

## INFLUÊNCIA DA ISQUEMIA-REPERFUSÃO SOBRE A FUNÇÃO VASOMOTORA DE ARTÉRIAS AORTAS ISOLADAS.

PAOLA QUEVEDO DA COSTA<sup>1</sup>; KAREN MARTIRENA MONKS DA SILVA<sup>2</sup>, TAIS KOPP DA SILVEIRA<sup>2</sup>, FERNANDO DIÓGENES TEIXEIRA MEYER<sup>2</sup>, E PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas 1 – [quevedopaola97@gmail.com](mailto:quevedopaola97@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [martirenakaren@gmail.com](mailto:martirenakaren@gmail.com); [taiskopp@hotmail.com](mailto:taiskopp@hotmail.com); [fdtmeyer@gmail.com](mailto:fdtmeyer@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [schenkel.paulo@ufpel.edu.br](mailto:schenkel.paulo@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A modulação do tônus vascular é de extrema importância para determinação do fluxo sanguíneo dos tecidos. Sua regulação deve ser precisa a fim de garantir o suprimento adequado que varia em diferentes condições. Neste contexto, o endotélio vascular exerce ação importante por estar diretamente envolvido na síntese e na secreção de substâncias vasoativas como, por exemplo, o óxido nítrico (NO) e a endotelina, moléculas que atuam na regulação do tônus vascular sob diferentes estímulos. A ação contrarregulatória desses e de outros agentes vasodilatadores e vasoconstritores determina a tensão do músculo liso vascular. Portanto, um desbalanço favorável aos constritores pode contribuir com a piora funcional e estar associado em doenças como o infarto agudo do miocárdio, isquemias transitórias, hipertensão arterial, hipertensão arterial pulmonar, dentre outras (CERQUEIRA, et al., 2002).

A síndrome de isquemia-reperfusão é um conceito coletivo que reúne diversas condições patológicas que se desenvolvem no contexto da restauração do fluxo sanguíneo principal em um órgão ou segmento de membro que foi submetido à isquemia por um longo período (NEIMARK MI, 2021). Estudo deste problema aparentemente começou em 1881, quando R. VonVolkman descreveu contratura muscular associada à isquemia após fratura do membro. Níveis muito mais elevados de produção de radicais livres de oxigênio são induzidos imediatamente após a reperfusão devido à reintrodução repentina de altas tensões de oxigênio, levando a danos oxidativos nas estruturas celulares, como início da peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e oxidação do DNA (XIANG et al., 2021). Com isso, esse trabalho teve como objetivo determinar a influência da isquemia-reperfusão sobre a função vasomotora de artérias aortas isoladas.

### 2. METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pela comissão de ética e uso de animais da UFPel (CEUA 047712/2023-4).

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas com, aproximadamente, 60 dias provenientes do Biotério Central. Esses foram devidamente eutanasiados para retirada cuidadosa da artéria aorta que, após serem limpas do tecido adiposo, foram seccionadas transversalmente em anéis de aproximadamente 3 mm. Os anéis foram então fixados em ganchos de aço inoxidável à alavanca de um transdutor de deslocamento de força (TIM-100, AVS) e mantidos em solução de Krebs-Henseleit (37°C, pH 7,4) e aerados continuamente com carbogênio (CO<sub>2</sub> 95% e O<sub>2</sub> 5%)

Uma vez fixados no aparelho e estabilizados por 30 minutos, os vasos foram testados quanto sua capacidade contrátil e de relaxamento conforme protocolos descritos abaixo.

**Protocolo 1 (Integridade do vaso):** adição de cloreto de potássio (KCl, 80 mM) para avaliarmos a integridade funcional do vaso e para obtermos a tensão máxima.

**Protocolo 2 (Resposta Basal):** os vasos foram pré contraídos com fenilefrina ( $10^{-6}$  M) e, em ato contínuo, submetidos a uma curva de acetilcolina (Ach  $10^{-9}$  até  $10^{-4}$  M) para análise da resposta vasodilatadora dependente do endotélio (PEÇANHA G.A.W., 2008).

**Protocolo 3 (ISC 1h e 3 h):** aortas mantidas em solução de Krebs modificada (sem glicose e sem aerar com mistura de carbogênio O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%) por 1h ou 3h. Ao término desse período, essas foram testadas novamente conforme protocolo 2.

**Protocolo 4 (REP 1:30h e 3:30h):** após período de isquemia descrito no protocolo 3, os vasos foram reperfundidos por 30 minutos e testados novamente conforme protocolo 2. Para isso, o meio de incubação foi trocado para solução de Krebs-Henseleit e foram aerados com carbogênio.

**Protocolo 5 (NPS):** ao final do experimento, a resposta vasodilatadora independente do endotélio foi avaliada. Para isso, os vasos foram pré contraídos com fenilefrina ( $10^{-6}$  M) e submetidos a uma curva com nitroprussiato de sódio (NPS  $10^{-9}$  até  $10^{-4}$  M) (PEÇANHA G.A.W., 2008).

Assim, os grupos experimentais foram assim divididos:

- 1) Grupo sem endotélio (e-);
- 2) Grupo com endotélio (e+);
- 3) Grupo em que as artérias aortas foram testadas após 1h para avaliarmos a influência do tempo nas respostas (e+ CTRL 1h);
- 4) Grupo em que as artérias aortas foram testadas após 3h para avaliarmos a influência do tempo nas respostas (e+ CTRL 3h);
- 5) Grupo em que as artérias aortas foram testadas após 1h de isquemia (e+ ISC 1h);
- 6) Grupo em que as artérias aortas foram testadas após 3h de isquemia (e+ ISC 3h);
- 7) Grupo em que as artérias aortas foram testadas após 1:30h para avaliarmos a influência do tempo nas respostas (e+ CTRL 1:30h);
- 8) Grupo em que as artérias aortas foram testadas após 3:30h para avaliarmos a influência do tempo nas respostas (e+ CTRL 3:30h);
- 9) Grupo em que as artérias aortas foram submetidas à isquemia de 1 hora e testadas após 30min de serem reperfundidas (e+ REP 1);
- 10) Grupo em que as artérias aortas foram submetidas à isquemia de 1 hora e testadas após 30min de serem reperfundidas (e+ REP 3);

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de viabilidade dos vasos utilizando KCl mostrou aumento da tensão em  $1,14 \pm 0,30$  g/f, corroborando achados de Delbin M.A., e indicando que estavam aptos para realização dos testes de reatividade (DELBIN M.A., 2009). Logo após, foi testada a resposta de relaxamento dependente do endotélio de todos os vasos. Nesse, a presença do endotélio foi determinante para promover o relaxamento em resposta a Ach, resultado que serviu como resposta basal pré-isquemia/reperfusão. Assim como nosso trabalho, Tseng et al., mostraram uma curva inicial, para verificar a integridade e capacidade de relaxamento pós contração com dose única de fenilefrina, o que é importante para podermos comparar com a curva posterior, servindo assim, como uma curva de referência (TSENG et al., 2022). Quando expostos ao período de isquemia, observamos que 3h em isquemia promoveu prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio e que 1h de isquemia não alterou essa resposta, tendo resultados semelhantes ao observado no teste basal. Esses achados foram importantes para que pudéssemos determinar o melhor tempo de isquemia. Visando avaliar não apenas a influência da isquemia, mas também do tempo em que os vasos ficaram expostos, partimos para análise do tempo sobre a resposta vasodilatadora. Observamos um prejuízo na resposta vasodilatadora após 1 hora de incubação (grupo e+ CTRL 1h) e que foi ainda mais pronunciado após 3 horas em relação à resposta basal. Da mesma forma, Granado et al., utilizou a reatividade vascular para avaliar a influência da isquemia/reperfusão na resposta vasoconstritora e vasodilatadora, e Hashimoto et al., avaliou os efeitos do tônus vascular nos períodos pré e pós isquemia, analisando assim como nosso estudo, a questão temporal envolvida nas respostas (GRANADO et al., 2022) (HASHIMOTO et al., 1991).

Ao final dos períodos de isquemia os vasos foram reperfundidos por 30 minutos e reavaliados. Enquanto que o grupo reperfundido após 3h de isquemia (e+ REP 3) apresentou apenas 40% de relaxamento, seu grupo controle temporal (e+ CTRL 3:30) relaxou mais do que 60%. Já o grupo reperfundido após 1h de isquemia (e+ REP 1) teve relaxamento, em torno de 80%, semelhante ao seu controle temporal (grupo e+ CTRL 1:30). De forma semelhante, Worku et al., também avaliou respostas da funcionalidade dos vasos em modelo de isquemia/reperfusão (Worku et al., 2010). Os grupos controle apresentaram comportamento semelhantes quando avaliados após 1:30 e 3:30 min, sendo que ambos tiveram um prejuízo parcial do relaxamento ( $\pm 50\%$ ) quando comparado ao e+basal. Ao final dos experimentos, os vasos foram submetidos à curva de NPS para determinação da resposta independente do endotélio. Observamos que todas as aortas tiveram relaxamento semelhante, inclusive os vasos sem endotélio. Respostas independente de endotélio também foram avaliadas por Peçanha G.A.W, mostrando que seus resultados vão ao encontro dos nossos achados (PEÇANHA G.A.W., 2008).

### 4. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que o tempo de 3 horas de isquemia induziu prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, sendo o mais indicado para testes com potenciais agentes cardioprotetores no modelo *ex-vivo*. Além disso, o tempo de incubação também se mostrou um fator determinante na resposta vasodilatadora, devendo ser considerado em futuras análises.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

DELBIN, Maria Andréia. Reatividade vascular de artérias mesentérica e pulmonar de ratos após isquemia/reperfusão pulmonar: efeito do treinamento físico. 2009.

GRANADO M, González-Hedström D, Amor S, Fajardo-Vidal A, Villalva M, de la Fuente-Fernández M, Tejera-Muñoz A, Jaime L, Santoyo S, García-Villalón AL. Marjoram extract prevents ischemia reperfusion-induced myocardial damage and exerts anti-contractile effects in aorta segments of male wistar rats. *J Ethnopharmacol*. 2022. doi: 10.1016/j.jep.2021.114660.

HASHIMOTO, Kazuhiro, Pearson, Paul J., Schaff, Hartzell V., Cartier, Raymond. Endothelial cell dysfunction after ischemic arrest and reperfusion: A possible mechanism of myocardial injury during reflow. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1991. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)36858-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)36858-8)

NEIMARK MI. Sindrom ishemii-reperfuzii [Ischemia-reperfusion syndrome]. *Khirurgiia (Mosk)*. 2021;(9):71-76. Russian. doi: 10.17116/hirurgia202109171. PMID: 34480458.

PEÇANHA, Giulia Alessandra Wiggers. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos. 2008. 163 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

TSENG, Tzu-Ling et al. “Oroxylin-A and its phosphonate derivative potentiate eNOS/NO-mediated relaxation and attenuate vasoconstrictor-induced contraction in the mouse aorta.” *Journal of pharmacological sciences* vol. 150,4 (2022): 223-232. doi:10.1016/j.jphs.2022.09.007

XIANG, M., Lu, Y., Xin, L., Gao, J., Shang, C., Jiang, Z., Lin, H., Fang, X., Qu, Y., Wang, Y., Shen, Z., Zhao, M., & Cui, X. (2021). Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6614009>.

WORKU Abebe, Jun Yao Liu, Hereward Wimborne, Mahmood S. Mozaffari, Effects of chromium picolinate on vascular reactivity and cardiac ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats, *Pharmacological Reports*, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70324-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70324-8).