Malik AB. Release of tumor necrosis factor after pulmonary artery occlusion and reperfusion. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Jan;147(1):143-7
- Pasero D, Martin EL, Davi A, Mascia L, Rinaldi M, Ranieri VM. The effects of inhaled nitric oxide after lung transplantation. *Minerva Anesthesiol.* 2010;76(5):353-61.
- Paterson HM, Murphy TJ, Purcell EJ, Shelley O, Kriynovich SJ, Lien E, Mannick JA, Lederer JA. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J Immunol* 2003;171:1473–83.
- Penninga L, Penninga EI, Moller CH, Iversen M, Steinbruchel DA, Gluud C. Tacrolimus versus cyclosporine as primary immunosuppression for lung transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;5:CD008817.
- Persky AM, Brazeau GA. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):161-76.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(4):457-65.

Qayumi AK, Jamieson WR, Godin DV, Lam S, Ko KM, Germann E, Van den Broek J. Response to allopurinol pretreatment in a swine model of heart-lung transplantation. *J Invest Surg*. 1990;3:331-40.

Rawson ES, Gunn B, Clarkson PM. The effects of creatine supplementation on exercise-induced muscle damage. *J Strength Cond Res*. 2001;15(2):178-84.

Rawson ES, Gunn B, Clarkson PM. The effects of creatine supplementation on exercise-induced muscle damage. *J Strength Cond Res*. 2001 May;15(2):178-84.

Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res*. 2000;86(2):117-8.

Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(5):837-49.

Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S, Fimognari C. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids*. 2011;40(5):1385-96.

Sharma AK, Fernandez LG, Awad AS, Kron IL, Laubach VE. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF-alpha during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L105.

Shimamoto A, Pohlman TH, Shomura S, Tarukawa T, Takao M, Shimpo H. Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 2006;82:2017-23.

Simonneau G, Gatzoulis M A, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R.. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62 (suppl):D34-41.

Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(6):699-705

Suzuki Y, Cantu E, Christie JD. Primary graft dysfunction. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34:305-19.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20.

Templeton AW, Garrotto LJ. Acquired extracardiac causes of pulmonary ischemia. *Dis Chest*. 1967 Feb;51(2):166-71.

Travis WD, Costabel U, Hansell DM, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188: 733-48.

Vieira RP, Duarte AC, Claudino RC, Perini A, Santos AB, Moriya HT, Arantes-Costa FM, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37:660-7.

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.

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011 May;40(5):1271-96.

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 Jan 1;281 (Pt 1):21-40.

Waxman K. Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation. *New Horiz.* 1996;4(2):153-60.

Weill D, Benden C, Corris PA, Dark JH, Davis RD, Keshavjee S, Lederer DJ, Mulligan MJ, Patterson GA, Singer LG, Snell GI, Verleden GM, Zamora MR, Glanville AR. A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014 an update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34(1):1-15.

Weyker PD, Webb CA, Kiamanesh D, Flynn BC. Lung ischemia reperfusion injury: a bench-to-bedside review. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2013;17(1):28-43.

Whitson BA, Hayes D Jr. Indications and outcomes in adult lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2014;6(8):1018-23.

Witt CA, Hachem RR. Immunosuppression: what's standard and what's new? *Semin Respir Crit Care Med.* 2013;34(3):405-13.

Wolf M, Drubbel V, Hendriks JM, Van Schil PE. Red blood cell accumulation in a rat model of pulmonary ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2009;50:351-6.

Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol.* 2002;168:1286-93

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000 Jul;80(3):1107-213.

Wyss M, Schulze A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience.* 2002;112(2):243-60.

- Xavier AM, Pêgo-Fernandes PM, Correia AT, Pazetti R, Monteiro R, Canzian M, Jatene FB. Influence of cyclosporine A on mucociliary system after lung transplantation in rats. *Acta Cir Bras.* 2007;22(6):465-9.
- Yamashita H, Akamine S, Sumida Y, Inoue M, Sawada T, Nagayasu T, Oka T. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of the rabbit lung. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(1):292-7.
- Yusen RD, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Rossano JW, Stehlik J. International Society for Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. *J Heart Lung Transplant.* 2016 Oct;35(10):1170-1184.
- Zanotti G, Casiraghi M, Abano JB, Tatreau JR, Sevala M, Berlin H, Smyth S, Funkhouser WK, Burridge K, Randell SH, Egan TM. Novel critical role of Toll-like receptor 4 in lung ischemia-reperfusion injury and edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297:L52.
- Zhao G, al-Mehdi AB, Fisher AB. Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am J Physiol.* 1997;273(6 Pt 1):L1112-7.
- Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L1018.