UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade da aorta
torácica de ratos**

Willian Márcio da Silva

Ribeirão Preto/ SP
2017

Willian Márcio da Silva

**Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade da aorta
torácica de ratos**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Opção: Morfologia e Medicina Experimental

Orientador: Profa. Dra. Andréa Carla Celotto

Ribeirão Preto/ SP

2017

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Willian Márcio

Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade da aorta torácica de ratos. Ribeirão Preto, 2017.
51 f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientadora: Celotto, Andréa Carla.

1. Acidose metabólica. 2. Reatividade. 3. NH₄Cl. 4.L-NAME. 5. Indometacina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Willian Márcio da Silva

Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade da aorta torácica de ratos.

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Opção: Morfologia e Medicina Experimental

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a.Dr^a._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Dedico este trabalho

Aqueles que amo: minha família e amigos,

Que sempre me apoiaram na luta pelos meus ideais

Proporcionando o meu crescimento pessoal e profissional

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Andréa Carla Celotto, pela confiança e honra dada a mim para participar deste projeto tão maravilhoso e significativo em minha vida.

À minha amiga Agnes A. F. Albuquerque Fagundes pela paciência, dedicação e apoio em qualquer situação.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Evora pelo apoio e conselhos.

À secretária do Departamento de Cirurgia e Anatomia, Juliana, pela ajuda e incentivo.

Aos meus pais pelo amor, carinho, ajuda e por nunca deixarem que eu desistisse.

À minha namorada Daiana Quirino Ribeiro, que sempre me incentivou, me deu força nos piores momentos, que durante minha “ausência” devido aos estudos conseguiu tempo para trabalhar, estudar, tomar conta de mim, de minha casa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e apoio financeiro no projeto.

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

*"A persistência é o menor
caminho para o êxito."*

Charles Chaplin

*"A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não
seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma
como nos acostumamos ver o mundo."*

Albert Einstein

RESUMO

Silva, W. M. **Efeito da acidose metabólica crônica sobre a reatividade da aorta torácica de ratos.** 2017. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: Os distúrbios ácido-básicos são comuns na prática médica e podem variar desde uma acidose ou alcalose simples até um distúrbio misto complexo e potencialmente fatal. A acidose metabólica ocorre por aumento na quantidade de ácidos não-voláteis sob condições como: insuficiência renal, sepse, diabetes grave, diarreia e outras. Há mais de um século tem-se conhecimento de que mudanças no pH promovem alterações no tônus vascular, o que afeta a circulação e controle da pressão sanguínea. **Objetivos:** 1) estabelecer um modelo eficiente de acidose metabólica crônica (AMC) em ratos; 2) avaliar os parâmetros ventilatórios durante a indução da AMC; 3) investigar os efeitos da AMC sobre a reatividade da aorta de ratos, bem como os mecanismos envolvidos nesta resposta. **Metodologia:** A AMC foi induzida com cloreto de amônio *ad libitum* 0,5 M + 0,02M por gavagem, durante 10 dias. Os parâmetros ventilatórios avaliados foram frequência respiratória (f_R), volume corrente (V_c) e ventilação pulmonar (VE). No estudo de reatividade vascular foram realizadas curvas dose-resposta para acetilcolina (ACh), fenilefrina (Phe), endotelina 1 (ET-1) e angiotensina II (Ang II), em aorta com e sem endotélio, na ausência e presença do L-NAME. **Resultados:** A AMC induzida por cloreto de amônio (NH_4Cl) reduziu o pH para 7.17 (controle 7.39), com níveis de bicarbonato (HCO_3^-) próximos a 9.8 mmol/L (controle 21.9 mmol/L). Quanto aos parâmetros ventilatórios, houve um aumento do V_c no segundo dia de tratamento, levando a um aumento na VE. Nos estudos de reatividade vascular, a AMC não alterou a resposta para a ACh e ET-1, entretanto reduziu a vasoconstrição induzida pela Ang II e Phe, sendo a resposta para Phe restaurada na presença de L-NAME. **Conclusões:** 1) a partir do protocolo empregado foi possível obter um modelo de AMC reproduzível; 2) houve alterações ventilatórias apenas no início do tratamento, associada à redução de pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), embora não significativa, mostrando uma resposta compensatória transitória; 3) o efeito da AMC sobre a reatividade vascular, parece ser agonista-seletiva e o óxido nítrico (NO) está envolvido nessa resposta.

Palavras-chave: Acidose metabólica crônica, óxido nítrico, endotélio, reatividade vascular

ABSTRACT

Silva, W. M. **Effect of the chronic metabolic acidosis on rat thoracic aorta reactivity.** 2016. Term paper (Master Degree) – Medical School, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introduction: The acid-base disorders are common in the medical practice and can vary from an acidosis or simple alkalosis to a mixed, complex and potentially fatal disorder. The metabolic acidosis occurs because of the increase in the quantity of nonvolatile acids under conditions such as kidney disease, sepsis, serious diabetes, diarrhea, and so on. More than one century there is some knowledge that the extracellular pH has promoted changes in the vascular tonus, which affects the circulation and the blood pressure control. **Objectives:** 1) Develop an efficient model of chronic metabolic acidosis (CMA) in rats; 2) Evaluate the ventilatory parameters during the induction of the CMA; 3) to investigate the effects of the CMA on rat aorta reactivity as well as the mechanisms involved in this response. **Methodology:** The CMA was induced by NH_4Cl 0.5M ad libitum + 0.02M by gavage during 10 days. The assessed ventilatory parameters were respiratory frequency (fR), tidal volume (Vt) and pulmonary ventilation (VE). The studies of the vascular reactivity were carried out by dose-response curve to acetylcholine (ACh), phenylephrine (Phe), endothelin-1 (ET-1) and angiotensin II (Ang II), in aorta with and without endothelium, in absence and presence of the L-NAME. **Results:** The acidosis induced by ammonium chloride (NH_4Cl) reduced the pH to 7.17 (7.39 control), with levels of bicarbonate (HCO_3^-) about 9.8 mmol/L (21.9 control mmol/L). As for the ventilatory parameters, there was an increase of the Vt in the second day of the treatment, which lead to an increase in the VE. In the studies of the vascular reactivity, the CMA have not changed the response to the ACh and ET-1, however the vasoconstriction induced by Ang II and Phe were reduced after CMA, and this was restored by L-NAME. **Conclusions:** 1) From the used protocol, it was possible to obtain a model of reproducible CMA. 2) There were ventilatory alterations only in the beginning of the treatment, associated to the reduction of pCO_2 , although not significant, which showed a transitory compensatory response. 3) The effect of the CMA on the vascular reactivity seems to be agonist-selective and the nitric oxide (NO) is involved in this response.

Key words: Chronic metabolic acidosis, nitric oxide, endothelium, vascular reactivity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1: Imagens das câmaras de órgãos (organ chambers).....	28
FIGURA 4.1: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o pH sanguíneo..	30
FIGURA 4.2: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o Bicarbonato sanguíneo	31
FIGURA 4.3: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre a pCO_2 sanguínea	31
FIGURA 4.4: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o peso corporal durante os 10 dias de tratamento	32
FIGURA 4.5: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de uréia plasmática e na urina.....	32
FIGURA 4.6: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de creatinina plasmática e na urina	33
FIGURA 4.7: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a ventilação pulmonar	34
FIGURA 4.8: Efeito da acidose metabólica crônica sobre o volume corrente.....	34
FIGURA 4.9: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a frequência respiratória .	35
FIGURA 4.10: Efeito do tratamento com NH_4Cl (NH_4Cl 0,5M <i>ad libitum</i> + gavagem 0,02M) sobre o pH sanguíneo durante os 10 dias.....	35
FIGURA 4.11: Efeito do tratamento com NH_4Cl (0,5M <i>ad libitum</i> + gavagem 0,02M) sobre o Bicarbonato sanguíneo durante os 10 dias	36
FIGURA 4.12: Efeito do tratamento com NH_4Cl (NH_4Cl 0,5M <i>ad libitum</i> + gavagem 0,02M) sobre a pCO_2 sanguínea durante os 10 dias	36
FIGURA 4.13. Curvas dose-resposta para acetilcolina em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio, pré-contráídos com Phe (10^{-7} M)	37
FIGURA 4.14: Curvas dose-resposta para endotelina-1 em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio	38
FIGURA 4.15: Curvas dose-resposta para endotelina-1 em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio	38

FIGURA 4.16: Curvas dose-resposta para angiotensina II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio	39
FIGURA 4.17: Curvas dose-resposta para angiotensina II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio	39
FIGURA 4.18: Curvas dose-resposta para angiotensina II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio, incubados com L-NAME	40
FIGURA 4.19: Curvas dose-resposta para angiotensina II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio, incubados com L-NAME	40
FIGURA 4.20: Curvas dose-resposta para fenilefrina em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio	41
FIGURA 4.21: Curvas dose-resposta para fenilefrina em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio	41
FIGURA 4.22: Curvas dose-resposta para fenilefrina em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio, incubados com L-NAME	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	acetilcolina
AMC	acidose metabólica crônica
Ang II	angiotensina II
ATP	trifosfato de adenosina
AT1	receptor de angiotensina
AT2	receptor de angiotensina
AT1A	receptor de angiotensina
AT1B	receptor de angiotensina
BaCl ₂	cloreto de bário
BTPS	temperatura e pressão corporal saturada
°C	centígrados
C ₆ H ₁₂ O ₆	glicose
Ca ²⁺	íon cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CEUA	comissão de ética no uso de animais
Cl ⁻	cloreto
CO ₂	dióxido de carbono
COBEA	colégio brasileiro de experimentação animal
EPM	erro padrão da média
ET	endotelina
ETA	receptor de endotelina
ETB	receptor de endotelina
ET-1	endotelina 1
FMRP	faculdade de medicina de ribeirão preto
f _R	frequência respiratória
g	gramas
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
H ⁺	íon de hidrogênio
HCl	cloreto de hidrogênio
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
H ₂ CO ₃	ácido carbônico

K ⁺	potássio
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina-metilester
mEq/L	miliequivalentes por litro
mg	miligrama
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mm	milímetro (s)
mM	milimolar
mmHg	milímetros de Mercúrio
mmol/L	milimol por litro
M	Molar
mL	mililitro
mL.Kg ⁻¹	Mililitros de quilogramas de peso
mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	Mililitros de quilogramas de peso por minuto
n	número
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₃	amônia
NH ₄ ⁺	amônio
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase
p < 0.0001	valor mínimo probabilidade < 0,05 estatisticamente significativo
p < 0.04	valor mínimo probabilidade < 0,04 estatisticamente significativo
p < 0,05	valor mínimo probabilidade < 0,05 estatisticamente significativo
p < 0.01	valor mínimo probabilidade < 0,01 estatisticamente significativo
p < 0.001	valor mínimo probabilidade < 0,001 estatisticamente significativo
p < 0.002	valor mínimo probabilidade < 0,002 estatisticamente significativo
p < 0,003	valor mínimo probabilidade < 0,003 estatisticamente significativo

PAF	fator ativador de plaquetas
pCO ₂	pressão parcial do dióxido de carbono
P _A	pressão de vapor d'água à temperatura da câmara
P _B	pressão de vapor d'água à temperatura corporal
Phe	fenilefrina
PGE2	prostaglandina E2
PGF2a	prostaglandina F2 alfa
PGI ₂	prostaciclina
pH	potencial hidrogeniônico
pH _o	pH extracelular
pH _i	pH intracelular
P _K	deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração
P _T	deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente
SNC	sistema nervoso central
T _A	temperatura do ar dentro da câmara
T _{amb}	temperatura ambiente
T _C	temperatura corporal
USP	universidade de são paulo
V	ventilação
V _c	volume corrente
VDCC	voltage-dependent calcium channels
VE	ventilação pulmonar
V _K	volume de ar injetado na câmara do animal para calibração

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1.1 Conceitos Gerais	19
1.2 Equilíbrio ácido-base e função vascular.....	21
1.3 Influência da acidose/acidificação na função vascular	22
2 OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral	244
2.2. Objetivos específicos.....	24
2.2.1 Objetivos referentes ao modelo	244
2.2.2 Objetivos referentes a função vascular	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais	25
3.2 Indução da Acidose Metabólica Crônica.....	25
3.3 Coleta de sangue	26
3.4 Gasometria.....	26
3.5 Breve avaliação da função renal	26
3.6 Avaliação dos parâmetros ventilatórios	27
3.7 Estudo da reatividade vascular em câmara de órgãos isolados (organ chambers).....	27
3.8 Critérios de exclusão	29
3.9 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Indução da acidose metabólica crônica	30
4.2 Avaliação da função respiratória.....	33
4.3 Reatividade vascular	37
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

INTRODUÇÃO

O pH do sangue e do fluido extracelular devem permanecer dentro de limites estreitos (7,35 a 7,45). Algumas condições fisiopatológicas como: comprometimento do sistema nervoso central (SNC), insuficiência pulmonar, choque endotóxico, parada cardíaca, insuficiência renal crônica, hiperatividade adrenal, diabetes mellitus, problemas hepáticos, sepse ou mesmo manobras médicas como a circulação extracorpórea e a ventilação mecânica, podem promover alterações que levam ao desequilíbrio, daí a necessidade de controle e avaliações periódicas para evitar complicações para os pacientes (Austin e Wray 2000).

Os distúrbios ácido-básicos são comuns na prática médica, principalmente, em pacientes tratados em unidade de terapia intensiva. Esses distúrbios podem variar desde uma acidose ou alcalose simples até um distúrbio misto complexo podendo levar à morte (Evora 1999; Austin e Wray 2000; Nadai 2013).

Em situações de acidose notam-se alterações da permeabilidade e função enzimática celular, podendo levar a disfunção de diversos órgãos e sistemas. Essas alterações sistêmicas promovidas por variações do pH são bastante diversas: aumento da resistência vascular pulmonar, redução da resistência vascular sistêmica, alteração da atividade elétrica do miocárdio e do SNC, alterações da contratilidade do miocárdio, modificação da resposta a certos agentes químicos, endógenos e exógenos como hormônios e drogas vasoativas.

A maneira como a acidose ocorre (mudança da $p\text{CO}_2$) ou adição de ácido ou base), assim como o tipo de vaso acometido, são importantes para o tipo de resposta vascular produzida. Além do seu efeito direto no tônus vascular, a acidose também pode alterar a responsividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores.

Os mecanismos pelos quais a acidose influencia o tônus vascular ou sua resposta à determinados agonistas ainda não é completamente entendida, mas existem algumas evidências que sugerem a participação do NO, prostaciclina (PGI_2), canais de potássio e fluxo de cálcio.

Os estudos que envolvem a compreensão sobre os efeitos do pH na função vascular datam de mais de um século, entretanto, fornecem dados preliminares e inconclusivos (Gaskell 1880). Estudos mais recentes têm mostrado que a redução

de pH do sangue aumenta o fluxo sanguíneo. A “vasodilatação ácido-metabólica” foi sugerida para contribuir na regulação do fluxo sanguíneo local, mediar a vasodilatação que ocorre durante a hipoxia, isquemia ou durante o aumento da atividade metabólica, a fim de atender às necessidades de energia e oxigênio (Celotto et al. 2008).

Estudos confirmam que a redução do pH perivascular na acidemia diminui a capacidade de resposta à vasoconstritores e resultando em dificuldade de manutenção da pressão arterial sistêmica. O pH perivascular pode afetar muitos processos celulares, mas os mecanismos precisos de hiporresponsividade vascular ainda não são conhecidos (Celotto et al. 2008; Besse et al. 2006; Lopes et al. 2005; Hattori et al. 2002).

Estudos *in vitro* indicam que a resposta contrátil dos vasos sanguíneos é reduzida se o pH é diminuído, entretanto apesar das evidências que indiquem que o pH induz alterações na contratilidade do músculo liso, os mecanismos responsáveis para tais efeitos não foram completamente elucidados. (Loutzenhiser, Matsumoto et al. 1990; Celotto et al. 2016; Austin e Wray 1993; Kubo et al. 2007; Soejima, K., et al. 1996).

O conhecimento e as ferramentas disponíveis nem sempre são adequados para resolver os problemas de saúde existentes e há uma necessidade constante e sem fim de gerar novas informações e desenvolver maneiras melhores, e mais efetivas, de proteger e promover a saúde. (Cohred 2006)

Há aproximadamente 10 anos iniciou-se uma linha de pesquisa, no laboratório de função endotelial da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para se estudar a função vascular sob os efeitos da acidose e alcalose. Esses estudos adotaram modelo experimental *in vivo* e *in vitro* de distúrbios metabólicos e respiratórios e, os resultados tem permitido uma melhor compreensão sobre a influência do pH sobre a função vascular: 1) a acidificação extracelular induzida com HCl em aorta torácica de rato causou relaxamento dependente do pH nos anéis com endotélio intacto e anéis aórticos sem endotélio pré-contraídos com Phe; 2) a acidose metabólica *in vitro* induzida por borbulhamento de concentrações aumentadas de CO₂ possibilitou o registro de forças isométricas; 3) a acidose metabólica aguda, *in vivo*, potencializa a resposta vasodilatadora da ACh e promove aumento nos níveis de NO. (Celotto et al. 2011; Nadai et al. 2014; Celotto et al. 2016).

No presente estudo, dando prosseguimento a essa linha de investigação, objetivou-se alcançar uma melhor compreensão sobre os efeitos causados pela acidose metabólica crônica na reatividade vascular frente a diferentes agonistas.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Conceitos Gerais

O organismo produz íons de hidrogênio (H^+) metabolizando proteínas (aminoácidos contendo enxofre, como cisteína e metionina, e aminoácidos catiônicos, como lisina e arginina), carboidratos (ácido láctico, na hipóxia) e gorduras (cetoácidos, no déficit de insulina). O excesso desses íons H^+ é removido pelo metabolismo de ânions orgânicos, como o citrato e o acetato, provenientes de frutas e vegetais, que gera (HCO_3^-) (Carlotti 2008).

Existem mecanismos de regulação para todos os íons que se ingere ou que são produzidos pelo metabolismo do organismo, inclusive em relação ao H^+ . A regulação do balanço do H^+ é semelhante à regulação de outros íons no corpo, pois, para haver homeostasia é preciso que exista equilíbrio entre a ingestão e/ou a produção de H^+ e a eliminação do excesso da substância do organismo. E, para a eliminação de todos os íons, os rins desempenham um papel importante no processo, inclusive para a regulação da remoção de H^+ do organismo. Entretanto, o controle da concentração de H^+ no líquido extracelular é complexo e envolvem outros processos e outros órgãos, inclusive mecanismos de tamponamento ácido-básicos nos quais o sangue, as células e os pulmões são essenciais para normalizar e manter as concentrações de H^+ no líquido extracelular e intracelular. (Hall, J. and A. Guyton (2006); Aires 2008).

O termo “potencial hidrogeniônico” (pH) é utilizado como referência à concentração de íons H^+ livres em solução. O pH normal do sangue arterial é de 7,4, enquanto o pH do sangue venoso e dos líquidos intersticiais é de cerca de 7,35, porque apresentam quantidades maiores de dióxido de carbono (CO_2) liberadas pelas células. Pode-se afirmar que o indivíduo apresenta acidose quando o pH está abaixo do pH considerado normal e quando o pH está acima dos parâmetros normais, pode-se afirmar que o indivíduo apresenta alcalose. O limite mínimo de pH fica em torno de 6,8, e o limite máximo de pH em torno de 8,0, mas é preciso correção e intervenções para normalizar e equilibrar o pH, para preservação da vida. (Hall, J. and A. Guyton 2006; Ganong 2006; Souza 2006; Evora 2011).

A regulação do pH nos líquidos corporais, para evitar acidose ou alcalose é realizada por três mecanismos primários: (1) os sistemas-tampão químicos ácido-

básicos dos líquidos corporais que se combinam, imediatamente, com ácido ou base para evitar alterações excessivas da concentração de H^+ ; (2) o centro respiratório, que regula a remoção de dióxido de carbono (e, portanto, de ácido carbônico) do líquido extracelular; e (3) os rins, que podem excretar tanto urina ácida como alcalina, reajustando a concentração de H^+ no líquido extracelular para níveis normais, durante a acidose ou a alcalose. (Hall, J. and A. Guyton 2006; Aires 2008; Ader, Carré et al. 2005).

Em caso de variação do pH, a primeira defesa do organismo acontece pela ação dos sistemas-tampão dos líquidos corporais que respondem em fração de segundos para minimizar essas alterações, mas os sistemas-tampão não eliminam ou acrescentam íons H^+ ao corpo, efetivam reações que os mantêm controlados até que voltem a ser normalizados. Posteriormente, o sistema respiratório age como uma segunda linha de defesa, e também em questão de minutos eliminam o CO_2 , e, conseqüentemente, o H_2CO_3 do corpo. Assim, o organismo evita que a concentração de H^+ se altere muito, até que os rins sejam ativados à participar do processo como a terceira linha de defesa que elimina o excesso de ácido ou base do corpo. A resposta dos rins é mais lenta, se comparada com as outras defesas e podem durar horas a vários dias, mas a ação desses órgãos é eficiente e definitiva, pois, são os sistemas reguladores ácido-básicos mais potentes. Os rins controlam e promovem o equilíbrio ácido-básico ao excretar urina ácida ou básica. Sem o tamponamento, a produção e a ingestão diária de ácidos causariam grandes variações da concentração de H^+ nos líquidos corporais. (Hall, J. and A. Guyton 2006).

Através de exames que determinam o pH pode-se identificar se o distúrbio é acidose ou alcalose. O pH inferior a 7,4 indica acidose, enquanto o pH acima do parâmetro citado indica alcalose. A segunda etapa é medir a pCO_2 e a concentração plasmática de HCO_3^- . O valor normal da pCO_2 é cerca de 40 mmHg, e de HCO_3^- , 24 mmol/L. Determinando a causa dos distúrbios do equilíbrio ácido-básico (acidose ou alcalose) permite identificar se o problema é metabólico ou respiratório. (Evora 2011; Hall, J. and A. Guyton 2006).

A acidose respiratória apresenta pH inferior a 7,35 e pCO_2 acima de 45 mmHg e tem como causa primária a retenção de CO_2 no sangue que pode ser causada por hipoventilação. Tal condição pode deprimir o miocárdio levando à arritmias, por isso, deve ser tratada o mais precocemente possível. (Carlotti 2012).

Situações como, fluxo arterial reduzido durante a circulação extracorpórea por falhas na manutenção ou na regulação do aparelho, redução da temperatura do sangue, transfusão de sangue estocado e preservado em soluções ácidas, diabéticos submetidos a jejum prolongado, e outras causas menos comuns como a hipóxia das massas musculares, causada pela vasoconstrição que acompanha a perfusão, podem causar acidose metabólica. (Amaral 1985). Como consequência a acidose metabólica pode causar contração do miocárdio, depressão do tônus muscular, arritmia ventricular, redução de respostas à medicação com inotrópicos e vasopressores.

1.2 Equilíbrio ácido-básico e função vascular

Há aproximadamente um século, tem-se observado que mudanças no pH extracelular (pH_0) leva à alterações no tônus vascular, afetando a circulação e o controle da pressão sanguínea. Gaskell, em 1880, demonstrou que o pH é importante para o controle do tônus vascular através da observação, em artéria mesentérica de rã, que uma redução no pH utilizando ácido láctico acarreta um aumento do diâmetro vascular, enquanto um aumento no pH por hidróxido de sódio promovia redução do mesmo (Gaskell 1880). A alteração do pH promove mudanças no tônus do músculo liso vascular com impacto no controle de circulação e pressão arterial. (Evora 2011; Celotto 2008).

Os estudos de Mizuno e Demura et al. (2002) sobre os efeitos das variações do pH no organismo demonstram que a alcalose, assim como a acidose, afetam os mecanismos celulares de vasodilatação, em parte, por aumentar o nível de PGI_2 .

A acidemia, ou seja, a redução do pH perivascular diminui a responsividade a vasoconstritores, resultando em dificuldade de manter a pressão sanguínea sistêmica. Redução do pH para valores próximos a 7,0, promovem uma substancial inibição da contratilidade do músculo liso vascular cardíaco de ratos, o qual tem sido associado ao aumento da hiperpolarização e sequestro de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (Evora 2011).

O aumento do pH que ocorre na alcalose, também interferem na resistência das artérias, embora de maneira diferenciada. Segundo Yoon, Zucarello e Rapoport (2000) sob condições de alcalose metabólica aguda acompanhada de hipercapnia compensatória.

Yoon et al. (2012) demonstraram que o aumento do pH produziu aumento na tensão das tiras de artéria mesentérica, enquanto a diminuição do pH reduziu a tensão, essas alterações foram atribuídas às variações de Ca^{2+} .

A acidose altera a permeabilidade e as funções enzimáticas celulares, isso leva à alterações nas funções de diversos órgãos e sistemas. As variações do pH do organismo podem promover alteração da resistência vascular sistêmica, alterações da atividade elétrica do miocárdio e do SNC, também podem interferir no metabolismo do organismo e na responsividade à agentes químicos, endógenos e exógenos, porém, os mecanismos que promovem alterações no tônus vascular ainda não foram totalmente esclarecidos (Loutzenhiser et al. 1990).

1.3 Influência da acidose/acidificação na função vascular

Estudos realizados em cães anestesiados e colocados em circuito de circulação extracorpórea mostrou que a acidose respiratória (pH 7,16) promoveu aumento do fluxo na artéria coronária, a qual foi inibido pela administração tanto de L-NAME quanto L-NMMA. (Evora 2011; Gurevicius et al 1995).

A participação do NO nos efeitos vasculares desencadeados pela acidose também foi observado em artérias cerebrais de ratos, nas quais verificou-se que a dilatação induzida pela acidose foi mediada por canais de K^+ e NO. (Horiuchi et al. 2002).

Em um experimento, utilizou-se aorta de rato isolada e o resultado mostrou que a acidificação (pH=7,0) era capaz de potencializar o relaxamento induzido pela ACh, por aumentar a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Besse, Tanguy et al. 2006).

Estudos em artérias mamárias humanas, mostraram que o pH ácido reduziu as contrações, devido a hiperpolarização por abertura dos canais de K^+ e diminuição de Ca^{2+} . (Rohra et al. 2005)

Soejima, K., et al. (1996) também observaram que a abertura de canais de K^+ sensíveis ao ATP no músculo liso vascular medeia a dilatação coronariana arteriolar durante a acidose, quando examinaram os efeitos da acidose no tônus vasomotor em arteríolas de porcos pelo uso de cloreto de bário BaCl_2 (100 mmol/L, inibidor inespecífico do canal de K^+) e glibenclamida (5 mmol/L, inibidor do canal de K^+ sensível a ATP).

Lopes et al. (2005) mostraram o efeito da acidose sobre as contrações do músculo liso vascular evocadas pela noradrenalina em tiras de aorta de coelho. Observaram que a acidose diminui as contrações induzidas pela noradrenalina, sendo tal efeito atribuído ao bloqueio dos alfa-adrenoceptores pelo H^+ , durante a acidose.

Em anéis arteriais obtidos a partir de aorta de rato Sprague-Dawley, foi relatado que a acidose não modificou as respostas aórticas à ACh ou à adrenalina durante a normoxia, mas os anéis submetidos à hipoxia e reoxigenados a pH 7,4 mostraram uma redução nas respostas vasodilatadoras à ACh e vasoconstritora à norepinefrina. (Lopes et al. 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da acidose metabólica crônica sobre a reatividade da aorta torácica de rato, bem como os mecanismos envolvidos nesta resposta.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Objetivos referentes ao modelo

- Obter um modelo viável e efetivo de acidose metabólica crônica em ratos;
- Avaliar a função renal para garantir tratar-se de um quadro de acidose metabólica exclusiva, ou seja, sem comprometimento da função renal;
- Avaliar os parâmetros ventilatórios nos animais acidóticos: ventilação pulmonar (VE), frequência respiratória (f_R) e volume corrente (V_c), afim de excluir qualquer participação respiratória no modelo.

2.2.2 Objetivos referentes à função vascular

- Verificar a resposta da aorta torácica de ratos acidóticos frente a diferentes agonistas (ACh, Phe, Ang II e ET-1) e se esta é modificada ou não pela presença do endotélio;
- Investigar a participação do NO na resposta vascular induzida pela acidose metabólica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com idade média de 45-50 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 água e à comida.

O número de animais para cada protocolo foi de 6 (n=6), número este necessário para realização de análise estatística de acordo com a experiência do nosso laboratório nesse tipo de estudo e embasado na literatura da área. O projeto em questão foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto da USP (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).

3.2 Indução da Acidose Metabólica Crônica

A acidose metabólica crônica foi induzida no grupo acidose 1 pela substituição de água por uma solução do cloreto de amônio 0,50M durante dez dias. Já o grupo acidose 2, 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 0,02M, em volume de 1 mL, durante os dez dias. Optamos pelo segundo modelo de indução de acidose após constarmos que o primeiro tratamento falhou em promover acidose nos animais. Os animais do grupo acidose receberam *ad libitum* a solução de cloreto de amônio diluída em uma solução de 0,03% de suco artificial em pó. Os animais do grupo controle receberam água. Os animais foram divididos aos pares por caixa e a ingestão da solução era medida diariamente.

3.3. Coleta de Sangue

Para verificar se houve sucesso na indução da acidose metabólica crônica, o rato foi pesado e em seguida foi aplicado uma injeção intraperitoneal de solução de uretano, na dose de 2 mg/kg de peso. O rato ficou anestesiado em menos de 5 minutos e colocado no suporte. O abdome foi aberto por uma incisão mediana, utilizando a pinça e a tesoura e em seguida as vísceras abdominais foram afastadas, expondo a gordura retroperitoneal, atrás da qual se encontra a aorta abdominal. A aorta abdominal ficou exposta após a retirada da gordura retroperitoneal com algodão seco. Puncionou-se a aorta abdominal com a seringa de 5 ml descartável dotada da agulha hipodérmica 25X0,8 mm com a solução de heparina que nela foi colocada e extraiu um volume de 5 ml de sangue onde foram separados em 2 eppendorfes, sendo 1 ml para o exame de uréia e 1 ml para o exame de creatinina plasmática e 1 ml em uma seringa de 1ml para ser submetido à análise por gasometria.

3.4 Gasometria

As medidas bioquímicas de pH, pCO_2 e concentração plasmática de íon de HCO_3^- foram realizadas por aparelho de hemogasometria Gem Premier 3000 (Instrumentation Laboratory Co., Bedford, MassACHussets, EUA) 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 três semanas. A seringa contendo sangue é introduzida no aparelho que suga a amostra para análise.

3.5 Breve avaliação da função renal

Para verificar os níveis de creatinina e uréia na urina, com o propósito de obter uma simples avaliação da função renal, após o procedimento de incisão abdominal para a coleta de sangue para análise bioquímica e gasométrica, foi coletado o volume disponível de urina, puncionando a bexiga do animal com a seringa de 5 ml dotada da agulha 25X0,8 mm e que foi colocado em um tubo de coleta de urina. As

análises foram realizadas com o emprego de kits Labtest[®], utilizando urina de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante.

3.6 Avaliação dos parâmetros ventilatórios

A ventilação foi medida por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (Bartlett e Tenney 1970). 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 de tempo (~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). 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 (f_R) e o volume corrente (V_c) que foi calculado através da fórmula: $V_c = P_T/P_K \times T_A/T_{amb} \times (P_B - P_A)/(P_B - T_A/T_C(P_B - P_C))$, onde V_K : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração; P_T : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente; P_K : deflexão de pressão associada com cada V_K injetado para calibração, T_C : temperatura corporal; T_{amb} : temperatura ambiente; T_A : temperatura do ar dentro da câmara; P_B : pressão de vapor d'água à temperatura corporal; P_A : pressão de vapor d'água à temperatura da câmara. A ventilação foi obtida pelo produto de f_R e V_c . A ventilação (V) e o V_c foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente à T_c e saturados com vapor d'água (BTPS)

3.7 Estudo da reatividade vascular em câmara de órgãos isolados (organ chambers)

Os animais foram anestesiados com uretano (2mg/Kg) e posteriormente exsanguinados pela aorta abdominal. Foi realizada uma toracotomia e a aorta foi então exposta, isolada e cuidadosamente removida. O segmento arterial foi colocado em solução de Krebs (composição em mM: NaCl 118,3; KCl 4,7;

MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,22; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0 e C₆H₁₂O₆ 11,1; pH 7,4), o tecido externo à adventícia foi removido e, por fim, foi cortada em segmentos de 4-5mm.

Após esta preparação inicial, cada anel foi suspenso entre duas alças de aço inoxidável, que foram passadas através de sua luz, e este conjunto foi imerso em uma cuba contendo 10 mL de solução de Krebs, aquecida a 37°C e o sistema era aerado com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Uma das alças estava ancorada a um suporte fixo e a outra conectada a um transdutor (Grass force-displacement transducer FT03, Grass Instrument CO, Quincy, EUA) para mensurar a tensão isométrica. Os transdutores foram acoplados a um registrador de 8 canais (Gould, Cleveland, EUA), permitindo, desta forma, o registro simultâneo da tensão isométrica de até 8 anéis vasculares.

Figura 3.1. Imagem das câmaras de órgãos (organ chambers). A imagem foi feita no laboratório de Função Vascular do Departamento de Cirurgia e Anatomia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Antes de iniciar os experimentos farmacológicos propriamente ditos, os anéis vasculares foram submetidos ao ponto ótimo de estiramento-tensão de 2g 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 Phe (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 ACh (10^{-6} M) 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 Phe, ACh, Ang II e ET-1. Com o objetivo de avaliar a participação do NO, as curvas foram realizadas com e sem N ω -nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) (2×10^{-4} M), um inibidor inespecífico da óxido nítrico sintetase (NOS), o tempo de incubação com L-NAME foi de 45 minutos.

3.8 Critérios de exclusão

Os animais que não apresentavam pH igual ou menor que 7,2 e HCO $_3^-$ igual ou menor que 18 mM, foram descartados.

Nos estudos de reatividade vascular, os anéis de artérias que se apresentaram com menos de 70% de endotélio ou mais 20%, no caso dos anéis sem endotélio, foram descartados.

3.9 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Indução da acidose metabólica crônica

Os resultados mostram que, dos tratamentos propostos, apenas a associação de NH_4Cl 0,5M *ad libitum* com gavagem 0,02M, por dez dias, foi capaz de reduzir o pH (7.39 para 7.17) e o HCO_3^- (23,11 para 10,79 mmol/L) à níveis satisfatórios para caracterizar um modelo de acidose metabólica crônica (Figura 4.1 e 4.2). Observou-se também redução nos níveis de pCO_2 (37 para 29 mmHg), caracterizando uma resposta compensatória em decorrência do quadro de acidose metabólica (Figura 4.3).

Os animais do grupo controle apresentaram ganho de peso compatível com o crescimento esperado no período de 10 dias (309 para 408 g), enquanto os grupos tratados com NH_4Cl mantiveram praticamente o mesmo peso, do início ao final do tratamento (288 para 293 g) (Figura 4.4).

Figura 4.1: 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). *** $p < 0.0001$, indica diferença significativa em relação ao controle. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.2: Efeito dos diferentes tratamentos com NH_4Cl sobre o HCO_3^- sanguíneo. Acidose 1 (NH_4Cl 0,5M *ad libitum*); Acidose 2 (NH_4Cl 0,5M *ad libitum* + gavagem 0,02M). *** $p < 0.0001$, indica diferença significativa em relação ao controle. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.3: 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). * $p < 0.01$ e ** $p < 0.002$, indica diferença significativa em relação ao controle. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.4: 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). *** $p < 0.0001$, controle 10 dias versus controle; acidose 1 10 dias versus controle 10 dias e acidose 2 10 dias versus controle 10 dias. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni.

A partir dos próximos resultados os gráficos utilizarão apenas a denominação acidose e este se refere ao tratamento 2. A avaliação da função renal, através dos níveis de uréia e creatinina sanguínea e urinária no grupo acidose, mostraram que a sobrecarga de NH_4Cl não promoveu alterações na filtração renal (figuras 4.5 e 4.6).

Figura 4.5: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de uréia plasmática e na urina no grupo acidose. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni. (n=10)

Figura 4.6: Efeito da acidose metabólica sobre os níveis de creatinina plasmática e na urina no grupo acidose. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni. (n=10)

4.2 Avaliação da função respiratória

A acidose promoveu um aumento significativo da ventilação no segundo dia pós ingestão de NH_4Cl . A partir do terceiro dia, a ventilação declinou significativamente ($p < 0,003$) de $1724 \pm 235,43 \text{ mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para $1001 \pm 67,81 \text{ mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e permaneceu reduzida até o décimo dia ($709,22 \pm 126,66 \text{ mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), sendo que no nono dia foi significativamente ($p < 0,05$) menor que o controle (Figura 4.7). Esse perfil da ventilação é reflexo principalmente do V_c que apresenta um aumento gradual até o segundo dia ($8,66 \pm 0,94 \text{ mL.Kg}^{-1}$ no controle para $13,7 \pm 1,60 \text{ mL.Kg}^{-1}$) onde é significativamente maior que o controle ($P < 0,05$) e redução significativa a partir do quarto dia de acidose (Figura 4.8). Não houve alteração da f_R durante todo o período estudado (Figura 4.9). A medida da gasometria dia a dia acompanhando a ventilação mostrou que os valores de pH decaem já no primeiro dia de tratamento, acompanhando a redução no HCO_3^- , mas sofre oscilações durante os 10 dias de tratamento, acompanhado também por oscilações no HCO_3^- (Figuras 4.10 e 4.11). Já os valores de pCO_2 não se alteram ao longo do tratamento, se mantendo em torno de 30 mmHg, enquanto o controle se mantém por volta de 39 mmHg (Figura 4.12)

Figura 4.7: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a ventilação pulmonar. * $p < 0.04$, indica diferença significativa em relação ao controle. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni. (n=3)

Figura 4.8: Efeito da acidose metabólica crônica sobre o volume corrente. * $p < 0.05$, indica diferença significativa em relação ao controle. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni. (n=3)

Figura 4.9: Efeito da acidose metabólica crônica sobre a frequência respiratória. * $p < 0.05$, indica diferença significativa em relação ao controle. ANOVA, One Way com pós-teste de Bonferroni. (n=3)

Figura 4.10: Efeito do tratamento com NH_4Cl (NH_4Cl 0,5M *ad libitum* + gavagem 0,02M) sobre o pH sanguíneo durante os 10 dias. (n=3)

Figura 4.11: Efeito do tratamento com NH_4Cl ($0,5\text{M}$ *ad libitum* + gavagem $0,02\text{M}$) sobre o HCO_3^- sanguíneo durante os 10 dias. ($n=3$)

Figura 4.12: Efeito do tratamento com NH_4Cl (NH_4Cl $0,5\text{M}$ *ad libitum* + gavagem $0,02\text{M}$) sobre a pCO_2 sanguínea durante os 10 dias. ($n=3$)

4.3 Reatividade vascular

A acidose metabólica crônica não alterou o relaxamento induzido pela ACh (Figura 4.13). Em relação ao efeito contrátil de alguns agonistas importantes, observamos que a resposta da ET-1 não foi alterada, tanto em anéis com, quanto sem endotélio (Figuras 4.14 e 4.15). Já a contração induzida pela Ang II apresentou-se reduzida em artérias de animais acidóticos. Esta redução da contração para Ang II foi significativa em anéis com endotélio, enquanto em anéis sem endotélio, embora haja uma tendência para redução, o erro não permite avaliar a significância (Figuras 4.16 e 4.17). Essa redução na contração para Ang II foi revertida após a incubação com L-NAME, em anéis com endotélio (Figuras 4.18 e 4.19). Quanto à contração induzida pela Phe, também houve uma redução da contração em anéis com endotélio, que foi revertida pela incubação com L-NAME (Figuras 4.20, 4.21 e 4.22). No caso da Phe, a redução na contração não foi observada no efeito máximo da droga, mas sim na potência.

Figura 4.13: Curvas dose-resposta para ACh em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M). Os dados representam a média $\pm$ EPM ($n = 6$), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.14: Curvas dose-resposta para ET-1 em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio. Os dados representam a média $\pm$ EPM ($n = 6$), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.15: Curvas dose-resposta para ET-1 em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio. Os dados representam a média $\pm$ EPM ($n = 6$), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.16: Curvas dose-resposta para Ang II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio. Os dados representam a média $\pm$ EPM ($n = 6$), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0.01$ e ** $p < 0.001$.

Figura 4.17: Curvas dose-resposta para Ang II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio. Os dados representam a média $\pm$ EPM ($n = 6$), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.18: Curvas dose-resposta para Ang II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio, incubados com L-NAME. Os dados representam a média $\pm$ EPM (n = 6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.19: Curvas dose-resposta para Ang II em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio, incubados com L-NAME. Os dados representam a média $\pm$ EPM (n = 6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.20: Curvas dose-resposta para Phe em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio. Os dados representam a média $\pm$ EPM ($n = 6$), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$.

Figura 4.21: Curvas dose-resposta para Phe em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, sem endotélio. Os dados representam a média $\pm$ EPM ($n = 6$), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.22: Curvas dose-resposta para Phe em anéis, de aorta de ratos controle e acidóticos, com endotélio, incubados com L-NAME. Os dados representam a média $\pm$ EPM (n = 6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$.

5 DISCUSSÃO

O propósito do presente estudo foi investigar os efeitos da AMC sobre a reatividade vascular. Dessa forma, foi preciso empregar um modelo de AMC exclusiva, ou seja, não associada a qualquer outra condição como, por exemplo, diabetes ou doença renal. A literatura traz alguns modelos animais de AMC utilizando diferentes concentrações de NH_4Cl com duração variável do tratamento.

O primeiro desafio do presente estudo foi encontrar um protocolo de indução de AMC que fosse reproduzível e eficiente. Após a primeira tentativa, baseada nos dados da literatura, utilizando NH_4Cl 0,5M *ad libitum* por dez dias, infelizmente o tratamento empregado não foi capaz de reduzir os níveis de HCO_3^- e o pH de forma satisfatória. Portanto, foi necessário fazer algumas adequações na metodologia. Foi acrescido ao tratamento existente uma dose extra de NH_4Cl de 0,02M por gavagem. Após esse ajuste, obtivemos ao final de 10 dias, pH próximo a 7.17, com HCO_3^- em torno de 10 mmol/L.

A função renal também foi avaliada para verificar se tratar apenas de um quadro de AMC, isenta de comprometimento renal. Os animais que desenvolveram AMC não apresentaram alteração nos níveis séricos e urinário de uréia e creatinina, mesmo tendo uma redução na ingestão de líquido, que provavelmente ocorreu pelo sabor diferente da água em consequência do NH_4Cl , tornando-a menos palatável, mesmo com o acréscimo de sucos em pó para saborizar a solução. Esses resultados diferem dos encontrados por Celotto et al. (2016), onde os níveis séricos de uréia e creatinina de coelhos aumentaram após administração de NH_4Cl por 7 dias. No trabalho citado, o aumento de uréia e creatinina poderia ser associado a um quadro de desidratação, uma vez que a pressão venosa central estava reduzida ou à um prejuízo da filtração renal. Já Kryshtal et al. (2003) mostrou em modelo de acidose crônica com NH_4Cl em ratos, um aumento nos níveis séricos de uréia que ele atribui à um aumento no catabolismo de proteínas e ativação da síntese de uréia para eliminar o excesso de amônio (NH_4^+). (Kryshtal 2003).

Os animais que receberam NH_4Cl também apresentaram menor ganho de peso durante o período estudado. Essa redução no ganho de peso poderia ser devido à redução também na ingestão de ração, observada nesses animais.

Haldane, em 1921, descreveu o efeito da ingestão de NH_4Cl no balanço ácido-básico, portanto, o NH_4Cl em soluções oferecidas como água de beber à animais é protocolo padrão para produção de acidose metabólica em modelos experimentais. A acidose metabólica produzida pela administração de solução de NH_4Cl deriva da dissociação do cloreto de amônio nos tecidos em NH_4^+ e cloreto (Cl^-). O íon NH_4^+ dissocia-se em amônia (NH_3) e H^+ liberando prótons pela absorção de NH_3 e pelo metabolismo hepático (Feldman, 1989).

Em relação aos resultados obtidos a partir da análise ventilatória, podemos observar que houve um aumento na ventilação, em decorrência do aumento do V_c , no início do tratamento. Embora os valores de pCO_2 nos animais estejam por volta de 10 mmHg abaixo do controle, não há diferença estatística entre os grupos. Entretanto, isso poderia indicar que inicialmente houve uma tentativa de compensação respiratória que acabou sendo superada pela compensação renal, uma vez que no segundo dia de tratamento os valores de pH e HCO_3^- se aproximaram novamente da normalidade. Os dados a partir da ventilação ainda são um tanto quanto conflitantes, e isso pode ser associado ao fato do número de animais ser baixo, exceto para a medida do décimo dia, pela dificuldade de realização das medidas, uma vez que necessita da colaboração do animal, ou ainda pelo fato das medidas diárias não terem sido realizadas nos mesmos animais, impossibilitando um acompanhamento mais fidedigno de cada um. Tais medidas não puderam ser realizadas nos mesmos animais, diariamente, porque não tivemos sucesso em manter uma cânula arterial por dez dias. Dessa forma, para a medida da gasometria era necessário sacrificar o animal, após realizar a medida da ventilação.

Antes de iniciarmos a discussão a respeito dos achados no que se refere à reatividade vascular, é importante esclarecer o que nos levou a selecionar os agonistas empregados no presente estudo. Uma análise minuciosa da literatura sobre pH e função vascular nos mostrou que as drogas mais utilizadas eram cloreto de potássio (KCl), Phe e ACh. A partir de experiências prévias do grupo nessa área, optamos por utilizar a Phe e ACh. Com o propósito de expandir um pouco mais nossos estudos, optamos por utilizar mais duas drogas vasoativas: Ang II e ET-1. Embora essas drogas não sejam comumente empregadas nos estudos de reatividade com variação de pH, elas se destacam por sua importância no controle do tônus vascular.

Os rins, como mencionado na revisão da literatura, constituem um dos mecanismos mais importantes para regulação do equilíbrio ácido-básico, através da excreção de ácidos e reabsorção de HCO_3^- . Nos rins há um importante equilíbrio entre agentes vasoconstritores e vasodilatadores, responsável pela regulação da filtração glomerular. Dentre os agentes vasoconstritores devem ser ressaltados: peptídeos como a Ang II e ET-1, além de outras substâncias como adenosina, PAF (fator ativador de plaquetas) e metabólitos do ácido araquidônico (PGF2a, tromboxane A2 e leucotrienos). Entre os agentes vasodilatadores há: peptídeos como bradicinina e peptídeos natriuréticos, além de outras substâncias como NO, PGE2, PGI_2 e dopamina (Roux et al. 1999).

A ET-1 é um peptídeo encontrado em vários órgãos, é produzida pelo endotélio vascular e age como mensageiro químico dentro do organismo (Garcia et al. 1998). É essencial para controlar a atividade do vaso sanguíneo e, sob condições normais, seus níveis são baixos. Contudo, em estados patológicos tais como a hipertensão arterial pulmonar, as doenças do tecido conjuntivo como a esclerodermia, fibrose do pulmão e doença renal, os níveis de ET podem se alterar (Roux et al. 1999 e Yamane et al. 1994). Existem dois tipos de receptores de endotelina: ETA, que é predominantemente encontrado na camada de músculo liso presente nos vasos sanguíneos, e ETB, localizado na superfície do endotélio. Esses receptores quando ativados pela ET, iniciam uma cascata de efeitos que levam a diferentes respostas celulares (Garcia et al. 1998; Miyauchi et al. 1999).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é considerado um sistema endócrino, com os componentes da cascata enzimática produzidos em locais bem definidos e tendo como seu peptídeo efetor a Ang II, que exerce suas ações em órgãos-alvo distantes do local de produção (Dzau et al. 1988; Dzau et al. 1988). A função mais importante da Ang II é a vasoconstrição direta do sistema arterial. Além disso, estimula o sistema nervoso simpático aumentando a liberação de catecolaminas (Carvalho et al. 2005; Ribeiro et al. 2001). Os efeitos da Ang II são mediados pelos receptores AT1 e AT2 (Carey et al. 2000). Sasamura et al. (1992) clonaram e caracterizaram duas isoformas do AT1: AT1A e AT1B. Hoje, sabe-se que existem vários tipos de receptores AT, envolvidos em ações específicas da Ang II ou das outras angiotensinas.

Em relação aos resultados obtidos a partir dos estudos de reatividade vascular, no presente trabalho, quando a acidose foi realizada *in vivo* e as artérias foram

posteriormente coletadas para o estudo, observamos uma redução da vasoconstrição que foi seletiva para os agonistas Phe e Ang II, e tal efeito parece ser mediado pelo NO. Esses resultados diferem dos encontrados por Celotto et al. (2016) onde a AMC não promoveu alterações na reatividade das artérias aorta e carótida de coelhos, para Phe. Entretanto, os resultados frente a vasodilatação para ACh corroboram nos dois estudos, ou seja, sem alteração. Outros estudos realizados pelo mesmo grupo mostraram que quando a variação do pH é realizada *in vitro* a resposta observada também é diferente, sendo a acidificação extracelular responsável por promover vasodilatação em aorta de rato, mediada pelo NO e canais de K⁺ (Celotto, Restini et al. 2011).

Outros grupos de pesquisadores também mostraram que o pH exerce diferentes efeitos sobre a reatividade vascular. Tais efeitos podem variar de acordo o vaso estudado, o método empregado para variar o pH, assim como todo o delineamento escolhido para o estudo. Hattori et al. (2002) mostraram que ao reduzir o pH do banho para 7.0 utilizando HCl, o relaxamento induzido pela ACh foi aumentado em torno de 25%, e esse efeito foi atribuído a aumento de quase dez vezes na produção de GMPc, em anéis de aorta de rato. Já Lopes et al. (2005) também utilizando HCl para reduzir o pH do banho para 6.8, não observou alteração no relaxamento induzido pela ACh a, em aorta de rato. Além dos resultados observados para relaxamento, esse mesmo estudo mostrou que a vasoconstrição induzida por norepinefrina também não foi alterada, resultado este que se contrapõe aos observados no presente estudo para as curvas com Phe.

Christou et al. (2012), utilizando um modelo de hipertensão pulmonar por hipóxia, observaram que a indução de acidose com NH₄Cl 1,5% por 5 dias melhorou a responsividade da artéria pulmonar de ratos a Phe e ACh, efeito este que não foi observado quando os protocolos foram realizados em artéria mesentérica provenientes dos mesmos animais. Esses resultados reforçam ainda mais a dependência do leito vascular estudado, quando se trata de pH e função vascular.

Empregando um modelo de hipóxia *in vitro*, Besse et al. (2006) observaram que a redução do pH nesse modelo levou a redução tanto da vasoconstrição pela Phe, quanto do relaxamento pela ACh em aorta de ratos.

A diversidade de respostas encontradas nos estudo que relacionam pH e função vascular não estão apenas nos leitos vasculares e agonistas empregados, mas também nos mecanismo que estão mediando tais respostas. No presente

estudo, as alterações de contração observada para Phe e Ang II são, ao menos em partes, mediadas pelo NO. A participação desse mediador químico durante variações do pH também foi observado por diversos autores: aorta de rato (Hattori et al. 2002), artéria cerebral de rato (Horiuchi et al. 2002), artéria pulmonar de leitão (Gordon et al. 2003), artéria pulmonar humana (Mizuno et al. 2002) e aorta de rato (Celotto et al. 2010; Celotto et al. 2011 e Capellini et al. 2013).

6 CONCLUSÕES

A principal conclusão foi que a AMC, desenvolvida segundo o protocolo empregado no presente estudo, promoveu alterações na reatividade da aorta de maneira agonista-seletiva, uma vez que, alterou apenas a contração para Ang II e Phe. O mecanismo envolvido na redução da contração conta com a participação do NO. Embora algumas alterações nos parâmetros ventilatórios tenham sido observadas, estudos mais detalhados do modelo experimental precisam ser realizados para que se possa fazer qualquer afirmação a respeito do comportamento respiratório.

Os dados encontrados ressaltam a importância de pesquisa nessa área, uma vez que acidose metabólica é uma condição comumente presente em situações como sepse, choque cardiogênico e choque hipovolêmico. E sabe-se que esta contribui para o aumento da morbidade e mortalidade em situações graves como as mencionadas acima, por levar à alterações no sistema cardiovascular, ainda que estas não estejam tão bem descritas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ader, J. L., F. Carré, et al. (2005). Fisiologia. Guanabara Koogan: 2005.
- Aires, M. M. Fisiologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S/A: 2008.
- Amaral, R.V.G. - Alterações do Equilíbrio Ácido-Base em Circulação Extracorpórea. In Circulação Extracorpórea. Temas Básicos. São Paulo, 1985.
- Austin, C. and S. Wray (1993). "Extracellular pH signals affect rat vascular tone by rapid transduction into intracellular pH changes." J Physiol **466**: 1-8.
- Austin, C. and S. Wray (2000). "Interactions between Ca(2+) and H(+) and functional consequences in vascular smooth muscle." Circ Res **86**(3): 355-363.
- Bartlett, D., Jr. and S. M. Tenney (1970). "Control of breathing in experimental anemia." Respir Physiol **10**(3): 384-395.
- Besse, S., et al. (2006). "Protection of endothelial-derived vasorelaxation with cariporide, a sodium-proton exchanger inhibitor, after prolonged hypoxia and hypoxia-reoxygenation: effect of age." Eur J Pharmacol **531**(1-3): 187-193.
- Capellini, V. K., et al. (2013). "The effect of extracellular pH changes on intracellular pH and nitric oxide concentration in endothelial and smooth muscle cells from rat aorta." PLoS One **8**(5): e62887.
- Carey, R. M., et al. (2000). "Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function." Hypertension **35**(1 Pt 2): 155-163.
- Carlotti APCP (2012). "Abordagem clínica dos distúrbios do equilíbrio ácido-base." Rev. Medicina (Ribeirão Preto); **45**(2): 244-62 Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/revista>. Acesso em 02/02/17.
- Carvalho, M.H.C et al (2005). "Aspectos farmacológicos dos inibidores da ECA e dos receptores de angiotensina II." Rev Bras Hipertens. **12**(2): p. 97-102.
- Celotto, A. C., et al. (2008). "Effects of acid-base imbalance on vascular reactivity." Braz J Med Biol Res **41**(6): 439-445.
- Celotto, A. C., et al. (2010). "Extracellular alkalinization induces endothelium-derived nitric oxide dependent relaxation in rat thoracic aorta." Nitric Oxide **23**(4): 269-274.
- Celotto, A. C., et al. (2016). "Acute but not chronic metabolic acidosis potentiates the acetylcholine-induced reduction in blood pressure: an endothelium-dependent effect." Braz J Med Biol Res **49**(2): e5007.
- Celotto, A. C., et al. (2011). "Acidosis induces relaxation mediated by nitric oxide and potassium channels in rat thoracic aorta." Eur J Pharmacol **656**(1-3): 88-93.
- Christou, H., et al. (2012). "Improved pulmonary vascular reactivity and decreased hypertrophic remodeling during nonhypercapnic acidosis in experimental pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(9): L875-890.

Cohred (2006). Council on Health Research for Development and Global Forum for Health Research. Ministério da Saúde. p.08.

de Nadai, T. R., et al. (2013). "Metabolic acidosis treatment as part of a strategy to curb inflammation." Int J Inflamm **2013**: 601424.

de Nadai T.R., et al. (2014). "Presentation of na experimental method to induce *in vitro* ("organ chambers") respiratory acidosis and its effect na vascular reactivity." Acta Cirúrgica Brasileira – Vol. 29 (11) 2014 – 711-714.

Dzau, V. J. (1988). "Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis." Circulation **77**(6 Pt 2): 14-13.

Dzau, V. J. (1988). "Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control." J Hypertens Suppl **6**(3): S7-12.

Evora, P. R. B., C. L. Reis, et al. (1999). "Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio ácido-básico: uma revisão prática." Medicina Ribeirão Preto **32**: 451-469.

Evora, P. R. B. "Disfunção Endotelial Vasoplégica e Choque Circulatório." Rio de Janeiro, Editora Atheneu: 2011.

Feldman, G. M. (1989). "Effect of chronic metabolic acidosis on net electrolyte transport in rat colon." Am J Physiol **256**(6 Pt 1): G1036-1040.

Ganong, W. F. (2006). Fisiologia Médica Rio de Janeiro, McGraw Hill Interamericana do Brasil Ltda.

Garcia R. G. et al. "Endotelinas: Importância nas Funções Cardiovasculares." Rev Médica HSVP, 1998. **10**(22): p. 39-47.

Gaskell, W. H. (1880). "On the Tonicity of the Heart and Blood Vessels." J Physiol **3**(1): 48-92.16.

Gordon, J. (2003). "The Pfeifer book of successful leadership development tools. " San Francisco, CA: John Wiley & Sons Inc.

Gurevicius, J., et al. (1995). "Contribution of nitric oxide to coronary vasodilation during hypercapnic acidosis." Am J Physiol **268**(1 Pt 2): H39-47.

Haldane, J. B. (1921). "Experiments on the regulation of the blood's alkalinity: II." J Physiol **55**(3-4): 265-275.

Hall, J. and A. Guyton (2006). Tratado de Fisiologia Médica, Elsevier.

Hattori, K., et al. (2002). "Augmentation of NO-mediated vasodilation in metabolic acidosis." Life Sci **71**(12): 1439-1447.

Horiuchi, T., et al. (2002). "Role of endothelial nitric oxide and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis." Stroke **33**(3): 844-849.

Kryshtal, M. V. (2003). "[Effect of chronic acidosis on protein metabolism]." Fiziol Zh **49**(5): 58-62.

Kubo I., et al. (2007) "Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation." J Agric Food Chem: 34: 970-973.

Lopes, A. C. (2005). Equilíbrio Ácido-Base e Hidroeletrolítico, Atheneu.

Loutzenhiser, R., et al. (1990). "H(+)-induced vasodilation of rat aorta is mediated by alterations in intracellular calcium sequestration." Circ Res **67**(2): 426-439.

Miyauchi, T. and T. Masaki (1999). "Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system." Annu Rev Physiol **61**: 391-415.

Mizuno, S., et al. (2002). "Alkalosis stimulates endothelial nitric oxide synthase in cultured human pulmonary arterial endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(1): L113-119.

Ribeiro, W., et al. (2001). "Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas da angiotensina II em humanos." Rev Bras Hipertens, 2001. **8**(1): p. 114-24.

Rohra, D. K., et al. (2005). "Acidosis-induced relaxation of human internal mammary artery is due to activation of ATP-sensitive potassium channels." Eur J Pharmacol **514**(2-3): 175-181.

Roux, S., et al. (1999). "Endothelin antagonism with bosentan: a review of potential applications." J Mol Med (Berl) **77**(4): 364-376.

Sasamura, H., et al. (1992). "Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome." Biochem Biophys Res Commun **185**(1): 253-259.

Soejima, K., et al. (1996). "Protective effect of B464, a lipid A analog, on endotoxin-induced cellular responses and acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **154**(4 Pt 1): 900-906.

Souza, M. H. L. and D. O. Elias (2006). Fundamentos da circulação extracorpórea. Rio de Janeiro, Centro Editorial Alfa Rio.

Yamane, K. (1994). "Endothelin and collagen vascular disease: a review with special reference to Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis." Intern Med **33**(10): 579-582.

Yoon SeongHun, M. Zuccarello, and Rapoport Robert M. (2012). "pCO₂ and pH regulation of cerebral blood flow." Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3442265/. Acesso em 17/01/17