UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

AGNES AFRODITE SUMARELLI ALBUQUERQUE FAGUNDES

Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade vascular da artéria carótida e função cardiorrespiratória de ratos

Ribeirão Preto

2018

AGNES AFRODITE SUMARELLI ALBUQUERQUE FAGUNDES

Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade vascular da artéria carótida e função cardiorrespiratória de ratos

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Carla Celotto

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Fagundes, Agnes Afrodite Sumarelli Albuquerque

Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade vascular da artéria carótida e função cardiorrespiratória de ratos. Ribeirão Preto, 2018.
87 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Celotto, Andréa Carla

1. Acidose metabólica crônica. 2. Cloreto de amônio. 3. Reatividade vascular. 4. Ventilação. 5. Ecocardiograma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGNES AFRODITE SUMARELLI ALBUQUERQUE FAGUNDES

Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade vascular da artéria carótida e função cardiorrespiratória de ratos

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico a conquista deste título a toda minha família e amigos, que sempre foram meu alicerce e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu suporte espiritual.

Ao meus pais, Ademir e Sueli, pela formação pessoal, por me mostrar a importância do estudo, pelo apoio e incentivo para nunca desistir e sempre querer mais.

Ao meu esposo Reginaldo, por todo incentivo e apoio nas horas boas e ruins, pelo suporte dentro do laboratório nos finais de semana, por cuidar de tudo na minha ausência e sempre incentivar a busca pelos meus objetivos.

Às minhas irmãs, Ísis e Ariadne, que mesmo longe sempre me incentivaram.

À família Fagundes, que escolhi fazer parte, Dna Maria, Roger, Fabiana, Fernando, Flávio, sobrinhas Beatriz, Emanuelly e Lorena, pelas palavras de carinho, ajuda e momentos de descontração.

Aos primos Claudinei e Vanessa, que mesmo longe foram minha maior torcida.

Ao Dr Paulo Evora, pelos ensinamentos e incentivo a dar sempre um passo além, por fazer possível a conquista de mais um objetivo e sempre me cobrar por mais um “paper”.

À Profa. Dra. Andrea Carla, que antes de ser minha orientadora é uma amiga. Obrigado por toda ajuda possível e impossível para concluir este trabalho, pelas conversas dentro e fora do laboratório e por me mostrar o que é ter amor pela ciência.

À Luíza, que chegou no laboratório para estudar e acabou se tornando uma amiga, me ajudando e tornando os dias mais fáceis dentro do laboratório.

Ao Willian, por dividir os momentos de frustação ou euforia durante o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga do Laboratório de Histologia, Sandra, pela ajuda com o material para análise histológica, amizade e conselhos.

Às técnicas do Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático, Maria Cecília e Clarisse, pelas análises bioquímicas.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Anatomia, Juliana e Camila, pela ajuda burocrática e incentivo.

À Vanessa de Souza Nakagi e Ana Carolina Mieko Omoto do Departamento de Fisiologia - FMRP pela ajuda com o exame de ecocardiografia e análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Francisco Ribeiro de Moraes da Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata – FACISB pela ajuda com a análise da histologia.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por abrir as portas da pós-graduação aos seus funcionários.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E aos animais que cederam suas vidas para que eu pudesse concluir este trabalho.

Epígrafe

Comece fazendo o que é necessário,

depois, o que é possível, e de repente

você estará fazendo o impossível.

São Francisco de Assis

RESUMO

Fagundes, AASA. **Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade vascular da artéria carótida e função cardiorrespiratória de ratos.** (Tese). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

Introdução: Os distúrbios ácido-base são comuns na prática médica e podem variar desde uma acidose ou alcalose simples até um distúrbio misto complexo e potencialmente fatal. Em situação de acidose ou alcalose, a permeabilidade iônica e as funções enzimáticas celulares se alteram, acarretando disfunção de diversos órgãos e sistemas. A acidose metabólica (MA), uma condição clínica comum, é causada por uma diminuição no pH do sangue e na concentração de bicarbonato. Pode ocorrer agudamente, com duração de algumas horas a um dia, ou como uma condição crônica, quando o pH normal não pode ser totalmente restaurado. Acidose, como um tipo dominante de distúrbio ácido-base, atualmente, é considerada um fator causador de disfunções cardiovasculares. Poucas pesquisas sobre o efeito da acidose metabólica crônica na função cardíaca, *in vivo*, estão disponíveis. Assim, é de grande interesse estudar a contratilidade cardíaca *in vivo* e as mudanças elétricas em resposta a acidose metabólica, além da reatividade vascular em artérias de animais acidóticos. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi demonstrar os efeitos da acidose metabólica crônica (AMC) induzida pela administração de cloreto de amônio sobre a função cardiovascular e respiratória, assim como os possíveis mecanismos envolvidos. **Metodologia:** A AMC foi induzida em ratos Wistar pela substituição de água por uma solução do cloreto de amônio 0,50M *ad libitum* acrescido de 0,02M por gavagem, durante dez dias. Após dez dias os animais foram agrupados para as demais análises. Foi avaliada a reatividade vascular, frente a diversas drogas vasoativas (Acetilcolina, Fenilefrina, Angiotensina II, Endotelina-1 e ionóforo de cálcio – A23137) utilizando a metodologia de banho de órgão isolado. Algumas curvas dose-resposta foram realizadas na presença de L-NAME. Também foi avaliada a função cardíaca, através do ecocardiograma para pequenos animais, analisando os seguintes parâmetros: débito cardíaco, frequência cardíaca, volume sistólico e encurtamento sistólico e diastólico. A função respiratória foi analisada por

pletismografia de corpo inteiro e os parâmetros analisados foram ventilação, volume corrente e frequência respiratória. Além das análises principais citadas acima, foram realizadas também, dosagem de óxido nítrico, análise histológica de rins e dosagens de parâmetros associados a função renal (ureia e creatinina). **Resultados:** A acidose metabólica crônica (1) potencializou o relaxamento induzido pelo ionóforo de cálcio de maneira dependente do óxido nítrico e não foram observadas alterações para os demais agonistas testados; (2) reduziu o débito cardíaco e volume sistólico, sem alteração na frequência cardíaca; (3) reduziu os níveis de nitrito e nitrato plasmático; (4) aumentou a ventilação e o volume corrente, sem alterações na frequência respiratória e (5) não foram observadas alterações na ureia e creatinina e morfologia dos rins. **Conclusão:** A acidose metabólica promoveu alterações na reatividade vascular, na função cardíaca e na ventilação pulmonar.

Palavras-chave: Acidose metabólica crônica. Cloreto de amônio. Reatividade vascular. Ventilação. Ecocardiograma.

ABSTRACT

Fagundes, AASA. **Effect of chronic metabolic acidosis on vascular reactivity of the carotid artery and cardiorespiratory function in rats.** (Thesis). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

Introduction: Acid-base disorders are common in medical practice and can range from simple acidosis or alkalosis to a complex and potentially fatal disorder. In a situation of acidosis or alkalosis, the ionic permeability and the cellular enzymatic functions can change, leading to dysfunction of several organs and systems. Metabolic acidosis (MA), a common clinical condition, is caused by a decrease in blood pH and bicarbonate concentration. It can occur acutely, lasting from a few hours to a day, or as a chronic condition, when normal pH cannot be fully restored. Acidosis, as a dominant type of acid-base disorder, is currently considered a factor causing cardiovascular dysfunction. Few researches on the effect of chronic metabolic acidosis on cardiac function, in vivo, are available. Thus, it is of great interest to study cardiac contractility in vivo and electrical changes in response to metabolic acidosis, in addition to vascular reactivity in arteries from acidotic animals. **Aim:** The aim of the present study was to demonstrate the effects of chronic metabolic acidosis (CMA) induced by the administration of ammonium chloride on cardiovascular and respiratory function, as well as the possible mechanisms involved. **Methods:** CMA was induced in Wistar rats by replacing water by solution of ammonium chloride 0.50M *ad libitum* plus 0.02M per gavage, for ten days. After ten days the animals were grouped for the remaining analyzes. Vascular reactivity was evaluated for several vasoactive drugs (Acetylcholine, Phenylephrine, Angiotensin II, Endothelin-1 and calcium ionophore - A23137) using the isolated organ chamber methodology. Some dose-response curves were performed in the presence of L-NAME. Cardiac function was also evaluated through echocardiogram for small animals, analyzing the following parameters: cardiac output, heart rate, systolic volume and systolic and diastolic shortening. The respiratory function was analyzed by plethysmography of the whole body and the parameters analyzed were ventilation, tidal volume and respiratory rate. In addition to the main analyzes mentioned above, nitric oxide analysis, photomiographs of kidneys and urea and creatinine analysis for renal function evaluation, were also performed. **Results:**

Chronic metabolic acidosis (1) potentiated calcium ionophore-induced relaxation in a nitric oxide-dependent manner and with no changes for the other agonists tested; (2) reduced cardiac output and systolic volume, with no change in heart rate; (3) reduced nitrite and plasma nitrate levels; (4) increased ventilation and tidal volume without changes in respiratory rate and (5) no changes were observed in urea and creatinine and morphology of the kidneys. **Conclusion:** Metabolic acidosis promoted changes in vascular reactivity, cardiac function and pulmonary ventilation.

Key words: Metabolic chronic acidosis. Ammonium chloride. Vascular reactivity. Ventilation. Echocardiogram.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o pH sanguíneo.....45

Figura 2: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o bicarbonato sanguíneo.....46

Figura 3: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre a pCO_2 sanguínea.....46

Figura 4: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) sobre o pH sanguíneo.....47

Figura 5: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) sobre o bicarbonato sanguíneo.....47

Figura 6: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) sobre a pCO_2 sanguínea.....48

Figura 7: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o peso corporal durante os 10 dias de tratamento.....48

Figura 8: Relação entre a quantidade de solução e ração ingeridas durante os 10 dias de tratamento pelos Grupo Controle (A) (solução somente com suco) e Grupo Acidose (B) (solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M)).....49

Figura 9: Relação entre a quantidade de solução ingerida e peso durante os 10 dias de tratamento dos Grupo Controle (A) (solução somente com suco) e Grupo Acidose (B) (solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M)).....50

Figura 10: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D).....52

Figura 11: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D).....53

Figura 12: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D).....54

Figura 13: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D).....55

Figura 14: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D).....56

Figura 15: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a ventilação.....57

Figura 16: Efeito da acidose metabólica crônica sobre o volume corrente.....57

Figura 17: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a frequência respiratória.....58

Figura 18: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de ureia plasmática e na urina.....59

Figura 19: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de creatinina plasmática e na urina.....59

Figura 20: Fotomicrografia renal de ratos do grupo controle (A e B) e grupo acidose (C e D).....60

Figura 21: Curva dose-resposta para acetilcolina em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M).....61

Figura 22: Curva dose-resposta para cálcio ionóforo A23187 em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M).....62

Figura 23: Curva dose-resposta para fenilefrina em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio.....62

Figura 24: Curva dose-resposta para angiotensina II em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio.....63

Figura 25: Curva dose-resposta para endotelina-1 em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio.....63

Figura 26: Níveis de nitrito plasmático em animais do grupo controle e grupo acidose.....64

Figura 27: Níveis de nitrato plasmático em animais do grupo controle e grupo acidose.....64

Figura 28: Valores funcionais obtidos pela ecocardiografia em ratos do grupo controle e acidose. (A) Frequência cardíaca (FC), (B) Volume sistólico (VS), (C) Débito cardíaco (DC).....66

Figura 29: Valores funcionais obtidos pela ecocardiografia em ratos do grupo controle e acidose. (A) Fração de ejeção (FE), (B) Fração de encurtamento (FEN).....66

Figura 30: Valores morfológicos obtidos pela ecocardiografia em ratos do grupo controle e acidose. (A) Diâmetro diastólico ventrículo esquerdo (DDVE), (B) Diâmetro sistólico ventrículo esquerdo (DSVE), , (C) Espessura da parede anterior - diástole (EPAD), (D) Espessura da parede anterior - sístole (EPAS), (E) Espessura da parede posterior - diástole (EPPD), (F) Espessura da parede posterior - sístole (EPPS).....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores da gasometria do grupo controle e acidose.....45

Tabela 2 – Valores da ureia e creatinina plasmática e urinária nos grupos controle e acidose.....58

Tabela 3 – Valores funcionais e morfológicos obtidos pela ecocardiografia no grupo controle e
acidose.....65

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - centígrados

A23187 – cálcio ionóforo

ACh - acetilcolina

AMC - acidose metabólica crônica

Ang II - angiotensina II

AT-1 - receptor de angiotensina

BE - excesso de base

BTPS - temperatura e pressão corporal saturada

$C_6H_{12}O_6$ - glicose

Ca^{2+} - íon cálcio

$CaCl_2$ - cloreto de cálcio

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO_2 - dióxido de carbono

COBEA - colégio brasileiro de experimentação animal

DC – débito cardíaco

DDV - diâmetro diastólico do ventrículo

DSV - diâmetro sistólico do ventrículo

EPAD - espessura da parede anterior - diástole

EPAS - espessura da parede anterior - sístole

EPM - erro padrão da média

EPPD - espessura da parede posterior - diástole

EPPS - espessura da parede posterior - sístole

ET - endotelina

ET-1 - endotelina 1

ETA - receptor de endotelina

FC – frequência cardíaca

FE - fração de ejeção

FEN - fração de encurtamento

f_R - frequência respiratória

g – gramas

Glu - glicose

H^+ - íon de hidrogênio

H_2O - água

H_2CO_3 - ácido carbônico

$H_2PO_4^-$ - dihidrogenofosfato

HCl - cloreto de hidrogênio

HCO_3^- - bicarbonato

HPO_4^{2-} - hidrogenofosfato

K^+ - potássio

KCl - cloreto de potássio

Kg - quilograma

KH_2PO_4 - fosfato de potássio monobásico

Lac - lactato

L-NAME - Nω-nitro-L-arginina-metilester

M - Molar

mEq/L - miliequivalentes por litro

mg - miligrama

$MgSO_4$- sulfato de magnésio

min - minuto

mL - mililitro

mm – milímetro

mM - milimolar

mmHg - milímetros de Mercúrio

mmol/L - milimol por litro

n - número

Na^+ - sódio

NaCl - cloreto de sódio

$NaHCO_3^-$ - bicarbonato de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

NH_3 - amônia

NH_4^+ - amônio

NH_4Cl - cloreto de amônio

NO - óxido nítrico

NO_2^- - nitrito

NO_3^- - nitrato

NOS - óxido nítrico sintetase

O_2 – oxigênio

O_3 - ozônio

OH^- - íon hidroxila

P_A - pressão de vapor d'água à temperatura da câmara

P_B - pressão de vapor d'água à temperatura corporal

pCO_2 - pressão parcial arterial do dióxido de carbono

PE – fenilefrina

PGI_2 - prostaciclina

pH - potência de hidrogênio

pH_i - pH intracelular

pH_o - pH extracelular

P_K - deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração

pO_2 - pressão parcial arterial de oxigênio

P_T - deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente

SNC – sistema nervoso central

SO_2 – saturação de oxigênio

T_A - temperatura do ar dentro da câmara;

T_{amb} - temperatura Ambiente

T_C - temperatura Corporal

TCO_2 - dióxido de carbono total

THbc – hemoglobina total

V - ventilação

V_c - volume corrente

VDCC - voltage-dependent calcium channels

VE – ventrículo esquerdo

V_K - volume de ar injetado na câmara do animal para calibração

VP - ventilação pulmonar

VS – volume sistólico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21
2. ESTADO DA ARTE 24
2.1. Equilíbrio Ácido-Base 24
2.2. Distúrbios do Equilíbrio ácido-base 27
2.3. Efeitos da acidose metabólica sobre a contratilidade cardíaca 29
2.4. Efeitos da acidose metabólica sobre a reatividade vascular 30
2.5. Efeitos da acidose metabólica sobre a ventilação pulmonar 31
3. OBJETIVOS 34
3.1. Objetivo geral 34
3.2. Objetivos específicos 34
4. MATERIAIS E MÉTODOS 36
4.1. Animais 36
4.2. Indução da acidose metabólica crônica 36
4.3. Canulação da artéria femoral para avaliação da gasometria diária 37
4.4. Gasometria 37
4.5. Avaliação dos parâmetros ventilatórios 37
4.6. Avaliação da ureia e creatinina plasmática e urinária renal 38
4.7. Análise histológica do rim 38
4.8. Estudo da reatividade vascular em câmaras de órgão isolado (organ chambers) 39
4.9. Determinação indireta de NO plasmático pela dosagem de Nitrito (NO_2^-) e Nitrato (NO_3^-) 40
4.10. Ecocardiograma 41
4.11. Critérios de exclusão 42
4.12. Análise estatística 42
5. RESULTADOS 44
5.1. Indução acidose metabólica crônica 44
5.2. Gasometria diária 51
5.3. Avaliação dos parâmetros ventilatórios 56
5.4. Avaliação da ureia e creatinina plasmática e urinária 58
5.5. Análise histológica do rim 60
5.6. Estudo da reatividade vascular em câmaras de órgão isolado (organ chambers) 61
5.7. Determinação indireta de NO plasmático pela dosagem de Nitrito (NO_2^-) e Nitrato (NO_3^-) 64

5.8. Ecocardiograma 65
6. DISCUSSÃO 69
6.1. Indução da acidose metabólica crônica 69
6.2. Gasometria diária 71
6.3. Avaliação dos parâmetros ventilatórios 72
6.4. Avaliação ureia e creatinina 74
6.5. Reatividade vascular 75
6.6. Ecocardiograma 77
7. CONCLUSÃO 80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios ácido-base são comuns na prática médica e podem variar desde uma acidose ou alcalose simples até um distúrbio misto complexo e potencialmente fatal. Em situação de acidose ou alcalose, a permeabilidade iônica e as funções enzimáticas celulares se alteram, acarretando disfunção de diversos órgãos e sistemas. Essas alterações sistêmicas promovidas por variações no pH são as mais diversas: redução da resistência vascular sistêmica, alterações da atividade elétrica do miocárdio e do SNC, modificação da resposta a certos agentes químicos, endógenos e exógenos (hormônios ou drogas vasoativas), alteração na resposta ventilatória a hipóxia e hipercapnia, entre outras. Há mais de um século se têm conhecimento de que, mudanças no pH extracelular promovem alterações no tônus vascular afetando a circulação e controle da pressão sanguínea, na contratilidade do miocárdio, prejudicando o bombeamento cardíaco e na manutenção do equilíbrio ácido-base, envolvendo os mecanismos de controle da ventilação e o processamento tubular renal (1, 2).

A acidose metabólica (MA), uma condição clínica comum, é causada por uma diminuição no pH do sangue e na concentração de bicarbonato (3, 4). Pode ocorrer agudamente, com duração de algumas horas a um dia, ou como uma condição crônica, quando o pH normal não pode ser totalmente restaurado. A acidose metabólica também pode ocorrer frequentemente como uma complicação secundária e ter um efeito prejudicial no desfecho dos pacientes com várias condições de risco de morte. Estudos mostram que a acidose metabólica pode resultar de muitas condições, como doenças renais crônicas, acidose láctica, cetoacidose diabética e acidose induzida por dieta (5, 6).

Acidose, como um tipo dominante de distúrbio ácido-base, atualmente, é considerada um fator causador de disfunções cardiovasculares. Allen e Orchard (1983) relataram que a acidose poderia induzir um efeito inotrópico negativo no coração, através da alteração da atividade elétrica, bombas e canais, e modificações na sensibilidade do miofilamento cálcio (7). A maioria dos estudos sobre os efeitos cardíacos da acidose foram realizados principalmente em tecidos isolados ou miócitos, entretanto as alterações de função cardíaca in vivo, também dependem de outros fatores como alterações no retorno venoso, pós-carga, sistema nervoso e mecanismos compensatórios (8). Poucas pesquisas sobre o efeito da acidose

metabólica crônica na função cardíaca, *in vivo*, estão disponíveis. Assim, é de grande interesse em estudar a contratilidade cardíaca *in vivo* e as mudanças elétricas em resposta a acidose metabólica. Quanto a função vascular, sabe-se que a acidose promove vasodilatação, mediada por mecanismos que envolvem a participação do óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2), canais de potássio e fluxo de cálcio (1, 2, 9-12). Da mesma forma que os estudos da função cardíaca, a função vascular, normalmente é avaliada em vaso isolado com indução da acidose *in vitro*. Os resultados desses trabalhos caracterizam mecanismos importantes envolvidos na resposta vascular a acidose, entretanto, estariam mais relacionados a efeitos agudos da acidose. Os distúrbios do equilíbrio ácido-base impactuam no transporte de oxigênio para os tecidos, permitindo assim a manutenção das funções celulares. Para entender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa condição, é necessário rever o efeito das alterações ácido-base no coração, na rede vascular e nos pulmões (7, 13, 14).

A necessidade de oxigênio pelos vários tecidos, é atendida pelos sistemas cardiovascular e pulmonar combinados, que funcionam como uma unidade denominada "sistema de transporte de oxigênio" do corpo. O movimento de oxigênio do ar ambiente para as células do tecido envolve ventilação pulmonar, débito cardíaco (incluindo músculo cardíaco), distribuição sistêmica do fluxo, e finalmente a capacidade dos tecidos aproveitarem esse oxigênio (14). Sendo importante compreender os efeitos das mudanças no pH de cada uma dessas etapas. O objetivo do presente estudo foi demonstrar os efeitos da acidose metabólica crônica induzida pela administração de cloreto de amônio sobre a função cardiovascular e respiratória, assim como os possíveis mecanismos envolvidos.

Estado da Arte

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Equilíbrio Ácido-Base

O hidrogênio é o elemento mais abundante no universo. Combinado com outros elementos, é o décimo que mais ocorre na crosta terrestre.

No estudo das reações ácido-base, a concentração do íon hidrogênio (H^+) é fundamental. Para se referir às potências das concentrações de H^+ ($[H^+]$) livres em uma solução, é utilizado o pH ou potencial hidrogeniônico.

O pH é inversamente relacionado à $[H^+]$, ou seja, um pH baixo corresponde a uma $[H^+]$ elevada, e um pH alto corresponde a uma $[H^+]$ baixa. Assim, o pH serve para nos indicar se uma solução é ácida, neutra ou básica.(15-17)

O pH é expresso por uma escala numérica que vai de 0 (zero) a 14, sendo 7 o ponto de neutralidade. Soluções com pH entre 0 e 7 são consideradas ácidas e com pH entre 7 e 14 são denominadas básicas ou alcalinas. (17, 18)

Nos líquidos corporais a $[H^+]$ necessita de uma regulação precisa, pois quase todos os sistemas de enzimas no corpo têm suas atividades influenciadas pelo pH. Assim, todas as funções celulares e corporais podem sofrer mudanças de acordo com a $[H^+]$.

No indivíduo normal, o H^+ mantém-se, normalmente, em uma baixa concentração nos líquidos corporais, com pH entre 7,35 e 7,45, mostrando assim que é precisamente regulado por sistemas tampões e demais dispositivos fisiológicos existentes, enfatizando a sua importância para as diversas funções celulares.(16, 17, 19)

Existem três mecanismos compensadores que regulam a concentração de íons H^+ nos líquidos corporais para evitar o desenvolvimento de acidose ou alcalose. Os sistemas químicos de tampões ácido-base dos líquidos corporais, o sistema respiratório e os rins.(16, 17, 19, 20)

Tampão é qualquer substância capaz de ligar-se, reversivelmente, aos H^+. Assim, os sistemas químicos de tampões ácido-base dos líquidos corporais, atuam imediatamente, e qualquer variação da concentração de íons H^+ é neutralizada, impedindo a ocorrência de alterações excessivas do pH. A reação é imediata com os tampões sanguíneos, mas leva de 2 a 4 horas para o tamponamento a nível intracelular. Mesmo sendo muito eficiente, os sistemas tampões não eliminam os

íons H^+ do organismo, nem os adicionam, mas, apenas, os mantem inalterados até que o equilíbrio possa ser restabelecido. (16, 17, 19)

Para a regulação química do equilíbrio ácido-base, os principais sistemas tampões do organismo são o sistema tampão bicarbonato, o sistema tampão fosfato e as proteínas.

O sistema tampão bicarbonato depende de dois ingredientes: um ácido fraco, o ácido carbônico (H_2CO_3) e um sal de bicarbonato, como o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$). (16, 17, 20) Este é o tampão extracelular mais eficiente do organismo, pois permite a regulação fisiológica de seus componentes de maneira independente, o dióxido de carbono (CO_2) pela respiração e o bicarbonato (HCO_3^-) pelos rins. Portanto, o tampão bicarbonato comporta-se fisiologicamente de uma maneira muito mais eficiente que a esperada, respondendo por quase a metade do tamponamento de todos os ácidos despejados nos fluidos biológicos diariamente.(16, 17)

O sistema tampão fosfato apresenta importante papel no tamponamento do líquido tubular renal e dos líquidos intracelulares e tem como principais elementos o dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$) e o hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}). Esse sistema tampão tem pK de 6,8, que não difere muito do pH normal de 7,4 dos líquidos corporais, permitindo que este sistema opere próximo à sua capacidade máxima de tamponamento, no entanto, devido à sua concentração no líquido extracelular ser baixa, a capacidade total de tamponamento do sistema fosfato é muito menor que a do sistema tampão bicarbonato. (16, 21)

Devido à alta concentração, principalmente no interior das células, as proteínas estão entre os tampões mais abundantes no organismo e tem alta capacidade de tamponamento em razão do pK de muitos sistemas protéicos estarem próximos a 7,4. Por ocorrer pequena difusão de íons H^+ e de HCO_3^- através da membrana celular, o pH das células se mantem próximo ao pH do líquido extracelular. E essa difusão dos elementos do sistema tampão bicarbonato provoca alteração do pH dos líquidos intracelulares quando há mudança do pH extracelular. Assim, o sistema tampão de proteínas no interior das células ajudam a impedir alterações do pH dos líquidos extracelulares, mas podem levar várias horas para se tornarem totalmente eficazes devido a lentidão do movimento dos íons H^+ e HCO_3^- através das membranas celulares quando há algum distúrbio ácido-base extracelular.(15, 17, 21)

Há também a regulação respiratória do equilíbrio ácido-base que é um tipo fisiológico de sistema tampão, pois atua rapidamente e a concentração de íons H^+ muito alta é evitada até que a resposta mais lenta dos rins possa controlar o desequilíbrio. A resposta do mecanismo respiratório a uma alteração da concentração de H^+ é rápida, no máximo 30 minutos, e passageira, pois quando o nível de H^+ volta ao normal, a ventilação diminui até chegar a seu nível prévio.

A capacidade de tamponamento do sistema respiratório é uma a duas vezes maior que a capacidade de tamponamento do sistema tampão químico, ou seja, uma quantidade maior de ácido ou base pode ser tamponada por esse mecanismo.

O controle da concentração de CO_2 no líquido extracelular é feito pelos pulmões. Um aumento da ventilação elimina o CO_2 do líquido extracelular e reduz a concentração de íons H^+, aumentando o pH. Por outro lado, a redução da ventilação aumenta o CO_2, com o consequente aumento da concentração de H_2CO_3 e íons de H^+, diminuindo, assim, o pH no líquido extracelular. Portanto, o sistema respiratório atua como controlador por feedback negativo da $[H^+]$. Quanto à eficiência do controle respiratório, esse é incapaz de normalizar por completo a $[H^+]$ quando o pH for alterado por algum distúrbio fora do sistema respiratório. (15, 17, 20)

O sistema renal responsável pelo equilíbrio ácido-base é o mais eficiente e duradouro do organismo, porém, muito lento, precisando de várias horas a dias para reajustar a concentração de íons H^+. O controle renal deste equilíbrio se dá quando os rins excretam urina ácida ou básica, através de mecanismos como reabsorção de íons HCO_3^- filtrados, produção de novos íons HCO_3^-e secreção de íons H^+.

O processo de secreção de íons H^+ e reabsorção de HCO_3^- começa quando o CO_2 se difunde para as células tubulares, ou é formado pelo metabolismo, nas células epiteliais tubulares. O CO_2, sob influência da enzima anidrase carbônica, combina-se com H_2O para formar H_2CO_3, que se dissocia em HCO_3^- e H^+. Os íons H^+ são secretados pela célula para o lúmen tubular, pelo cotransporte de sódio-hidrogênio. O íon HCO_3^- produzido na célula (quando o íon H^+ de dissocia do H_2CO_3) desloca-se e a seguir atravessa a membrana basolateral para o líquido intersticial renal e o sangue dos capilares peritubulares. O resultado é que, para cada íon H^+ secretado no lúmen tubular, um íon HCO_3^- penetra no sangue.

Em condições normais, os túbulos renais devem secretar, pelo menos, quantidade de íons H^+ suficiente para reabsorver quase todo HCO_3^- filtrado, e deve haver íons H^+ remanescentes em quantidade suficiente para serem excretados

como ácido titulável ou amônio (NH_4^+) a fim de eliminar do organismo os ácidos não-voláteis produzidos, diariamente, pelo organismo.(16, 17, 20, 21)

2.2. Distúrbios do Equilíbrio ácido-base

Quando os valores de pH, pressão parcial do dióxido de carbono (pCO_2) e HCO_3^- permanecem equilibrados, diz-se que o organismo se encontra em equilíbrio ácido-base. No entanto, quando os valores se afastam da normalidade, considera-se que esteja ocorrendo um distúrbio ácido-base. A elevação do pH sanguíneo para valores acima dos normais é chamada de alcalose, e o oposto, a queda para valores abaixo dos normais é considerada acidose.

O equilíbrio ácido-base é influenciado tanto pelas concentrações de CO_2 quanto de HCO_3^- plasmático. Assim, quando o distúrbio estiver relacionado à pCO_2 este é considerado respiratório, e quando a origem estiver ligada às concentrações plasmáticas de HCO_3^-, este é considerado metabólico (17, 21). Entre os possíveis distúrbios ácido-base, estão a alcalose ou acidose respiratória e alcalose ou acidose metabólica.

A alcalose respiratória é caracterizada pela redução na pCO_2 e elevação do pH plasmático. É resultado de um aumento das trocas gasosas nos pulmões, geralmente devido à hiperventilação por estimulação dos centros respiratórios como uma resposta à ansiedade, ao medo, estresse emocional ou à altitude, estimulação do Centro Respiratório Bulbar (CRB) (encefalites, emoção, febre e infecções sistêmicas, intoxicação por salicilato, hipoxemia), reflexos (choque), por estimulação de receptores torácicos (atelectasia, pneumopatias agudas), assistência ventilatória, insuficiência hepática e lesões do Sistema Nervoso Central. No tratamento o objetivo é combater a hiperventilação.(15-17, 20-24)

A acidose respiratória é caracterizada por elevação da pCO_2 do líquido extracelular e por redução do pH plasmático, causados por uma diminuição nas trocas gasosas nos alvéolos como resultado de redução da ventilação ou diminuição na difusão gasosa. A compensação deste distúrbio não pode ser feita pela ventilação, uma vez que este é a principal causa. Assim, a correção deste desequilíbrio é feita pelos tampões dos líquidos corporais e pelos rins, que necessitam de vários dias para corrigir esta acidose.

As causas da acidose respiratória são: redução funcional do parênquima pulmonar (tuberculose, câncer, enfisema pulmonar, pneumonia), dificuldade de trocas gasosas (edema pulmonar, insuficiência respiratória crônica) e estímulos respiratórios insuficientes (intoxicação com depressores do sistema nervoso central, anestésicos e barbitúricos). O tratamento é baseado em oxigenação e ventilação adequadas, promovendo a manutenção das vias aéreas livres, correção da hipóxia e/ou hipercapnia, remoção de secreções e tratamento das infecções respiratórias, quando presentes. (15-17, 20-24)

A alcalose metabólica é caracterizada por uma elevada concentração de HCO_3^- no plasma e um elevado pH plasmático. A causa mais comum deste desequilíbrio é a perda de volume gástrico no vômito ou aspiração do conteúdo do estômago, mas também pode ocorrer devido à ingestão de antiácidos, diuréticos, infusão de bicarbonato, hemorragia e excesso de aldosterona. O tratamento utilizado é o restabelecimento do volume perdido, reposição de cloretos, acetazolamida e cloridrato de arginina. (15-17, 20-24)

A acidose metabólica crônica (AMC) é talvez o distúrbio ácido-base mais frequente observado na clínica. Origina-se da diminuição do pH nos fluídos corporais, quando o organismo acumula excessos de H^+ ou ocorre uma diminuição da $[HCO_3^-]$. (25-27)

Independente da razão, os excessos de ácidos são tamponados incialmente pelos sistemas tampões do organismo. Os mecanismos tissulares agem redistribuindo os íons entre os compartimentos celular e extracelular, provocando a saída de bases e a entrada de íons H^+ no interior das células. Já através dos mecanismos pulmonares, a ventilação é estimulada, levando ao aumento da eliminação do H_2CO_3. E o mecanismo renal, aumenta a secreção de H^+ e a reabsorção de HCO_3^-.(16, 17, 20)

Entretanto, devido ao tamponamento e à hiperventilação não serem, totalmente, eficazes na prevenção do aumento da $[H^+]$, esta permanece elevada, em todo corpo. Nos rins, isso estimula a secreção de H^+ e a reabsorção de HCO_3^-. Durante dias, o rim (exceto na insuficiência renal) pode ser capaz de corrigir esse distúrbio, por excretar o excesso de H^+ e adicionar, ao plasma, o HCO_3^- que foi perdido, tanto como consequência direta do distúrbio primário, tanto como consequência da compensação respiratória. Uma vez ocorrido isso, a $[H^+]$ plasmática retorna ao normal e a ventilação é também normalizada.(15, 16, 21)

Existem diversas causas que originam a acidose metabólica, como: deficiência na excreção renal dos ácidos normalmente formados no organismo, formação de quantidades excessivas de ácidos metabólicos no organismo, perda de base dos líquidos corporais (diarreia), adição de ácidos metabólicos ao corpo por ingestão ou infusão parenteral (acetilsalicílicos, álcool metílico), e também pode ter algumas doenças como razões primárias.(28-30)

2.3. Efeitos da acidose metabólica sobre a contratilidade cardíaca

Entre as várias consequências adversas da acidemia, as mais temidas pelos intensivistas são sobre o sistema cardiovascular. (31)

O coração é um órgão de alta atividade metabólica, susceptível a quedas no pH e a acidose metabólica afeta diretamente a função cardíaca.(32)

Um dos efeitos da acidose metabólica sobre a função cardíaca é a centralização do volume sanguíneo, o que aumenta a susceptibilidade a edema pulmonar. (31, 33)

A acidose tem efeitos eletrofisiológicos complexos que estão associados a uma alta recorrência de arritmias ventriculares, podendo ser fatal, quando não revertida rapidamente. Alguns achados sugerem que a diminuição do pH intracelular (pH extracelular constante) aumenta a atividade do trocador de sódio/ hidrogênio (Na^+/H^+), que aumenta o fluxo de Na^+ intracelular, e portanto altera a atividade do trocador de sódio/cálcio (Na^+/Ca^{2+}). Isso causa um aumento do Ca+ intracelular, podendo induzir arritmias. (7, 33-38)

A acidose não afeta apenas o ritmo cardíaco, mas também a contratilidade. Quando ocorre redução do pH para valores inferiores a 7,2 ocorrerá a inibição da bomba Na^+/K^+/ATPase e alteração na atividade dos trocadores Na^+/Ca^{2+} e Na^+/H^+, levando à redução no potencial de ação dos cardiomiócitos e consequente redução da força de contração e insuficiência cardíaca. Tais efeitos na contratilidade estão relacionados a redução da afinidade da troponina pelo cálcio e redução no bombeamento do cálcio de volta ao retículo sarcoplasmático. Dessa forma, é possível observar aumento da concentração de cálcio nos miócitos, durante a disfunção contrátil. De maneira geral, a acidose metabólica está relacionada a efeitos inotrópico, cronotrópico e lusitrópico negativos, por alterar o transporte de

íons através da membrana e modificar a afinidade dos filamentos ao cálcio. (14, 33, 37)

Além disso, também foi observada uma diminuição da afinidade da hemoglobina ao oxigênio, provocando vasodilatação arteriolar e vasoconstrição do sistema venoso, levando a hipoperfusão dos órgãos. (7, 31, 39, 40)

2.4. Efeitos da acidose metabólica sobre a reatividade vascular

Há mais de um século tem-se conhecimento de que mudanças no pH extracelular (pH_0) promovem alterações no tônus vascular, o que afeta a circulação e o controle da pressão sanguínea. Gaskell, em 1880, foi, provavelmente, o primeiro a mostrar que o pH é importante para o controle tônus vascular, quando demonstrou, em artéria mesentérica de rã, que uma redução no pH utilizando ácido lático acarretava em aumento do diâmetro vascular, enquanto um aumento no pH por hidróxido de sódio promovia redução do diâmetro vascular (41).

Quando o pH_0 está na faixa de 7.4, o pH intracelular (pH_i) na célula do músculo liso vascular se encontra em torno de 7.1. Devido ao fluxo de íons através da membrana celular, alterações no pH_0 refletem em mudanças no pH_i no mesmo sentido, mas com velocidade, duração e intensidade diferentes. Por exemplo, em artéria mesentérica, as alterações do pH_i são em torno de 70% em relação ao pH_0 e ocorrem dentro de apenas 2 minutos (42).

A redução do pH perivascular na acidemia diminui a responsividade a vasoconstritores e resulta em dificuldade de manter a pressão sangüínea sistêmica (43, 44). O pH perivascular pode afetar muitos processos celulares (42, 45), mas o mecanismo preciso dessa hiporesponsividade vascular permanece desconhecido. Alterações no pH (7,4 - 7,0) têm mostrado uma substancial inibição da contratilidade do músculo liso vascular (46, 47), o qual tem sido associado a aumento da hiperpolarização (48, 49) e armazenamento de Ca^{+2} em organelas intracelulares (38).

Os mecanismos pelos quais o pH influencia o tônus vascular ou sua resposta a determinados agonistas podem envolver: óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2), canais de potássio e cálcio. Por exemplo, em aorta de rato, reduções no pH intracelular podem afetar a concentração intracelular de Ca^{+2}, por mecanismos que envolvem influxo de Ca^{+2} para o retículo sarcoplasmático (38). As mudanças no pH

também podem atuar diretamente sobre os miofilamentos contráteis (50) e alterar os receptores presentes na membrana celular (51).

A acidose também pode afetar a resposta vascular a determinados agonistas. Estudo realizado em aorta de coelho mostrou que a acidificação por aumento da pCO_2 e redução do bicarbonato, promoveu uma redução na potência da noradrenalina, deslocando sua curva para a direita de maneira competitiva. O efeito máximo deste agonista não foi alterado na faixa de pH 7,24 - 6,90; entretanto, foi reduzido em pH 6,51. Os autores sugerem que, durante a acidificação, os íons hidrogênio podem, de alguma forma, bloquear os alfa-adrenoceptores (52).

Tobian et al. (1959), utilizando anéis de aorta de rato, mostraram que a resposta contrátil induzida pela noradrenalina se encontrava reduzida em 43% frente à acidificação por alteração na pCO_2, e apenas em 26% quando se tratava de acidificação por adição de ácido. Em casos em que a acidificação era severa, a redução na contração induzida pela noradrenalina passava de 26% para 32%, o que ressalta, mais uma vez, o efeito vasorelaxante causado pela redução do pH (46).

2.5. Efeitos da acidose metabólica sobre a ventilação pulmonar

A ventilação é controlada por *feedback* negativo mediado por pO_2, pCO_2 e pH sanguíneo. Os sítios receptores que reagem à acidose, hipercapnia e hipóxia estão nos quimiorreceptores periféricos arteriais (carótida e corpos aórticos) e nos quimiorreceptores centrais na medula oblonga do cérebro. Dentre esses fatores, o pH de ambos sangue e cérebro, fornece o mecanismo químico principal para controle ventilatório. Entretanto, esse tipo de interpretação as vezes parece confusa, uma vez que, as alterações no pH sanguíneo não correspondem diretamente a alterações no pH cerebral ou líquido cefalorraquidiano. Por exemplo, acidose causada por uma elevação aguda da pCO_2 no sangue induz um maior aumento da ventilação do que a mesma diminuição do pH causada por infusão de ácido; portanto alterações no pH sanguíneo *per se* parecem não ser muito adequadas para explicar o controle químico por *feedback*, sendo necessário também alterações na pCO_2 sanguínea e no pH no líquido cefalorraquidiano. Quando uma perturbação ácido-base persiste por mais de 24 horas, mecanismo de transporte ativo na barreira hematoencefálica restabelecem a concentração de H^+ no líquido cefalorraquidiano aos níveis normais (53).

Assim, após uma alteração do equilíbrio ácido-base um estado estacionário é novamente atingido e não há mais variação de pH no líquido cefalorraquidiano ou tecido cerebral para direcionar a ventilação, restando apenas o distúrbio de pH sanguíneo, agindo sobre quimiorreceptores periféricos, para sustentar as mudanças crônicas na ventilação. Por outro lado, Fend, Miller e Pappenheimer (1966) observaram, em modelo animal, que mesmo quando um novo estado estacionário é alcançado, uma pequena variação de pH ainda persiste no tecido cerebral e no líquido cefalorraquidiano. Essa variação que persiste, é sempre na mesma direção, mas de menor magnitude que a persistente no sangue, sugerindo que os quimiorreceptores centrais ainda proporcionam parte significativa da resposta ventilatória remanescente nos distúrbios ácido-base crônicos (54).

Objetivo

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da acidose metabólica crônica sobre a função cardiovascular e respiratória.

3.2. Objetivos específicos

Obter um modelo viável e efetivo de acidose metabólica crônica em ratos.

Avaliar os parâmetros ventilatórios nos animais acidóticos, utilizando a pletismografia corpo inteiro: ventilação pulmonar (VP), frequência respiratória (fR) e volume corrente (Vc).

Realizar uma breve avaliação da função renal: ureia e creatinina plasmática e urinária e histologia do rim.

Avaliar a reatividade vascular da artéria carótida de ratos acidóticos frente a diferentes agonistas (fenilefrina (PE), acetilcolina (ACh), cálcio ionóforo A23187 (A23187), angiotensina II (Ang II) e endotelina-1 (ET-1)).

Investigar a participação do óxido nítrico na resposta vascular induzida pela acidose metabólica crônica.

Avaliar a função cardíaca na acidose metabólica crônica, através do ecocardiograma: frequência cardíaca, volume sistólico, débito cardíaco, fração de ejeção, fração de encurtamento, diâmetro diastólico ventrículo, diâmetro sistólico ventrículo, espessura da parede posterior – diástole, espessura da parede posterior – sístole, espessura da parede anterior – diástole e espessura da parede anterior – sístole.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com idade média de 70-90 dias (300 a 350 g). A espécie foi proveniente do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos no biotério da Cirurgia Experimental no Departamento de Cirurgia e Anatomia, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, à temperatura constante (22°C), e com livre acesso a solução e à comida.

Os procedimentos com os animais, bem como os protocolos experimentais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo 23/2015), estando, portanto, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Função Endotelial do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP-USP).

4.2. Indução da acidose metabólica crônica

A acidose metabólica crônica foi induzida pela substituição de água por uma solução do cloreto de amônio 0,50M durante dez dias. Os animais do grupo acidose receberam ad libitum a solução de cloreto de amônio (NH_4Cl) diluída em uma solução de 0,03% de suco artificial em pó. Os animais do grupo controle receberam suco artificial em pó (Figura 1A).

Com o objetivo de garantir que cada animal ingerisse a quantidade mínima da solução, suficiente para a instalação do quadro de acidose metabólica, também foi realizada a gavagem com uma solução de cloreto de amônio 0,02M, com volume de 1 mL durante os dez dias (Figura 1B).

Os animais foram divididos aos pares por caixa e a ingestão da solução e ração era medida diariamente.

4.3. Canulação da artéria femoral para avaliação da gasometria diária

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (50 mg/kg) e Xylazina (10 mg/Kg) via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada tricotomia na região abdominal e no dorso do animal (atrás do pescoço), onde as cânulas foram introduzidas e exteriorizadas, respectivamente.

Foi realizada uma incisão transversal, seguida da dissecção da artéria femoral esquerda. Depois a cânula, confeccionada de polietileno (sendo 18 cm de PE50 soldada a 5 cm de PE10), preenchidas com soro fisiológico heparinizado, foram implantadas na aorta abdominal através da artéria femoral, e verificada a presença de refluxo sanguíneo pelo cateter.

Após este procedimento, as cânulas foram exteriorizadas no dorso do animal, para que não tivessem acesso de modo que estes não a destruíssem, permitindo assim a coleta de amostra de sangue diariamente para avaliação gasométrica do animal não anestesiado.

4.4. Gasometria

Para avaliar se houve sucesso na indução da acidose metabólica crônica, as amostras do sangue arterial coletadas da artéria aorta abdominal de cada animal foram submetidas à análise por gasometria.

As medidas bioquímicas de pH, pressão parcial de dióxido de carbono arterial (pCO_2), pressão parcial de oxigênio arterial (pO_2), saturação de oxigênio (SO_2), concentração plasmática de íon de bicarbonato (HCO_3^-), sódio, potássio, cálcio, glicose e lactato foram realizadas por aparelho de hemogasometria Gem Premier 3000 (Instrumentation Laboratory Co., Bedford, MassAChussets, EUA) (Figura 2) previamente calibrado, utilizando-se cartucho próprio do tipo iQM 150 GEM Premier iQM Instrumentation Laboratory Co., Bedford, MassAChussets, EUA. Cada cartucho permite a análise de 150 amostras dentro de um período de 21 dias.

4.5. Avaliação dos parâmetros ventilatórios

A ventilação foi medida por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (55). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi

interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos (~2 min). As oscilações de pressão causadas pela respiração do animal foram captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor de pressão e o amplificador de sinais (ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments). O sinal foi então enviado para o sistema de aquisição e análise dos dados (PowerLab, ADInstruments) (Figura 3).

A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória (fR) e o volume corrente (Vc) que foi calculado através da fórmula: Vc=PT/PK x TA/Tamb x (PB-PA)/PB-TA/TC(PB-PC), onde VK: volume de ar injetado na câmara do animal para calibração; PT: deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente; PK: deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração, TC: temperatura corporal; Tamb: temperatura ambiente; TA: temperatura do ar dentro da câmara; PB: pressão de vapor d'água à temperatura corporal; PA: pressão de vapor d'água à temperatura da câmara. A ventilação foi obtida pelo produto de fR e Vc. A ventilação (V) e o Vc foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à Tc e saturados com vapor d'água (BTPS).

4.6. Avaliação da ureia e creatinina plasmática e urinária renal

A coleta de sangue pela artéria aorta abdominal (colocada em tubo de ensaio com heparina) e urina diretamente da bexiga foram feitas logo após a anestesia dos animais e armazenadas.

Posteriormente foram realizadas análises de creatinina e ureia plasmática e urinária. As análises foram realizadas com o emprego de kits Labtest®, utilizando urina e plasma de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante.

4.7. Análise histológica do rim

Para a análise histológica foi coletado o rim do lado esquerdo dos animais controle e acidóticos.

Após a coleta de amostra sanguínea pela artéria aorta abdominal para a avaliação da gasometria, iniciou-se a perfusão com solução salina (NaCl) 0,9% para retirada do sangue e, depois, com paraformol 4% para fixação. Ao final da perfusão, o rim foi coletado e cortado longitudinalmente e uma fatia central de cerca de 2 mm foi armazenada em formol 10%.

Após 24 horas de fixação em formoltamponado 10% (v/v), as amostras de rim passaram por desidratação progressiva (bateria de álcoois de baixa graduação até álcool absoluto: 50, 70, 80, 90, 95 e 100% - v/v), seguida por diafanização em xilol e inclusão em parafina. Após microtomia (Micrótomo 2040, Reichert-Jung, Alemanha), cortes de 3 µm de espessura foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina/eosina para análise histológica.

4.8. Estudo da reatividade vascular em câmaras de órgão isolado (organ chambers)

Os animais foram anestesiados com uretano (2 mg/Kg). Após completa anestesia, foi realizada uma incisão abdominal, seguida de coleta de amostra sanguínea para análises posteriores e exsanguinados pela artéria aorta abdominal. Em seguida, na região cervical anterior foi realizada uma incisão, dissecção da artéria carótida, que foi cuidadosamente removida.

O segmento arterial foi colocado em solução de Krebs (composição em mM: NaCl 118,3, KCl 4,7, MgSO4 1,2, KH_2PO_4 1,22, $CaCl_2$ 2,5, $NaHCO_3$ 25,0 e $C_6H_{12}O_6$ 11,1, pH 7,4), por fim, foi cortada em seguimentos de 4-5 mm.

Após esta preparação inicial, cada anel foi suspenso entre duas alças de aço inoxidável, que foram passadas através de sua luz (Figura 4A), e este conjunto foi imerso em uma cuba contendo 10 mL de solução de Krebs (Figura 4C), que eram mantidas a 37°C e aeradas com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). Uma das alças estava ancorada a um suporte fixo e a outra conectada a um transdutor (Figura 4B) (Force transducer (5mg – 25g), ADInstrument CO, Dunedin, New Zealand) para mensuração da tensão isométrica. Os transdutores foram acoplados a um registrador de 8 canais (PowerLab/16SP, ADInstrument CO, Dunedin, New Zealand), permitindo, desta forma, o registro simultâneo da tensão isométrica de até 8 anéis vasculares (Figura 4D).

Antes de iniciar os experimentos farmacológicos propriamente ditos, os anéis vasculares foram submetidos ao ponto ótimo de estiramento-tensão de 1g por meio de um sistema micrométrico, e permaneceram em repouso sob esta tensão durante 60 minutos. Durante o período de estabilização, a solução de Krebs foi substituída de 3 a 4 vezes e a tensão ajustada. Após este período de estabilização, foi realizada a contração dos anéis mediante adição de fenilefrina (PE) (10-7M) ao banho, esta concentração permitiu avaliar a integridade da musculatura lisa. Depois de atingido o platô de contração, a presença de endotélio nos anéis foi avaliada mediante a indução de relaxamento pela adição de acetilcolina (ACh) (10-6M) ao banho. Subsequentemente, a solução das cubas foi substituída por uma solução de Krebs pura e a preparação foi deixada em repouso por 20 minutos.

Após este segundo período de estabilização, foram obtidas curvas concentração-resposta para PE, ACh, cálcio ionóforo A23187 (A23187), angiotensina II (Ang II) e endotelina-1 (ET-1). Com o objetivo de avaliar a participação do óxido nítrico (NO), as curvas foram realizadas com e sem Nω-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) ($2x10^{-4}$M), um inibidor inespecífico da óxido nítrico sintetase (NOS). O tempo de incubação com L-NAME foi de 45 minutos.

4.9. Determinação indireta de NO plasmático pela dosagem de Nitrito (NO_2^-) e Nitrato (NO_3^-)

Amostras de sangue total foram coletadas pela artéria aorta abdominal e colocadas em tubo heparinizado. O plasma foi obtido por centrifugação 2.500 g (10 minutos, 4ºC) e mergulhado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (-70ºC) para posterior dosagem do nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) plasmáticos.

Alíquotas de plasma foram desproteinizadas por incubação com etanol absoluto (4ºC), mantidas por 30 minutos em freezer (-20ºC), e em seguida, centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Alemanha).

Para a medida do NO plasmático, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ ozônio (O_3) utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyser (280i NOA).

Das amostras desproteinizadas, utilizou-se o volume de 5 µl, que foi injetado na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de

vanádio em 1N de HCl à 95ºC) que converte o NO_3^- em NO, em quantidades equimolares. Como o gás nitrogênio, o NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador. NO é detectado pela reação com ozônio, emitindo uma luz vermelha ($NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$; $NO_2 \rightarrow NO_2 + hv$). O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de NO na amostra. A concentração de NO_3^- foi calculada por comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas (5 - 100 µM) de nitrato de sódio. Os valores foram expressos em µM.

As concentrações de NO_2^- foram determinadas com o uso de 200 µl da amostra como descrito acima, exceto que na câmara de reação contém uma solução de iodo acidificado contendo 0,5 g de iodeto de potássio e 0,325 g de iodo em 10 ml de água com 35 ml de ácido acético, o qual reduz somente o NO_2^- em NO. A concentração de NO_2^- foi calculado por comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas (2 – 0,1 µM) de nitrito de sódio. Os valores foram expressos em µM.

As dosagens do NO_2^- e NO_3^- plasmáticos foram realizada no Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP – USP.

4.10. Ecocardiograma

O exame ecodopplercardiográfico foi realizado nos animais do grupo controle e acidose após 10 dias do tratamento.

Foi utilizado o ecocardiógrafo Vevo 2100® high-Resolution Imaging System (Visual Sonics, Toronto, ON, Canadá), concedido pela FAPESP por meio do projeto Multiusuários (2009-54010-1), com sonda de 20 MHz.

Os animais foram anestesiados com uretano (2 mg/Kg), permitindo-os manter a respiração espontânea durante o exame. Os pelos da região anterior do tórax foram retirados com o auxílio de creme depilatório Veet®. Foram colocados em placa aquecida (37ºC a 40ºC) e as quatro patas conectadas a eletrodos de eletrocardiograma.

Foram posicionados para obtenção do eixo longo. Com a visualização bidimensional do ventrículo esquerdo em eixo longo foi obtida uma imagem em modo-M, a partir dessa imagem foram analisados os seguintes parâmetros (em mm): espessura da parede anterior - diástole (EPAD), espessura da parede anterior - sístole (EPAS), espessura da parede posterior - diástole (EPPD), espessura da parede posterior - sístole (EPPS), diâmetro diastólico do ventrículo (DDV) e diâmetro sistólico do ventrículo (DSV). A fração de encurtamento (FEnc) (%) será calculada a partir da obtenção desses valores bem como a fração de ejeção (FE) (%) utilizando o método de Teichholz.

4.11. Critérios de exclusão

Os animais que não apresentavam pH igual ou menor que 7,2 e HCO_3^- igual ou menor que 18 mM ao final do tratamento, foram eutanasiados.

Nos estudos de reatividade vascular, os anéis de artérias carótidas que se apresentaram com menos de 70% de endotélio foram descartados.

4.12. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) e foram comparados (descrito nas legendas) pela análise de variância de uma (one-way ANOVA) ou duas vias (two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni e teste t, utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Corporation, La Jolla, California, EUA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Indução acidose metabólica crônica

A indução da acidose metabólica crônica foi feita incialmente com uma solução de cloreto de amônio (NH_4Cl) com concentração de 0,5M (Acidose 1) diluída em uma solução de 0,03% de suco artificial em pó que foi oferecida aos animais durante 10 dias, *ad libitum*. Enquanto que os animais do grupo controle ingeriram somente a solução de suco artificial em pó.

Os resultados da gasometria arterial dos animais do grupo Acidose 1 mostraram que estes, após os 10 dias, não desenvolveram a acidose metabólica crônica (pH: 7,36; HCO_3^-: 14,9; pCO_2: 30,7), uma vez que mesmo com níveis reduzidos de HCO_3^-, o pH encontrava-se dentro da faixa de normalidade (Figura 1,2 e 3), assim adicionamos ao tratamento inicial uma gavagem diária (10 dias) com solução de NH_4Cl com concentração de 0,02M (Acidose 2).

A partir dos resultados obtidos, o tratamento do grupo acidose 2 foi escolhido como o modelo de indução de acidose metabólica crônica, a ser empregado para as demais análises do projeto. Os valores obtidos, em relação ao grupo controle, de pH (7,39 para 7,24) (Figura 4) e HCO_3^- (22,72 para 15,12 mEq/L) (Figura 5) alcançaram níveis considerados satisfatórios para o desenvolvimento do projeto. Também foi observada uma redução do pCO_2 (37,22 para 32,90 mmHg) (Figura 6), caracterizando uma resposta compensatória em decorrência do quadro de acidose metabólica.

O peso dos animais também foi medido durante os dez dias de tratamento. Foi observado um ganho de peso, no grupo controle, compatível com o crescimento esperado no período (309 para 408 g), já nos grupos tratados o ganho de peso, no mesmo período, não foi significativo (Acidose 1: 277 para 292 g; Acidose 2: 295 para 302 g) (Figura 7).

Também foram analisados os valores de pressão parcial de oxigênio (pO_2), sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), glicose (Glu), lactato (Lac) e saturação de oxigênio (SO_2). Todas estas variáveis apresentaram diferença estatística significativa, exceto pO_2, Ca^{2+} e SO_2.(Tabela 1).

Desse momento em diante, iremos nos referir à grupo controle e grupo acidose, esse último corresponde à acidose 2 apresentado até o presente momento,

uma vez que este foi definido como modelo experimental de acidose metabólica crônica.

Tabela 1 – Valores da gasometria do grupo controle e acidose. Os dados representam a média ± EPM (n = 32).

	Controle	Acidose
pH	7,39 ± 0,009	7,24 ± 0,01$^{\#\#}$
Pressão parcial arterial de oxigênio (pO_2) (mmHg)	81.83 ± 2.33	94.33 ± 1.05
Pressão parcial arterial de dióxido de carbono (pCO_2) (mmHg)	37,22 ± 0,77	32,90 ± 0,56 $^{\#\#\#}$
Sódio (Na^+) (mmol/L)	141.3 ± 0.67	143.8 ± 0.35 $^{\#}$
Potássio (K^+) (mmol/L)	4.59 ± 0.14	4.13 ± 0.05 ***
Cálcio (Ca^{2+}) (mmol/L)	0,92 ± 0,04	1,02 ± 0,03
Glicose (Glu) (mgl/dL)	207,9 ± 6,85	186,3 ± 2,93 **
Lactato (Lac) (mmol/L)	2.24 ± 0.13	1.85 ± 0.08 *
Bicarbonato (HCO_3^-) (mmol/L)	22,72 ± 0,41	15,12 ± 0,43 $^{\#\#}$
Saturação de oxigênio (SO_2) (%)	95,33 ± 0,52	94,93 ± 0,33

* p = 0,0176; ** p = 0,0012; *** p = 0,0003; $^{\#}$ p = 0,0007; $^{\#\#}$ p < 0,0001; $^{\#\#\#}$ p = 0,0001 (Controle versus Acidose).

Figura 2: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o pH sanguíneo. Acidose 1 (NH_4Cl 0,5M ad libitum); Acidose 2 (NH_4Cl 0,5M ad libitum + gavagem 0,02M). Os dados representam a média ±EPM (n = 16), *** p<0.0001 (controle *versus* acidose 2, One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

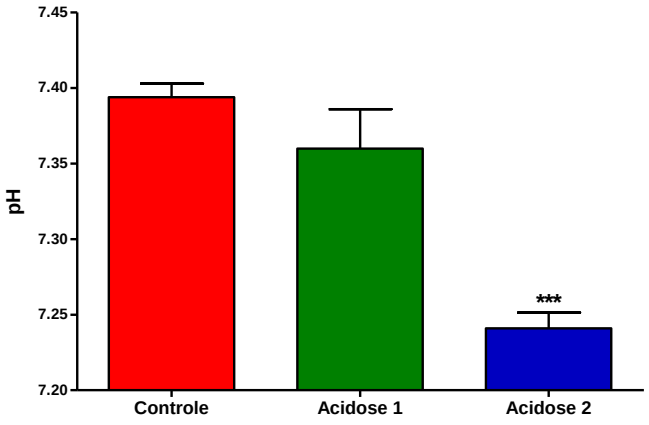


Figura 2: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o bicarbonato sanguíneo. Acidose 1 (NH_4Cl 0,5M ad libitum); Acidose 2 (NH_4Cl 0,5M ad libitum + gavagem 0,02M). Os dados representam a média ±EPM (n = 16), *** p<0.0001 (controle *versus* acidose 1 e acidose 2), One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

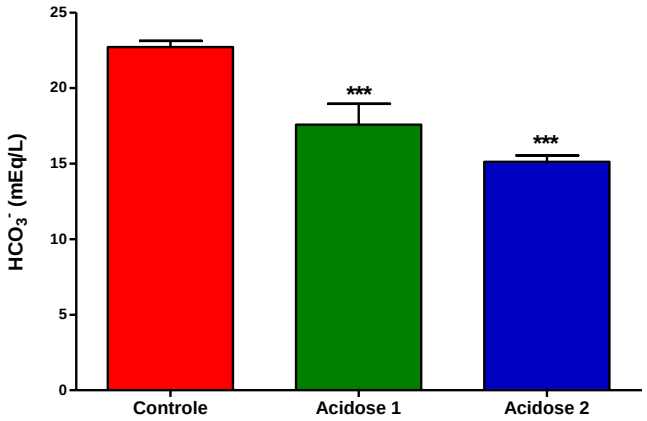


Figura 3: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre a pCO_2 sanguínea. Acidose 1 (NH_4Cl 0,5M ad libitum); Acidose 2 (NH_4Cl 0,5M ad libitum + gavagem 0,02M). Os dados representam a média ±EPM (n = 16), *** p=0.0001 (controle *versus* acidose 1; controle *versus* acidose 2), One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

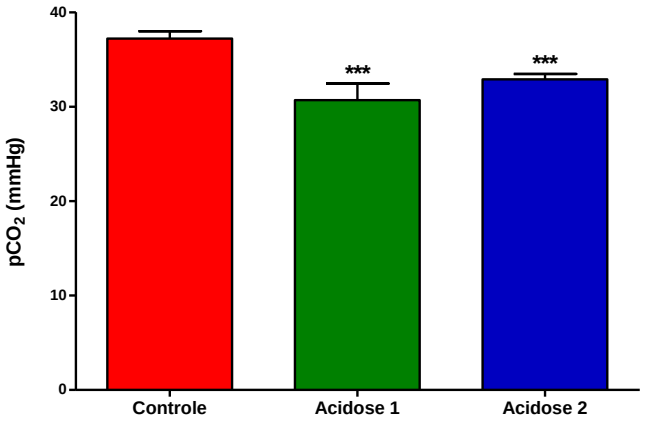


Figura 4: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) sobre o pH sanguíneo. Os dados representam a média ±EPM (n = 16), *** p<0.0001 (controle *versus* acidose), Teste t.

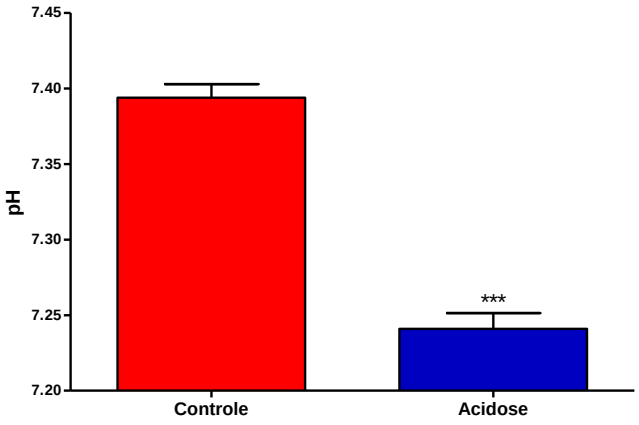


Figura 5: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) sobre o bicarbonato sanguíneo. Os dados representam a média ±EPM (n = 16), *** p<0.0001 (controle *versus* acidose), Teste t.

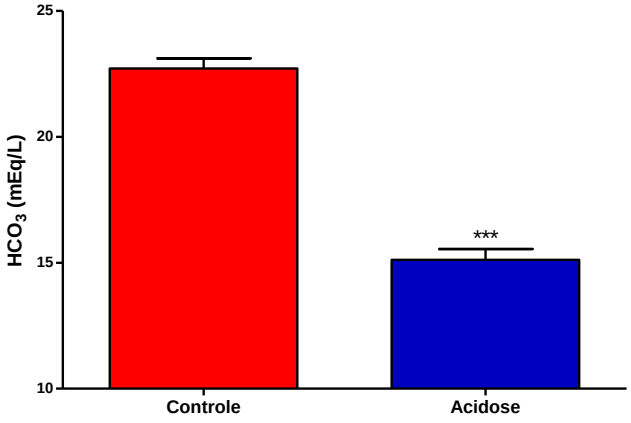


Figura 6: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) sobre a pCO_2 sanguínea. Os dados representam a média ±EPM (n = 16), *** p=0.0001 (controle *versus* acidose), Teste t.

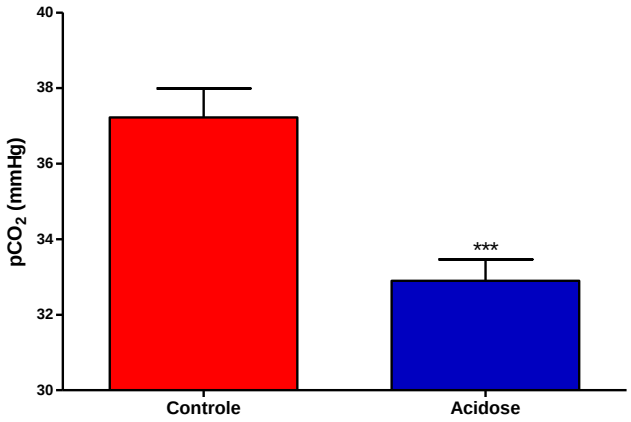
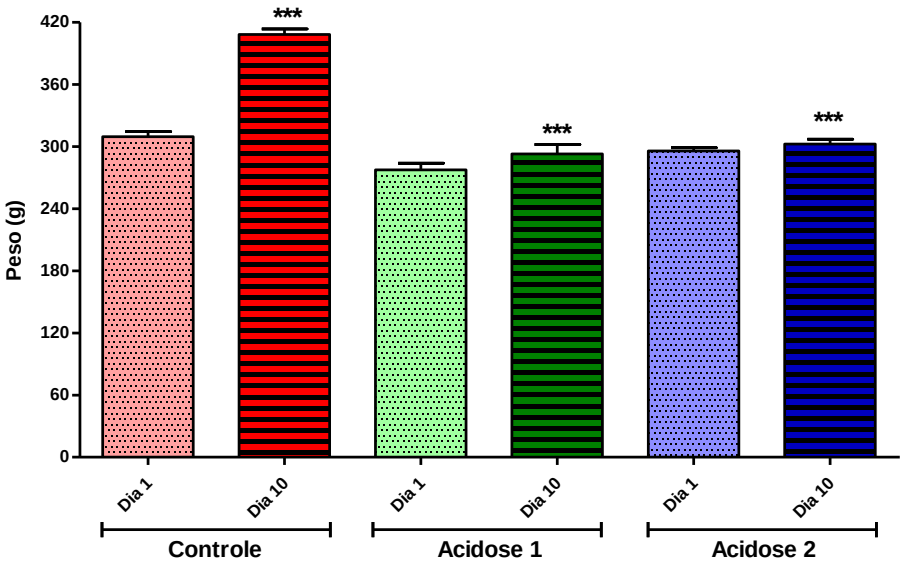


Figura 7: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o peso corporal durante os 10 dias de tratamento. Acidose 1 (NH_4Cl 0,5M ad libitum); Acidose 2 (NH_4Cl 0,5M ad libitum + gavagem 0,02M). Os dados representam a média ±EPM (n = 16), *** p<0.0001 (controle Dia 1 *versus* controle Dia 10), (controle Dia 10 *versus* acidose 1 Dia 10), (controle Dia 10 *versus* acidose 2 Dia 10), One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.



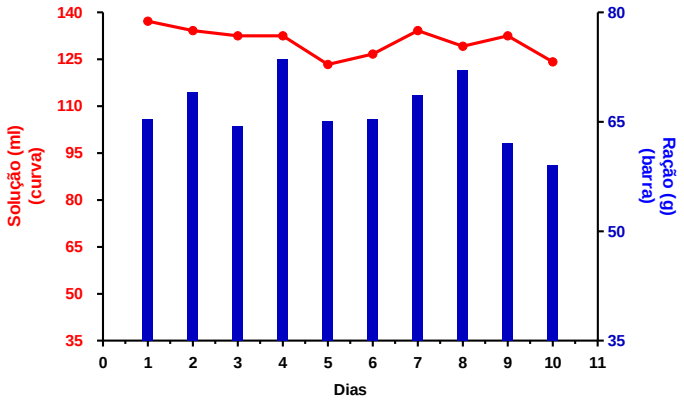
As relações entre consumo de solução, ração e o peso dos animais foram analisadas a partir das medidas diárias.

O grupo controle iniciou o tratamento ingerindo uma média de 137 ml de solução e 65g de ração. No decorrer dos dez dias houve uma pequena variação da quantidade, terminando com 124ml e 59g (Figura 8 A).

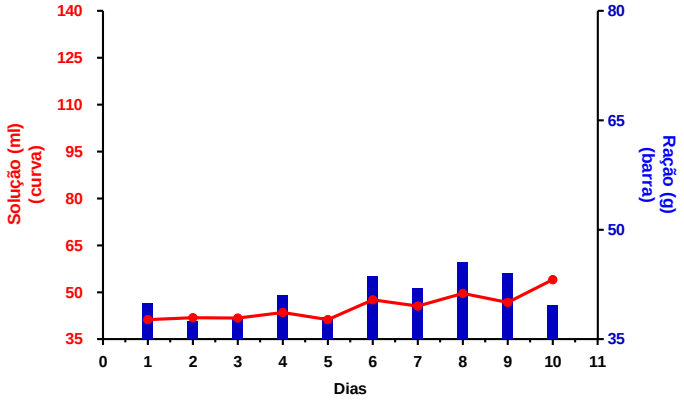
Quanto ao grupo acidose, a ingestão de solução e ração foi muito inferior. Iniciaram o tratamento ingerindo 41ml de solução e 39g de ração, finalizando com um leve aumento na ingestão de solução (54ml). Mesmo havendo um aumento na ingestão de ração do sexto ao nono dia, finalizaram o tratamento ingerindo a mesma quantidade do início (Figura 8 B).

A ingestão de solução e ração tem uma relação positiva com o ganho de peso corporal em ambos grupos. Sendo o ganho de peso maior quanto maior a ingestão de líquido e alimento. (Figura 8 e 9).

Figura 8: Relação entre a quantidade de solução e ração ingeridas durante os 10 dias de tratamento pelos Grupo Controle (A) (solução somente com suco) e Grupo Acidose (B) (solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M)), (n = 16).

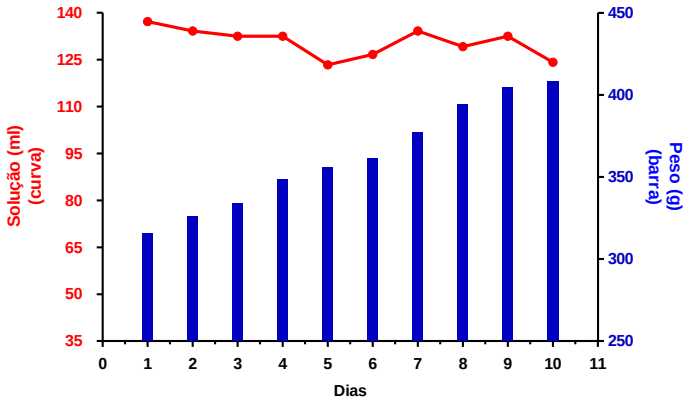


A

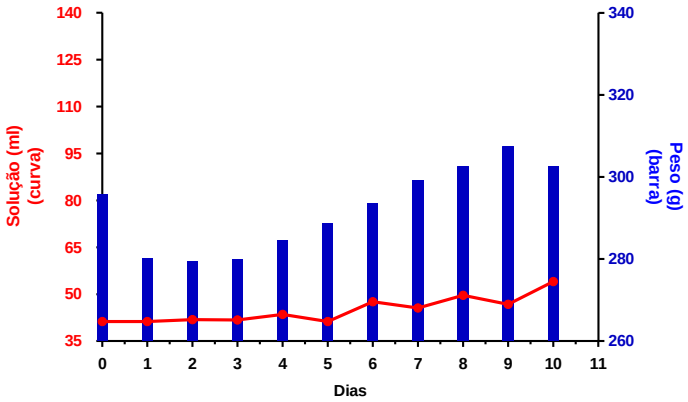


B

Figura 9: Relação entre a quantidade de solução ingerida e peso durante os 10 dias de tratamento dos Grupo Controle (A) (solução somente com suco) e Grupo Acidose (B) (solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M)), (n = 16).



A



B

5.2. Gasometria diária

Para que houvesse uma monitorização dos valores gasométricos e assim poder acompanhar a evolução da acidose metabólica crônica nos animais, estes receberam uma cânula colocada na artéria femoral, permitindo uma coleta de amostra sanguínea arterial diária.

Do total de animais canulados (n = 16), apenas em quatro (A,B,C,D) foi possível a coleta diária de amostra sanguínea. Alguns morreram devido à hemorragia causada pela saída da cânula da artéria femoral, alguns retiraram a cânula e outros precisaram ser eutanasiados para evitar sofrimento do animal.

A solução que esses animais ingeriram foi medida diariamente, mas não houve uma relação direta com a variação dos valores de pH (Figura 10).

Analisando a relação dos valores de pH e HCO_3^- nos quatro animais, é possível observar que houve uma variação diretamente proporcional entre estas duas variáveis. Mostrando uma queda acentuada do pH até o terceiro dia e uma tentativa de retorno ao pH inicial entre o sexto e sétimo dia, com uma nova queda nos valores em seguida (Figura 11). Essa variação do pH está associada a variações nos valores de HCO_3^-.

Na relação entre os valores de pH e pCO_2, podemos notar que entre o primeiro e segundo dia houve uma tentativa de compensação da acidose com a diminuição da pCO_2, o que promoveu um retorno do pH. Então, os valores do pH aumentaram junto com a pCO_2 nos dias seguintes até o sexto ou sétimo dia, após esse período, o pH volta a diminuir até final do tratamento, normalmente com pouca alteração da pCO_2 (Figura 12).

Examinando a relação entre pCO_2 e HCO_3^- notou-se que a variação é proporcional durante o tempo de tratamento (Figura 13).

Em dois dos quatro animais os valores de pH diminuíram com o tratamento de dez dias (Figura 14 A,C), enquanto que nos outros dois não houve diferença, finalizando com o mesmo pH do início (Figura 14 B,D). Já quanto ao pCO_2 e HCO_3^-, três animais mostraram uma diminuição dos valores entre o início e final do tratamento (Figura 14 A,C,D), e um deles apresentou aumento no decorrer do tratamento.

Figura 10: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D), (n = 4). Relação entre o pH e a quantidade de solução ingerida durante os 10 dias de tratamento.

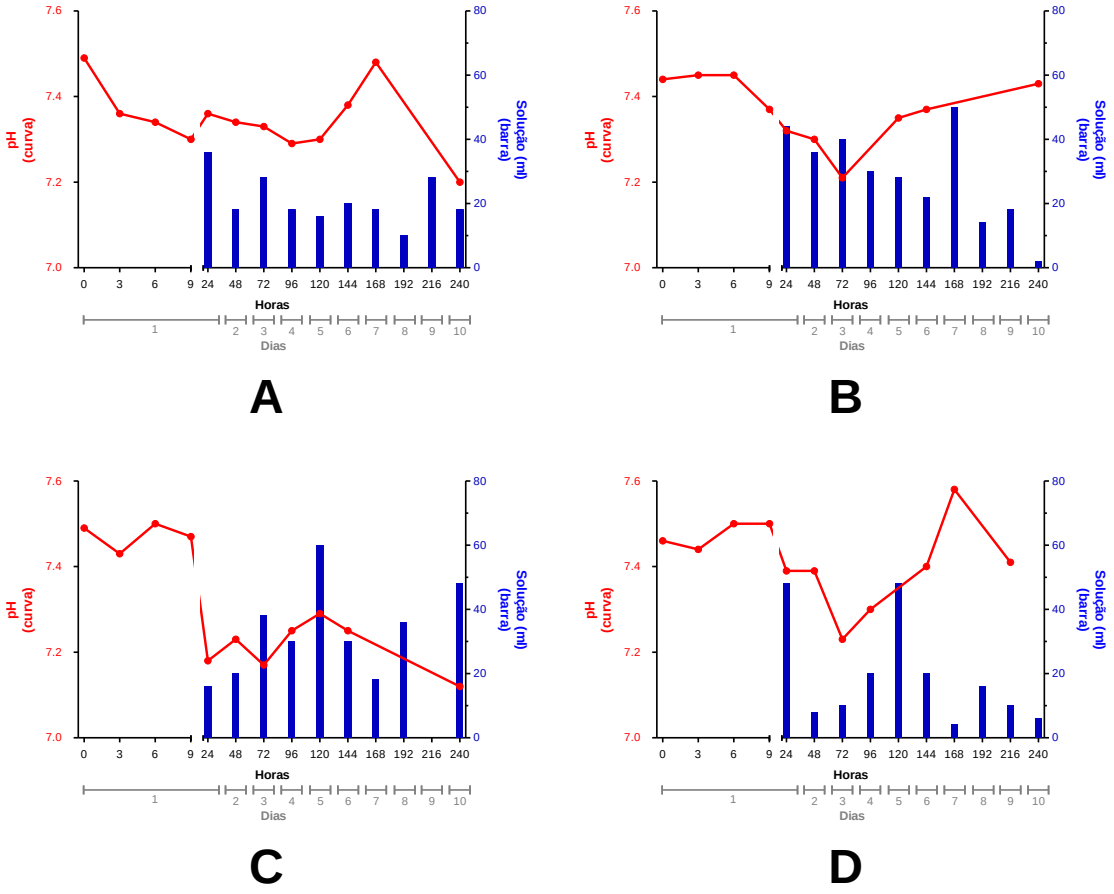


Figura 11: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D), (n = 4). Relação entre o pH e bicarbonato durante os 10 dias de tratamento.

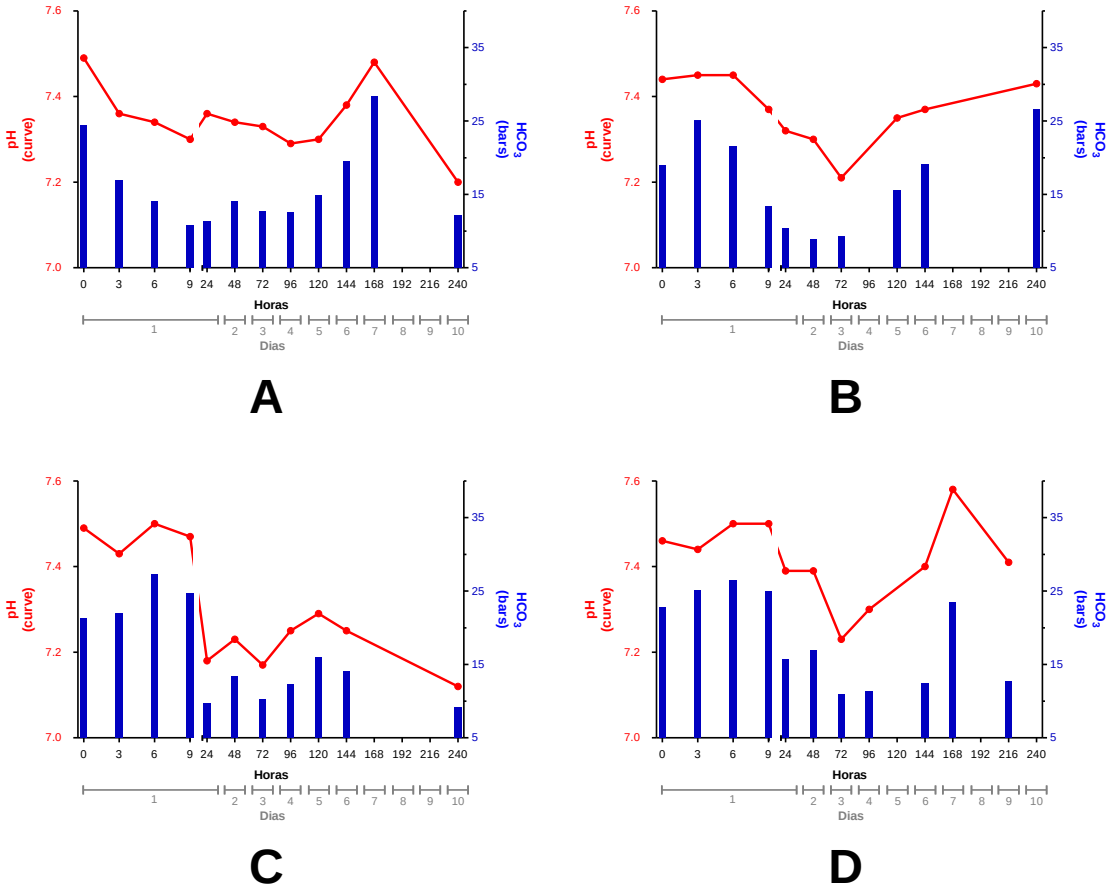


Figura 12: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D), (n = 4). Relação entre o pH e a pCO_2 durante os 10 dias de tratamento.

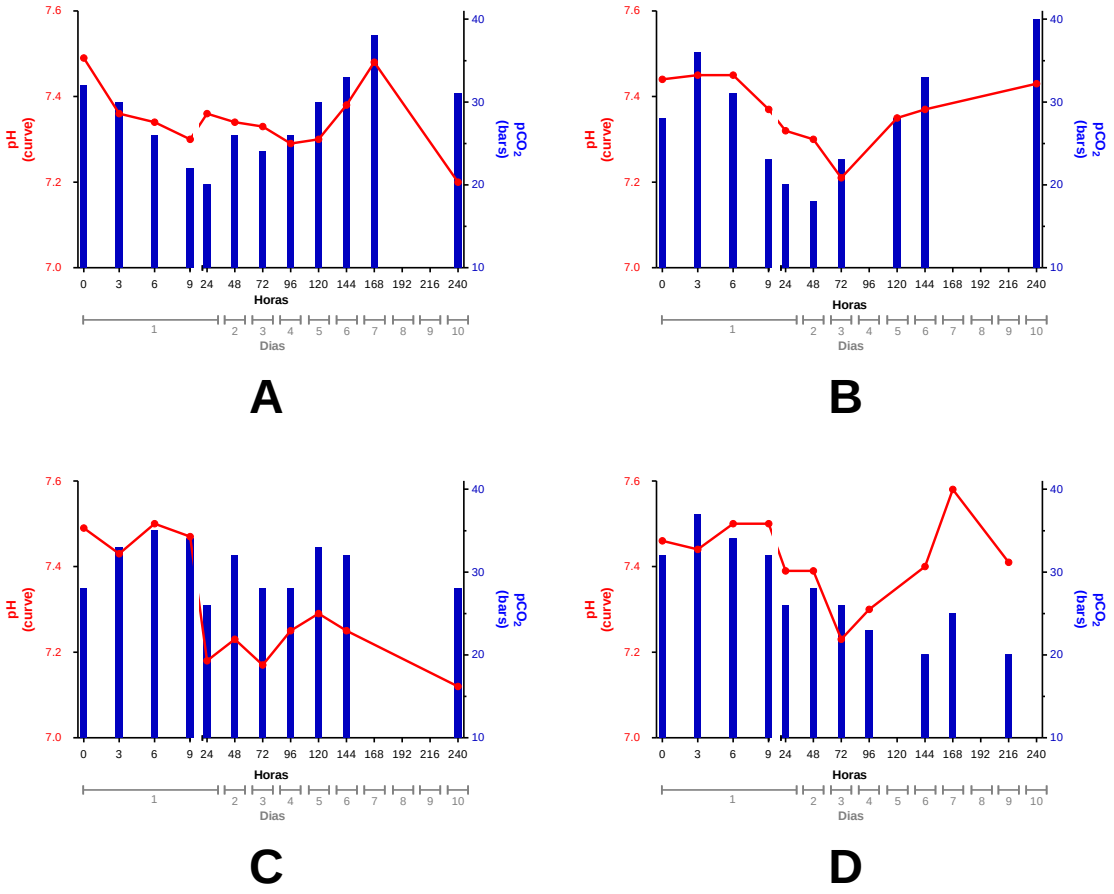


Figura 13: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D), (n = 4). Relação entre a pCO_2 e o bicarbonato durante os 10 dias de tratamento.

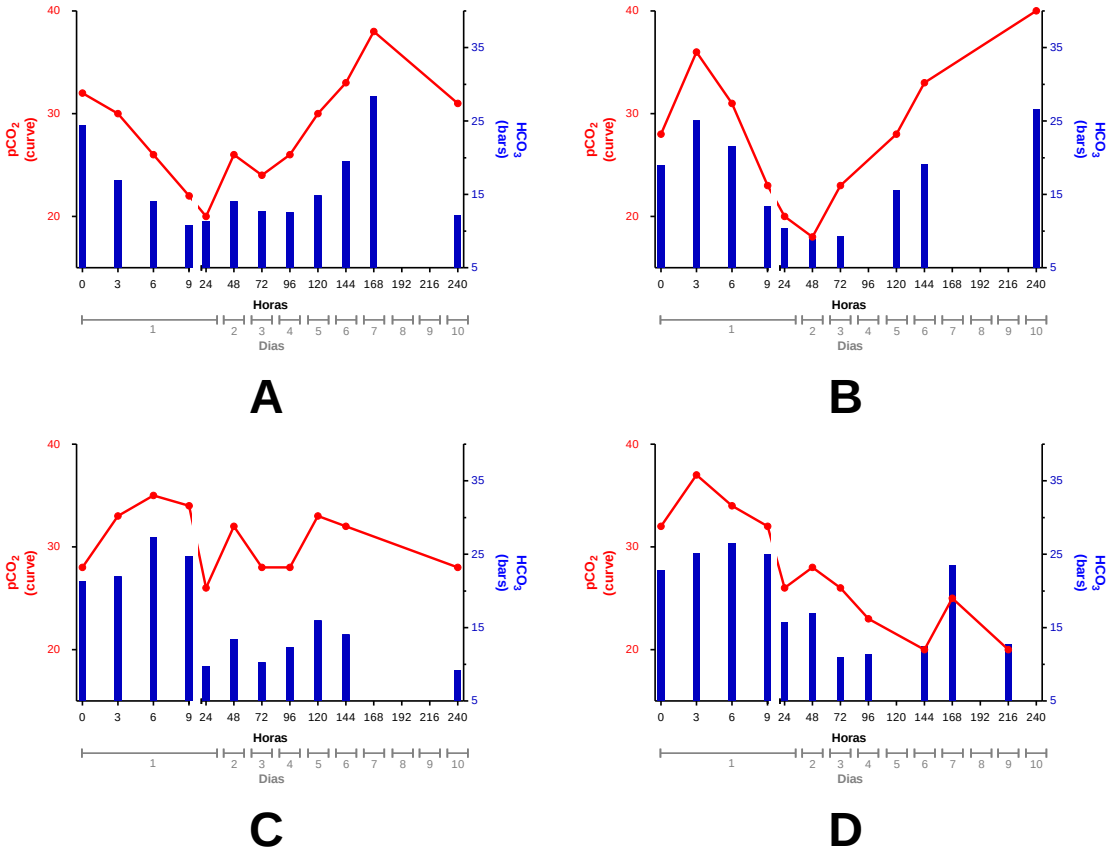
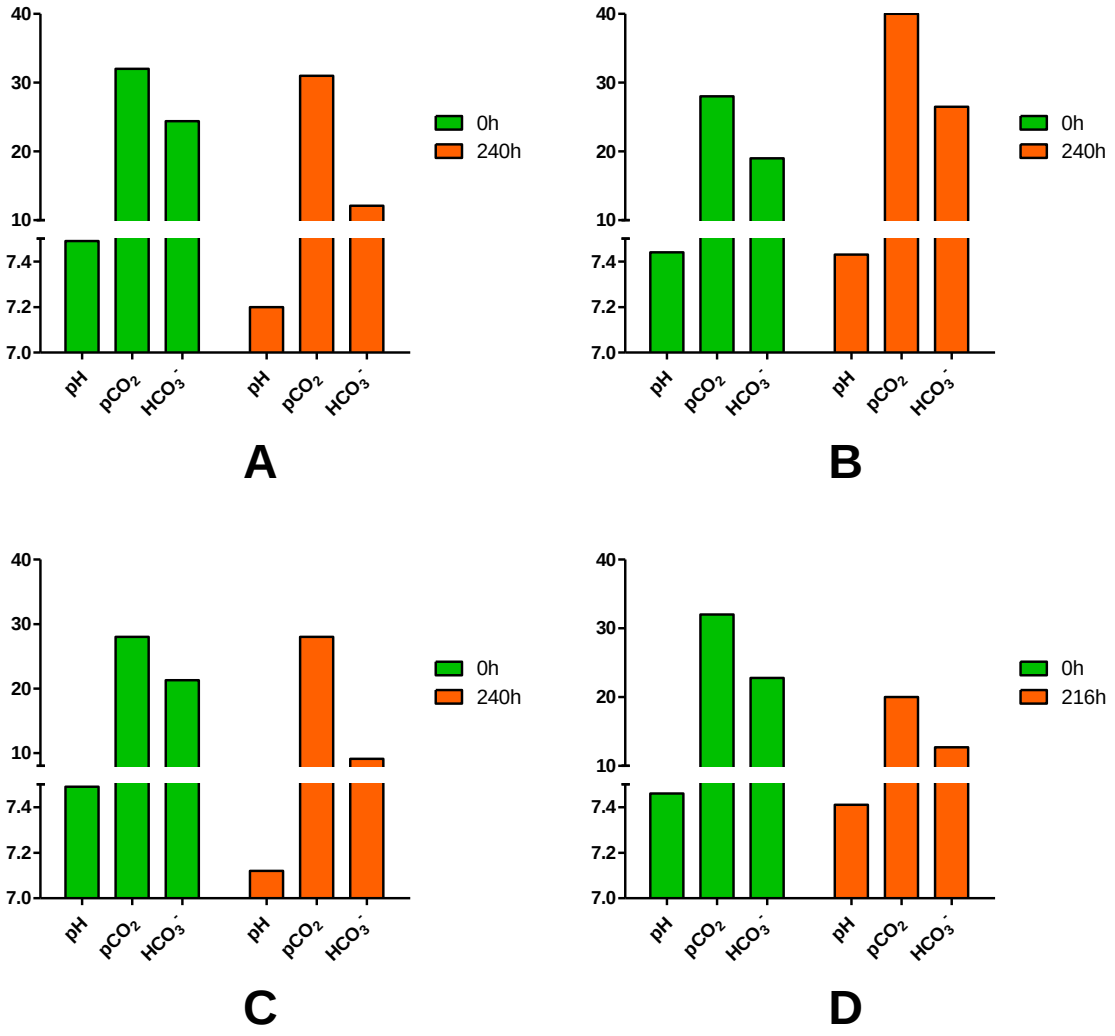


Figura 14: Efeito do tratamento com solução (NH_4Cl 0,5M) *ad libitum* e gavagem (NH_4Cl 0,02M) nos animais canulados (A, B, C, D), (n = 4). Relação entre o pH, pCO_2 e bicarbonato no dia 1 e 10 dias depois do tratamento.



5.3. Avaliação dos parâmetros ventilatórios

A indução da acidose metabólica durante dez dias promoveu um aumento significativo da ventilação já no segundo dia do tratamento. A partir do terceiro dia, os valores diminuíram significativamente ($p<0,003$) de 1724±235,43 mL/Kg.min para 1001±67,81 mL/Kg.min e permaneceu reduzida até o décimo dia (709,22±126,66 mL/Kg.min) (Figura 15). Este resultado é reflexo principalmente do volume corrente que apresenta um aumento gradual até o segundo dia (8,66± 0,94 mL/Kg no

controle para 13,7±1,60 mL/Kg) onde é significativamente maior que o controle (P<0,05) e redução significativa a partir do quarto dia de acidose (Figura 16).

Durante o período de tratamento não foi observada alteração na frequência respiratória (Figura 17).

Figura 15: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a ventilação. *** p < 0,0001 (Dia 0 *versus* Dia 2). Os dados representam a média ±EPM (n = 8), One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

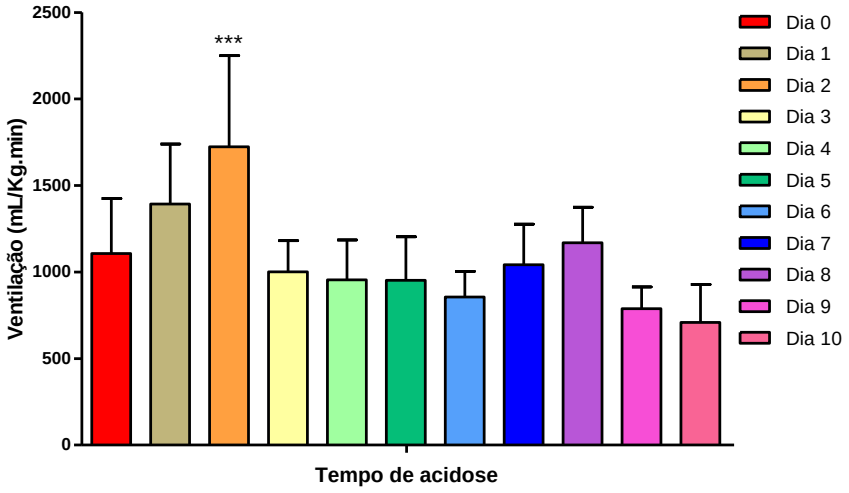


Figura 16: Efeito da acidose metabólica crônica sobre o volume corrente. ** p < 0,001 (Dia 0 versus Dia 2). Os dados representam a média ±EPM (n = 8), One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

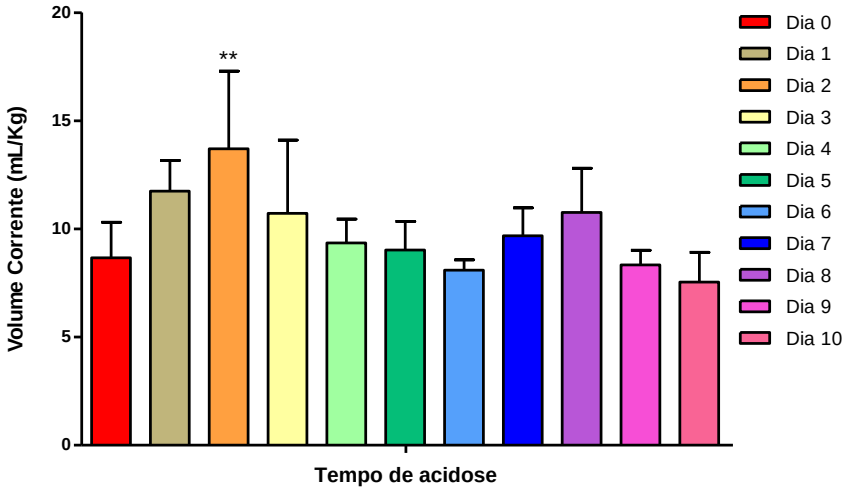
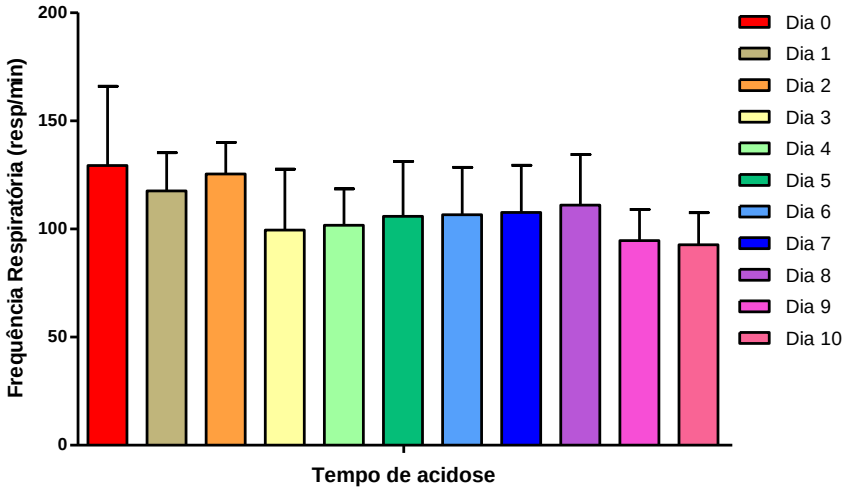


Figura 17: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a frequência respiratória. Os dados representam a média ±EPM (n = 8), One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.



5.4. Avaliação da ureia e creatinina plasmática e urinária

A avaliação da ureia e creatinina plasmática e urinária nos grupos controle e acidose, mostrou que o tratamento durante dez dias com a solução de NH_4Cl não promoveu alterações na filtração renal, uma vez que nenhuma alteração foi observada para estes parâmetros (Figuras 18 e 19) (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores da ureia e creatinina plasmática e urinária nos grupos controle e acidose. Os dados representam a média ± EPM (n = 10).

	Controle	Acidose
Ureia plasmática	54,27 ± 1,74	58,89 ± 1,63
Ureia urina	3695 ± 420,2	3316 ± 248,7
Creatinina plasmática	0,589 ± 0,023	0,583 ± 0,023
Creatinina urina	47,14 ± 5,27	48,83 ± 2,55

Figura 18: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de ureia plasmática e na urina. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados representam a média ±EPM (n = 10), Test t.

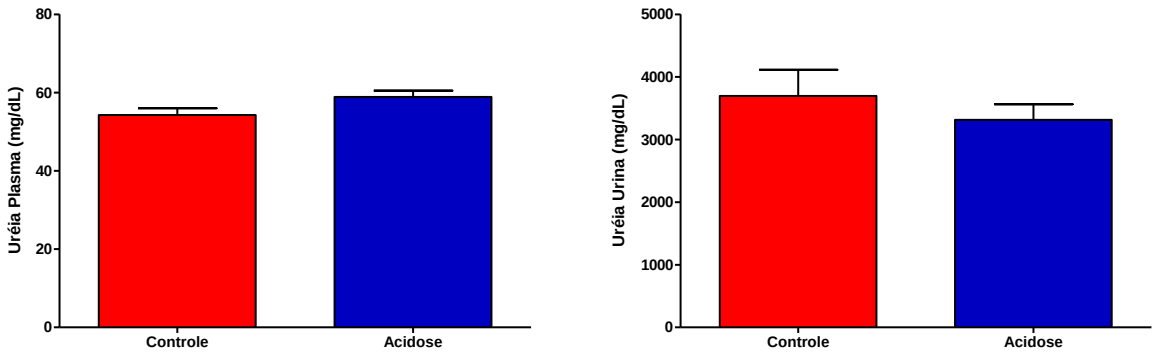
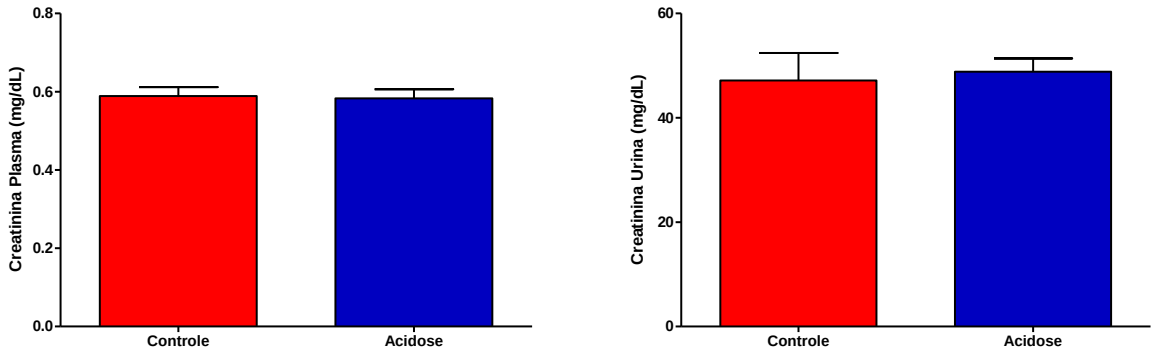


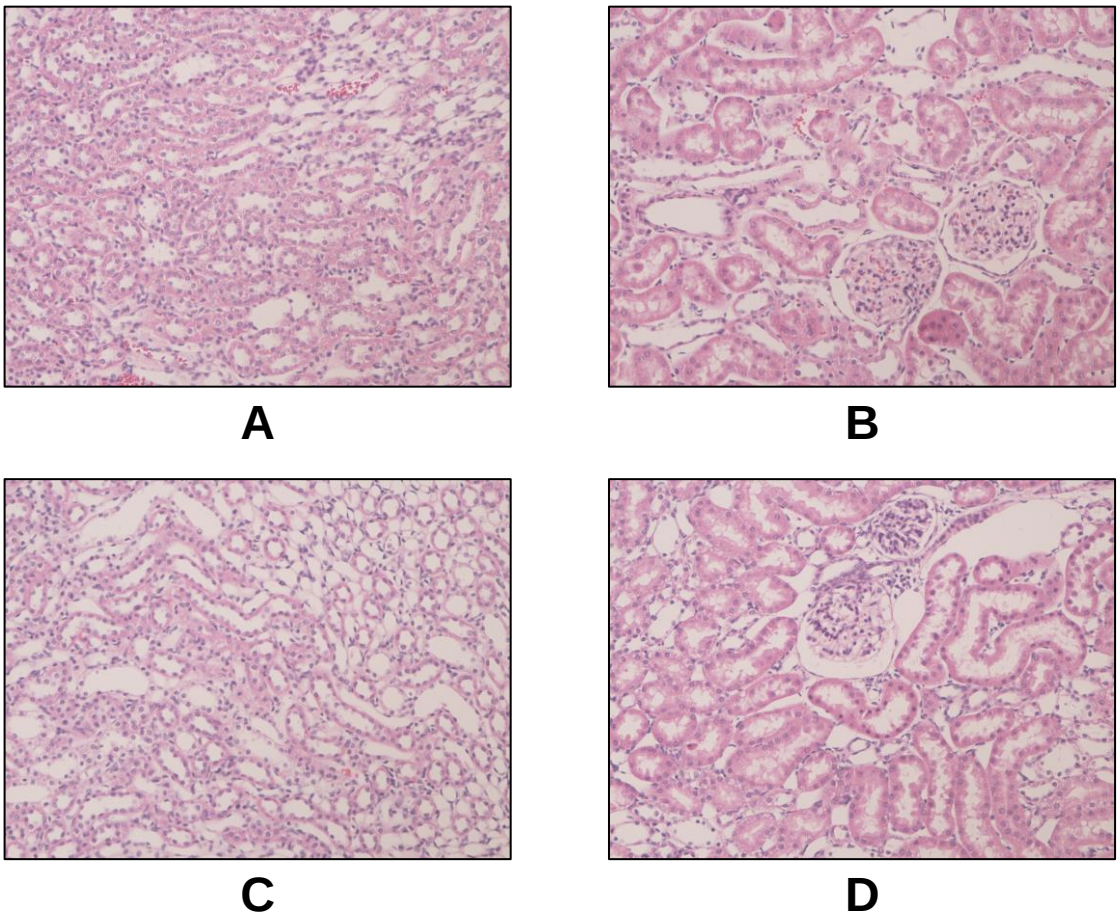
Figura 19: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de creatinina plasmática e na urina. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados representam a média ±EPM (n = 10), Test t.



5.5. Análise histológica do rim

Na análise histológica do rim esquerdo dos animais utilizados no estudo, não foram observadas diferenças significativas. (Figura 20).

Figura 20: Fotomicrografia renal de ratos do grupo controle (A e B) e grupo acidose (C e D). A e C – Medula renal (20x); C e D – Córtex renal (20x). Coloração Hematoxilina-eosina (HE).



5.6. Estudo da reatividade vascular em câmaras de órgão isolado (organ chambers)

O tratamento para indução da acidose metabólica com a solução de NH_4Cl não alterou o relaxamento induzido pela ACh em anéis de carótida com endotélio pré contraídos com PE (Figura 21).

Também em anéis de carótida com endotélio, o A23187 promoveu maior relaxamento em anéis do grupo acidose quando comparado ao grupo controle. Este efeito foi bloqueado na presença do L-Name (Figura 22).

Nas curvas dose-resposta com PE a contração nos anéis com endotélio do grupo acidose somente foi maior na última dose, quando comparado ao grupo controle. (Figura 23).

A contração induzida pela angiotensina II apresentou-se aumentada em artérias do grupo acidose com endotélio em relação ao grupo controle. (Figura 24).

A resposta contrátil da endotelina-1 não foi alterada no grupo acidose comparado ao grupo controle, com endotélio. (Figura 25).

Figura 21: Curva dose-resposta para acetilcolina em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M). Os dados representam a média ± EPM (n = 10), Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

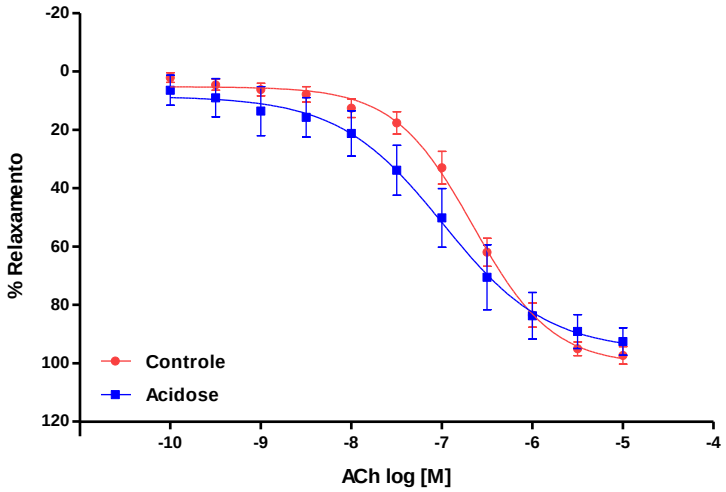


Figura 22: Curva dose-resposta para cálcio ionóforo A23187 em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M). Os dados representam a média ± EPM (n = 10), a p < 0,05, b p < 0,01 (controle *versus* acidose), c p < 0,05, d p < 0,01, e p < 0,001 (acidose versus acidose L-Name). Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

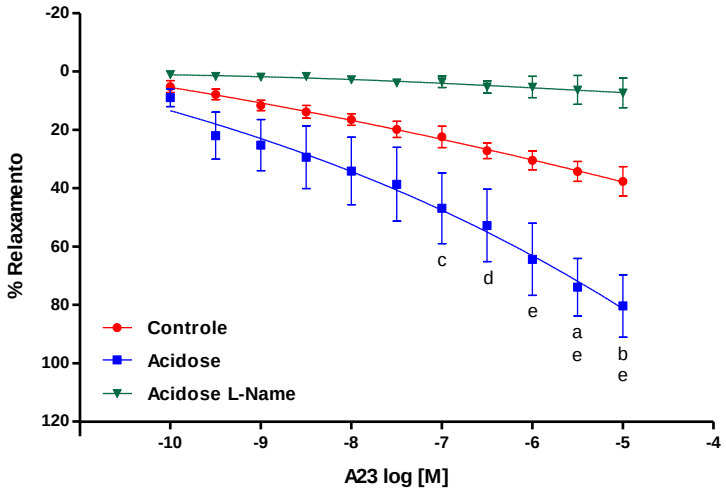


Figura 23: Curva dose-resposta para fenilefrina em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio. Os dados representam a média ± EPM (n = 10). Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

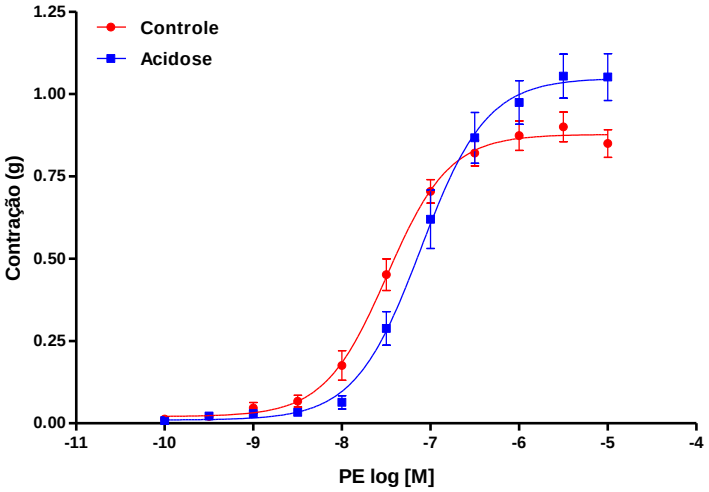


Figura 24: Curva dose-resposta para angiotensina II em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio. Os dados representam a média ± EPM (n = 10). Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

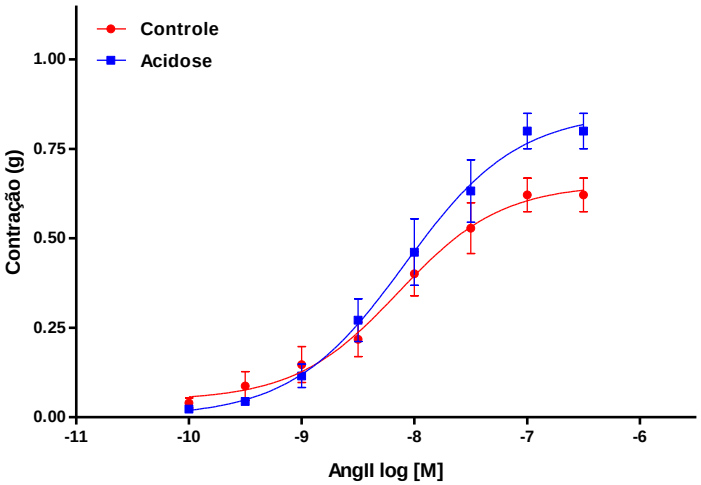
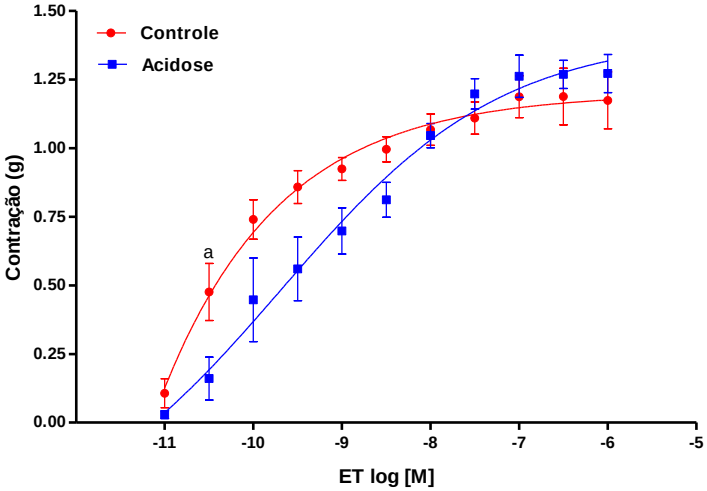


Figura 25: Curva dose-resposta para endotelina-1 em anéis de carótida de ratos controle e acidóticos, com endotélio. Os dados representam a média ± EPM (n = 10), a $p < 0,05$, (controle *versus* acidose). Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.



5.7. Determinação indireta de NO plasmático pela dosagem de Nitrito (NO_2^-) e Nitrato (NO_3^-)

A acidose metabólica crônica induzida nos animais provocou uma queda nos valores de nitrito (Controle: 0.6246 ± 0.0434; Acidose: 0.4685 ± 0.0374) e nitrato (Controle: 25.88 ± 1.07 ; Acidose: 21.69 ± 1.37) (Figura 26 e 27).

Figura 26: Níveis de nitrito plasmático em animais do grupo controle e grupo acidose. Os dados representam a média ±EPM (n = 10), ** p = 0,008 (controle *versus* acidose), Test t.

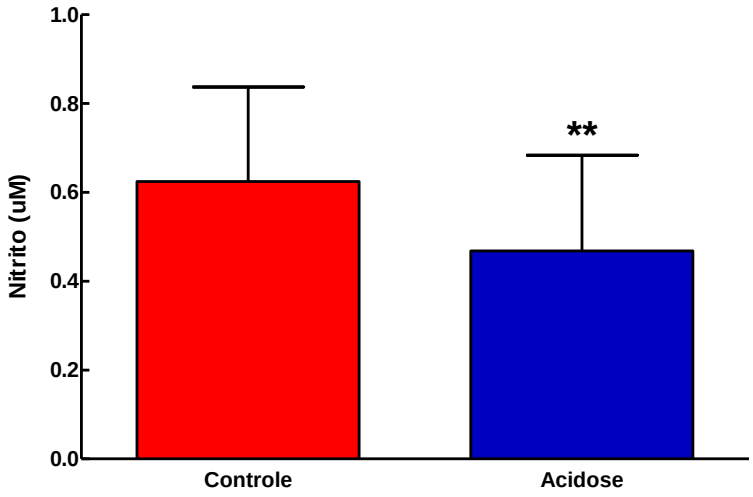
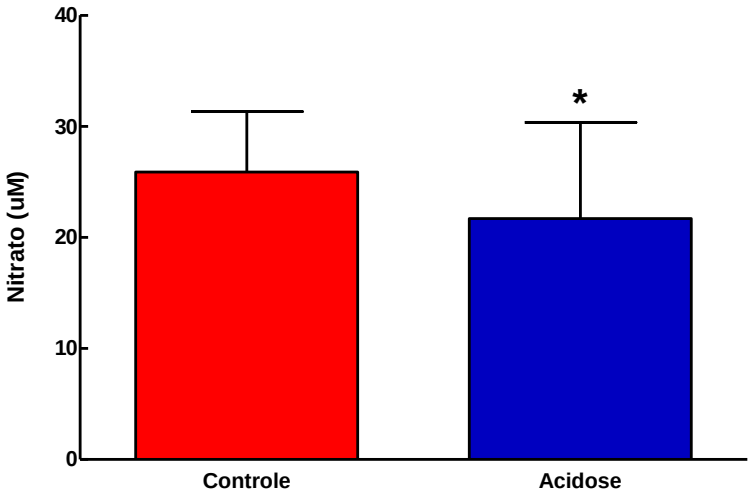


Figura 27: Níveis de nitrato plasmático em animais do grupo controle e grupo acidose. Os dados representam a média ±EPM (n = 10), * p = 0,01 (controle *versus* acidose), Test t.



5.8. Ecocardiograma

Os valores funcionais obtidos pela ecocardiografia mostraram uma redução significativa do débito cardíaco (DC) e do volume sistólico (VS) enquanto que a frequência cardíaca (FC) não apresentou diferença entre os grupos (Tabela 3) (Figura 28).

A fração de ejeção (FE) e a fração de encurtamento (FEN) também não apresentaram diferença estatística (Figura 29).

Os valores morfológicos obtidos, como espessura da parede anterior - diástole (EPAD), espessura da parede anterior - sístole (EPAS), espessura da parede posterior - diástole (EPPD), espessura da parede posterior - sístole (EPPS), diâmetro diastólico do ventrículo (DDV) e diâmetro sistólico do ventrículo (DSV) não apontam um aumento significativo (Figura 30).

Tabela 3 – Valores funcionais e morfológicos obtidos pela ecocardiografia no grupo controle e acidose. Os dados representam a média ±EPM (n = 8).

	Controle	**Acidose**
Frequência Cardíaca	379,9 ± 24,97	355,8 ± 29,59
Volume Sistólico	204,9 ± 24,79	129,6 ± 21,78 *
Débito Cardíaco	75,05 ± 6,52	46,02 ± 7,61 **
Fração de Ejeção	82,52 ± 2,56	82,37 ± 2,06
Fração de Encurtamento	25,34 ± 0,98	24,66 ± 1,26
Diâmetro Diastólico Ventrículo	4,65 ± 0,36	4,75 ± 0,36
Diâmetro Sistólico Ventrículo	1,83 ± 0,24	1,84 ± 0,19
Espessura da Parede Posterior – Diástole	2,59 ± 0,17	2,35 ± 0,14
Espessura da Parede Posterior – Sístole	3,81 ± 0,24	3,40 ± 0,15
Espessura da Parede Anterior – Diástole	2,30 ± 0,10	2,28 ± 0,08
Espessura da Parede Anterior – Sístole	4,33 ± 0,13	4,05 ± 0,14

* p = 0,0425; ** p = 0,0160 (Controle versus Acidose).

Figura 28: Valores funcionais obtidos pela ecocardiografia em ratos do grupo controle e acidose. (A) Frequência cardíaca (FC), (B) Volume sistólico (VS), (C) Débito cardíaco (DC). Os valores estão expressos em médias ± EPM (n = 8), * p = 0,04; ** p = 0,01 (controle *versus* acidose), Teste t.

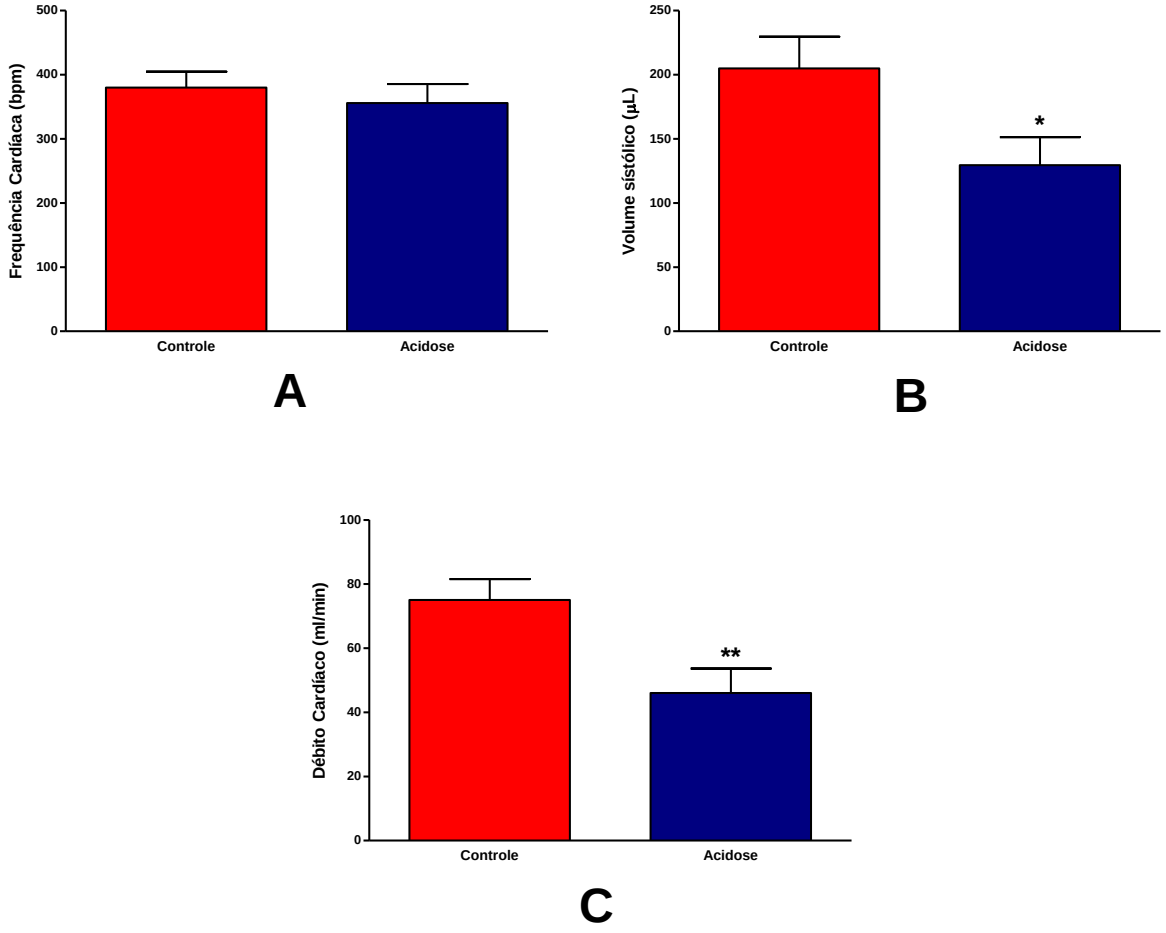


Figura 29: Valores funcionais obtidos pela ecocardiografia em ratos do grupo controle e acidose. (A) Fração de ejeção (FE), (B) Fração de encurtamento (FEN). Os valores estão expressos em médias ± EPM, (n = 8), Teste t.

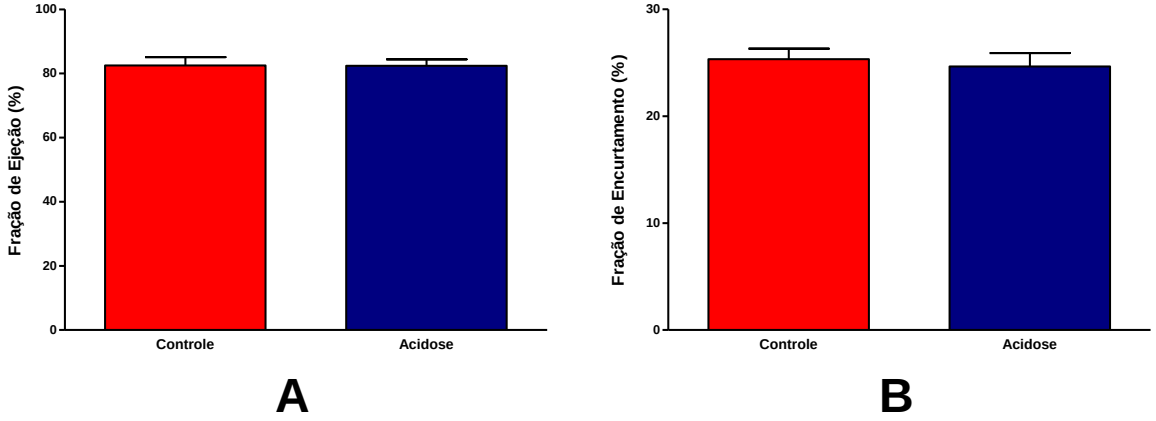
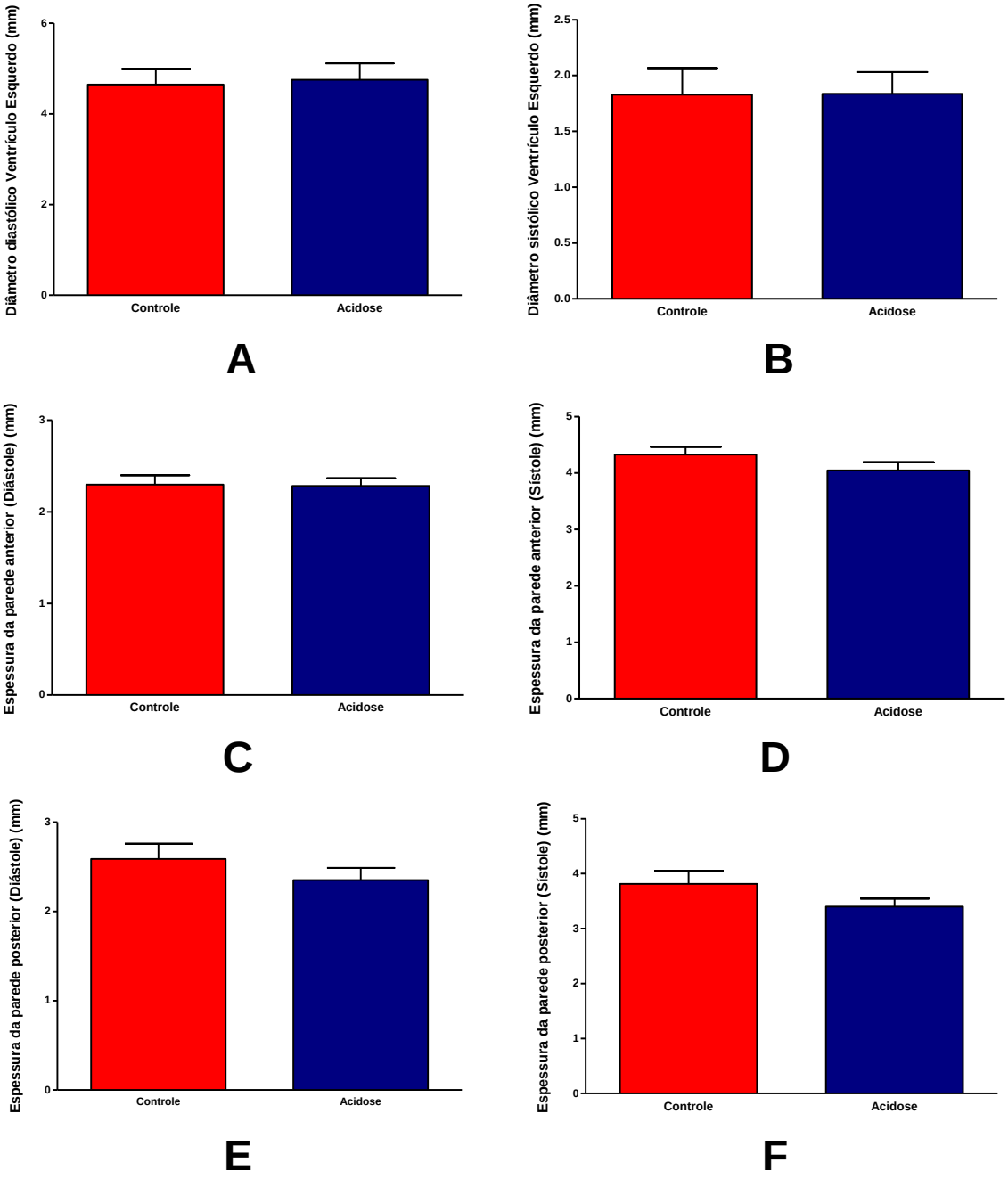


Figura 30: Valores morfológicos obtidos pela ecocardiografia em ratos do grupo controle e acidose. (A) Diâmetro diastólico ventrículo esquerdo (DDVE), (B) Diâmetro sistólico ventrículo esquerdo (DSVE), , (C) Espessura da parede anterior - diástole (EPAD), (D) Espessura da parede anterior - sístole (EPAS), (E) Espessura da parede posterior - diástole (EPPD), (F) Espessura da parede posterior - sístole (EPPS). Os valores estão expressos em médias ± EPM, (n = 8), Teste t.



Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Indução da acidose metabólica crônica

O protocolo padrão para indução da acidose metabólica em animais de experimentação envolvendo o cloreto de amônio teve início em 1921, quando Davies (1920) sugeriu que essa substância reduzia a reserva alcalina no sangue e em outros tecidos (56).

A forma mais frequentemente utilizada do cloreto de amônio é diluído na água, mas também pode ser adicionado na ração ou gelificado, ou por duas destas vias, água e ração ao mesmo tempo (5, 57-59).

A concentração da solução de cloreto de amônio e o tempo de tratamento utilizados para a indução da acidose metabólica crônica varia muito em relação ao objetivo proposto em cada experimento. Há referências citando o uso de solução padrão de 0,28M, 0,25M, 0,3M pura ou com sucralose, variando de 1,8% a 2,2%, 5%, durante 2, 3, 5, 6, 7,10 dias ou 2 semanas (5, 57-64). Neste estudo buscou-se avaliar os efeitos da acidose metabólica isolada, ou seja, não associada a qualquer doença ou condição. Assim, foram testadas duas metodologias de indução de acidose, as quais foram confirmadas ou não pela análise gasométrica do sangue arterial.

A metodologia utilizada aqui foi baseada em experimentos prévios do nosso laboratório e foi adaptada conforme a necessidade deste estudo (1).

Foram testadas soluções de cloreto de amônio com concentração de 1M (nenhum animal sobreviveu mais que 3 dias), 0,25M e 0,5M (nenhum animal ficou acidótico). Com esta última concentração, os animais ingeriram pouca solução, talvez pela baixa palatabilidade ou desconforto gastrointestinal (65), assim foi introduzida a glicose, que também não foi bem aceita. O problema da baixa aceitação pelos animais da solução de cloreto de amônio foi resolvida pela diluição em solução de 0,03% de suco artificial em pó. Logo, a introdução da gavagem com solução de cloreto de amônio 0,02M resolveu o problema da indução da acidose metabólica isolada, apresentando os parâmetros definidos inicialmente.

A quantidade de peso ganho, água e comida ingeridos durante o tratamento neste estudo condiz com o que foi obtido por Nowik et al. (2010), Carbajo et al. (2001) e Faroqui et al. (2006), onde os animais tratados ganharam menos peso,

comeram menos e ingeriram menos solução. Diferente do trabalho de Lasheen e Mohamed (2016) onde não foi observada nenhuma diferença no consumo de solução ou comida (5, 57, 58, 64).

A análise de gases sanguíneos pode ser feita em amostras venosas ou arteriais, mas padronizamos amostras arteriais (artéria aorta abdominal e artéria femoral) pois são melhor utilizadas quando se tenta avaliar distúrbios metabólicos, eletrolíticos e de ventilação (66, 67).

As amostras de sangue coletadas dos animais, tratados ou não, foram analisadas por gasometria imediatamente.

Os resultados imediatos dos testes mediram diretamente o pH, pressão parcial de oxigênio (pO_2) e dióxido de carbono (pCO_2), sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), glicose (Glu), lactato (Lac), hematócrito (Htc), e indiretamente o bicarbonato (HCO_3^-), dióxido de carbono total (TCO_2), excesso de base (BE), saturação de oxigênio (SO_2) e hemoglobina total (THbc).

Os valores de pH e HCO_3^- deste experimento concordam com os valores obtidos por Nowik et al. (2010), Lasheen e Mohamed (2016), Magalhães et al. (2016), Lucioni et al. (2002), Wang et al. (1998) e Celotto et al. (2016), enquanto que o valor de pCO_2 no grupo acidose obtido neste estudo se mostrou menor que do grupo controle, divergindo do trabalho de Nowik et al. (2010), onde o valor no grupo acidose era maior que do grupo controle, e de Wang et al. (1998) e Celotto et al. (2016), onde os valores de ambos os grupos não apresentaram diferença (1, 57, 59, 60, 62).

Em vista disso, podemos confirmar, baseado na literatura e nos resultados das análises apresentados a seguir, que o protocolo utilizado neste estudo foi efetivo para a indução da acidose metabólica crônica.

Nas análises de eletrólitos encontramos aumento de Na^+ e diminuição de K^+ no grupo acidose. Estas alterações poderiam estar relacionadas a um aumento na produção de aldosterona, corroborando com os dados de Lasheen e Mohamed (2016), que também encontrou um aumento significante da renina e aldosterona no plasma, e Nowik et al. (2010), que encontrou elevação da excreção de aldosterona na urina, o que levou a hipocalemia. Diferente de Afzal et al. (2013) que encontraram hipercalemia moderada a grave (57, 68).

Quando há acidose, segundo Aires (2008), nos rins há inibição da Na^+/K^+-ATPase, com consequente inibição da secreção de K^+ para a luz tubular, e a

redução da permeabilidade dos canais luminais de K^+ das células principais. Outra hipótese, é que os animais tenham apresentado desidratação, o que ativaria o sistema renina-angiotensina-aldosterona, que estimula a síntese de angiotensina II e a secreção de aldosterona (69).

A análise gasométrica também apresentou baixa disponibilidade de lactato, que pode ser justificado pela acidose que reduz a ação de algumas enzimas relacionadas ao metabolismo anaeróbio, diminuindo a taxa glicolítica e glicogenolítica e está associada a um maior consumo desse íon pelo fígado e outros tecidos ao invés de uma redução na sua produção. Considerando que na presença de anóxia este é um metabólito anaeróbico, a diminuição do lactato também pode ter ligação com o aumento da pO_2, ainda que sem alteração na SO_2 (65, 70, 71).

Os níveis de glicose se mostraram baixos, o que poderia estar relacionado com a diminuição da ingesta alimentar dos animais do grupo acidose, ou também, ter relação com o baixo nível de potássio, que pode ter sido deslocado para o meio intracelular pela insulina que também absorveu a glicose (72-75).

6.2. Gasometria diária

Com a finalidade de acompanhar a evolução da acidose metabólica nos animais durante os 10 dias de tratamento, foi feita uma cirurgia para a colocação de uma cânula na artéria femoral esquerda para a coleta de amostra sanguínea diariamente.

A canulação arterial e venosa, incluindo a veia jugular, aorta abdominal, artéria carótida, artéria e veia femoral, tem sido muito utilizada para monitorizar de forma aguda e crônica a pressão arterial, colher amostras de sangue e administrar substâncias durante um tempo prolongado no modelo experimental de ratos (76).

As artérias femorais são de fácil acesso e o fluxo sanguíneo prejudicado não afeta os principais órgãos, como o cérebro ou o abdômen, mas um dos principais benefícios deste modelo é que todo os procedimentos podem ser realizados com o mínimo de estresse para o animal.

Há muitos métodos da canulação descritos na literatura relatando a capacidade de atingir um período prolongado de repetidas amostragens de sangue sem causar coágulos e / ou embolia. Alguns trabalhos que mantiveram a coleta de sangue por longo tempo (mais de uma semana) utilizaram equipamentos inseridos

individualmente nos animais para facilitar a coleta e perfusão de solução anticoagulante durante todo o tempo de monitorização. Neste trabalho devido a limitação de material e técnica cirúrgica disponível, contamos com o auxílio de pessoal técnico especializado do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para ensinar o método. Assim, mesmo fazendo uma coleta diária de amostra de sangue e logo em seguida lavando com solução heparinizada, não foi possível manter a patência das cânulas em todos os animais durante o período de tratamento de 10 dias (76-85).

A gasometria diária realizada com as amostras sanguíneas de quatro animais mostrou a evolução da indução da acidose metabólica. Diferente do que foi encontrado por Lucioni et al. (2002), que não observou alteração no valor do pH mas sim no HCO_3^- nos dois primeiros dias de tratamento e uma diferença significativa somente no sexto dia, neste estudo observou-se uma queda acentuada do pH até o terceiro dia e uma tentativa de retorno ao pH inicial entre o sexto e sétimo dia, com uma nova queda nos valores em seguida. Faroqui et al. (2006) também encontrou resultado semelhante ao nosso com uma queda dos valores de HCO_3^- nas primeiras 24 horas de indução da acidose (62, 64).

Essa variação se deve a degradação de NH_4Cl que aumenta a $[H^+]$ no sangue. Assim, o H^+ reage com as bases tampão do líquido corporal, incluindo o HCO_3^-, a fim de atenuar a acidose metabólica. A diminuição da $[HCO_3^-]$ e do pH, altera o comportamento de alguns parâmetros respiratórios promovendo um aumento na ventilação e frequência respiratória, eliminando o CO_2 formado e após esse ajuste ventilatório a pCO_2 diminui. Desta maneira, na indução da acidose ocorrem mudanças dinâmicas na liberação da carga ácida que provavelmente representam mudanças no início do tratamento ou representam mudanças compensatórias, que podem variar de animal para animal (65, 69, 86).

6.3. Avaliação dos parâmetros ventilatórios

Há inúmeros testes funcionais desenvolvidos e utilizados para avaliação qualitativa e quantitativa da função pulmonar, e indicam somente o quanto e como uma doença alterou essa função, podendo, assim, contribuir, mas não fazer o diagnóstico patológico e/ou etiológico. Também não revelam alterações em todos os

tipos de doenças pulmonares, somente naquelas cujas lesões estruturais atingem magnitude suficiente para serem detectadas (87, 88).

Um método mais facilmente utilizado em pequenos animais de experimentação é a pletismografia de corpo inteiro em um sistema fechado, que oferece uma maneira precisa, não-invasiva, quantitativa e evita o uso de anestesia e apoios. A pletismografia foi utilizada neste estudo para quantificar a frequência respiratória (respirações/min), volume corrente (mL/Kg) e ventilação (mL/Kg. min) (89-92) .

Neste trabalho a indução da acidose metabólica durante dez dias promoveu um aumento significativo da ventilação e do volume corrente no início do tratamento e os valores diminuíram significativamente até o decimo dia. Entretanto, não foi observada alteração na frequência respiratória. Estes achados corroboram com o trabalho de Van de Ven et al. (2001), que depois do tratamento de indivíduos com duas doses de 26.75 mg/kg de NH_4Cl administrado oralmente, mostrou frequência respiratória inalterada com um aumento significativo de volume corrente e ventilação (93).

A ventilação é regulada pelos níveis de pCO_2, pO_2 e pH do sangue arterial. Mudanças nesses parâmetros são detectadas pelos quimiorreceptores periféricos e centrais, e a informação é conduzida ao centro de controle respiratório no tronco encefálico. Os quimiorreceptores periféricos são sensíveis às variações da pO_2, pCO_2 e pH arterial e os quimiorreceptores centrais são mais sensíveis a alterações na pCO_2 arterial e pH do líquido cefalorraquidiano. Ambos são importantes para a manutenção do equilíbrio ácido-base por regulação da ventilação pulmonar (69, 70, 94).

Um distúrbio ácido-base, como a acidose metabólica, resulta em sinais (principalmente alterações em $[H^+]$) que são detectados, preferencialmente, pelos quimiorreceptores periféricos. Estes fornecem informações para o centro de controle respiratório, provocando o aumento da ventilação como um meio para restaurar o pH normal do sangue (70, 92).

Assim, como a aclimatação à altitude, onde ocorrem respostas adaptativas aos quimiorreceptores periféricos que minimizam a sensibilidade à pO_2, mas fornecem uma entrada adequada ao centro de controle respiratório para manter um equilíbrio ácido-base quase normal, podemos inferir, que a diminuição da ventilação e volume corrente encontrada neste estudo depois do terceiro dia de tratamento

pode ser devido a alterações nos quimiorreceptores centrais e periféricos pela exposição a longo prazo (dias) a [H^+] elevada e pCO_2 reduzida (69, 70).

6.4. Avaliação ureia e creatinina

Os rins desempenham um papel central na manutenção e defesa contra distúrbios sistêmicos do pH. Em resposta a uma agressão ácida, os rins sofrem várias mudanças adaptativas em sua função e aumenta apropriadamente a excreção de ácido na urina, levando à correção da acidose metabólica (63, 64, 95).

Para avaliar a função renal e confirmar a indução da acidose metabólica sem a influência de lesão nos rins associada, optou-se por determinar a concentração plasmática e urinária de ureia e creatinina, uma vez que a verificação de possíveis danos renais expressa alteração nestes valores.

A análise destes parâmetros é muito utilizada na literatura para indicar insuficiência renal, uma das doenças que tem como consequência a acidose metabólica.

Não há padronização dos valores de referência para ureia e creatinina plasmática e urinária na literatura, confirmando que há variações intraespécies, decorrentes de diferenças geográficas e de manuseio. Neste estudo o valor encontrado no grupo controle para creatinina plasmática concorda com os trabalhos de Castro et al. (2014), Dantas et al. (2006), Magalhães et al. (2016), enquanto que a creatinina urinária encontrada foi menor que do trabalho de Castro et al. (2014), e Dantas et al. (2006), e maior que Nowik et al. (2010). Quanto à ureia plasmática o valor para o grupo controle deste estudo diverge do encontrado por Dantas et al. (2006), e Magalhães et al. (2016), que apresentaram valores menores (57, 60, 96, 97).

O trabalho com acidose metabólica de Nowik et al. (2010), que utilizou 0,28M de NH_4Cl com 0,5% de sucralose na água dos animais, apresentou um valor de creatinina urinária próximo ao achado aqui, e Magalhães et al. (2016) mostrou um valor de creatinina plasmática acima do nosso resultado com animais acidóticos, que não mostraram diferença estatística quando comparados com o grupo controle (57, 60).

Diferente de Celotto et al. (2016) que encontrou um aumento da concentração de ureia e creatinina plasmática induzindo a acidose com solução de 1% de NH_4Cl com 0,5% de glicose (1).

Na análise histológica do rim esquerdo dos animais utilizados no estudo, não foram observadas diferenças significativas, enquanto que Magalhães et al. (2016) (indução de AMC com 0,28M NH_4Cl na água por 5 dias) também fez coloração de hematoxilina e eosina e mostrou apenas alterações leves nos túbulos. Já no trabalho de Tammaro et al. (2018) (indução de AMC com 0,3M NH_4Cl na água por 21 dias) com camundongos, foi feita coloração de tricrômio de Masson e encontraram um dano progressivo do parênquima renal (60, 98).

Desta forma, dependendo da metodologia de indução da acidose, como variação da concentração de NH_4Cl, tempo de tratamento ou espécie animal, é possível encontrar ou não lesão renal.

6.5. Reatividade vascular

Desde que Gaskell estudou a tonicidade dos vasos sangüíneos em solução ácida, e foi reconhecido que o pH do sangue, entre outros fatores, como hipóxia e pCO_2, é um importante determinante do tônus vascular, o efeito vasodilatador da acidose vem sendo pesquisado em diferentes tipos de leitos vasculares (99).

A literatura mostra que a acidose promove alteração na responsividade vascular a diferentes agonistas (12, 38, 100-104). Entretanto esses resultados são obtidos em modelos de acidose in vitro. Nesses casos, a maioria dos estudos indica diminuição da contração ou potencialização do relaxamento mediado por NO e canal de potássio (102).

Estudos realizados por Celotto et al. (2016) em coelhos empregando modelo de acidose aguda e crônica, observou que apenas a acidose aguda promoveu aumento no efeito hipotensor da ACh in vivo, entretanto, quando as artérias (aorta e carótida) de animais acidóticos foram colocadas em banho de órgãos, não foram observadas alterações na reatividade para ACh e PE. Corroborando com os resultados encontrado por Magalhães et al. (2016), que também não encontrou alterações na reatividade para ACh em artéria renal de ratos acidóticos (1, 60).

No presente estudo, observou-se que apenas o relaxamento para o cálcio ionóforo (A23187) foi potencializado pela acidose. Tal efeito foi observado na presença de endotélio e bloqueado pelo L-Name, sugerindo a participação do NO.

O mecanismo pelo qual o cálcio ionóforo promove relaxamento envolve o aumento no influxo de cálcio na célula endotelial, ativando a via cálcio-calmodulina, induzindo a produção de NO que se difunde para o músculo promovendo o relaxamento. A literatura mostra que o aumento da concentração de H^+ extracelular pode alterar o funcionamento de bombas e trocadores presentes na membrana celular, como por exemplo Na^+/K^+-ATPase, trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), canal de Ca^{2+} tipo L (LCC), trocador Na^+/H^+ (NHE), canal de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SR) (receptor de rianodina, RyR) e SR Ca+-ATPase (SERCA). (38, 105, 106).

Poderíamos considerar que a acidose pode alterar o funcionamento do trocado NHE, o que altera a concentração de sódio, levando a inversão do NCX e aumento do Ca^{2+} intracelular no endotélio. Esse acúmulo de Ca^{2+} induzido pela acidose poderia, somado ao Ca^{2+} mobilizado pelo cálcio ionóforo, aumentar a atividade da NOS e produção de NO vascular. (2, 37, 105).

A ausência de alteração para a Ach e os demais vasoconstritores sugere que não há disfunção endotelial, nem alteração na expressão e/ou função de receptores AT-1, α-adrenérgico e ET-A. Biais et al. (2012) mostra que apenas a sinalização ligada aos receptores beta-adrenérgicas está alterada, efeito que não foi observada para a sinalização envolvendo receptores alfa-adrenérgicos (8).

Embora possa ser observado um aumento do NO arterial induzido pelo cálcio ionóforo, não observamos um aumento do NO plasmático, como seria esperado para acidose. Ao contrário, foi observada diminuição do nitrito e nitrato plasmático, que não implicou em prejuízo no relaxamento vascular. Celotto et al. (2016), observou em modelo de acidose, em coelhos, que apenas a acidose aguda promoveu um aumento de NO plasmático, efeito este não observado no modelo crônico (1).

Alguns fatores poderiam justificar a diminuição do NO na acidose. Um deles é que inicialmente o meio ácido permite maior estabilidade do NO e portanto mais tempo de ação. Seus produtos também tendem a ser convertidos novamente em NO. Isso poderia implicar em diminuição da produção de NO, uma vez que este

permanece disponível por mais tempo, sendo menos NO suficiente para exercer seu papel (107).

Outro fator é que a acidose e o estresse oxidativo se intensificam mutuamente. A acidose pode levar ao estresse oxidativo também diminuindo os níveis intracelulares de um dos antioxidantes mais importantes, a glutationa, uma diminuição alcançada através de múltiplos mecanismos relacionados ao pH. A acidose também pode reduzir a atividade das enzimas antioxidantes. Assim, poderia estar ocorrendo um maior consumo de NO por espécies reativas (108, 109).

6.6. Ecocardiograma

A acidose metabólica afeta diretamente a função cardíaca e esta pode estar comprometida mesmo em indivíduos sem doença cardíaca ou pulmonar intrínseca devido aos distúrbios ácido-base.

Depois do tratamento para indução da acidose metabólica os animais apresentaram valores funcionais obtidos pela ecocardiografia em que havia uma redução significativa do débito cardíaco (DC) e do volume sistólico (VS) enquanto que não houve alteração da frequência cardíaca (FC). Essa diminuição do DC relacionada a diminuição do VS poderia ser justificado por redução de volemia ou por alteração na contratilidade cardíaca.

Uma vez que a ingesta hídrica pelos animais do grupo acidose diminuiu durante o tratamento, poderia implicar na diminuição da volemia, diminuição do retorno venoso levando a diminuição do DC. Em uma situação como esta seria esperada um aumento da FC compensatória, que não ocorreu. Lasheen e Mohamed (2016), induziram acidose metabólica usando NH_4Cl em ratos, e verificaram diminuição de FC, uma vez que acidose parece ter efeito cronotrópico negativo, afetando o potencial de ação no nó sinoatrial e assim causando bradicardia. Entretanto a ausência de modificação da FC no presente estudo poderia ser justificado pela ação da acidose sobre os receptores B-adrenérgicos. Biais et al. (2012) relataram que a acidose poderia prejudicar o efeito cronotrópicopositivo da estimulação β-adrenérgica, por alterações na transmissão de sinal na via que envolve desde o receptor β-adrenérgico até a adenilato ciclase (5, 8).

O efeito inotrópico negativo proporcionado pela acidose também poderia explicar a diminuição do DC. A acidose pode diminuir a sensibilidade da troponina

pelo cálcio, causando uma diminuição da contratilidade cardíaca. Estudos de Lasheen e Mohamed (2016) mostram que a acidose metabólica promove um quadro peculiar no miócito, caracterizado pela diminuição da contratilidade com aumento da concentração intracelular de cálcio. O aumento da concentração de cálcio citosólico ocorre por não ligação deste à troponina e pelo retardo na recaptação do cálcio para o retículo sarcoplasmático. A acidose altera a recaptação de cálcio no retículo sarcoplasmático na célula cardíaca. Durante a diástole o cálcio é sequestrado para retículo sarcoplasmático, e, posteriormente, liberado para o citoplasma para iniciar uma nova contração A acidose causa uma redução na quantidade de cálcio disponível a cada ciclo, diminuindo assim a quantidade de Ca que está potencialmente disponível para ligação à troponina (5, 14, 35).

O efeito inotrópico causado pela diminuição do pH, também ocorre devido a inibição do transportador da Na^+/K^+-ATPase que diminui o potencial de ação dos cardiomiócitos, resultando em redução da força das contrações musculares (14, 33, 37, 69).

Podemos considerar ainda a possibilidade da ocorrência de fibrose no tecido cardíaco, como um fator para redução do DC, uma vez que o aumento da aldosterona no miócito por promover esse efeito. Embora não tenhamos realizado dosagens de aldosterona, observamos aumento nos níveis de sódio e potássio. Para entender melhor a participação da aldosterona na alteração da função cardíaca, associado as dosagens bioquímicas também seria importante a análise histológica do músculo cardíaco (110).

Conclusão

7. CONCLUSÃO

A acidose metabólica crônica induzida por cloreto de amônia (NH_4Cl) provocou efeitos prejudiciais na função cardíaca reduzindo o débito cardíaco e volume sistólico, sem alterar a frequência cardíaca. Na reatividade vascular de carótidas de ratos potencializou o relaxamento induzido pelo ionóforo de cálcio de maneira dependente do óxido nítrico e não foram observadas alterações para os demais agonistas testados. Também reduziu os níveis de nitrito e nitrato plasmático. Na avaliação dos parâmetros respiratórios, causou aumentou da ventilação e do volume corrente, sem provocar alterações na frequência respiratória. Contudo, não foram observadas alterações na ureia e creatinina e morfologia dos rins.

Distúrbios no equilíbrio ácido-base são problemas comumente encontrados na medicina clínica e decisões sobre seu tratamento são de grande importância em pacientes com problemas pulmonares, nos quais os distúrbios ácido-base podem ser especialmente críticos. Da mesma forma, a função cardiopulmonar pode estar significativamente comprometida, mesmo em pacientes sem doença cardíaca ou pulmonar intrínseca, diante de distúrbios ácido-base. É essencial, portanto, compreender as consequências fisiopatológicas desses distúrbios no sistema cardiovascular e pulmonar.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Celotto AC, Ferreira LG, Capellini VK, Albuquerque AA, Rodrigues AJ, Evora PR. Acute but not chronic metabolic acidosis potentiates the acetylcholine-induced reduction in blood pressure: an endothelium-dependent effect. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 2016;49(2):e5007.
2. Celotto AC, Capellini VK, Baldo CF, Dalio MB, Rodrigues AJ, Evora PR. Effects of acid-base imbalance on vascular reactivity. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 2008;41(6):439-45.
3. Koeppen BM. Renal regulation of acid-base balance. Advances in Physiology Education. 1998;20(1):9.
4. Bastos MG, Bregman R, Kirsztajn GM. [Chronic kidney diseases: common and harmful, but also preventable and treatable]. Revista da Associacao Medica Brasileira. 2010;56(2):248-53.
5. Lasheen NN, Mohamed GF. Possible mechanisms of cardiac contractile dysfunction and electrical changes in ammonium chloride induced chronic metabolic acidosis in Wistar rats. Physiological research. 2016;65(6):927-40.
6. Weiner ID, Hamm LL. Molecular mechanisms of renal ammonia transport. Annual review of physiology. 2007;69:317-40.
7. Crampin EJ, Smith NP, Langham AE, Clayton RH, Orchard CH. Acidosis in models of cardiac ventricular myocytes. Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences. 2006;364(1842):1171-86.
8. Biais M, Jouffroy R, Carillion A, Feldman S, Jobart-Malfait A, Riou B, et al. Interaction of metabolic and respiratory acidosis with alpha and beta-adrenoceptor stimulation in rat myocardium. Anesthesiology. 2012;117(6):1212-22.
9. Ishizaka H, Kuo L. Acidosis-induced coronary arteriolar dilation is mediated by ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle. Circulation research. 1996;78(1):50-7.
10. Smith GL, Austin C, Crichton C, Wray S. A review of the actions and control of intracellular pH in vascular smooth muscle. Cardiovascular research. 1998;38(2):316-31.
11. Mizuno S, Demura Y, Ameshima S, Okamura S, Miyamori I, Ishizaki T. Alkalosis stimulates endothelial nitric oxide synthase in cultured human pulmonary arterial endothelial cells. American journal of physiology. 2002;283(1):L113-9.
12. Hattori K, Tsuchida S, Tsukahara H, Mayumi M, Tanaka T, Zhang L, et al. Augmentation of NO-mediated vasodilation in metabolic acidosis. Life sciences. 2002;71(12):1439-47.
13. Allen DG, Orchard CH. The effects of changes of pH on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. The Journal of physiology. 1983;335:555-67.
14. Mitchell JH, Wildenthal K, Johnson RL, Jr. The effects of acid-base disturbances on cardiovascular and pulmonary function. Kidney international. 1972;1(5):375-89.
15. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Fisiologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. 1082 p.
16. Curi R, Procopio J. Fisiologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. 857 p.
17. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 10º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
18. Souza MHL, Elias DO. Alterações do Equilíbrio Ácido-Base. Fundamentos da Circulação Extracorpórea. 2º ed. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio; 2006.
19. Piva JP, Garcia PCR, Martha VF. Distúrbios do equilíbrio ácido-básico. Jornal de Pediatria (Rio J). 1999;75(Supl. 2):9.
20. Douglas CR. Tratado de Fisiologia Aplicada às Ciências da Saúde. 4 ed. São Paulo: Robe; 1999. 1338 p.
21. Davies A, Blakeley AGH, Kidd C. Fisiologia Humana. Porto Alegre: Artmed; 2002. 980 p.
22. Evora PRB, Garcia LV. Equilíbrio Ácido-Base. Medicina. 2008;41(3):301-11.

23. Évora PRB, Reis CLd, Ferez MA, Conte DA, Garcia LV. Distúrbios do Equilíbrio Hidroeletrolítico e do Equilíbrio Acidobásico - Uma Revisão Prática. Medicina. 1999;32:451-69.
24. Furoni RM, Neto SMP, Giorgi RB, Guerra EMM. Distúrbios do Equilíbrio Ácido-Básico. Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba. 2010;12(1):5-12.
25. Koeppen BM. Renal regulation of acid-base balance. Advances in Physiology Education. 1998;20(1):132-41.
26. Bastos MG, Carmo WB, Abrita RR, Almeida EC, Mafra D, Costa DMN, et al. Doença Renal Crônica: Problemas e Soluções. Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia. 2004;XXVI(4):202-15.
27. Bastos MG, Bregman R, Kirsztajn GM. [Chronic kidney diseases: common and harmful, but also preventable and treatable]. Rev Assoc Med Bras. 2010;56(2):248-53.
28. Messa P, Mioni G, Maio GD, Ferrando C, Lamperi D, Famularo A, et al. Derangement of acid-base balance in uremia and under hemodialysis. Journal of nephrology. 2001;14 Suppl 4:S12-21.
29. Leal VO, Leite Júnior M, Mafra D. Acidose metabólica na doença renal crônica: abordagem nutricional. Rev Nutr. 2008;21(1):93-103.
30. Wiseman AC, Linas S. Disorders of potassium and acid-base balance. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2005;45(5):941-9.
31. Rocha PN. Uso de bicarbonato de sódio na acidose metabólica do paciente gravemente enfermo. Jornal Brasileiro de Nefrologia. 2009;31(4):297-306.
32. Monteiro CETB. Acidic environment evoked by chronic stress: A novel mechanism to explain atherogenesis. Infarct Combat Project. 2008.
33. Rezende LR, Souza PB, Pereira GRM, Lugon JR. Metabolic acidosis in hemodialysis patients: a review. Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia. 2017;39(3):305-11.
34. Pedersen TH, Gurung IS, Grace A, Huang CL. Calmodulin kinase II initiates arrhythmogenicity during metabolic acidification in murine hearts. Acta physiologica. 2009;197(1):13-25.
35. Kapur S, Wasserstrom JA, Kelly JE, Kadish AH, Aistrup GL. Acidosis and ischemia increase cellular Ca2+ transient alternans and repolarization alternans susceptibility in the intact rat heart. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2009;296(5):H1491-512.
36. Zhou HZ, Malhotra D, Shapiro JI. Contractile dysfunction during metabolic acidosis: role of impaired energy metabolism. The American journal of physiology. 1991;261(5 Pt 2):H1481-6.
37. Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. The American journal of physiology. 1990;258(6 Pt 1):C967-81.
38. Loutzenhiser R, Matsumoto Y, Okawa W, Epstein M. H(+)-induced vasodilation of rat aorta is mediated by alterations in intracellular calcium sequestration. Circulation research. 1990;67(2):426-39.
39. Alves RP. Repercussões cardíacas da disfunção renal em pequenos animais. Brasília: Universidade de Brasília; 2013.
40. Andrade OVB, Ihara FO, Troster EJ. Metabolic acidosis in childhood: why, when and how to treat. Jornal de Pediatria. 2007;83(2 Suppl):S11-21.
41. Gaskell WH. On the Tonicity of the Heart and Blood Vessels. J Physiology. 1880;3(1):48-92.
42. Austin C, Wray S. Extracellular pH signals affect rat vascular tone by rapid transduction into intracellular pH changes. The Journal of physiology. 1993;466:1-8.
43. Campbell, Houle DB, Crisp NW, Jr., Weil MH, Brown EB, Jr. Depressed response to intravenous sympathicomimetic agents in humans during acidosis. Diseases of the chest. 1958;33(1):18-22.
44. Dusting GJ, Rand MJ. Interactions between the hydrogen ion concentration and vasoconstrictor responses to catecholamines and sympathetic nerve stimulation. Clinical and experimental pharmacology & physiology. 1975;Suppl 2:43-8.
45. Aalkjaer C. Regulation of intracellular pH and its role in vascular smooth muscle function. Journal of hypertension. 1990;8(3):197-206.

46. Tobian L, Martin S, Eilers W. Effect of pH on norepinephrine-induced contractions of isolated arterial smooth muscle. The American journal of physiology. 1959;196(5):998-1002.
47. Rooke TW, Sparks HV, Jr. Effect of metabolic versus respiratory acid-base changes on isolated coronary artery and saphenous vein. Experientia. 1981;37(9):982-3.
48. Harder DR. Effect of H+ and elevated PCO2 on membrane electrical properties of rat cerebral arteries. Pflugers Arch. 1982;394(2):182-5.
49. Bonnet P, Rusch NJ, Harder DR. Characterization of an outward K+ current in freshly dispersed cerebral arterial muscle cells. Pflugers Arch. 1991;418(3):292-6.
50. Fabiato A, Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiace and skeletal muscles. The Journal of physiology. 1978;276:233-55.
51. Flavahan NA, McGrath JC. alpha 1-adrenoceptors can mediate chronotropic responses in the rat heart. British journal of pharmacology. 1981;73(3):586-8.
52. Stokke DB, Andersen PK, Brinklov MM, Nedergaard OA, Hole P, Rasmussen NJ. Acid-base interactions with noradrenaline-induced contractile response of the rabbit isolated aorta. Anesthesiology. 1984;60(5):400-4.
53. Mitchell RA, Carman CT, Severinghaus JW, Richardson BW, Singer MM, Shnider S. Stability of cerebrospinal fluid pH in chronic acid-base disturbances in blood. Journal of applied physiology. 1965;20(3):443-52.
54. Fencl V, Miller TB, Pappenheimer JR. Studies on the respiratory response to disturbances of acid-base balance, with deductions concerning the ionic composition of cerebral interstitial fluid. The American journal of physiology. 1966;210(3):459-72.
55. Bartlett D, Jr., Tenney SM. Control of breathing in experimental anemia. Respiration physiology. 1970;10(3):384-95.
56. Davies HW, Haldane JB, Kennaway EL. Experiments on the regulation of the blood's alkalinity: I. The Journal of physiology. 1920;54(1-2):32-45.
57. Nowik M, Kampik NB, Mihailova M, Eladari D, Wagner CA. Induction of metabolic acidosis with ammonium chloride (NH4Cl) in mice and rats--species differences and technical considerations. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2010;26(6):1059-72.
58. Carbajo E, Lopez JM, Santos F, Ordonez FA, Nino P, Rodriguez J. Histologic and dynamic changes induced by chronic metabolic acidosis in the rat growth plate. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2001;12(6):1228-34.
59. Wang T, Egbert AL, Jr., Aronson PS, Giebisch G. Effect of metabolic acidosis on NaCl transport in the proximal tubule. The American journal of physiology. 1998;274(6 Pt 2):F1015-9.
60. Magalhaes PA, de Brito TS, Freire RS, da Silva MT, dos Santos AA, Vale ML, et al. Metabolic acidosis aggravates experimental acute kidney injury. Life sciences. 2016;146:58-65.
61. Nagami GT. Ammonia production and secretion by S3 proximal tubule segments from acidotic mice: role of ANG II. American journal of physiology Renal physiology. 2004;287(4):F707-12.
62. Lucioni A, Womack C, Musch MW, Rocha FL, Bookstein C, Chang EB. Metabolic acidosis in rats increases intestinal NHE2 and NHE3 expression and function. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2002;283(1):G51-6.
63. Bento LM, Carvalheira JB, Menegon LF, Saad MJ, Gontijo JA. Effects of NH4Cl intake on renal growth in rats: role of MAPK signalling pathway. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2005;20(12):2654-60.
64. Faroqui S, Sheriff S, Amlal H. Metabolic acidosis has dual effects on sodium handling by rat kidney. American journal of physiology Renal physiology. 2006;291(2):F322-31.
65. Correia-Oliveira CR, Kiss MAPD. Induced metabolic acidosis by ammonium chloride: action Mechanisms, dose and effects on athletic performance. Journal of Physical Education. 2017;28:10.
66. Gonzalez AL, Waddell LS. Blood Gas Analyzers. Topics in companion animal medicine. 2016;31(1):27-34.

67. Rieser TM. Arterial and venous blood gas analyses. Topics in companion animal medicine. 2013;28(3):86-90.
68. Afzal B, Mehmood A, Shahbaz S, Kabir S, Zai TK. Predictors of Outcome in Patients Presenting with Moderate to Severe Hyperkalemia. Emergency Medicine. 2013;4(1):3.
69. Aires MdM. Fisiologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 1232 p.
70. Lindinger MI, Heigenhauser GJ. Effects of gas exchange on acid-base balance. Comprehensive Physiology. 2012;2(3):2203-54.
71. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. The Journal of physiology. 2004;558(Pt 1):5-30.
72. Barone B, Rodacki M, Cenci MCP, Zajdenverg L, Milech A, Oliveira JEP. Cetoacidose Diabética em Adultos – Atualização de uma Complicação Antiga. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2007;51(9):1434-47.
73. Trefz FM, Constable PD, Lorenz I. Effect of Intravenous Small-Volume Hypertonic Sodium Bicarbonate, Sodium Chloride, and Glucose Solutions in Decreasing Plasma Potassium Concentration in Hyperkalemic Neonatal Calves with Diarrhea. Journal of veterinary internal medicine. 2017;31(3):907-21.
74. Davis SM, Maddux AB, Alonso GT, Okada CR, Mourani PM, Maahs DM. Profound hypokalemia associated with severe diabetic ketoacidosis. Pediatric diabetes. 2016;17(1):61-5.
75. Carlotti AP, St George-Hyslop C, Bohn D, Halperin ML. Hypokalemia during treatment of diabetic ketoacidosis: clinical evidence for an aldosterone-like action of insulin. The Journal of pediatrics. 2013;163(1):207-12 e1.
76. Jespersen B, Knupp L, Northcott CA. Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements. Journal of visualized experiments : JoVE. 2012(59).
77. Sijbesma JW, Zhou X, Vallez Garcia D, Houwertjes MC, Doorduin J, Kwizera C, et al. Novel Approach to Repeated Arterial Blood Sampling in Small Animal PET: Application in a Test-Retest Study with the Adenosine A1 Receptor Ligand [(11)C]MPDX. Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging. 2016;18(5):715-23.
78. Deshmukh SV, Durston J, Shomer NH. Validation of the use of nonnaive surgically catheterized rats for pharmacokinetics studies. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS. 2008;47(6):41-5.
79. Huang CC, Wu CH, Huang YY, Tzen KY, Chen SF, Tsai ML, et al. Performing Repeated Quantitative Small-Animal PET with an Arterial Input Function Is Routinely Feasible in Rats. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. 2017;58(4):611-6.
80. Feng J, Fitz Y, Li Y, Fernandez M, Cortes Puch I, Wang D, et al. Catheterization of the carotid artery and jugular vein to perform hemodynamic measures, infusions and blood sampling in a conscious rat model. Journal of visualized experiments : JoVE. 2015(95).
81. Peternel L, Skrajnar S, Cerne M. A comparative study of four permanent cannulation procedures in rats. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2010;61(1):20-6.
82. Hall RI, Ross LH, Bozovic M, Grant JP. A simple method of obtaining repeated venous blood samples from the conscious rat. The Journal of surgical research. 1984;36(1):92-5.
83. Jeger V, Arrigo M, Hildenbrand FF, Muller D, Jirkof P, Hauffe T, et al. Improving animal welfare using continuous nalbuphine infusion in a long-term rat model of sepsis. Intensive care medicine experimental. 2017;5(1):23.
84. Allavena RE, West H, Gale J, Debrue M. Pathological and Clinical Analysis of Vascular Catheterization Models in Rats, with Exploration of Interventions to Improve Clinical Tolerance. Toxicologic pathology. 2016;44(8):1095-104.
85. Blouin A, Molez S, Pham D, Ayach B, Dussault P, Escher E, et al. A novel procedure for daily measurements of hemodynamical, hematological, and biochemical parameters in conscious unrestrained rats. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2000;44(3):489-505.
86. Kim EY, Choi JS, Lee KE, Kim CS, Bae EH, Ma SK, et al. Altered regulation of renal Acid base transporters in response to ammonium chloride loading in rats. The Korean journal of physiology &

pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology. 2012;16(2):91-5.
87. Terra Filho J. Avaliação laboratorial da função pulmonar. Medicina. 1998;31:191-207.
88. Pereira CAC. Bases e Aplicações Clínicas dos Testes de Função Pulmonar. Revista Brasileira de Medicina do Trabalho. 2004;2(4):317-30.
89. Lim R, Zavou MJ, Milton PL, Chan ST, Tan JL, Dickinson H, et al. Measuring respiratory function in mice using unrestrained whole-body plethysmography. Journal of visualized experiments : JoVE. 2014(90):e51755.
90. Goineau S, Rompion S, Guillaume P, Picard S. Ventilatory function assessment in safety pharmacology: optimization of rodent studies using normocapnic or hypercapnic conditions. Toxicology and applied pharmacology. 2010;247(3):191-7.
91. DeLorme MP, Moss OR. Pulmonary function assessment by whole-body plethysmography in restrained versus unrestrained mice. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2002;47(1):1-10.
92. Receno CN, Glausen TG, DeRuisseau LR. Saline as a vehicle control does not alter ventilation in male CD-1 mice. Physiological reports. 2018;6(10):e13702.
93. Van de Ven MJ, Colier WN, van der Sluijs MC, Oeseburg B, Folgering H. Ventilatory response in metabolic acidosis and cerebral blood volume in humans. Respiration physiology. 2001;124(2):105-15.
94. Fu C, Xue J, Wang R, Chen J, Ma L, Liu Y, et al. Chemosensitive Phox2b-expressing neurons are crucial for hypercapnic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. The Journal of physiology. 2017;595(14):4973-89.
95. Moret C, Dave MH, Schulz N, Jiang JX, Verrey F, Wagner CA. Regulation of renal amino acid transporters during metabolic acidosis. American journal of physiology Renal physiology. 2007;292(2):F555-66.
96. Castro BBA, Colugnati FAB, Cenedeze MA, Suassuna PGA, Pinheiro HS. Padronização da avaliação da função renal de ratos (Rattus norvegicus) Wistar do biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora. Jornal Brasileiro de Nefrologia. 2014;36(2):139-49.
97. Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Silmara Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Acta Scientiarum Health Sciences. 2006;28(2):165-70.
98. Tammaro G, Zacchia M, Zona E, Zacchia E, Capasso G. Acute and chronic effects of metabolic acidosis on renal function and structure. Journal of nephrology. 2018.
99. Gaskell WH. On the Tonicity of the Heart and Blood Vessels. The Journal of physiology. 1880;3(1):48-92 16.
100. Baretella O, Xu A, Vanhoutte PM. Acidosis prevents and alkalosis augments endothelium-dependent contractions in mouse arteries. Pflugers Archiv : European journal of physiology. 2014;466(2):295-305.
101. Yeo JL, Tan BT, Achike FI. Exploring the mechanism of endothelial involvement in acidosis-induced vasodilatation of aortic tissues from normal and diabetic rats. European journal of pharmacology. 2010;642(1-3):99-106.
102. Celotto AC, Restini CB, Capellini VK, Bendhack LM, Evora PR. Acidosis induces relaxation mediated by nitric oxide and potassium channels in rat thoracic aorta. European journal of pharmacology. 2011;656(1-3):88-93.
103. de Nadai TR, de Nadai MN, Cassiano Silveira AP, Celotto AC, Albuquerque AA, de Carvalho MT, et al. In vitro effects of extracellular hypercapnic acidification on the reactivity of rat aorta: Rat aorta vasodilation during hypercapnic acidification. Nitric oxide : biology and chemistry. 2015;50:79-87.
104. Mohanty I, Parija SC, Suklabaidya S, Rattan S. Acidosis potentiates endothelium-dependent vasorelaxation and gap junction communication in the superior mesenteric artery. European journal of pharmacology. 2018;827:22-31.

105. Crimi E, Taccone FS, Infante T, Scolletta S, Crudele V, Napoli C. Effects of intracellular acidosis on endothelial function: an overview. Journal of critical care. 2012;27(2):108-18.
106. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P. Intracellular pH regulation in heart. Journal of molecular and cellular cardiology. 2009;46(3):318-31.
107. Rohra DK, Sharif HM, Zubairi HS, Sarfraz K, Ghayur MN, Gilani AH. Acidosis-induced relaxation of human internal mammary artery is due to activation of ATP-sensitive potassium channels. European journal of pharmacology. 2005;514(2-3):175-81.
108. Frassetto LA, Sebastian A. How metabolic acidosis and oxidative stress alone and interacting may increase the risk of fracture in diabetic subjects. Medical hypotheses. 2012;79(2):189-92.
109. Rustom R, Wang B, McArdle F, Shalamanova L, Alexander J, McArdle A, et al. Oxidative stress in a novel model of chronic acidosis in LLC-PK1 cells. Nephron Experimental nephrology. 2003;95(1):e13-23.
110. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. Circulation research. 1990;67(6):1355-64.