



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAMILA BORECKI VIDIGAL

**TRATAMENTO COM TOPIRAMATO NA INFÂNCIA:  
EFEITOS ADVERSOS A CURTO E LONGO PRAZO EM  
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E METABÓLICOS DE  
RATOS E RATAS WISTAR**

CAMILA BORECKI VIDIGAL

**TRATAMENTO COM TOPIRAMATO NA INFÂNCIA:  
EFEITOS ADVERSOS A CURTO E LONGO PRAZO EM  
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E METABÓLICOS DE  
RATOS E RATAS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Graziela Scianti Ceravolo

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

V653t Vidigal, Camila Borecki.  
Tratamento com topiramato na infância : efeitos adversos a curto e longo prazo em parâmetros cardiovasculares e metabólicos de ratos e ratas Wistar / Camila Borecki Vidigal. - Londrina, 2022.  
74 f. : il.

Orientador: Graziela Scialanti Ceravolo.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Antiepiléptico - Tese. 2. DOHaD - Tese. 3. Endotélio vascular - Tese. 4. Reatividade da aorta - Tese. I. Ceravolo, Graziela Scialanti . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

CAMILA BORECKI VIDIGAL

**TRATAMENTO COM TOPIRAMATO NA INFÂNCIA:  
EFEITOS ADVERSOS A CURTO E LONGO PRAZO EM  
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E METABÓLICOS DE  
RATOS E RATAS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA  
Titulares**

---

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Graziela Scialanti  
Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Himori Akamine  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos  
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

---

Dr. Tiago Januário da Costa  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

## **Suplentes**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniella Bonaventura  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rubia Casagrande  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andressa de Freitas Mendes Dionísio  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Fabio Goulart de Andrade  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 15 de julho de 2022

Dedico este trabalho em memória de meu pai, minha eterna inspiração na busca de conhecimento. Também dedico este trabalho à minha avó Mercedes, que me acolheu, que foi avó, que foi mãe, que deu força e luz no decorrer da minha trajetória acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Que momento é esse, de parar para descrever os agradecimentos desse percurso... Um filme passa em minha mente!

Primeiramente, agradeço a Deus, ao maestro deste Universo, pelo dom da vida e pelas oportunidades proporcionadas.

Agradeço ao apoio da minha família, em especial à minha avó Mercedes. Eu não teria chegado até aqui sem sua ajuda, sem seu apoio. A senhora é peça fundamental para que essa garota, vinda do interior, esteja finalizando esta longa e desafiadora trajetória. Quem me conhece sabe como meus olhos brilham ao falar de ti, és a mulher mais incrível que já conheci!!!

Por falar em mulheres incríveis... Professora Graziela, nos conhecemos quando eu ainda estava no segundo ano da faculdade, uma aluna do curso de fisioterapia interessada nas aulas de farmacologia...Um pouco distante do contexto ali presente... Quem diria, que essa aluna da fisioterapia seria uma de suas alunas de mestrado e doutorado na área de farmacologia, em um laboratório repleto de farmacêuticos e biomédicos?! Sou extremamente grata pela sorte que tive, em ter uma orientadora como você! Aprendi contigo a ser pesquisadora, a ter um olhar crítico, a escrever um artigo científico, a buscar ser o meu melhor nas condições disponíveis, que sabemos que são deficitárias no ambiente de pesquisa científica deste país... Obrigada professora pelos seus ensinamentos, pela sua paciência, pelo seu apoio e compreensão ao longo de todos esses anos. Saiba que terá meu respeito e admiração eterna, independente do percurso que a vida me direcionar daqui em diante!

Não posso interromper o tópico de mulheres incríveis, pois fui privilegiada em ter várias em minha vida... Agradeço a minha mãe, por sempre incentivar e apoiar minhas escolhas. Agradeço à tia Solange, que contribuiu literalmente para a execução desta pesquisa. Agradeço à tia Dirce, que embora não contabilizado para comprovação, quantas vezes não escutou minhas lamentações e inseguranças? Agradeço às grandes mulheres do Laboratório de Farmacologia Vascular da UEL... Kaw, Deborah, Carol, Dani... Vocês são incríveis, e sempre torcerei por vocês. Aprendi muito com estas maravilhosas farmacêuticas!!! Além de aprender

profissionalmente com vocês, cada uma me proporcionou uma lição de vida diferente, vocês são guerreiras e de histórias admiráveis!!! Um agradecimento em especial para Kaw e Deborah, quantos finais de semana não passamos juntas naquela UEL fazendo experimentos e tratamento?! Foi trabalhoso, mas estamos colhendo bons frutos do “projeto Top”! Agradeço também às ICs do Laboratório de Farmacologia Vascular, em especial, a Rafa e a Ju, que auxiliaram na execução deste projeto!

Deixo meus agradecimentos às colaborações, que sem a ajuda de vocês não teria obtido resultados tão incríveis! Obrigada professor Fábio Goulart, pelo auxílio na histologia. Obrigada Lorena Borges e professora Daniela Gerardin, pela parceria na execução do projeto e tratamento dos animais. Obrigada professora Maria do Carmo pelo auxílio na idealização do projeto. Obrigada Tiago Januário e professora Rita Tostes por abrirem as portas do laboratório e permitir aprender com vocês as análises moleculares. Obrigada professora Rubia Casagrande pelo auxílio no teste NBT. Obrigada Kenny Gutemberg e professora Gislaine Gomes pela análise da pressão arterial.

Não posso deixar de agradecer às minhas grandes amigas, Camila, Barbara e Lorena! Obrigada pelo suporte nos momentos de crise, pela compreensão nos momentos de ausência, pela rica amizade que temos!

Agradeço aos homens de minha vida! Primeiramente ao meu esposo Argel, que vivenciou as dores e as delícias de conviver com uma doutoranda... Obrigada pelo seu apoio, pela sua paciência e compreensão. Obrigada aos meus irmãos, Tiago e Júlio Cezar, que mesmo com a distância, sempre se mantiveram presentes. Tenho certeza de que nosso pai está orgulhoso lá de cima, por ver os caminhos que trilhamos!

Deixo meus agradecimentos à CAPES pela bolsa e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Deixo meus agradecimentos aos técnicos do laboratório de Fisiologia da UEL, em especial, a Fujiko, por todo cuidado e atenção que tens com os alunos da pós-graduação.

Agradeço aos animais que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço aos professores do departamento de Ciências Fisiológicas, por todo conhecimento compartilhado ao longo destes anos. Tive a oportunidade de aprender também com professores das instituições nucleadoras, USP e UFMG... como já dizia Cora Carolina “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”. Meus sinceros agradecimentos a todos vocês!

Não posso deixar de expressar minha gratidão à minha terapeuta, Lisiane! Que pessoa incrível você é, não só profissionalmente, mas como ser humano. Obrigada por me ajudar a enxergar novas perspectivas!

“Isso vos digo: é preciso ter ainda um caos dentro de si para gerar uma estrela dançarina”

“E sejam quais forem meus destinos e minhas experiências vividas, sempre implicarão caminhada e escalada de montanhas. Em suma, não se vive outra experiência, senão a si mesmo”

*Friedrich Nietzsche*

VIDIGAL, Camila Borecki. **Tratamento com topiramato na infância:** efeitos adversos a curto e longo prazo em parâmetros cardiovasculares e metabólicos de ratos e ratas Wistar. 2022. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

O topiramato (TPM) é um fármaco da nova geração de antiepilépticos (AEDs) amplamente usado na população pediátrica. Recentemente, o uso de TPM em crianças e adolescentes foi associado ao aumento de marcadores de risco vascular. É bem estabelecido o papel do endotélio na modulação do tônus e homeostase do sistema vascular. De fato, a disfunção endotelial é um evento precoce no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Entretanto, até o momento, não existem estudos avaliando os efeitos do uso de TPM sobre a função endotelial. Atualmente, é reconhecido que a exposição a fármacos em fases críticas do desenvolvimento do organismo, como a infância, pode favorecer o estabelecimento de doenças na vida adulta. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a função cardiovascular de ratos e ratas adultos tratados com TPM durante a infância. Além disso, os efeitos adversos a curto (24h após o término do tratamento) e longo prazo (vida adulta) do tratamento com TPM sobre parâmetros metabólicos foram investigados. Para tanto, ratos e ratas Wistar foram tratados com TPM (41mg/kg) ou água (grupo CTR) por gavagem do dia pós-natal (DPN)16 ao 28. Na vida adulta (ratos no DPN 120; ratas a partir do DPN 85, no estro fisiológico), a reatividade da aorta torácica foi avaliada *in vitro* ao vasoconstritor fenilefrina (Fenil) e aos vasodilatadores acetilcolina e nitroprussiato de sódio. A comparação entre os grupos CTR e TPM foi feita utilizando a resposta máxima para os fármacos ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e  $pD_2$  (-log da concentração do fármaco que causa 50% da  $R_{m\acute{a}x}$ ). Também foi investigado o papel dos fatores contráteis derivados do endotélio na disfunção vascular induzida pelo TPM, a espessura da aorta torácica, e a expressão das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), NOX-2 e p47phox na aorta. Ainda, parâmetros cardiovasculares de pressão arterial e frequência cardíaca foram avaliados por método direto. No que se refere aos parâmetros metabólicos, foram analisados o perfil lipídico, consumo de ração, peso corporal, Índice de Lee, peso de tecido adiposo branco (TAB, retroperitoneal e perigonadal) e marrom (TAM) dos animais. Como resultado, foi evidenciado hiperreatividade para Fenil em ratos e ratas TPM quando comparadas com as respostas no grupo CTR. Nos ratos TPM, a  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil foi restaurada pela inibição da NADPH oxidase e da COX-2, enquanto que nas ratas TPM, a  $R_{m\acute{a}x}$  foi restaurada apenas pela inibição da COX-2. Além disso, ratos TPM apresentaram hipertrofia da aorta, e expressão aumentada de NOX-2 e p47phox, enquanto ratas TPM apresentaram expressão aumentada de COX-2 em comparação aos seus respectivos CTR. Por outro lado, ratos e ratas TPM não apresentaram alterações na vasodilatação e nos demais parâmetros cardiovasculares avaliados. No que se refere aos parâmetros metabólicos, o tratamento com TPM não interferiu no consumo de ração, peso corporal e perfil lipídico, sendo estes semelhantes aos observados no grupo CTR. Entretanto, foi demonstrado que o tratamento com TPM reduziu os depósitos de TAB em machos a curto e longo prazo, e reduziu os depósitos de TAM em fêmeas a longo prazo quando esses parâmetros foram comparados com os dos CTR. Em conjunto, o presente estudo fornece evidências, pela primeira vez, que o tratamento

com TPM durante a infância causa disfunção vascular sexo-específica na vida adulta. Ademais, o efeito do TPM sobre o tecido adiposo diferiu entre machos e fêmeas. Assim, o TPM é capaz de afetar o padrão saúde-doença de maneira sexo-específica.

**Palavras-chave:** antiepiléptico; DOHaD; endotélio vascular; reatividade da aorta; tecido adiposo; perfil lipídico; pressão arterial; diferenças sexuais.

VIDIGAL, Camila Borecki. **Topiramate treatment in childhood:** short- and long-term adverse effects on cardiovascular and metabolic parameters in male and female Wistar rats. 2022. 81 p. Thesis (PhD in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

Topiramate (TPM) is a new generation of antiepileptic drugs (AEDs) widely used in the pediatric population. Recently, the use of TPM in children and adolescents has been associated with increased vascular risk markers. The role of the endothelium in the modulation of tone and homeostasis in the vascular system is well established. In fact, endothelial dysfunction is an early event in the development of cardiovascular disease. However, as far as we know, there are no studies evaluating the effects of TPM use on endothelial function. Currently, it is recognized that exposure to drugs in critical stages of the organism's development, such as childhood, can favor the establishment of diseases in adult life. Given the above, the aim of the study was to evaluate the cardiovascular function of adult rats and rats treated with TPM during childhood. In addition, the short-term (24h after the end of treatment) and long-term (adult life) adverse effects of TPM treatment on metabolic parameters were investigated. For the purpose, male and female Wistar rats were treated with TPM (41mg/kg) or water (CTR group) by gavage from postnatal day (PND) 16 to 28. In adulthood (males at PND 120; females from PND 85, always in physiological estrus), the reactivity of the thoracic aorta was evaluated *in vitro* to the vasoconstrictor phenylephrine (Phenyl) and to the vasodilators acetylcholine and sodium nitroprusside. The comparison between the CTR and TPM groups was made through the maximum response to the drug (maxR) and pD<sub>2</sub> (-log of the drug concentration that causes 50% of the maxR). We also investigated the role of endothelium-derived contractile factors in TPM-induced vascular dysfunction, thoracic aortic thickness, and aortic expression of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), NOX-2 and p47phox. In addition, cardiovascular parameters of blood pressure and heart rate were evaluated by direct method. Regarding the metabolic parameters, the lipid profile, food consumption, body weight, Lee Index, white (WAT, retroperitoneal and perigonadal) and brown (BAT) adipose tissue weights of the animals were analyzed. As a result, aortic hyperreactivity to Phenyl was evidenced in male and female TPM rats as compared to CTR groups. In TPM males, maxR for Phenyl was restored inhibiting NADPH oxidase and COX-2, while in TPM females the maxR was restored only by COX-2 inhibition. Furthermore, TPM male showed aortic hypertrophy, and increased expression of NOX-2 and p47phox, while TPM females showed increased aortic expression of COX-2 compared to their respective controls. On the other hand, the vasodilation and cardiovascular parameters was similar between CTR and TPM rats. Regarding the metabolic parameters, the treatment with TPM did not interfere in the food consumption, body weight and lipid metabolism when compared with CTR. However, treatment with TPM reduced WAT deposits in male rats in the short and long term, and to reduce BAT deposits in female rats in the long-term in comparison with CTR values. Taken together, the present study provides evidence for the first time that TPM treatment during childhood causes sex-specific vascular dysfunction in adulthood. Furthermore, the effect of TPM on adipose tissue differed between male and female. Thus, TPM can affect the health-disease pattern in a sex-specific manner.

**Keywords:** antiepileptic; DOHaD; vascular endothelium; aortic reactivity; adipose tissue; lipid profile; blood pressure; sex differences.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Delineamento experimental.....	31
<b>Figura 2.</b>	Curvas concentração efeito-cumulativa para fenilefrina em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância.....	40
<b>Figura 3.</b>	Curvas concentração efeito-cumulativas para acetilcolina e nitruprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância .....	42
<b>Figura 4.</b>	Efeitos de antioxidantes e da inibição das cicloxigenases na resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio de ratos e ratas adultos tratados com ou água durante a infância.....	45
<b>Figura 5.</b>	Expressão de NOX-2 e p47phox na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância .....	48
<b>Figura 6.</b>	Expressão das cicloxigenases na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância .....	49
<b>Figura 7.</b>	Concentração de ânion superóxido em amostras de soro de ratos adultos tratados com topiramato ou água durante a infância.....	50
<b>Figura 8.</b>	Fotomicrografias representativas de secção transversal da aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância.....	51
<b>Figura 9.</b>	Acompanhamento diário da massa corpórea de ratos e ratas tratados com topiramato ou água durante a infância .....	53
<b>Figura 10.</b>	Consumo de ração de ratos e ratas tratados com topiramato ou água durante a infância.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância.....	41
<b>Tabela 2.</b> Resposta relaxante à acetilcolina e nitroprussiato de sódio em anéis de aorta isolados de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância .....	43
<b>Tabela 3.</b> Efeito da inibição da NADPH oxidase e das cicloxigenases na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância .....	46
<b>Tabela 4.</b> Efeito da inibição da cicloxigenase-2 na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância .....	47
<b>Tabela 5.</b> Pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância.....	52
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros biométricos de ratos 24h após o término do tratamento com topiramato ou água e na vida adulta.....	55
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros biométricos de ratas 24h após o término do tratamento com topiramato ou água e na vida adulta.....	56
<b>Tabela 8.</b> Ensaios bioquímicos de ratos e ratas 24h após o término do tratamento com topiramato ou água e na vida adulta.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEDs:	drogas antiepilépticas
ACh:	acetilcolina
AMPA:	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
Ang II:	angiotensina II
bpm:	batimentos por minuto
BW:	<i>Body weight</i>
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais
CCEC:	curvas concentração efeito cumulativas
CNA:	comprimento naso-anal
CMLV:	células do músculo liso vascular
Concea:	Controle Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX:	ciclooxigenase
CTR:	grupo controle
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNA:	ácido desoxirribonucleico
DOHaD:	Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (do termo em inglês <i>Developmental Origins of Health and Disease</i> )
DPN:	dia pós-natal
EDCF:	fatores contráteis derivados do endotélio
EDRF:	fatores relaxantes derivados do endotélio
Endo-:	sem endotélio
Endo+:	com endotélio
E1:	estrona
E2:	estradiol
E3:	estriol
E4:	estretol
eNOS:	óxido nítrico sintase endotelial
EPM:	erro padrão da média
ER:	receptores estrogênicos (do termo em inglês <i>estrogen receptor</i> )
FC:	frequência cardíaca
FDA:	<i>Food and drug administration</i>
Fenil:	fenilefrina

GABA:	ácido gama-aminobutírico
HDACs:	histonas desacetilases
HDL:	lipoproteína de alta densidade
IL:	índice de Lee
IMC:	índice de massa corporal
ip:	intraperitoneal
LDL:	lipoproteína de baixa densidade
MAPK:	proteína quinase ativada por mitógeno
NADPH oxidase:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NBT:	nitroazul tetrazólio
NO:	óxido nítrico
NOX-2:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase não fagocítica
NPS:	nitroprussiato de sódio
NS-398:	inibidor seletivo da cicloxigenase 2
PAD:	pressão arterial diastólica
PAM:	pressão arterial média
PAS:	pressão arterial sistólica
pD2:	-log da concentração do agonista que causa 50% da resposta máxima
PFA:	paraformaldeído
PGI2:	prostaciclina
R <sub>máx</sub> :	resposta máxima
SNC:	sistema nervoso central
SOD:	superóxido dismutase
EROs:	espécies reativas de oxigênio
TAB:	tecido adiposo branco
TAM:	tecido adiposo marrom
TPM:	topiramato/grupo topiramato
UCP-1:	proteína desacopladora 1
UEL:	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1 MODELO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO	29
3.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES A LONGO PRAZO	31
3.2.1 Reatividade Vascular	31
3.2.2 Quantificação Proteica Por Western Blotting	33
3.2.3 Dosagem De Ânion Superóxido	34
3.2.4 Análise Histológica Da Aorta Torácica	34
3.2.5 Parâmetros Cardiovasculares Por Método Direto	35
3.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS A CURTO E LONGO PRAZO	36
3.3.1 Avaliação Do Consumo De Ração	36
3.3.2 Parâmetros Biométricos	37
3.3.3 Análise Bioquímica	37
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES A LONGO PRAZO	39
4.1.1 Avaliação Da Resposta Contrátil E Relaxante Da Aorta Torácica De Ratos E Ratas Adultos Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância	39
4.1.2 Papel Dos Fatores Contráteis Derivados Do Endotélio Na Hiper-reatividade Para Fenilefrina Na Aorta Torácica De Ratos E Ratas Adultos Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância	43
4.1.3 Expressão Proteica Das Cicloxigenases, NOX2 e p47phox Na Aorta Torácica De Ratos E Ratas Adultos Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância	47

4.1.4	Avaliação De Ânion Superóxido Pelo Método NBT Em Amostras De Soro De Ratos Adultos Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância .....	50
4.1.5	Histologia Da Aorta Torácica De Ratos E Ratas Adultos Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância .....	50
4.1.6	Pressão Arterial E Frequência Cardíaca De Ratos E Ratas Adultos Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância .....	51
4.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS A CURTO E LONGO PRAZO.....	52
4.2.1	Acompanhamento De Massa Corpórea Durante O Tratamento Em Ratos E Ratas Tratados Com Topiramato Ou Água.....	52
4.2.2	Consumo De Ração A Curto E Longo Prazo De Ratos E Ratas Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância .....	53
4.2.3	Parâmetros Biométricos A Curto E Longo Prazo De Ratos E Ratas Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância .....	54
4.2.4	Análise Bioquímica A Curto E Longo Prazo De Ratos E Ratas Tratados Com Topiramato Ou Água Durante A Infância .....	56
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento da epilepsia, tanto em adultos quanto em crianças, baseia-se principalmente no uso de antiepiléticos (AEDs). AEDs consistem em um amplo grupo heterogêneo de fármacos que exibem diferentes mecanismos de ação, sendo estes classificados em primeira, segunda e terceira gerações, ou simplesmente em antiga e nova gerações de AEDs.

O uso prolongado de AEDs de antiga geração, como carbamazepina, valproato e fenitoína, é amplamente associado a distúrbios no metabolismo lipídico, aumento de peso corporal e risco aumentado para o desenvolvimento de aterosclerose (TAN et al., 2009; MINTZER, 2010; CHUANG et al., 2012; CHUKWU et al., 2014; VYAS et al., 2015). Estes anticonvulsivantes são conhecidos pelos seus efeitos sobre o sistema enzimático hepático, sendo potentes indutores ou inibidores do citocromo P450 (TAN et al., 2009; CHUANG et al., 2012). Nesse contexto, espera-se que as AEDs de nova geração, por exercerem menores efeitos sobre o sistema enzimático hepático, minimizem os distúrbios metabólicos e os riscos cardiovasculares, bem como doenças relacionadas à aterosclerose, causadas pelo uso prolongado dos anticonvulsivantes (CHUANG et al., 2012). Entretanto, o perfil de efeitos adversos cardiometabólicos dos AEDs de nova geração não é claro na literatura.

O topiramato (TPM) é um antiepilético de nova geração aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para o tratamento da epilepsia em crianças a partir dos 2 anos de idade (CHUANG et al., 2012; ANVISA, 2013). Existem vários mecanismos de ação pelos quais o TPM atenua a excitabilidade neuronal: bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem; potencialização da ação do ácido gama-aminobutírico (GABA) por efeito modulador nos receptores GABA-A; redução da atividade excitatória do glutamato por meio da inibição dos receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e cainato; inibição de canais para cálcio tipo L e inibição de anidrase carbônica, especificamente II e IV (ZHANG et al., 2000; CHUNG; EILAND, 2008; LIN, 2011; CLARK et al., 2013; SILBERSTEIN, 2017). Por outro lado, os mecanismos de ação periféricos do TPM são pouco explorados.

Embora o perfil de eficácia e efeitos adversos do TPM não serem completamente estabelecido, alguns ensaios clínicos sugerem que este fármaco pode ser uma alternativa eficaz para o tratamento de epilepsia em crianças menores de 2 anos de idade (WATEMBERG et al., 2003; VALENCIA et al., 2005). Além disso, o TPM tem sido usado na população pediátrica como *off-label* em outras condições, como obesidade e profilaxia da enxaqueca (BEN-MENACHEM et al., 2008; CZEPIEL et al., 2020; WU et al., 2020). Estas, são situações extremamente delicadas quando se considera o conceito de “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença”, do termo em inglês *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD).

O conceito DOHaD traz evidência de que as exposições ambientais durante períodos críticos de crescimento e desenvolvimento podem afetar a suscetibilidade e o risco de desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, como doenças cardiovasculares e metabólicas (BARKER; OSMOND, 1988; BARKER et al., 1989; OSMOND; BARKER, 2000; GLUCKMAN, 2008). Isso é plausível, uma vez que as influências ambientais durante o desenvolvimento levam a mudanças no epigenoma, por meio de mecanismos moleculares que estabelecem e mantêm padrões estáveis de expressão gênica sem alterar a sequência do DNA, em conjunto denominados mecanismos epigenéticos (GLUCKMAN et al., 2009).

A plasticidade do desenvolvimento é o fenômeno pelo qual um único genótipo pode dar origem a uma série de diferentes estados fisiológicos e/ou morfológicos em resposta a diferentes condições ambientais durante o desenvolvimento (WEST-EBERHARD, 2005; PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2016). Nesse sentido, o uso prolongado TPM durante períodos importantes de plasticidade do desenvolvimento, como a infância, pode estar associado a consequências em longo prazo para o organismo.

A monoterapia com TPM foi associada ao aumento de marcadores de risco vascular em crianças e adolescentes, tais como dislipidemia, hiperhomocisteinemia e aumento da espessura média-intimal da artéria carótida (EL-FARAHATY et al., 2015). Curiosamente, o TPM demonstrou exercer efeitos epigenéticos em células humanas, atuando como um inibidor de desacetilases de histonas (HDACs), que induz a hiperacetilação de histonas (EYAL et al., 2004; KONG; MA; ZHONG, 2020). Conforme já estabelecido na literatura, as HDACs são

importantes no sistema cardiovascular, pois participam do controle de processos como hipertrofia, fibrose, apoptose e metabolismo energético (KONG; MA; ZHONG, 2020). Considerando que a infância é um período importante de plasticidade do desenvolvimento, que o tratamento com TPM foi associado a um aumento de marcadores de risco vascular em crianças e que demonstrou exercer efeitos epigenéticos em células humanas, estudos investigando as consequências tardias do uso desse fármaco sobre o sistema cardiovascular são extremamente necessários.

A disfunção endotelial é um evento precoce que sinaliza o surgimento de doenças cardiovasculares, como aterosclerose e hipertensão (VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006; MELO et al., 2007; MARCHIO et al., 2019). Isso não é surpreendente, dado o papel das células endoteliais na homeostase vascular. O endotélio, além de proporcionar uma barreira física entre o fluxo sanguíneo e o músculo liso vascular, também atua como sensor de alterações hemodinâmicas, tem papel na angiogênese, coagulação e fibrinólise, produz mediadores que interferem no crescimento, atividade, migração e morte celular (KHADDAJ MALLAT et al., 2017; KRÜGER-GENGE et al., 2019).

Ademais, o endotélio produz e libera substâncias que modulam o tônus vascular. Essas substâncias são conhecidas como fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCF). Os EDRF incluem o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), fator hiperpolarizante do endotélio. Já os EDCF consistem nas espécies reativas de oxigênio (EROs), prostanóides vasoconstritores, endotelina-1 e angiotensina II (Ang II) (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). A disfunção endotelial é essencialmente definida como um desequilíbrio entre a produção e/ou ação de fatores contráteis e relaxantes liberados pelo endotélio (DHANANJAYAN et al., 2016; VANHOUTTE et al., 2017). A condição de disfunção dessas células predispõe a vasculatura um perfil pró-trombótico e pró-aterogênico, envolvendo vasoconstrição, aderência leucocitária, ativação plaquetária, mitogênese, coagulação prejudicada, inflamação vascular, pró-oxidação e remodelamento vascular (DHANANJAYAN et al., 2016). Em conjunto, esses fatores contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (WIDLANSKY; MALIK, 2015; VANHOUTTE et al., 2017).

O estresse oxidativo desempenha papel fundamental no desenvolvimento da disfunção endotelial e remodelação vascular (WIDLANSKY; MALIK, 2015). O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROS e sua detoxificação pelos sistemas antioxidantes, sendo a NADPH oxidase considerada a principal fonte enzimática de ânion superóxido na vasculatura (INCALZA et al., 2018). Este complexo enzimático, pela transferência de elétrons reduz o  $O_2$  em ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), usando o NADPH como doador de elétrons (DRUMMOND; SOBEY, 2014). Em altas concentrações o ânion superóxido pode reagir rapidamente com o NO formando peroxinitrito, um importante mediador da peroxidação lipídica e nitração de proteínas (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005; WIDLANSKY; MALIK, 2015). Além disso, como resultado dessa reação, ocorre a diminuição da biodisponibilidade do NO, contribuindo para a disfunção endotelial (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005; VANHOUTTE et al., 2017). Ainda, o excesso EROs pode iniciar o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório vascular, por meio da ativação de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox, como o fator nuclear Kappa B envolvido na regulação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão celular e a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (TEDGUI; MALLAT, 2006; VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006). Na verdade, estresse oxidativo e inflamação são processos interligados e presentes na doença vascular (VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006; CIPOLLONE; CICOLINI; BUCCI, 2008; BRIEGER et al., 2012; VANHOUTTE et al., 2017; MARCHIO et al., 2019).

Até o momento, não há estudos avaliando os efeitos do tratamento com TPM na função endotelial, seja em humanos ou modelos experimentais em roedores. Além disso, os estudos que associam o uso de TPM com aumento de marcadores de risco vascular não distinguem possíveis efeitos sexo-específicos, que são muito importantes na função vascular, bem como nas doenças cardiovasculares associadas à disfunção vascular (VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006; MARCHIO et al., 2019).

Nesse sentido, estudos epidemiológicos têm demonstrado que homens apresentam maior incidência de doenças cardiovasculares em relação às mulheres de mesma idade. Além disso, ao comparar mulheres pré e pós-menopausa, a incidência de doenças cardiovasculares é maior após o término do período reprodutivo (GREEN et al., 2016). Isso se dá, em partes, pelos hormônios sexuais

femininos, em especial os estrógenos, um grupo de compostos que incluem estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3) e estretol (E4). Destes, o E2, conhecido como 17  $\beta$ -estradiol, é o estrógeno circulante no período reprodutivo que apresenta maior impacto ao sistema cardiovascular e metabolismo (IORGA et al., 2017). O E2 tem a capacidade de interferir na função endotelial e perfil lipídico, além de exercer atividade antioxidante (WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001; MURPHY, 2011; CERAVOLO et al., 2013). Ainda, descreve-se que os estrógenos podem inibir a proliferação de células do músculo liso vascular (CMLV), efeito este compartilhado pelo NO, demonstrando haver sinergismo entre o E2 e o NO sobre a vasculatura (ORSAL; KHALIL, 2004). Com efeito, os estrógenos são capazes de aumentar a produção de NO na vasculatura, sendo este o principal EDRF (STANHEWICZ; WENNER; STACHENFELD, 2018).

Embora o papel da progesterona ainda receba pouca atenção na literatura, é importante destacar que este hormônio também exerce efeitos ao sistema cardiovascular. Em modelos experimentais, a progesterona demonstrou modular a síntese de vasodilatadores endoteliais, aumentando a síntese e ação de NO e PGI<sub>2</sub> (CUTINI; CAMPELO; MASSHEIMER, 2014); bem como, induzir relaxamento independente do endotélio (JIANG et al., 1992). Por outro lado, a incubação de progesterona em células musculares lisas cultivadas de aorta torácica de ratas Sprague Dawley foi associada a maior produção de EROs, que por sua vez, é um fator importante para o desenvolvimento de disfunção endotelial (WASSMANN; WASSMANN; NICKENIG, 2005). Em contraste, recentemente foi demonstrado em ratas ovariectomizadas, que o tratamento com progesterona preveniu o desenvolvimento de disfunção endotelial, por reduzir o estresse oxidativo (CUNHA et al., 2020). De fato, o papel da progesterona sobre o sistema vascular precisa ser melhor elucidado; entretanto, é nítido que há uma influência dos hormônios sexuais femininos no sistema cardiovascular. Assim, é importante avaliar os efeitos do uso de TPM em ambos os sexos.

O TPM tem sido associado à perda de peso e redução da massa corporal durante o período de tratamento, efeito adverso que contrasta a maioria das AEDs (VERROTTI et al., 2011). No entanto, a maioria dos estudos são realizados em adultos (BITON et al., 1999; REIFE; PLEDGER; WU, 2000; BEN-MENACHEM et al., 2003; PRIVITERA et al., 2003) ou nos modelos experimentais de roedores com

sobrepeso ou obesidade (YORK et al., 2000; ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011; CARICILLI et al., 2012). Na realidade, a presença de excesso de peso no início da terapia com TPM parece ser um preditivo para a perda de peso induzida por esse fármaco (VERROTTI et al., 2011). Nessa circunstância, considerando uma condição basal de sobrepeso e um efeito redutor do TPM na massa corporal, é plausível observar melhora em alguns parâmetros cardiometabólicos, como perfil lipídico e pressão arterial (BRAY et al., 2003; NARULA et al., 2010).

Os efeitos adversos do uso de TPM na infância sobre o metabolismo são pouco compreendidos. Alguns estudos realizados em crianças epiléticas mostraram que o tratamento com TPM por 6 meses resulta em diminuição do peso corporal e do IMC (LI et al., 2009; OZCELIK et al., 2014). Além de afetar a massa corporal, o tratamento com TPM demonstrou influenciar o perfil lipídico e de adipocinas dessas crianças, uma vez que foram observadas concentrações plasmáticas aumentadas de lipoproteína (a), HDL e adiponectina (LI et al., 2009; OZCELIK et al., 2014). No entanto, a monoterapia com TPM em crianças por 12 meses não interferiu no peso corporal, IMC e parâmetros metabólicos avaliados tais como concentrações plasmáticas de insulina, glicose em jejum, adiponectina, leptina, resistina e adiponectina (SONMEZ et al., 2013). Além disso, crianças e adolescentes tratados com TPM apresentaram diminuição do IMC aos 12 e 24 meses, mas não aos 36 meses de tratamento (REITER et al., 2004). Diante da controvérsia descrita, fica claro que mais estudos são necessários para caracterizar os efeitos metabólicos adversos do uso de TPM nessa faixa etária.

É importante destacar aqui que os efeitos adversos sobre o metabolismo decorrente do uso de TPM em crianças são descritos durante o período de tratamento com este fármaco. Não se sabe sobre as consequências tardias do uso de TPM no organismo dessas crianças. Considerando que estudos epidemiológicos indicam que o crescimento desacelerado durante a infância predispõe o indivíduo tardiamente ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares (BARKER et al., 2005; BAROUKI et al., 2012) e a obesidade (LAW et al., 1992; JORNAYVAZ et al., 2016), torna-se imprescindível investigar os efeitos em longo prazo do uso desse fármaco em uma fase tão importante de plasticidade do organismo que é a infância. A hipótese deste estudo é

que o tratamento com TPM durante a infância afeta o padrão saúde-doença na vida adulta.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar em ratos e ratas Wistar os efeitos adversos a curto e longo prazo do tratamento com TPM durante a infância, caracterizando parâmetros cardiovasculares e metabólicos e investigando possíveis alterações na função e estrutura vascular.

São objetivos específicos do presente estudo:

- i. Avaliar a resposta contrátil e relaxante da aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com TPM ou água durante a infância;
- ii. Avaliar a espessura da camada média da aorta torácica e expressão proteica da NADPH oxidase e cicloxigenases na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com TPM ou água durante a infância;
- iii. Averiguar a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos e ratas adultos tratados com TPM ou água durante a infância;
- iv. Avaliar, em ratos e ratas tratados com TPM ou água durante a infância, a massa corpórea e consumo de ração na última semana de tratamento; bem como avaliar o consumo de ração dos animais quando adultos;
- v. Examinar o perfil lipídico, a curto e longo prazo, de ratos e ratas tratados com TPM ou água durante a infância;
- vi. Analisar, a curto e longo prazo, os seguintes parâmetros biométricos de ratos e ratas tratados com TPM ou água durante a infância: peso corporal (g), Índice de Lee, massa dos tecidos viscerais branco (retroperitoneal e perigonadal) e marrom (interescapular).

Parte dos resultados deste estudo estão publicados no artigo **“Topiramate treatment in Wistar rats during childhood induces sex-specific vascular dysfunction in adulthood** (<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120189>; *Life Sciences* 288 (2022) 120189)”, disponível no anexo B.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

Neste trabalho, foram utilizados ratos da linhagem Wistar, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, adaptados e mantidos em ambiente controlado, na temperatura de 21 °C ( $\pm 2$  °C), ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:00 am) e livre acesso à água e ração (Nuvital®) para roedores. Estes animais constituíram a geração parental do delineamento experimental.

Para o acasalamento, aos finais de tarde, duas ratas virgens foram colocadas na mesma gaiola com um rato. Na manhã do dia seguinte, foi feito o esfregaço vaginal para determinação do diagnóstico de prenhez. Para este procedimento, foi introduzido um *swabe* com a ponta de algodão umedecida em solução salina no orifício vaginal, que e em seguida, foi cuidadosamente girado contra a parede vaginal. A amostra coletada de células epiteliais vaginais foi colocada em lâminas de vidro, e imediatamente visualizada sob um microscópio de luz com lentes objetivas de 40x. O diagnóstico de prenhez, considerado dia gestacional zero (DG 0), foi determinado quando na análise microscópica observou-se a presença de espermatozoides e a fase estral do ciclo estral, sendo esta fase caracterizada pela presença de células epiteliais queratinizadas predominantemente anucleadas (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015). As ratas foram acompanhadas durante toda a gestação, sendo o dia do nascimento dos filhotes denominado dia pós-natal zero (DPN 0). No DPN 1, os filhotes foram contados, identificados por sexo e pesados. No DPN 4, a ninhada foi reduzida para 10 animais (5 machos e 5 fêmeas, sempre que possível), com o objetivo de garantir homogeneidade do aleitamento materno entre as ninhadas. No DPN 16, os filhotes foram distribuídos em dois grupos experimentais:

- i. Grupo Controle (CTR): recebeu água de torneira por gavagem do DPN16 ao 28.
- ii. Grupo Topiramato (TPM): recebeu 41 mg/kg/dia de topiramato (Topamax®, Janssen-Cilag, Brasil) suspenso em água de torneira, por gavagem, do DPN 16 ao 28.

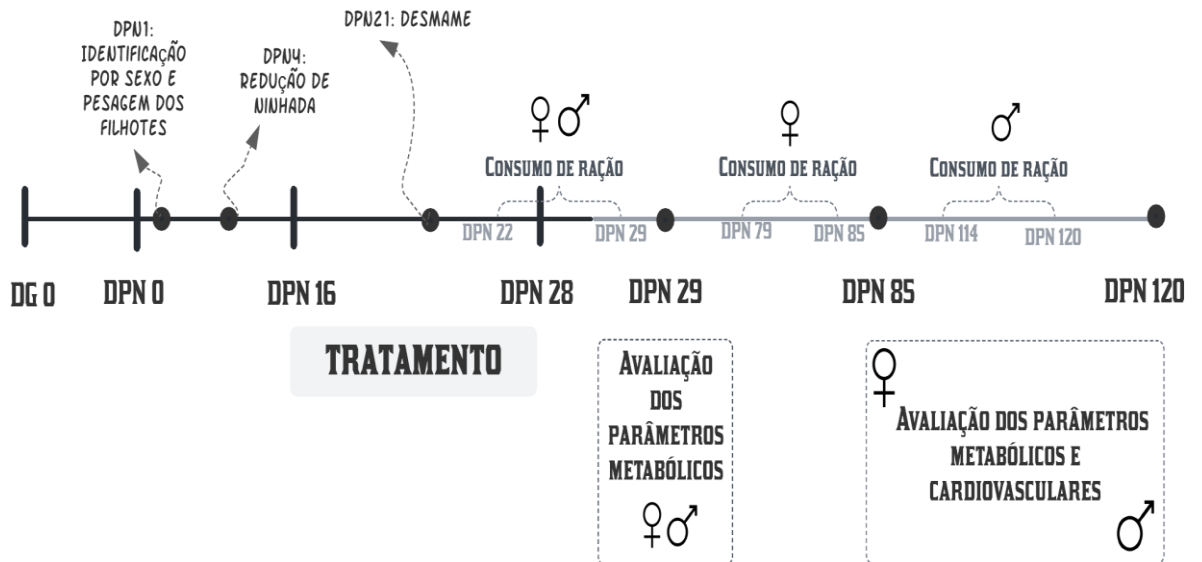
A duração do tratamento corresponde ao período de infância em roedores (MARCO et al., 2011) e a escolha da dose foi baseada nas doses de manutenção utilizadas para o tratamento de epilepsia em crianças, que variam de 3 à

9 mg/kg/dia (MORELAND; GRIESEMER; HOLDEN, 1999; RITTER et al., 2000; EXPERT COMMITTEE ON PEDIATRIC EPILEPSY, 2009; LI et al., 2009; SREENIVASAN; KUNJU, 2011; SONMEZ et al., 2013; OZCELIK et al., 2014). Considerando a dose máxima, 9 mg/kg/dia, foi realizado o ajuste dosimétrico utilizando a escala *body weight*  $\frac{3}{4}$  (BW  $\frac{3}{4}$ ) (EPA, 2006), para qual considerou-se o peso aproximado de uma criança de 3 anos como 12 kg e o de um roedor no período equivalente (16 dias) de 30 g. Assim, a dose obtida para o tratamento nos roedores foi de 41 mg/kg/dia de TPM. Ainda, durante o período de tratamento, no DPN 21, foi feito o desmame dos animais e alocação dos mesmos em seus respectivos grupos experimentais, mantendo-se 5 machos/gaiola ou 5 fêmeas/gaiola. Os animais foram pesados diariamente para correção do volume de fármaco administrado e para acompanhamento do ganho de peso, valores expressos em gramas (g).

Parâmetros cardiovasculares foram avaliados nos animais adultos, para investigação dos efeitos adversos do TPM em longo prazo sobre o sistema cardiovascular. Efeitos adversos metabólicos do TPM foram investigados 24h após o término do tratamento, bem como nos animais adultos. Desse modo, entende-se no presente estudo que o termo “efeitos adversos a curto prazo” refere-se às avaliações realizadas 24h após o término de tratamento com TPM ou água (i.e., DPN 29), e o termo “efeitos adversos a longo prazo” refere-se às avaliações realizadas nos animais quando adultos, em machos no DPN 120 e em fêmeas, a partir do DPN 85, na fase de estro fisiológico.

Todos os protocolos experimentais utilizados no estudo (Figura 1, delineamento experimental) foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL: 100/2018, ver anexo A) e estavam de acordo com o preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

**Figura 1.** Delineamento experimental



**Fonte:** próprio autor. DG: dia gestacional. DPN: dia pós-natal.

### 3.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES A LONGO PRAZO

#### 3.2.1. Reatividade Vascular

Após anestesia com tiopental sódico (40 mg/kg, ip, Cristália, Brasil), os animais foram submetidos ao procedimento de toracotomia e a porção torácica da aorta foi removida, dissecada e seccionada em quatro anéis transversais de 3 mm de comprimento. Dois dos anéis de aorta tiveram o endotélio removido por fricção, com o auxílio de uma haste fina de metal revestida por uma camada de algodão e os outros dois, tiveram o endotélio preservado. Os anéis foram mantidos em um banho para órgãos isolados montados através de uma haste inferior acoplada ao banho e uma haste superior conectada à um transdutor de força isométrico (FT03, Grass). O sinal de força convertido em sinal elétrico pelo transdutor, foi então captado por um amplificador (AECAD 04, AVS Projetos) e transmitido para um computador. Os seguimentos de aorta permaneceram sob tensão de 1,5 g em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificada (concentrações em mM: 130 NaCl, 14,9 NaHCO<sub>3</sub>; 4,7 KCl; 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,17 MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O; 5,5 glicose; 1,60 CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O e 0,026), gaseificada

com mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, mantidos aquecidos a 37° C durante todo o protocolo experimental e em pH 7,4 (HIGASHI et al., 2018).

Após período de estabilização de 1 hora, testou-se a viabilidade muscular dos anéis de aorta encubando-os com 90 mM da solução de cloreto de potássio (KCl) por 15 minutos. Os anéis que não responderam ao KCl foram descartados. A integridade do endotélio vascular também foi testada após novo período de estabilização, adicionando 3 µM de acetilcolina (ACh) nos anéis de aorta previamente contraídos com concentração submáxima (3 µM) de fenilefrina (Fenil). O endotélio foi considerado intacto quando o relaxamento induzido pela ACh foi maior que 70% em relação a contração, e removido, quando o relaxamento foi menor que 5%.

Após novo período de estabilização, foram realizadas curvas concentração efeito cumulativas (CCEC) para avaliação da capacidade contrátil e relaxante da aorta. Para avaliação da capacidade contrátil, as CCEC foram feitas utilizando Fenil (1 nM – 30 µM), em anéis com (Endo+) e sem (Endo-) endotélio, e as respostas a este agonista α1-adrenérgico foram expressas em gramas (g) de tensão. Para avaliação da função relaxante, foram realizadas CCEC para ACh (1 nM - 30 µM) nos anéis Endo+, um vasodilatador dependente do endotélio; e em anéis Endo -, foram realizadas CCEC para o nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1 nM – 3 µM), um agente doador de NO. Ambas as curvas de relaxamento foram efetuadas após contração com 3 µM de Fenil e tiveram seus resultados expressos como porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração.

Em outra série de experimentos, foi investigado o papel dos fatores contráteis derivados do endotélio na vasoconstrição induzida pela Fenil (CCEC, 1 nM – 30 µM). Para tanto, anéis Endo+ de ratos e ratas, tanto do grupo CTR como do grupo TPM foram pré-encubados por um período de 20 min com os seguintes bloqueadores: apocinina (30 µM), inibidor da geração de espécies reativas de oxigênio resultantes da ativação da NADPH oxidase e antioxidante; tempol (30 µM), mimético da superóxido dismutase e antioxidante; NS-398 (1 µM), um inibidor seletivo da cicloxigenase-2; dimetilsulfóxido (DMSO), veículo do NS-398; e indometacina (30 µM para ratas, 1 µM ratos), um inibidor não seletivo das cicloxigenases. A diferença nas concentrações de indometacina utilizadas na preparação de anéis de aorta entre fêmeas e machos se deve aos resultados obtidos em experimentos pilotos, nos quais

foram utilizadas diferentes concentrações de indometacina em curvas de Fenil. Para a realização dos experimentos, foi escolhida a concentração de indometacina que não interferiu na resposta contrátil da aorta dos animais controles.

Para comparação entre as curvas dos grupos CTR e TPM foram utilizadas a resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e a  $pD_2$  para cada fármaco, sendo que a  $pD_2$  corresponde ao  $-\log$  da concentração do agonista necessária para alcançar 50% da  $R_{m\acute{a}x}$ . Ambas foram calculadas utilizando uma análise de regressão não-linear (GraphPad Prism software, USA).

### 3.2.2. Quantificação proteica por Western Blotting

A aorta torácica foi isolada dos animais dos diferentes grupos experimentais, dissecada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer  $-80^{\circ}C$ . As amostras de aorta congeladas foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA e centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a  $4^{\circ}C$ . Após centrifugação, foi quantificado o conteúdo proteico total, utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras dos diferentes grupos foram então tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotreitól, 200 mM) e 30  $\mu g$  de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE, 10%) em aparelho para mini gel (BioRAD, Hercules, EUA). Em cada gel havia um marcador com peso molecular de valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente por 1h a 100 V (BioRAD). As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (albumina de soro bovino 5%, bovine serum albumin), a temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. Em seguida, as membranas foram incubadas individualmente com diferentes anticorpos: anti-ciclooxigenase 1 (COX1, 1:1000); anti-COX2 (1:2000) anti-NOX2 (1:2000); anti-p47<sup>phox</sup> (1:2000). Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora TBS-T (solução salina tamponada com Tris – *tris-buffered saline*) contendo 1% BSA, *overnight* a  $4^{\circ}C$ . A coloração de Ponceau foi utilizada para normalizar a expressão das proteínas avaliadas em cada amostra.

Após este procedimento, as membranas foram lavadas com solução tampão TBS-T por 30 minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado

com peroxidase pelo período de 1 hora, em temperatura ambiente. Na sequência, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T, e incubadas com solução quimioluminescente. A quimioluminescência foi detectada e visualizada utilizando o aparelho de quantificação LAS4000 (ImageQuant LAS4000, GE HealthCare Life Sciences, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com a utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageQuant, GE HealthCare).

### 3.2.3. Dosagem de ânion superóxido

A avaliação da produção de ânion superóxido foi realizada por meio do ensaio de nitroazul tetrazólio (NBT) modificado (SIM CHOI et al., 2006). Amostras de soro dos ratos foram centrifugadas e, para a reação, o sobrenadante (50 µL) foi incubado com 100 µL de NBT, em microplacas. O composto formado pela redução de NBT (formazan) foi solubilizado com 120 µL de 2 M hidróxido de potássio (KOH) e dimetilsulfóxido (DMSO). A redução de NBT a formazan foi medida a 620 nm utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas (Enspire, Perkin Elmer, EUA). Os resultados foram apresentados como redução de NBT (densidade óptica) por mg de proteína.

### 3.2.4. Análise histológica da aorta torácica

A aorta torácica foi isolada dos animais dos diferentes grupos experimentais e fixada em paraformaldeído (PFA) a 4%, para fixação por 6 horas. Após o período de fixação, as amostras foram armazenadas na geladeira em tubos contendo álcool 70%, até o momento da realização da inclusão. Para a desidratação e inclusão da aorta, foram realizados três banhos de álcool etílico 95% por 30 minutos cada, três banhos de álcool etílico 100% por 30 minutos cada, três banhos de xilol por 30 minutos cada, em temperatura ambiente; um banho de xilol por 30 minutos em estufa à 60°C, quatro banhos de parafina histológica em estufa à 60°C, e então, as aortas foram incluídas em moldes histológicos. Após o esfriamento completo, as peças incluídas foram afixadas em cassetes apropriados e destinadas à microtomia.

Foram realizados cortes de 7 µm de espessura em micrótomo, colocados em banho-maria à temperatura de 45°C e coletados em lâmina histológica de vidro, sendo armazenadas em estufa a 36°C por no mínimo 48 horas para completa

distensão e secagem do corte. As lâminas foram submetidas ao protocolo de coloração e montagem com dois banhos de xilol por 10 minutos cada, um banho em álcool etílico 100% por 5 minutos, um banho em álcool etílico 95% por 5 minutos, um banho em álcool etílico 70% por 5 minutos, um banho em água destilada por 5 minutos, coloração e solução aquosa de Hematoxilina de Harris por 2 minutos, viragem em água corrente por 5 minutos, colocação em solução aquosa de Eosina de Lison por 2 minutos, passagem rápida em água destilada, passagem rápida em álcool etílico 70%, um banho em álcool etílico 95% por 5 minutos, dois banhos de álcool etílico 100% por 10 minutos cada, um banho em solução de álcool e xilol (v/v) por 10 minutos, dois banhos em xilol por 10 minutos cada, seguindo-se as montagens das lâminas com Bálsamo do Canadá, coberto por lamínula de vidro e secagem das lâminas histológicas em estufa a 36 °C por 3 a 5 dias.

As análises foram realizadas em sistema de captura de imagens Moticam (Motic®, Xiamen, China) acoplado a um microscópio de luz (Motic®, BA410) e analisados no software Motic Image Plus® 3.0. A espessura da camada média da aorta torácica (músculo liso) foi avaliada em aumento de 400x. De cada imagem capturada, foram feitas 4 medições de espessura da camada média do vaso, seguindo as quatro extremidades da aorta torácica: medição superior, medição inferior, medição lateral direita e medição lateral esquerda. Ao final, foi realizado a somatória destas medidas e calculado uma média, que representou a espessura de músculo liso da aorta em análise (VIDIGAL et al., 2018).

### 3.2.5. Parâmetros cardiovasculares por método direto

Inicialmente, os animais adultos foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (100 mg/kg quetamina e 6,68 mg/kg xilazina, i.p) para a cateterização da artéria femoral e da veia femoral. As cânulas utilizadas foram compostas por um segmento de polietileno PE-10 de 4,5 cm de comprimento soldado a outro segmento de polietileno PE-50 contendo 13 cm de comprimento, anteriormente preenchidas com salina e heparina (heparina a 0,25%), obstruída com um pino de metal. Após a canulação da artéria e da veia, os segmentos PE-50 foram exteriorizados na região dorsal dos animais com auxílio de um trocater e fixado à pele com auxílio de uma sutura cirúrgica. Ao fim da cirurgia, foi administrado nos animais o analgésico fluxinina meglumina para analgesia (Banamine®, Schering Plough, Brasil

- 2,5 mg/kg, sc). A recuperação pós cirúrgica se deu em um período de 24 horas, onde os animais se encontraram em caixas individuais.

Após a recuperação, os animais foram transferidos para a sala onde foi realizado a obtenção do registro, 60 minutos antes do início das mensurações, afim de aclimatação ao novo ambiente. A cânula anteriormente implantada na artéria foi conectada a um transdutor de pressão arterial (Powerlab, modelo MLT0380), acoplado à um amplificador de sinal (AQCAD04F/AVS Project, Brasil), por último associado à um sistema computadorizado de registro (Powerlab/ ADInstruments). Os valores da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) foram oriundos da pressão arterial pulsátil, e a obtenção desses parâmetros teve uma duração de 30 minutos.

### 3.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS A CURTO E LONGO PRAZO

#### 3.3.1. Avaliação do Consumo de ração

O cálculo do consumo de ração foi realizado pela seguinte equação:

$$\text{Consumo alimentar} = \frac{\text{Peso inicial da ração (g)} - \text{Peso da ração após 24h (g)}}{5 \text{ animais/caixa}}$$

#### **(Equação 1)**

O consumo de ração foi avaliado nos últimos 7 dias de tratamento com TPM ou água (DPN 22 ao 28), e por um período de 7 dias consecutivos nos animais adultos (machos do DPN 114 ao 120; fêmeas do DPN 79 ao 85). O peso inicial da ração (g) foi fixado em 350g (infância) ou 450g (vida adulta) diariamente.

### 3.3.2. Parâmetros Biométricos

Os animais foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, ip, Cristália, Brasil); em seguida, mediu-se o comprimento naso-anal (cm) para o cálculo do Índice de Lee (IL) (Equação 2). Além disso, o tecido adiposo branco visceral (depósitos retroperitoneal e perigonadal – TAB) e tecido adiposo marrom interescapular (TAM) foram removidos e pesados, e os valores expressos em peso de tecido por 100g de peso corporal.

$$\text{Índice de Lee} = \left( \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal do animal (g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (cm)}} \right) \times 100$$

#### (Equação 2)

### 3.3.3. Análise Bioquímica

Após anestesia (tiopental sódico 40 mg/kg, ip, Cristália, Brasil), amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. A concentração plasmática de colesterol total (mg/dl) e triglicerídeos (TGC, mg/dl) foi avaliada pelo método enzimático DiaSys (grupo DiaSys/Kovalent, Brasil) usando o equipamento automático de laboratório Miura 200 (grupo Biosys/Kovalent, Brasil).

### 3.4. Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória para avaliar a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnova) e homogeneidade de variância (teste de Levene) de cada variável. As variáveis com distribuição normal e homogeneidade de variância foram analisadas por meio dos testes paramétricos (ANOVA de duas vias, ANOVA de uma via, ANOVA de medidas repetidas, teste t-Student), enquanto as variáveis que apresentaram distribuições não normais e homogêneas foram analisadas por testes não paramétricos (*Mann-Whitney U*).

Para análise estatística da reatividade vascular, o teste paramétrico utilizado dependeu do número de variáveis independentes. No caso das CCEC para Fenil, fora aplicado ANOVA de duas vias, seguido de ANOVA de uma via com Teste de Bonferroni. No caso das CCEC para ACh ou NPS, fora aplicado teste t-Student.

Os demais parâmetros cardiovasculares (i.e., western blotting, dosagem de ânion superóxido, histologia da aorta, pressão arterial e frequência cardíaca) também foram submetidos ao teste t-Student.

Para análise dos parâmetros metabólicos, o acompanhamento de ganho de massa corporal e consumo de ração foram analisados pelo teste ANOVA de medidas repetidas; os parâmetros biométricos na infância e vida adulta foram avaliados pelo teste t-Student; os parâmetros bioquímicos foram avaliados pelo teste t-Student, com exceção das concentrações séricas de colesterol total de machos na infância e concentrações de triglicerídeos de fêmeas na infância, que foram avaliados pelo teste de *Mann-Whitney U*.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  padrão da média (EPM) ou mediana (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartil) e os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram feitas utilizando o software SPSS (IBM, SPSS Statistics v20, NY, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES A LONGO PRAZO

#### 4.1.1. Avaliação da resposta contrátil e relaxante da aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

Os anéis de aorta torácica, Endo+ e Endo-, isolados de ratos e ratas dos grupos CTR e TPM apresentaram resposta concentração-dependente ao vasoconstritor Fenil (Figura 2) e para os vasodilatadores ACh e NPS (Figura 3).

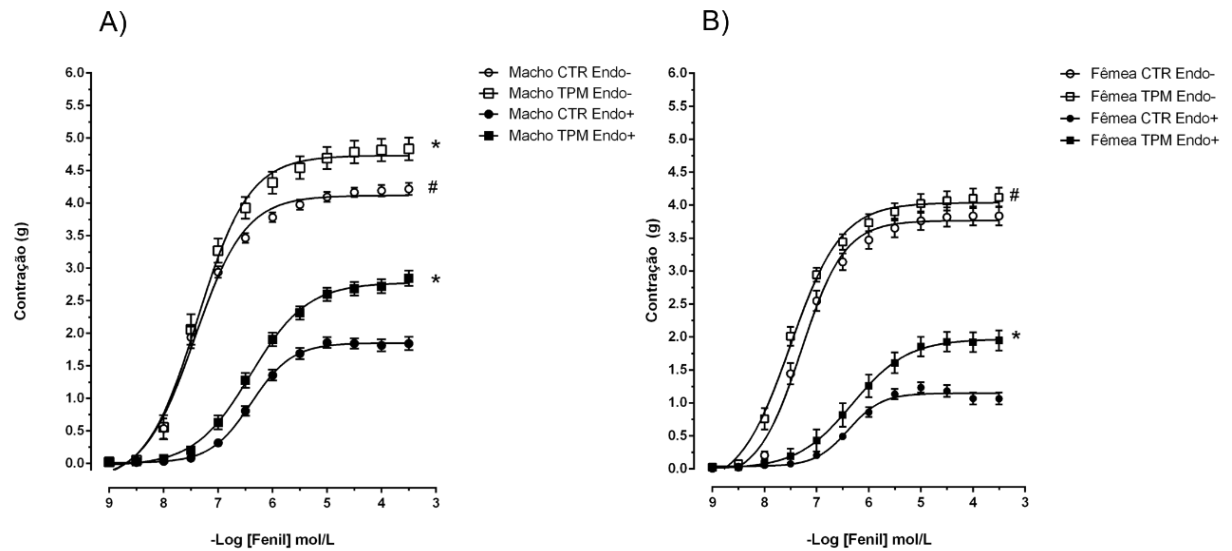
Em relação à resposta contrátil, ratos TPM apresentaram aumento da  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil [ $F(3,40) = 131,031$ ;  $p=0,00$ ] em anéis Endo+ e Endo- quando comparados com as respostas no grupo CTR. A remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil ao agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico em ambos os grupos (Tabela 1). Não foram detectadas diferenças na  $pD_2$  entre os grupos CTR e TPM [ $F(1,40) = 0,839$ ;  $p=0,36$ ].

Em fêmeas TPM, a  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil [ $F(3, 43) = 113,489$ ;  $p=0,00$ ] foi maior em anéis Endo+, mas não em anéis Endo-, quando comparada a  $R_{m\acute{a}x}$  do grupo CTR. Além disso, a remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil para Fenil na aorta de ambos os grupos experimentais (Tabela 1). Em relação aos valores de  $pD_2$ , ANOVA de duas vias demonstrou interação nas variáveis endotélio e tratamento [( $F(1,43) = 4,776$ ;  $p=0,03$ )]; na sequência, ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni demonstrou que anéis Endo- dos grupos CTR e TPM apresentaram maiores valores de  $pD_2$  em relação aos anéis Endo+; mas, não foram detectadas diferenças na  $pD_2$  entre ratas dos grupos CTR e TPM.

Em relação à curva de relaxamento para ACh, vasodilatador dependente de endotélio, a aorta de ratos [ $R_{m\acute{a}x}$ : ( $t(18)=1,639$ ,  $p=0,119$ ;  $pD_2$ : ( $t(18)=-0,258$ ,  $p=0,799$ ) e de ratas [ $R_{m\acute{a}x}$ : ( $t(20)=1,963$ ,  $p=0,064$ ;  $pD_2$ : ( $t(20)=0,656$ ,  $p=0,520$ )] TPM apresentou porcentagem de relaxamento semelhantes às de seus respectivos controles. De modo semelhante, não houve diferença na resposta relaxante de anéis de aorta para o NPS, um doador de NO, entre ratos [ $R_{m\acute{a}x}$ : ( $t(14)=1,020$ ,  $p=0,325$ ;

pD<sub>2</sub>:  $t(14)=1,083$ ,  $p=0,297$ ] e ratas [Rmáx:  $t(22)=-0,195$ ,  $p=0,847$ ; pD<sub>2</sub>:  $t(22)=-1,239$ ,  $p=0,228$ ] dos grupos CTR e TPM (Tabela 3).

**Figura 2.** Curvas concentração efeito-cumulativa para fenilefrina em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância



Curvas concentração efeito-cumulativa para fenilefrina em anéis de aorta com (Endo+) e sem (Endo-) endotélio de ratos (A) e ratas (B) adultos. CTR: grupo tratado com água durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato durante a infância. Dados reportados como média  $\pm$  EPM,  $n=10-12$ . A resposta máxima (Rmáx) foi avaliada com a ANOVA de duas vias, seguido de ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. \* $p<0,05$  Rmáx TPM vs CTR. # $p<0,05$  Rmáx anéis Endo- vs anéis Endo+.

**Tabela 1.** Resposta contrátil para fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

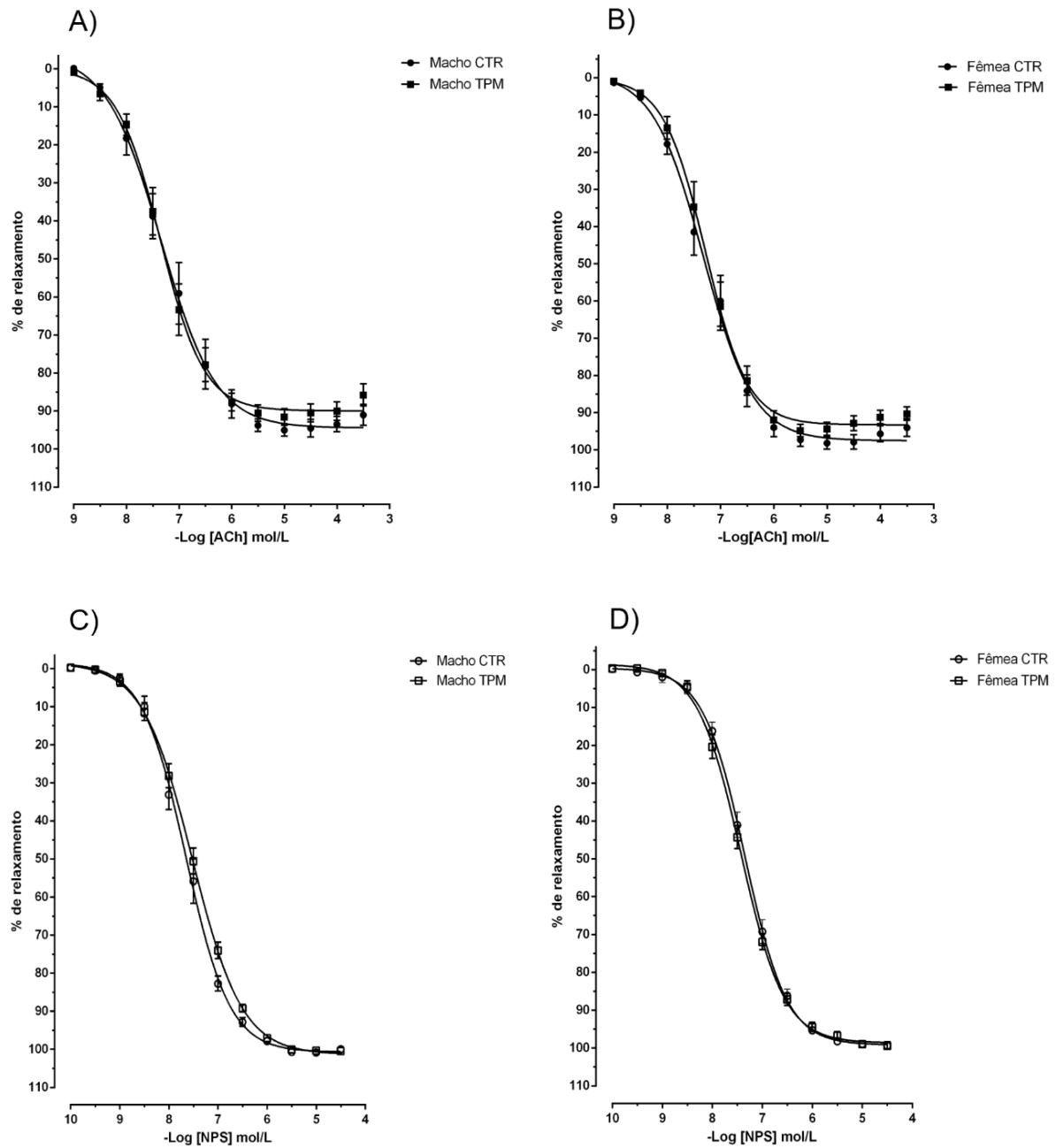
	Macho CTR		Macho TPM	
	Rmáx	pD2	Rmáx	pD2
<b>Endo+</b>	1,87 ± 0,09 [12]	6,37 ± 0,06 [12]	2,78 ± 0,11* [10]	6,41 ± 0,07 [10]
<b>Endo-</b>	4,11 ± 0,08 # [12]	7,47 ± 0,06# [12]	4,72 ± 0,17**# [10]	7,38 ± 0,07# [10]

	Fêmea CTR		Fêmea TPM	
	Rmáx	pD2	Rmáx	pD2
<b>Endo+</b>	1,15 ± 0,09 [12]	6,39 ± 0,05 [12]	1,97 ± 0,15* [12]	6,29 ± 0,12 [12]
<b>Endo-</b>	3,76 ± 0,14# [11]	7,30 ± 0,06# [11]	4,03 ± 0,14# [12]	7,54 ± 0,08# [12]

Resposta máxima (Rmáx, g) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx) para fenilefrina em anéis de aorta com (Endo+) ou sem (Endo-) endotélio. CTR: grupo tratado com água via gavagem durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavagem durante a infância. Dados reportados como média ± EPM; [n]: número de animais/grupo. ANOVA de duas vias, seguido de ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. \*p<0,05 TPM vs CTR; #p<0,05 Endo- vs Endo+.

**Figura 3.** Curvas concentração efeito-cumulativas para acetilcolina e nitruprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância



Curvas concentração efeito-cumulativas para acetilcolina em anéis com endotélio de ratos (A) e ratas (B), e para o nitruprussiato de sódio, em anéis sem endotélio de ratos (C) e ratas (D). CTR: grupo tratado com água durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato durante a infância. Dados reportados como média  $\pm$  EPM,  $n=8-10$ . A resposta máxima ( $R_{máx}$ ) foi avaliada pelo teste t-Student,  $p>0,05$ .

**Tabela 2.** Resposta relaxante à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta isolados de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

	Macho CTR		Macho TPM	
	Rmáx (%)	pD2	Rmáx (%)	pD2
<b>ACh</b>	94,22 ± 1,17 [10]	7,27 ± 0,18 [10]	90,75 ± 1,77 [10]	7,32 ± 0,11 [10]
<b>NPS</b>	98,24 ± 0,51 [8]	7,65 ± 0,08 [8]	97,63 ± 0,30 [8]	7,54 ± 0,06 [8]

	Fêmea CTR		Fêmea TPM	
	Rmáx (%)	pD2	Rmáx (%)	pD2
<b>ACh</b>	97,63 ± 1,72 [11]	7,37 ± 0,11 [11]	93,10 ± 1,53 [11]	7,25 ± 0,11 [11]
<b>NPS</b>	96,05 ± 0,96 [12]	7,35 ± 0,05 [12]	96,33 ± 1,09 [12]	7,44 ± 0,04 [12]

Resposta máxima (Rmáx, expressas como % de relaxamento à fenilefrina) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx) para acetilcolina (ACh, anéis com endotélio) e nitroprussiato de sódio (NPS, anéis sem endotélio). CTR: grupo tratado com água via gavagem durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavagem durante a infância. Dados reportados como média ± EPM; [n]: número de animais/grupo. Teste t-Student, p>0,05.

#### 4.1.2. Papel dos fatores contráteis derivados do endotélio na hiper-reatividade para fenilefrina na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato na infância

Em anéis Endo+ de ratos TPM [F(3,40)=6,022; p=0,00], apocinina (p=0,02) e indometacina (p=0,00), mas não tempol (p=0,25), diminuíram a Rmáx para Fenil quando comparados aos anéis Endo+ sem inibidores (Fig. 4B, Tabela 3). Em anéis Endo+ de machos CTR, a incubação com esses bloqueadores não interferiu na resposta ao agente vasoconstritor [F(3,32)=0,413; p=0,74] (Fig. 4A, Tabela 3). Além disso, apocinina, tempol e indometacina não interferiram nos valores de pD2 em anéis Endo+ de machos CTR [F(3,32)=1,023; p=0,39] e TPM [F(3,40) = 2,006; p=0,13].

Em anéis Endo+ de ratas TPM [F(3,36) = 4,171, p=0,01], a incubação com indometacina (p=0,01) restaurou a modulação endotelial sobre a resposta contrátil para Fenil, enquanto a incubação com apocinina (p=1,00) e tempol (p=0,75)

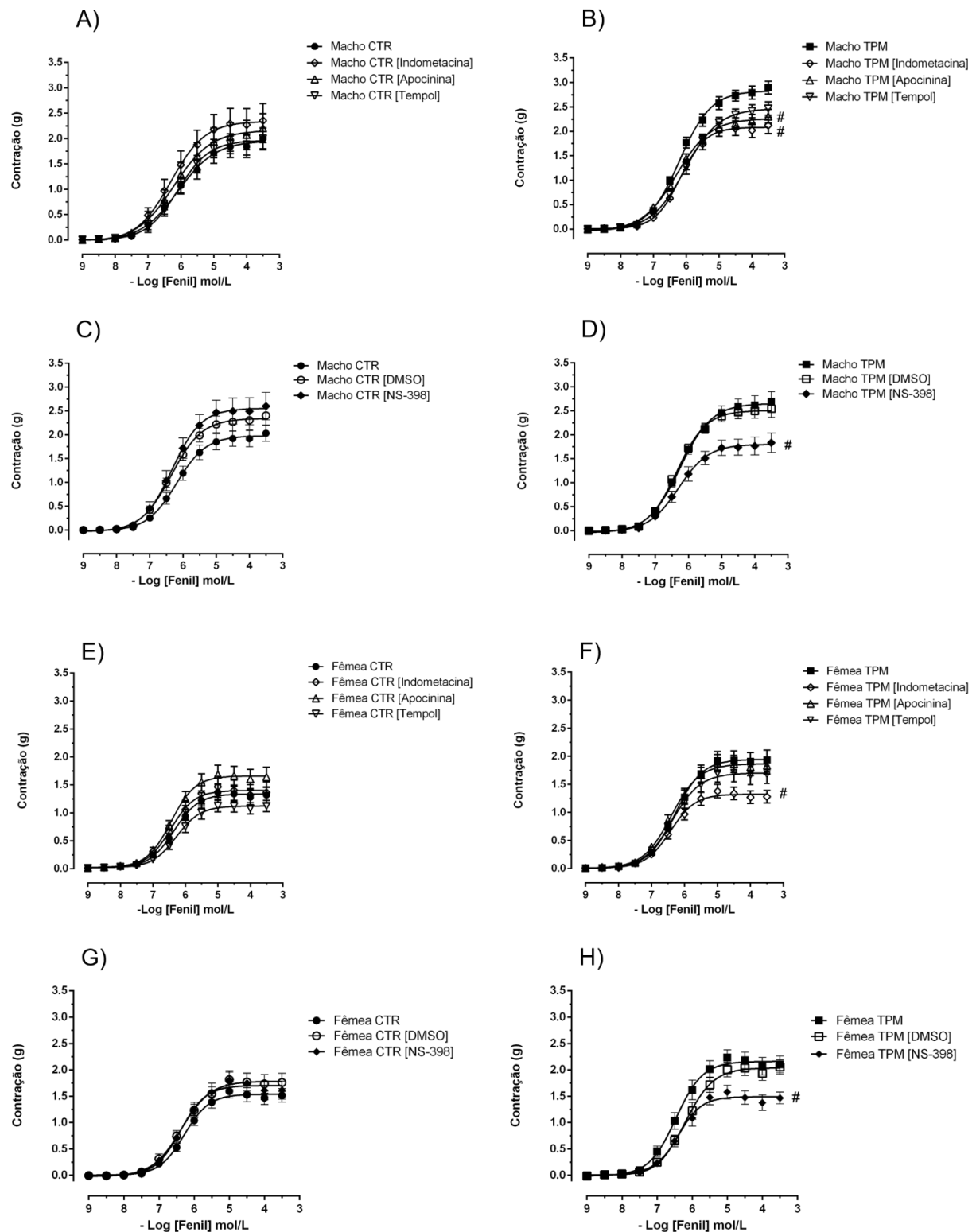
não interferiu na  $R_{m\acute{a}x}$  ao vasoconstritor  $\alpha$ -1 adrenérgico (Fig. 4F, Tabela 3). Em ratas CTR, a incubação com apocinina, indometacina e tempol não interferiu na  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil F (3,32) = 0,413;  $p=0,74$ ]. Ainda, os bloqueadores utilizados não interferiram nos valores de  $pD_2$  em ratas CTR [F (3,36) = 2,804,  $p=0,06$ ] e TPM [F (3,36) = 1,306,  $p=0,29$ ] (Tabela 3).

Considerando que a indometacina é um inibidor não seletivo das COX, e a incubação com este agente em anéis Endo+ de ratos e ratas TPM diminuiu a  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil; em outra série de experimentos, foram feitas curvas para este agonista vasoconstritor na presença de um inibidor seletivo de COX-2 (NS-398).

Em anéis Endo+ de machos TPM, o NS-398, mas não com DMSO (veículo NS-398), diminuiu a  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil [F (2,15) = 6,551;  $p=0,00$ ] (Fig. 4D, Tabela 4). A incubação com NS-398 ou DMSO não alterou a resposta contrátil na aorta do grupo CTR [F(2,15)=1,655;  $p=0,22$ ] (Fig. 4C, Tabela 4). Ainda, tanto NS398 quanto DMSO não interferiram nos valores de  $pD_2$  para Fenil na aorta de ratos CTR [F(2,15)=1,195;  $p=0,33$ ] e TPM [F(2,15)=0,380;  $p=0,69$ ].

Em anéis Endo+ de fêmeas TPM, a inibição da COX2 com N-398 diminuiu a  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil, enquanto o DMSO não interferiu nessa resposta [F (2,24) = 6,687;  $p=0,00$ ] (Fig. 4H, Tabela 4), quando os valores foram comparados com anéis Endo+ de fêmeas TPM sem incubação. Já em anéis Endo+ de fêmeas CTR, nenhum desses agentes interferiu na  $R_{m\acute{a}x}$  para Fenil [F (2,27) = 0,648,  $p=0,53$ ] (Fig., 4G, Tabela 4) em comparação com anéis Endo+ sem incubação. Além disso, não houve diferença nos valores de  $pD_2$  de ratas CTR [F(2,27)=0,477,  $p=0,62$ ] e TPM [F(2,24) = 3,314,  $p=0,06$ ].

**Figura 4.** Efeitos de antioxidantes e da inibição das cicloxigenases na resposta contrátil para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância



Curvas concentração efeito-cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio (Endo+) de ratos e ratas adultos tratados com topiramato (TPM – B, D, F, H) ou água (CTR – A, C, E, G) durante a infância. A contração foi avaliada na ausência ou presença de indometacina, apocinina, tempol, NS-398 e DMSO. Dados reportados como média  $\pm$  EPM,  $n=6-11$ . A resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) foi analisada por ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. # $p<0,05$   $R_{m\acute{a}x}$  anel Endo+ com inibidor vs anel Endo+ sem inibidor.

**Tabela 3.** Efeito da inibição da NADPH oxidase e das cicloxigenases na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

	<b>Macho CTR</b>		<b>Macho TPM</b>	
	Rmáx	pD <sub>2</sub>	Rmáx	pD <sub>2</sub>
<b>Sem inibidores</b>	1,99 ± 0,20 [9]	5,99 ± 0,14 [9]	2,87 ± 0,12 [11]	6,17 ± 0,09 [11]
<b>Indometacina</b>	2,33 ± 0,32 [9]	6,24 ± 0,10 [9]	2,09 ± 0,15 <sup>#</sup> [11]	6,18 ± 0,01 [11]
<b>Apocinina</b>	2,15 ± 0,29 [9]	6,14 ± 0,10 [9]	2,29 ± 0,14 <sup>#</sup> [11]	6,28 ± 0,08 [11]
<b>Tempol</b>	1,97 ± 0,20 [9]	6,07 ± 0,07 [9]	2,47 ± 0,14 [11]	6,03 ± 0,08 [11]

	<b>Fêmea CTR</b>		<b>Fêmea TPM</b>	
	Rmáx	pD <sub>2</sub>	Rmáx	pD <sub>2</sub>
<b>Sem inibidores</b>	1,34 ± 0,14 [10]	6,31 ± 0,06 [10]	1,95 ± 0,17 [10]	6,27 ± 0,05 [10]
<b>Indometacina</b>	1,41 ± 0,19 [10]	6,40 ± 0,06 [10]	1,29 ± 0,11 <sup>#</sup> [10]	6,43 ± 0,06 [10]
<b>Apocinina</b>	1,67 ± 0,17 [10]	6,43 ± 0,04 [10]	1,84 ± 0,14 [10]	6,39 ± 0,07 [10]
<b>Tempol</b>	1,14 ± 0,10 [10]	6,20 ± 0,09 [10]	1,63 ± 0,15 [10]	6,35 ± 0,06 [10]

Resposta máxima (Rmáx, g) e pD<sub>2</sub> (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx) para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio (Endo+) na ausência (sem inibidores) ou presença de indometacina, apocinina e tempol. CTR: grupo tratado com água via gavagem durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavagem durante a infância. Dados reportados como média ± EPM; [n]: número de animais/grupo. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. <sup>#</sup>p<0,05 anel Endo+ sem inibidor vs anel Endo+ com inibidor.

**Tabela 4.** Efeito da inibição da cicloxigenase-2 na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

	Macho CTR		Macho TPM	
	Rmáx	pD <sub>2</sub>	Rmáx	pD <sub>2</sub>
<b>Sem inibidores</b>	1,97 ± 0,17 [6]	6,20 ± 0,09 [6]	2,66 ± 0,20 [6]	6,27 ± 0,07 [6]
<b>NS-398</b>	2,54 ± 0,28 [6]	6,35 ± 0,10 [6]	1,80 ± 0,18 <sup>#</sup> [6]	6,36 ± 0,06 [6]
<b>DMSO</b>	2,34 ± 0,21 [6]	6,37 ± 0,06 [6]	2,52 ± 0,15 [6]	6,29 ± 0,08 [6]
	Fêmea CTR		Fêmea TPM	
	Rmáx	pD <sub>2</sub>	Rmáx	pD <sub>2</sub>
<b>Sem inibidores</b>	1,55 ± 0,13 [10]	6,26 ± 0,07 [10]	2,16 ± 0,16 [9]	6,42 ± 0,09 [9]
<b>NS-398</b>	1,72 ± 0,17 [10]	6,35 ± 0,08 [10]	1,49 ± 0,13 <sup>#</sup> [9]	6,35 ± 0,07 [9]
<b>DMSO</b>	1,80 ± 0,17 [10]	6,35 ± 0,06 [10]	2,05 ± 0,13 [9]	6,15 ± 0,07 [9]

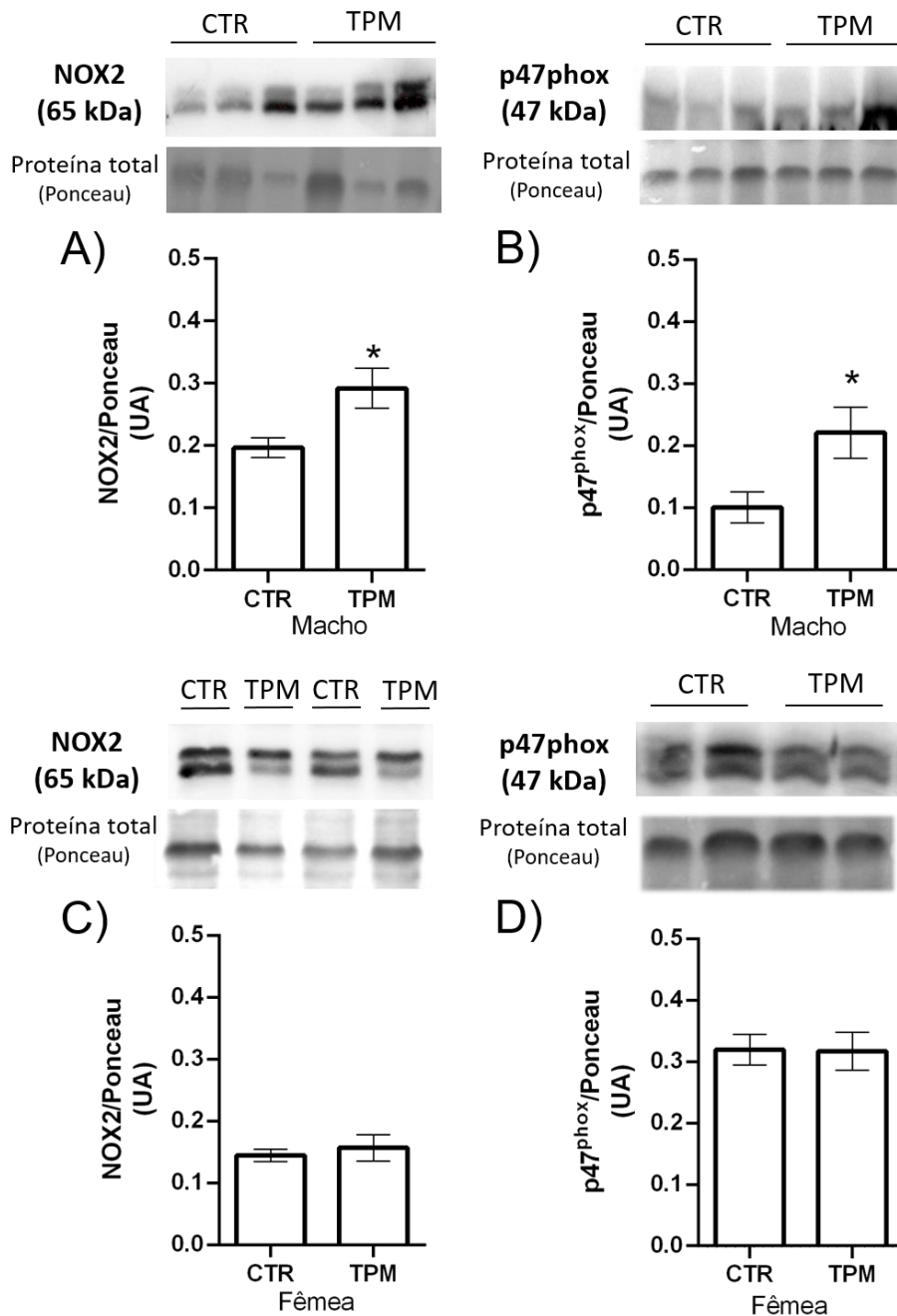
Resposta máxima (Rmáx, g) e pD<sub>2</sub> (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx) para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio (Endo+) na ausência (sem inibidores) ou presença de NS-398 e DMSO (veículo do NS-398). CTR: grupo tratado com água via gavagem durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavagem durante a infância. Dados reportados como média ± EPM; [n]: número de animais/grupo. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. <sup>#</sup>p<0,05 anel Endo+ sem inibidor vs anel Endo+ com inibidor.

#### 4.1.3. Expressão proteica das cicloxigenases, NOX2 e p47phox na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

Na aorta de ratos TPM, houve aumento da expressão de NOX-2 [t(9)=-2,825, p=0,02] e p47phox [t(8)=-2,487, p=0,03], subunidades da NADPH oxidase, em relação ao CTR (Fig. 5 A, C). No entanto, a expressão das cicloxigenases (COX-1, t(7)=1,613, p=0,151; COX-2, t(8)=-0,516, p=0,62) foi similar entre os grupos CTR e TPM (Fig. 6 A, C).

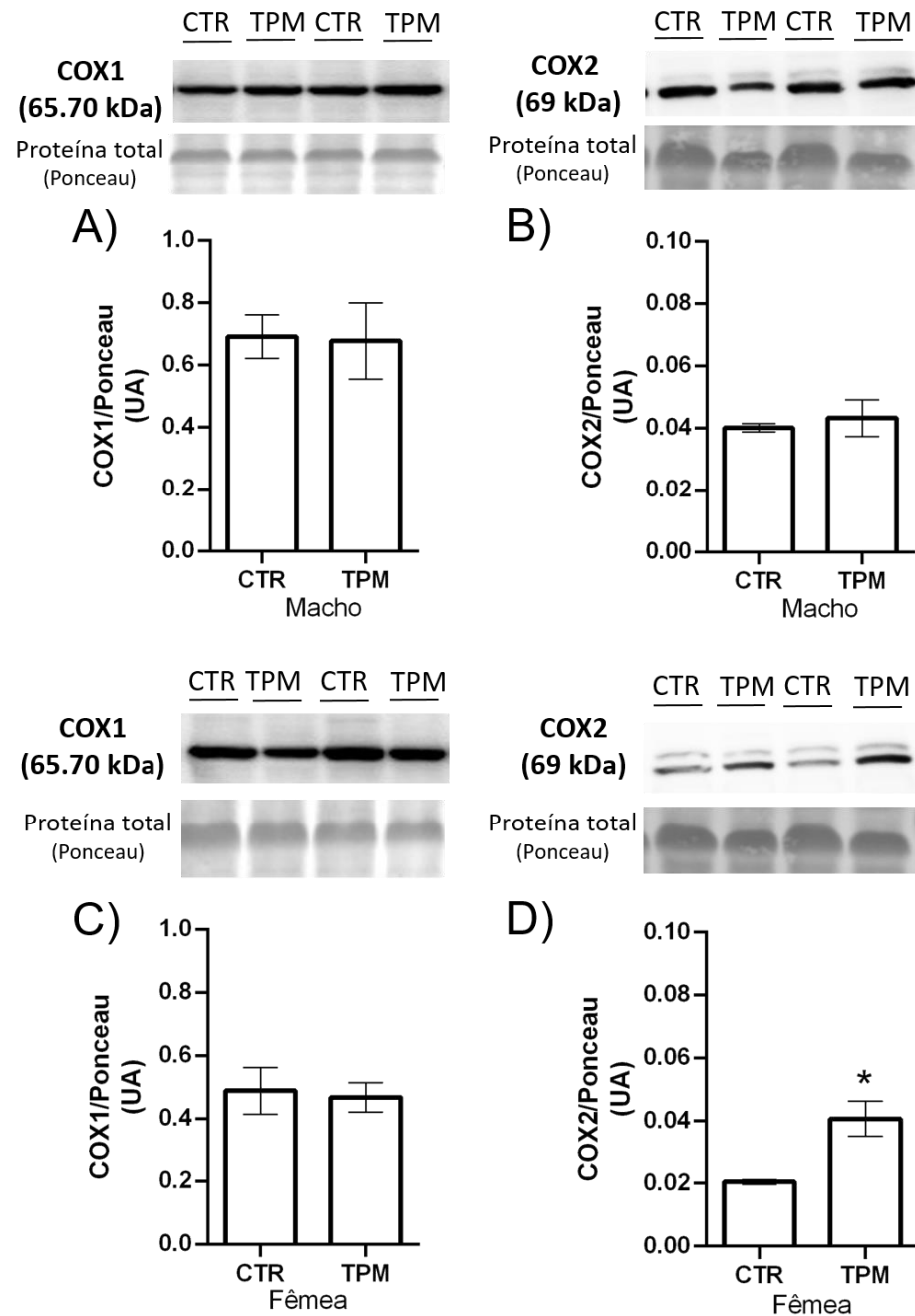
Ratas TPM, por sua vez, apresentaram expressão de COX-2 aumentada na aorta, quando comparadas às ratas CTR [t(6) = -3,564, p= 0,01] (Fig. 6D). A expressão de COX-1 [t(8) = -0,236, p= 0,81], NOX-2 [t(10) = -0,536, p= 0,604] e p47phox [t(7)=0,066, p= 0,94] foi similar entre os grupos (Figuras 6B, 5B e 5D).

**Figura 5.** Expressão de NOX-2 e p47phox na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância



Expressão de NOX-2 (A, C) e p47phox (B, D) na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato (TPM) ou água (CTR) durante a infância (dia pós-natal 16 – 28). As quantificações das proteínas no Western Blot foram normalizadas pelo Ponceau. Dados foram reportados como média  $\pm$  EPM, n=4 – 6. Teste t-Student, \*p<0,05 TPM vs CTR.

**Figura 6.** Expressão das cicloxigenases na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

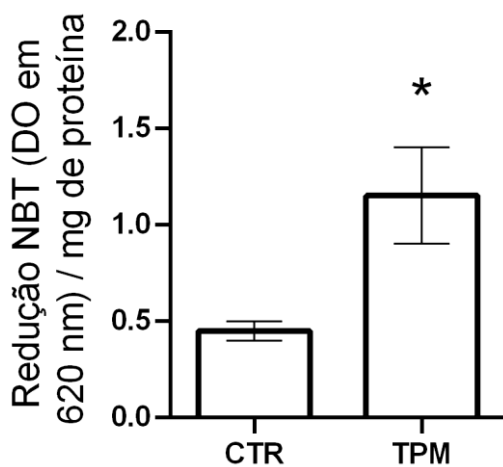


Expressão das cicloxigenases, COX-1 (A, C) e COX-2 (B, D), na aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato (TPM) ou água (CTR) durante a infância (dia pós-natal 16 – 28). As quantificações das proteínas no Western Blot foram normalizadas pelo Ponceau. Dados foram reportados como média  $\pm$  EPM,  $n=4 - 6$ . Teste t-Student, \* $p<0,05$  TPM vs CTR.

#### 4.1.4. Avaliação de ânion superóxido pelo método NBT em amostras de soro de ratos adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

A concentração de NBT reduzido no soro de ratos TPM [ $t(13) = -2,946$ ,  $p=0,01$ ] foi aumentada em comparação com a dos ratos CTR (Fig. 7), sugerindo concentrações aumentadas de ânion superóxido na aorta de ratos TPM.

**Figura 7.** Concentração de ânion superóxido em amostras de soro de ratos adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

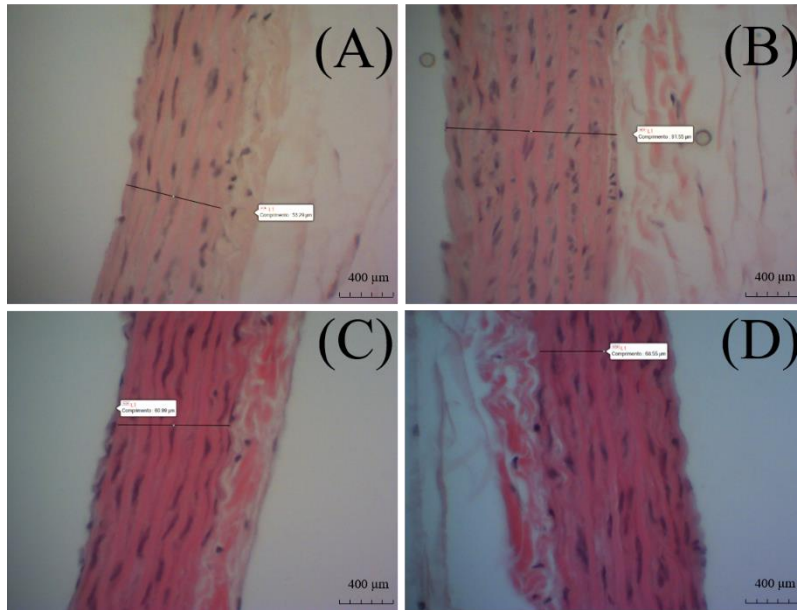


Concentração de ânion superóxido (redução de NBT expressa como densidade óptica a 620 nm/mg de proteína) em amostras de soro de ratos adultos tratados com topiramato (TPM) ou água (CTR) durante a infância (dia pós-natal 16 – 28). Os dados são reportados como média  $\pm$  SEM,  $n = 7-8$ . Test t-Student, \* $p < 0,05$  TPM vs CTR.

#### 4.1.5. Histologia da aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

Ratos TPM ( $69,88 \pm 1,24 \mu\text{m}$ ,  $n = 8$ ) apresentaram maior espessura da aorta torácica em comparação com o grupo CTR ( $63,90 \pm 1,26 \mu\text{m}$ ,  $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ). Em relação às fêmeas, não houve diferença na espessura da parede da aorta entre os grupos CTR ( $62,22 \pm 1,11 \mu\text{m}$ ,  $n = 7$ ) e TPM ( $61,62 \pm 2,69 \mu\text{m}$ ,  $n = 8$ ;  $p > 0,05$ ). Fotomicrografias representativas da aorta torácica podem ser visualizadas na Figura 8.

**Figura 8.** Fotomicrografias representativas de secção transversal da aorta torácica de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância



Fotomicrografias de secção transversal da aorta torácica de ratos (A, B) e ratas (C, D) adultos tratados com topiramato (TPM, B e D) ou água (CTR, A e C) durante a infância (dia pós-natal 16 – 28). A linha representa a espessura do músculo liso vascular. Coloração hematoxilina e eosina, aumento de 400x, n= 6 – 8/grupo.

#### 4.1.6. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

Ratos TPM apresentaram valores semelhantes para PAS [t(18)=0,329, p=0,746], PAD [t(18)=0,373, p=0,713] e FC [t(18)=-1,194, p=0,248] em relação ao CTR. De modo semelhante, não houve diferença nos parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca (PAS [t(12)=-0,306, p=0,765]; PAD [t(12)=1,769, p=0,102]; FC [t(12)=0,262, p=0,798]) entre fêmeas do grupo CTR e TPM. Os resultados são descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca de ratos e ratas adultos tratados com topiramato ou água durante a infância

	Macho		Fêmea	
	CTR	TPM	CTR	TPM
<b>PAS (mmHg)</b>	120,54 ± 3,67 [10]	118,64 ± 4,45 [10]	118,54 ± 3,82 [7]	120,24 ± 4,04 [7]
<b>PAD (mmHg)</b>	92,04 ± 2,58 [10]	90,90 ± 1,66 [10]	87,82 ± 3,29 [7]	81,38 ± 1,56 [7]
<b>FC (bpm)</b>	336,17 ± 12,22 [10]	357,33 ± 12,84 [10]	368,09 ± 15,18 [7]	363,44 ± 9,25 [7]

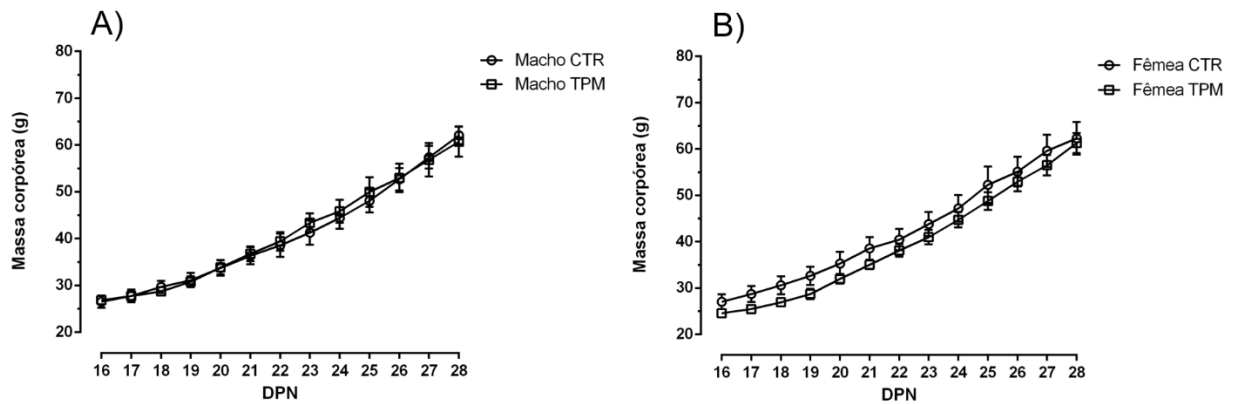
PAS: pressão arterial sistólica. PAD: pressão arterial diastólica. FC: frequência cardíaca. CTR: grupo tratado com água via gavagem durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavagem durante a infância. Dados reportados como média ± EPM, [n]: número de animais/grupo. Teste t-Student;  $p > 0,05$ .

## 4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS A CURTO E LONGO PRAZO

### 4.2.1. Acompanhamento de massa corpórea durante o tratamento em ratos e ratas tratados com topiramato ou água

O ganho de massa corporal corpórea (g) durante o período de tratamento (ou seja, PND 16 a 28) foi semelhante nos ratos [ $F(1,521; 16,73)=0,555$ ,  $p=0,538$ ] e ratas [ $F(1,568; 18,810) = 0,513$ ,  $p=0,563$ ] dos grupos CTR e TPM (Fig. 9).

**Figura 9.** Acompanhamento diário da massa corpórea de ratos e ratas tratados com topiramato ou água durante a infância

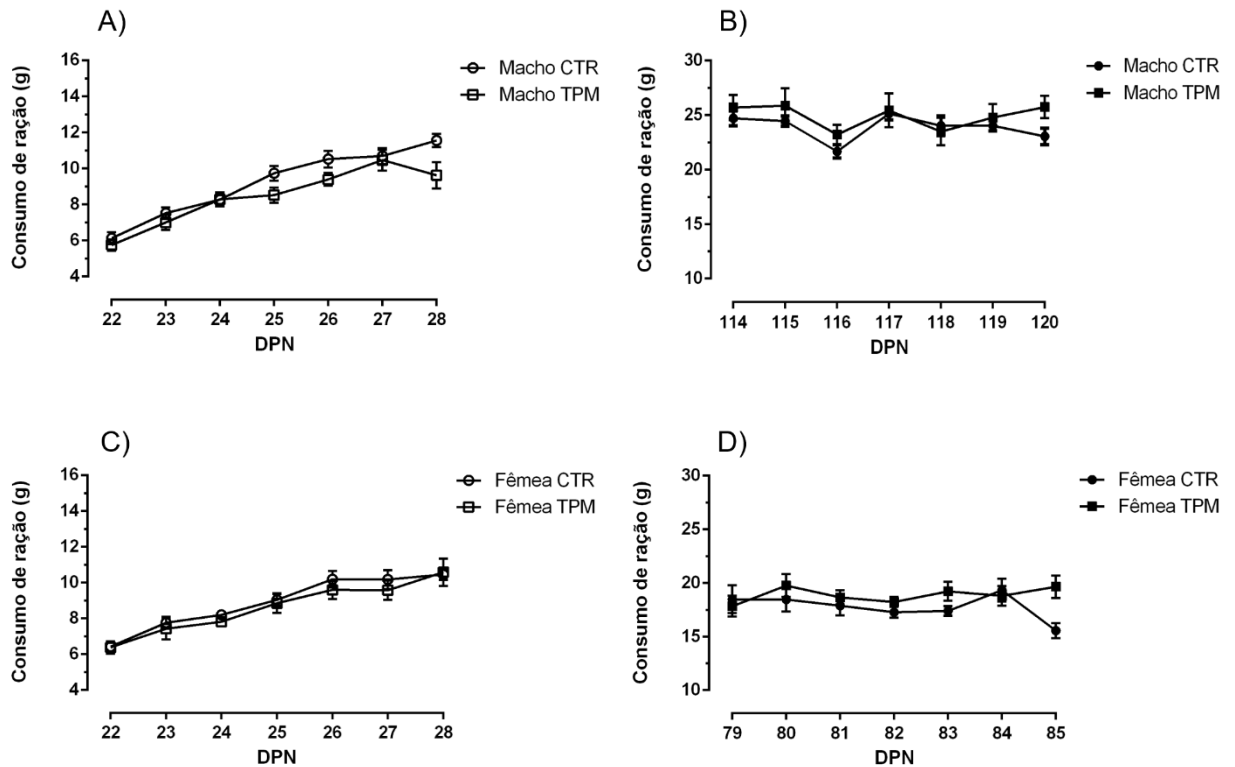


Massa corpórea (g) avaliada durante o período de tratamento (dia pós-natal (DPN) 16 ao 28) de ratos (A) e ratas (B). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 6 - 7$ /grupo. ANOVA de medidas repetidas,  $p > 0,05$ .

#### 4.2.2. Consumo de ração a curto e longo prazo de ratos e ratas tratados com topiramato ou água durante a infância

A quantidade diária de ração consumida por animal (g) durante o período de tratamento, avaliada por um período de sete dias, não diferiu entre os grupos CTR e TPM tanto em ratos [ $F(2,920; 43,794) = 2,674$ ,  $p = 0,060$ ], quanto em ratas [ $F(6, 54,219) = 0,631$ ,  $p = 0,705$ ] (Fig. 10A e 10C). De modo semelhante, não houve diferença no consumo de ração a longo prazo entre os grupos CTR e TPM em ratos [ $F(3,453; 41,435) = 21,132$ ,  $p = 0,351$ ] e ratas [ $F(2,458; 27,043) = 1,041$ ,  $p = 0,379$ ] adultos (Fig. 10B e 10D).

**Figura 10.** Consumo de ração de ratos e ratas tratados com topiramato ou água durante a infância



Consumo de ração (g) avaliado durante os últimos sete dias de tratamento (dia pós-natal (DPN) 22 ao 28) de ratos (A) e ratas (C), bem como consumo de ração (g) avaliado em ratos (B) e ratas (D) adultos tratados com topiramato ou água durante a infância por um período de sete dias consecutivos. Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 6 - 10$ /grupo. ANOVA de medidas repetidas,  $p > 0,05$ .

#### 4.2.3. Parâmetros biométricos a curto e longo prazo de ratos e ratas tratados com topiramato ou água durante a infância

Ratos TPM apresentaram diminuição no depósito de TAB retroperitoneal [ $t(11) = 5,368$ ,  $p = 0,000$ ] 24h após o término do tratamento, em comparação ao grupo CTR. Em contraste, não houve diferença entre os grupos nos demais parâmetros biométricos avaliados (peso corporal [ $t(11) = 0,259$ ,  $p = 0,800$ ]; Índice de Lee [ $t(11) = 1,637$ ,  $p = 0,130$ ]; TAB perigonadal [ $t(11) = 1,954$ ,  $p = 0,077$ ] e TAM [ $t(16) = 0,942$ ,  $p = 0,360$ ]). Ademais, ratos adultos do grupo TPM apresentaram redução nos depósitos de TAB retroperitoneal [ $t(19) = 3,493$ ,  $p = 0,002$ ] e perigonadal [ $t(19) = 3,007$ ,  $p = 0,007$ ] em relação ao controle. Os demais parâmetros biométricos

(peso corporal [t(19)=1,941, p=0,067]; Índice de Lee [t(19)=1,444, p=0,165]; TAM [t(19)=1,990, p=0,061]) foram semelhantes entre os ratos CTR e TPM. Os resultados são expressos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros biométricos de ratos 24h após o término do tratamento com topiramato ou água e na vida adulta

	Infância		Vida adulta	
	CTR	TPM	CTR	TPM
Peso corporal (g)	68,65 ± 3,12 [6]	67,39 ± 3,61 [7]	384,44±12,24 [10]	357,55 ± 8,01 [11]
Índice de Lee	32,10 ± 0,38 [6]	31,34 ± 0,28 [7]	31,27 ± 0,20 [10]	30,90 ± 0,16 [11]
TAB retroperitoneal (g/100)	0,16 ± 0,02 [6]	0,07 ± 0,01* [7]	1,04 ± 0,09 [10]	0,66 ± 0,07* [11]
TAB perigonadal (g/100)	0,17 ± 0,02 [6]	0,13 ± 0,02 [7]	1,26 ± 0,04 [10]	1,04 ± 0,06* [11]
TAM (g/100)	0,15 ± 0,01 [8]	0,14 ± 0,01 [10]	0,08 ± 0,00 [10]	0,07 ± 0,00 [11]

TAB: tecido adiposo branco. TAM: tecido adiposo marrom. CTR: grupo tratado com água via gavagem durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavagem durante a infância. Dados reportados como média ± EPM, [n]: número de animais/grupo. Teste t-Student; \*p< 0,05 TPM vs CTR.

Em relação às fêmeas, não houve diferença entre os grupos CTR e TPM no peso corporal [t(12)=0,466, p=0,649], Índice de Lee [t(12)=-0,408, p=0,691], TAB retroperitoneal [t(12)= -0,060, p=0,953], TAB perigonadal [t(12)= -1,552, p=0,147] e BAT [t(12)= -1,494, p=0,161] 24h após o término do tratamento. Na vida adulta, ratas TPM apresentaram redução nos depósitos de TAM [t(22)=2,621, p=0,016], quando comparado com ratas CTR. No entanto, não houve diferença significativa nos demais parâmetros biométricos avaliados entre os grupos CTR e TPM (peso corporal [t(22)=0,854, p=0,402]; Índice de Lee [t(22)=1,047, p=0,306]; TAB retroperitoneal [t(22)=0,390, p=0,700] e perigonadal [t(22)=1,799, p=0,086]). Os resultados são expressos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Parâmetros biométricos de ratas 24h após o término do tratamento com topiramato ou água e na vida adulta

	Infância		Vida adulta	
	CTR	TPM	CTR	TPM
Peso corporal (g)	71,91 ± 5,31 [7]	69,04 ± 3,12 [7]	221,21 ± 4,66 [12]	215,11±5,41 [12]
Índice de Lee	31,68 ± 0,39 [7]	31,87 ± 0,28 [7]	30,54 ± 0,15 [12]	30,28 ± 0,20 [12]
TAB retroperitoneal (g/100)	0,10 ± 0,01 [7]	0,10 ± 0,01 [7]	0,66 ± 0,04 [12]	0,63 ± 0,07 [12]
TAB perigonadal (g/100)	0,04 ± 0,01 [7]	0,05 ± 0,01 [7]	0,51 ± 0,03 [12]	0,43 ± 0,03 [12]
TAM (g/100)	0,12 ± 0,01 [7]	0,14 ± 0,01 [7]	0,08 ± 0,00 [12]	0,07 ± 0,00* [12]

TAB: tecido adiposo branco. TAM: tecido adiposo marrom. CTR: grupo tratado com água via gavage durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavage durante a infância. Dados reportados como média ± EPM, [n]: número de animais/grupo. Teste t-Student; \*p< 0,05 TPM vs CTR.

#### 4.2.4. Análise bioquímica a curto e longo prazo de ratos e ratas tratados com topiramato ou água durante a infância

Em relação aos ratos, não houve diferença nas concentrações plasmáticas de colesterol total [U=17.000, p=0,366] e triglicerídeos [t(10)=0,536; p=0,604] entre os grupos CTR e TPM, 24h após o término do tratamento. Na vida adulta, as concentrações plasmáticas de colesterol total [t(18)=-0,540; p=0,596] e triglicerídeos [t(16)=-0,448; p=0,660] foram semelhantes entre os grupos (Tabela 8).

Em relação às ratas, também não houve diferença nas concentrações plasmáticas de colesterol total [t(15)=-0,442; p=0,655] e triglicerídeos [U=17,000, p=0,115] 24h após o término do tratamento, assim como nas ratas adultas (colesterol total [t(16)=-0,750; p=0,464]; triglicerídeos [t( 16)=-1,995; p=0,063]). Os resultados são expressos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Ensaio bioquímico de ratos e ratas 24h após o término do tratamento com topiramato ou água e na vida adulta

<b>Infância</b>	<b>Macho</b>		<b>Fêmea</b>	
	CTR	TPM	CTR	TPM
CLT (mg/dl)	79,78 (55,20 – 98,22) [6]	70,01 (51,93 – 77,18) [8]	71,30 ± 3,02 [8]	74,13 ± 5,39 [9]
TGL (mg/dl)	63,00 ± 7,86 [5]	56,99 ± 7,61 [7]	32,60 (30,67 – 43,37) [8]	46,95 (35,87 – 56,25) [9]
<b>Vida adulta</b>	<b>Macho</b>		<b>Fêmea</b>	
	CTR	TPM	CTR	TPM
CLT (mg/dl)	69,59 ± 4,58 [10]	73,25 ± 5,01 [10]	50,16 ± 2,55 [9]	52,84 ± 2,51 [9]
TGL (mg/dl)	105,26 ± 10,12 [10]	113,71 ± 16,93 [8]	29,77 ± 3,50 [9]	46,11 ± 7,40 [9]

CLT: colesterol total plasmático. TGL: triglicerídeos plasmáticos. CTR: grupo tratado com água via gavagem durante a infância. TPM: grupo tratado com topiramato via gavagem durante a infância. Dados reportados como média ± EPM ou mediana (1º e 3º quartil); [n]: número de animais/grupo. Teste t-Student ou *Mann-Whitney U*;  $p > 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento com TPM durante a infância favorece a disfunção vascular na vida adulta, de forma sexo-específica. Paralelamente, foi demonstrado que o tratamento com TPM reduz os depósitos de tecido adiposo visceral em machos a curto e longo prazo, e reduz os depósitos de tecido adiposo marrom em fêmeas a longo prazo. Por outro lado, o tratamento com TPM não interferiu no perfil lipídico e pressão arterial desses animais.

Recentemente, a monoterapia com TPM em crianças e adolescentes tem sido associada à aceleração do desenvolvimento de aterosclerose (EL-FARAHATY et al., 2015), sendo o mecanismo envolvido nesse aumento de risco cardiovascular desconhecido. A disfunção endotelial é considerada um dos primeiros eventos relacionados à disfunção vascular e, no presente estudo, ratos e ratas tratados com TPM durante a infância apresentaram disfunção endotelial na vida adulta, caracterizada por hiper-reatividade da aorta para Fenil na presença de endotélio. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a função endotelial após o tratamento com TPM na infância.

A disfunção endotelial observada nos ratos TPM parece estar relacionada principalmente a um aumento na geração de EROs derivados da NADPH oxidase, uma vez que a incubação com apocinina restaurou a modulação endotelial nesses animais. É importante ressaltar que a NADPH oxidase é a principal fonte enzimática de ânion superóxido na vasculatura (RODIÑO-JANEIRO et al., 2013). Em excesso, o ânion superóxido é capaz de reagir com o NO para formar peroxinitrito, o que reduz consideravelmente a biodisponibilidade do NO, o principal fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (VANHOUTTE et al., 2017). Por sua vez, o peroxinitrito promove a nitração de proteínas e contribui para a disfunção e morte das células endoteliais (INCALZA et al., 2018). De acordo com os resultados obtidos pelo teste de NBT, ratos TPM apresentam concentrações elevadas de ânion superóxido, sugerindo ser esta a principal ERO envolvida na disfunção endotelial desses animais.

Dentre as isoformas da NADPH oxidase, a NOX-2 está associada à geração de EROs na vasculatura e contribui para a disfunção endotelial em diferentes situações, como hipertensão arterial (MURDOCH et al., 2011), envelhecimento (FAN et al., 2019), resistência à insulina (SUKUMAR et al., 2013) e exposição à xenobióticos

(KUNTIC et al., 2020). Além do aumento na expressão de NOX2, a aorta de ratos TPM apresentou aumento da expressão de p47phox, uma importante subunidade reguladora citosólica para a ativação desta isoforma da NADPH oxidase (RODIÑO-JANEIRO et al., 2013). Em conjunto, a disfunção endotelial de ratos TPM envolve geração de EROs, possivelmente produzida pela NOX-2.

O ânion superóxido parece não ser a única EROs envolvida na disfunção vascular de ratos TPM. De fato, o tempol, mimético da superóxido dismutase e antioxidante, não interferiu na hiper-reatividade para Fenil na aorta de ratos TPM, sugerindo a participação de outras EROs, como por exemplo o peróxido de hidrogênio. Concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio podem ativar as cicloxigenases, exercendo assim um efeito contrátil na aorta (JOSÉ GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2005). Na verdade, prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2 parecem estar envolvidos na disfunção endotelial dos animais TPM, uma vez que a indometacina e o NS-398 restauraram a modulação endotelial nesses animais. No entanto, os achados funcionais não foram completamente sustentados pelos resultados moleculares, visto que não foram observadas alterações na expressão de COX-1 e COX-2 nos ratos TPM. Curiosamente, a atividade e a expressão das COX nem sempre estão correlacionadas (HIGASHI et al., 2018). Ainda, prostanóides derivados da COX-2 são capazes de ativar a NADPH oxidase (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013), o que pode contribuir para o aumento de EROs observado em ratos adultos tratados com TPM durante infância.

Em contraste aos achados em ratos TPM, a disfunção endotelial em ratas TPM parece não envolver a geração de EROs, uma vez que a incubação com apocinina ou tempol não interferiu na hiper-reatividade Fenil na aorta destes animais. É bem descrito na literatura que os hormônios sexuais femininos, especialmente o estrogênio, exercem um efeito protetor ao sistema cardiovascular (STANHEWICZ; WENNER; STACHENFELD, 2018). Dentre os efeitos vasculares mais bem estabelecidos do estrogênio está a produção de NO, que ocorre por mecanismos genômicos e não genômicos (WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001; STANHEWICZ; WENNER; STACHENFELD, 2018). Ainda, o estrogênio exibe propriedades antioxidantes (BUSSE et al., 2002; KATALINIC et al., 2005; STANHEWICZ; WENNER; STACHENFELD, 2018) e é capaz de potencializar a função de prostanóides vasoconstritores na aorta de ratas por meio de mecanismos

envolvendo as vias da COX-2 e da tromboxano sintase (LI; KUO; STALLONE, 2008). De fato, a disfunção endotelial em ratas TPM está associada com a via da COX-2, uma vez que se observa maior expressão dessa isoforma das cicloxigenases na aorta de ratas TPM.

A disfunção endotelial resulta de um desequilíbrio na homeostase entre os fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. Este desequilíbrio pode se dar, por aumento da ação de EDCF em relação ao EDRF, ou diminuição da biodisponibilidade de EDRF (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005). Em geral, na disfunção endotelial há redução na vasodilatação dependente do endotélio, como consequência da redução da biodisponibilidade do NO (VANHOUTTE et al., 2017). Entretanto, no presente estudo, não foi identificado qualquer prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio em ratos e ratas TPM. Ainda, a sensibilidade do músculo liso ao NO permanece inalterada, uma vez que não houve diferença na resposta ao NPS. O fato de não se evidenciar prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio pode indicar que a avaliação da função endotelial foi feita precocemente, sugerindo assim a necessidade de mais estudos avaliando a função vascular desses animais quando mais velhos.

O estresse oxidativo e a inflamação, mecanismos envolvidos na disfunção endotelial dos animais TPM, são estímulos para alterações fenotípicas nas células do músculo liso vascular (CMLV). Ambos os estímulos podem converter o fenótipo contrátil das CMLV em um fenótipo secretor (VARIK et al., 2012; MARCHIO et al., 2019). Nesse fenótipo, as CMLV migram e proliferam, o que contribui para o aumento do tônus vascular e espessamento da parede arterial (MARCHIO et al., 2019). No presente estudo, foi demonstrado um aumento na espessura da aorta em ratos TPM, o que pode contribuir para a hiper-reatividade observada neste vaso sem endotélio (MARCHIO et al., 2019). Ao contrário dos achados em ratos TPM, em ratas TPM não foi evidenciado qualquer alteração estrutural na aorta. Em conjunto, esses achados demonstram a importância das EROs nas complicações vasculares devido ao tratamento com TPM durante a infância e destacam um possível papel protetor dos hormônios sexuais femininos no sistema vascular nas ratas tratadas com TPM. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A disfunção vascular pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose e hipertensão (VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006; MARCHIO et al., 2019). No presente estudo, ao avaliar a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos e ratas adultos tratados com TPM durante a infância, não foram observadas alterações destes parâmetros. Semelhante aos nossos achados, estudos realizados em roedores não evidenciaram alterações de frequência cardíaca e pressão arterial após tratamento com TPM (ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011; CORTÉS-MORENO et al., 2018). Diante do exposto, ressaltamos a importância da avaliação dos parâmetros cardiovasculares em animais mais velhos, uma vez que as consequências da disfunção vascular associada ao tratamento com TPM podem ser mais evidentes com o processo de envelhecimento.

O uso do TPM em humanos parece influenciar o perfil lipídico, além de outros marcadores de risco cardiovascular (LI et al., 2009; EL-FARAHATY et al., 2015). De fato, um estudo transversal e comparativo realizado em crianças demonstrou que o tratamento a longo prazo com TPM ( $2,6 \pm 0,8$  anos) foi associado à dislipidemia (EL-FARAHATY et al., 2015). Em outro estudo, crianças com epilepsia tratadas com TPM por 6 meses apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de lipoproteína (a) e HDL, mas não nas concentrações de LDL e triglicerídeos (LI et al., 2009). Esses achados sugerem que os efeitos do TPM no perfil lipídico são mais evidentes no tratamento a longo prazo. No presente estudo, embora não tenhamos observado diferença significativa nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos nos animais, destacamos uma tendência ( $p=0,063$ ) de aumento dos triglicerídeos plasmáticos em ratas adultas tratadas com TPM durante a infância.

Diversos estudos têm associado o uso de TPM com perda de peso e redução da massa corpórea durante o período de tratamento (VERROTTI et al., 2011). No entanto, a maioria dos estudos foram realizados em indivíduos adultos (BITON et al., 1999; REIFE; PLEDGER; WU, 2000; BEN-MENACHEM et al., 2003; PRIVITERA et al., 2003) ou em modelos experimentais de roedores sob dieta rica em gordura (YORK et al., 2000; ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011; CARICILLI et al., 2012). Em ratos Osborne-Mendel adultos sob dieta semissintética rica em gordura, o tratamento com TPM por um período de 80 dias na dose de 40mg/kg, mas não na dose de 10mg/kg, resultou em diminuição do peso corporal, o que foi atribuído à redução da

adiposidade (YORK et al., 2000). Os autores também investigaram os efeitos do TPM na ingestão alimentar, demonstrando uma redução precoce da ingestão alimentar, seguida de normalização em 4 a 7 dias (YORK et al., 2000). Outro estudo, por sua vez, demonstrou que o tratamento por 14 dias com TPM na dose de 100 mg/kg não alterou o peso corporal, mas diminuiu a relação peso de tecido adiposo visceral/peso corporal de ratos Wistar adultos sob dieta rica em gorduras (EL-ABHAR; SCHAALAN, 2012). De fato, o TPM parece diminuir a adiposidade independente de mudanças na ingestão alimentar, sugerindo o papel deste fármaco no aumento do gasto energético (VERROTTI et al., 2011).

Aqui foi demonstrado pela primeira vez que o tratamento com TPM durante a infância na dose de 41 mg/kg diminuiu os depósitos de tecido adiposo visceral, sem, no entanto, alterar o peso corporal, o índice de Lee ou a ingestão alimentar nos ratos Wistar. Esse achado sugere efeitos específicos do TPM no tecido adiposo. Nesse sentido, o TPM demonstrou induzir a lipólise em adipócitos da linhagem 3T3-L1, sugerindo que este fármaco pode atuar diretamente no tecido adiposo independente de seu efeito no sistema nervoso central (MARTINS et al., 2015). Além disso, os efeitos do TPM sobre o TAB de ratos parecem ser permanentes, pois mesmo na ausência do fármaco na circulação sanguínea, a redução neste tecido foi mantida. Nossos achados apoiam o papel do TPM na redução da adiposidade em ratos, e que esse efeito parece ser independente da presença de sobrepeso ou obesidade.

É importante destacar que os efeitos a curto e longo prazo do uso de TPM na infância parecem ser sexo-específicos, uma vez que nas ratas Wistar não houve diminuição do TAB, mas houve diminuição do TAM na idade adulta. De forma semelhante, em ratas Zucker com fenótipo magro, o tratamento com TPM nas doses de 15 e 60mg/kg por um período de 28 dias foi associado a uma diminuição nos depósitos de TAM (PICARD et al., 2000). No entanto, o uso de TPM em altas doses (60mg/kg) foi associado à redução do TAB retroperitoneal nesses animais (PICARD et al., 2000). Ainda, embora o tratamento com TPM não tenha afetado a ingestão alimentar, ratas Zucker com fenótipo magro tiveram redução do peso corporal após o período de tratamento (PICARD et al., 2000), o que não foi demonstrado no presente estudo.

Na verdade, os efeitos da TPM sobre parâmetros biométricos de fêmeas são contraditórios na literatura (PICARD et al., 2000; RICHARD et al., 2002; LALONDE et al., 2004; ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011). Em camundongos fêmeas não obesas, o tratamento com TPM na dose de 60mg/kg por 7 dias reduziu significativamente o ganho de gordura corporal desses animais. Os autores relataram que, embora esses animais tenham apresentado reduções no ganho de peso corporal e na ingestão alimentar após o tratamento, ambas as reduções não foram estatisticamente significativas (LALONDE et al., 2004). Já em camundongos fêmeas obesas, além de diminuir a massa gorda corporal, o tratamento com TPM diminuiu o ganho de peso corporal e a ingestão alimentar desses animais (LALONDE et al., 2004). Esses trabalhos sugerem que o efeito do fármaco é mais pronunciado em fêmeas obesas do que em fêmeas magras. Outros autores, por sua vez, demonstraram que o tratamento com TPM na dose de 50mg/kg por 2 meses em ratas albinas sob dieta rica em gorduras reduziu o ganho de massa corporal, mas não alterou os depósitos de tecido adiposo retroperitoneal (ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011). As divergências sobre os efeitos do TPM nos parâmetros biométricos podem ser decorrentes de alguns fatores, como o período de tratamento, diferentes doses de TPM e idade e linhagem de roedores. Desta forma, os efeitos do TPM sobre parâmetros biométricos em fêmeas precisam ser melhor elucidados.

Em suma, o presente estudo investigou os efeitos adversos a curto e longo prazo sob parâmetros cardiovasculares e metabólicos de ratos e ratas Wistar tratados com TPM durante a infância. Foi demonstrado que o tratamento com TPM durante a infância está associado com disfunção vascular sexo-específica na vida adulta, bem como alterações nos depósitos de tecido adiposo a curto e longo prazo; em ratos caracterizado por redução de TAB a curto e longo prazo, enquanto em ratas, caracterizado por redução de TAM em longo prazo. Além disso, demonstramos que o tratamento com TPM não afetou, a curto e longo prazo, o perfil lipídico, pressão arterial e frequência cardíaca desses animais.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo fornece evidências, pela primeira vez, de que o tratamento com TPM durante a infância causa disfunção vascular na idade adulta, e que os efeitos do TPM no sistema vascular são sexo-específicos. Esses resultados sugerem que o tratamento com TPM, em fases iniciais da vida, pode aumentar o risco de disfunção vascular na idade adulta, apontando para a necessidade de monitoramento cardiovascular em crianças tratadas com esse anticonvulsivante. Adicionalmente, o tratamento com TPM durante a infância reduziu os depósitos de tecido adiposo visceral a curto e longo prazo em ratos, e os depósitos de tecido adiposo marrom em ratas a longo prazo. As consequências do TPM sobre os depósitos de tecido adiposo ainda precisam ser melhor investigadas.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABO-ELMATTY, D. M.; ZAITONE, S. A. Topiramate induces weight loss and improves insulin sensitivity in dietary obese rats: comparison to sibutramine. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 15, n. 10, p. 1187–95, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22165681>>.
- ANVISA. Nota Técnica Nº 335/2013. Princípio ativo: topiramato. **Consultoria Jurídica/Advocacia Geral da União. Ministério da Saúde.**, v. 2012, p. 1–7, 2013.
- BARKER, D. J. . et al. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, set. 1989. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(89\)90710-1/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(89)90710-1/abstract)>.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. Low birth weight and hypertension. **BMJ**, v. 297, n. 6641, p. 134–135, 9 jul. 1988. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1833827&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- BARKER, D. J. P. et al. Trajectories of Growth among Children Who Have Coronary Events as Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1802–1809, 27 out. 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa044160>>.
- BAROUKI, R. et al. Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health. **Environmental Health**, v. 11, n. 1, p. 42, 20 dez. 2012. Disponível em: <<http://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-11-42>>.
- BEN-MENACHEM, E. et al. Predictors of Weight Loss in Adults with Topiramate-Treated Epilepsy. **Obesity Research**, v. 11, n. 4, p. 556–562, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1260085>>.
- BEN-MENACHEM, E. et al. Topiramate monotherapy in the treatment of newly or recently diagnosed epilepsy. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 7, p. 1180–1195, jul. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291808800458>>.
- BITON, V. et al. A randomized, placebo-controlled study of topiramate in primary generalized tonic-clonic seizures. **Neurology**, v. 52, n. 7, p. 1330–1330, 1 abr. 1999. Disponível em: <<http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.52.7.1330>>.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214514117300405>>.
- BRAY, G. A. et al. A 6-Month Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Trial of Topiramate for Weight Loss in Obesity. **Obesity Research**, v. 11, n. 6, p. 722–733, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805393>>.
- BRIEGER, K. et al. Reactive oxygen species: From health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, n. August, p. 1–14, 2012.
- BUSSEROLLES, J. et al. Metabolic Syndrome in the Rat: Females are Protected

Against the Pro-Oxidant Effect of a High Sucrose Diet. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 9, p. 837–842, 29 out. 2002. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/153537020222700918>>.

CARICILLI, A. M. et al. Topiramate Treatment Improves Hypothalamic Insulin and Leptin Signaling and Action and Reduces Obesity in Mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4401–4411, set. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2012-1272>>.

CERAVOLO, G. S. et al. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 341–346, mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.018>>.

CHUANG, Y. C. et al. Effects of long-term antiepileptic drug monotherapy on vascular risk factors and atherosclerosis. **Epilepsia**, v. 53, n. 1, p. 120–128, 2012.

CHUKWU, J. et al. Weight change, genetics and antiepileptic drugs. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 43–51, 2 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17512433.2014.857599>>.

CHUNG, A. M.; EILAND, L. S. Use of Second-Generation Antiepileptic Drugs in the Pediatric Population. **Pediatric Drugs**, v. 10, n. 4, p. 217–254, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2165/00148581-200810040-00003>>.

CIPOLLONE, F.; CICOLINI, G.; BUCCI, M. Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: Recent insights and future perspectives. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 118, n. 2, p. 161–180, 2008.

CLARK, A. M. et al. Plasma topiramate concentrations resulting from doses associated with neuroprotection against white matter injury and stroke in two strains of rat pups. **Pediatric Research**, v. 73, n. 3, p. 317–324, 19 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/pr2012194>>.

CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 6, p. 776–793, 3 ago. 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623315570339>>.

CORTÉS-MORENO, G. Y. et al. Anorectic efficacy and safety of the diethylpropion-topiramate combination in rats. **Drug Development Research**, v. 79, n. 5, p. 225–233, 2018.

CUNHA, T. R. da et al. Effects of progesterone treatment on endothelium-dependent coronary relaxation in ovariectomized rats. **Life Sciences**, v. 247, n. September 2019, p. 117391, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117391>>.

CUTINI, P. H.; CAMPELO, A. E.; MASSHEIMER, V. L. Differential regulation of endothelium behavior by progesterone and medroxyprogesterone acetate. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 3, p. 179–193, mar. 2014. Disponível em: <<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/220/3/179.xml>>.

CZEPIEL, K. S. et al. Pharmacotherapy for the Treatment of Overweight and Obesity in Children, Adolescents, and Young Adults in a Large Health System in the US. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. May, 13 maio 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.00290/full>>.

DHANANJAYAN, R. et al. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 372–379, 29 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12291-015-0516-y>>.

DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 9, p. 452–463, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.012>>.

EL-ABHAR, H. S.; SCHAALAN, M. F. Topiramate-induced modulation of hepatic molecular mechanisms: An aspect for its Anti-Insulin resistant effect. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

EL-FARAHATY, R. M. et al. Atherosclerotic effects of long-term old and new antiepileptic drugs monotherapy: A cross-sectional comparative study. **Journal of Child Neurology**, v. 30, n. 4, p. 451–457, 2015.

EPA. Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW 3/4 as Default Method in Derivation of the Oral RfD. n. 68, p. 1–34, 2006.

EXPERT COMMITTEE ON PEDIATRIC EPILEPSY, I. A. of P. Guidelines for diagnosis and management of childhood epilepsy. **Indian pediatrics**, v. 46, n. 8, p. 681–98, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19717860>>.

EYAL, S. et al. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 737–744, 2004.

FAN, L. M. et al. Nox2 contributes to age-related oxidative damage to neurons and the cerebral vasculature. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 8, p. 3374–3386, 2019.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 9, p. 2007–18, jul. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2545495>>.

GLUCKMAN, P. D. Effect of In Utero and Early Life Conditions on Adult Health and Disease. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 1, p. 61–73, 2008.

GLUCKMAN, P. D. et al. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 401–8, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2009.102>>.

GREEN, D. J. et al. Sex differences in vascular endothelial function and health in humans: impacts of exercise. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 2, p. 230–242, 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/EP085367>>.

HADI, H. A. R.; CARR, C. S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vascular health and risk management**, v. 1, n. 3, p. 183–198, 2005.

HIGASHI, C. M. et al. Intrauterine and lactational exposure to fluoxetine enhances endothelial modulation of aortic contractile response in adult female rats. **Vascular Pharmacology**, v. 108, n. December 2017, p. 67–73, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.04.004>>.

INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial

dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>>.

IORGA, A. et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, v. 8, n. 1, p. 33, 24 dez. 2017. Disponível em: <<https://bsd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13293-017-0152-8>>.

JIANG, C. et al. Progesterone induces endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 163–167, fev. 1992. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299992905248>>.

JORNAYVAZ, F. R. et al. Low birth weight leads to obesity, diabetes and increased leptin levels in adults: the CoLaus study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n. 1, p. 73, 3 dez. 2016. Disponível em: <<http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0389-2>>.

JOSÉ GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Characterization of four different effects elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat aorta. v. 43, p. 128–138, 2005.

KATALINIC, V. et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 47–52, jan. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605000062>>.

KHADDAJ MALLAT, R. et al. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 54, n. 7–8, p. 458–470, 17 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1394267>>.

KONG, F.-C.; MA, C.-L.; ZHONG, M.-K. Epigenetic Effects Mediated by Antiepileptic Drugs and their Potential Application. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 2, p. 153–166, 23 jan. 2020. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/175517/article>>.

KRÜGER-GENGE et al. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4411, 7 set. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4411>>.

KUNTIC, M. et al. Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2). **European Heart Journal**, p. 2472–2483, 2020.

LALONDE, J. et al. Additive effects of leptin and topiramate in reducing fat deposition in lean and obese ob/ob mice. **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 4, p. 415–420, 2004.

LAW, C. M. et al. Early growth and abdominal fatness in adult life. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 46, n. 3, p. 184–186, 1992.

LI, H. et al. Effects of topiramate on weight and metabolism in children with epilepsy. **Acta Paediatrica**, v. 98, n. 9, p. 1521–1525, set. 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508301>>.

LI, M.; KUO, L.; STALLONE, J. N. Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 6, p. 2444–2455, 2008.

LIN, K. Topiramato : Uma Molécula Multifacetada. **Rev Neurocoenc**, v. 19, n. 1, p. 8–9, 2011.

MARCHIO, P. et al. Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, n. Ldl, 2019.

MARCO, E. M. et al. Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: The issue of early adolescent exposure. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 8, p. 1722–1739, ago. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.011>>.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 1, p. 51–65, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2011.4335>>.

MARTINS, G. P. C. et al. Topiramate effects lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 6, p. 827–830, nov. 2015. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2015.514>>.

MELO, L. G. et al. Vascular Remodeling in Health and Disease. In: **Cardiovascular Medicine**. London: Springer London, 2007. p. 1541–1565.

MINTZER, S. Metabolic consequences of antiepileptic drugs. **Current Opinion in Neurology**, v. 23, n. 2, p. 164–169, abr. 2010. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00019052-201004000-00013>>.

MORELAND, E. C.; GRIESEMER, D. A.; HOLDEN, K. R. Topiramate for intractable childhood epilepsy. **Seizure**, v. 8, n. 1, p. 38–40, jan. 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1059131198902126>>.

MURDOCH, C. E. et al. Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction. **Basic Res Cardiol.**, p. 527–538, 2011.

MURPHY, E. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 109, n. 6, p. 687–696, 2 set. 2011. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.236687>>.

NARULA, P. K. et al. Topiramate for prevention of olanzapine associated weight gain and metabolic dysfunction in schizophrenia: A double-blind, placebo-controlled trial. **Schizophrenia Research**, v. 118, n. 1–3, p. 218–223, maio 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2010.02.001>>.

ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 2, p. R233–R249, 2004.

OSMOND, C.; BARKER, D. J. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of

coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. **Environmental health perspectives**, v. 108 Suppl, n. 3, p. 545–53, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852853>>.

OZCELIK, A. A. et al. The Effect of Topiramate on Body Weight and Ghrelin, Leptin, and Neuropeptide-Y Levels of Prepubertal Children With Epilepsy. **Pediatric Neurology**, v. 51, n. 2, p. 220–224, ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.05.001>>.

PADMANABHAN, V.; CARDOSO, R. C.; PUTTABYATAPPA, M. Developmental programming, a pathway to disease. **Endocrinology**, v. 157, n. 4, p. 1328–1340, 2016.

PICARD, F. et al. Topiramate Reduces Energy and Fat Gains in Lean ( Fa/? ) and Obese ( fa/fa ) Zucker Rats. **Obesity Research**, v. 8, n. 9, p. 656–663, dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11225714>>.

PRIVITERA, M. D. et al. Topiramate, carbamazepine and valproate monotherapy: double-blind comparison in newly diagnosed epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 107, n. 3, p. 165–175, 2 mar. 2003. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/08830738040190020901>>.

REIFE, R.; PLEDGER, G.; WU, S.-C. Topiramate as Add-On Therapy: Pooled Analysis of Randomized Controlled Trials in Adults. **Epilepsia**, v. 41, n. s1, p. 66–71, jan. 2000. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02175.x>>.

REITER, E. et al. Changes in body mass index during long-term topiramate therapy in paediatric epilepsy patients—a retrospective analysis. **Seizure**, v. 13, n. 7, p. 491–493, out. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1059131103002875>>.

RICHARD, D. et al. The effects of topiramate and sex hormones on energy balance of male and female rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 26, n. 3, p. 344–53, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896489>>.

RITTER, F. et al. Effectiveness, tolerability, and safety of topiramate in children with partial-onset seizures. Topiramate YP Study Group. **Epilepsia**, v. 41, n. S1, p. 82–5, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768307>>.

RODIÑO-JANEIRO, B. K. et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. **Vascular Health and Risk Management**, v. 9, n. 1, p. 401–428, 2013.

SILBERSTEIN, S. D. Topiramate in Migraine Prevention: A 2016 Perspective. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 57, n. 1, p. 165–178, jan. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/head.12997>>.

SIM CHOI, H. et al. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 27, n. 1, p. 31–44, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321810500403722>>.

SONMEZ, F. M. et al. Blood levels of cytokines in children with idiopathic partial and generalized epilepsy. **Seizure**, v. 22, n. 7, p. 517–521, 2013.

SREENIVASAN, P.; KUNJU, P. A. M. Efficacy of Topiramate as an Add-on Drug in Seizures in Indian Children—An Observational Study. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 78, n. 10, p. 1221–1224, 5 out. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12098-011-0395-z>>.

STANHEWICZ, A. E.; WENNER, M. M.; STACHENFELD, N. S. Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 315, n. 6, p. H1569–H1588, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00396.2018>>.

SUKUMAR, P. et al. Nox2 NADPH Oxidase Has a Critical Role in Insulin Resistance – Related Endothelial Cell Dysfunction. **Diabetes**, v. 62, n. June, p. 2130–2134, 2013.

TAN, T. Y. et al. Long-term antiepileptic drug therapy contributes to the acceleration of atherosclerosis. **Epilepsia**, v. 50, n. 6, p. 1579–1586, 2009.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 515–581, 2006.

VALENCIA, I. et al. Efficacy and Tolerability of Topiramate in Children Younger Than 2 Years Old. **Journal of Child Neurology**, v. 20, n. 8, p. 667–670, 2 ago. 2005. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/08830738050200080601>>.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, jan. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/apha.12646>>.

VARIK, B. J. Van et al. Mechanisms of arterial remodeling : lessons from genetic diseases. v. 3, n. December, p. 1–10, 2012.

VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 10, p. 582–593, out. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncpneph0283>>.

VERROTTI, A. et al. Topiramate-induced weight loss: A review. **Epilepsy Research**, v. 95, n. 3, p. 189–199, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.05.014>>.

VIDIGAL, C. B. et al. Intrauterine exposure to metformin: Evaluation of endothelial and perivascular adipose tissue function in abdominal aorta of adult offspring. **Life Sciences**, v. 207, n. May, p. 72–79, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.050>>.

VYAS, M. V. et al. Antiepileptic drug use for treatment of epilepsy and dyslipidemia: Systematic review. **Epilepsy Research**, v. 113, p. 44–67, jul. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.03.002>>.

WAGNER, A. H.; SCHROETER, M. R.; HECKER, M. 17 $\beta$ -Estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2121–2130, out. 2001. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.01-0123com>>.

WASSMANN, K.; WASSMANN, S.; NICKENIG, G. Progesterone Antagonizes the Vasoprotective Effect of Estrogen on Antioxidant Enzyme Expression and Function. **Circulation Research**, v. 97, n. 10, p. 1046–1054, 11 nov. 2005. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000188212.57180.55>>.

WATEMBERG, N. et al. Clinical Experience With Open-Label Topiramate Use in Infants Younger Than 2 Years of Age. **Journal of Child Neurology**, v. 18, n. 4, p. 258–262, 2 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12760428>>.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. Supplement 1, p. 6543–6549, 3 maio 2005. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/11310>>.

WIDLANSKY, M. E.; MALIK, M. A. Vascular Endothelial Function. In: LANZER, P. (Ed.). **PanVascular Medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 89–120.

WU, X. et al. The Efficacy and Safety of Topiramate in the Prevention of Pediatric Migraine: An Update Meta-Analysis. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, n. February, p. 1–10, 2020.

YORK, D. A. et al. Effect of topiramate on body weight and body composition of osborne-mendel rats fed a high-fat diet: alterations in hormones, neuropeptide, and uncoupling-protein mRNAs. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 967–975, out. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900700004512>>.

ZHANG, X. et al. Modulation of High-Voltage-Activated Calcium Channels in Dentate Granule Cells by Topiramate. **Epilepsia**, v. 41, n. s1, p. 52–60, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768302>>.

**ANEXO A**

Aprovação da Comissão Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL: 100/2018).



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 100/2018

Londrina, 15 de Junho de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliações agudas e tardias do metabolismo e dos sistemas cardiovascular e reprodutor de ratos tratados com topiramato na infância ou adolescência" Protocolo CEUA nº 9379.2018.26, sob a responsabilidade de Graziela Scallanti Ceravolo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em 14/06/2018.

O objetivo do projeto é avaliar em ratos tratados durante a infância (DPN 16-DPN28) ou na adolescência (DPN 28-DPN50) os parâmetros metabólicos, cardiovasculares e reprodutivos logo após o término do tratamento e na vida adulta (DPN 80-DPN90): 1) o fenótipo metabólico; 2) a variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca; 3) atividade do barorreflexo; 4) resposta pressora ao estresse de restrição agudo; 5) a reatividade da aorta torácica; 6) papel de componentes oxidantes nas alterações vasculares; 7) possíveis alterações nas Células progenitoras endoteliais circulantes; 8) instalação da puberdade; 9) fertilidade; 10) histomorfometria dos órgãos reprodutores; 11) dosagem hormonal. Grau de invasividade: 3.

Vigência do Projeto	21/07/2018 a 21/07/2022
Espécie/linhagem	Rato heterotípico (Wistar)
Nº de animais	354
Peso/idade	48 animais de 75 dias e 306 animais de 26 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, aorta, tecido adiposo retroperitoneal, perigonadal e mamão, ducto deferente, testículos, epidídimos, vesículas seminais, próstata, útero e ovários

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

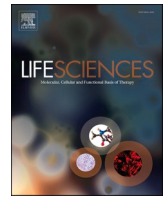
*Maria Fernanda R. Graciano*  
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Imo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Graziela Scallanti Ceravolo  
 Responsável pelo projeto  
 Departamento de Ciências Fisiológicas CCB  
 C/C para a Chefe do Depto de Fisiológica CCB  
 C/C para a Direção do CCB  
 C/C para Biotério do CCB

**ANEXO B**

**“Topiramate treatment in Wistar rats during childhood induces sex-specific vascular dysfunction in adulthood (<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120189>; *Life Sciences* 288 (2022) 120189)”**



## Topiramate treatment in Wistar rats during childhood induces sex-specific vascular dysfunction in adulthood

Camila B. Vidigal<sup>a</sup>, Kawane F. Moura<sup>b</sup>, Tiago J. Costa<sup>c</sup>, Lorena I. Borges<sup>a</sup>, Pedro M.M. Figaro<sup>d</sup>, Ingrid C. Pinto<sup>e</sup>, Fábio G. de Andrade<sup>b,d</sup>, Daniela C.C. Gerardin<sup>a,b</sup>, Rubia Casagrande<sup>e</sup>, Rita C. Tostes<sup>c</sup>, Maria do Carmo Franco<sup>f</sup>, Graziela S. Ceravolo<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

<sup>b</sup> Graduation Program of Physiological Sciences, Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Department of Histology, State University of Londrina, Londrina, Brazil

<sup>e</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

<sup>f</sup> Department of Physiology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Antiepileptic drug  
Endothelial dysfunction  
Aortic hypertrophy  
Oxidative stress  
Inflammation

### ABSTRACT

The present study determined whether treatment during childhood with topiramate (TPM), a new generation antiepileptic drug, results in altered aortic reactivity in adult male and female rats. We also sought to understand the role of endothelium-derived contractile factors in TPM-induced vascular dysfunction. Male and female Wistar rats were treated with TPM (41 mg/kg/day) or water (TPM vehicle) by gavage during childhood (postnatal day, 16–28). In adulthood, thoracic aorta reactivity to phenylephrine (phenyl), as well as aortic thickness and expression of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), NOX2, and p47<sup>phox</sup> were evaluated. The aortic response to phenyl was increased in male and female rats from the TPM group when compared with the control group. In TPM male rats, the hyperreactivity to phenyl was abrogated by the inhibition of NADPH oxidase and COX-2, while in female rats, responses were restored only by inhibition of COX-2. In addition, TPM male rats presented aortic hypertrophy and increased expression of NOX-2 and p47<sup>phox</sup>, while TPM female rats showed increased COX-2 aortic expression. Taken together, for the first-time, the present study provides evidence that treatment with TPM during childhood causes vascular dysfunction in adulthood, and that the mechanism underlying the vascular effects of TPM is sex-specific.

### 1. Introduction

Antiepileptic drugs, a wide heterogeneous group of drugs that exhibit different mechanisms of action, are divided into first-, second-, and third- generations, or simply into old and new generations of antiepileptic drugs. Long-term use of old antiepileptic drugs, especially the potential inducers of the cytochrome P450 enzyme, such as carbamazepine and phenytoin, has been associated with the acceleration of atherosclerosis [1,2]. In this context, new generation antiepileptic drugs are expected to minimize metabolic disorders and vascular risks and decrease atherosclerosis-related diseases caused by the prolonged use of these drugs [2]. However, the vascular risk of the long-term use of these new drugs is not completely known.

Topiramate (TPM) is a new generation antiepileptic drug approved

by the Food and Drug Administration for the treatment of epilepsy in children over 2 years old [3]. Although the efficacy and adverse effects profile of TPM is not fully established, some clinical trials have suggested that this drug may be an effective alternative for the treatment of epilepsy in children under 2 years of age [4,5]. In fact, TPM has been used as an off-label in the neonatal period [6].

TPM treatment in children and adolescents with epilepsy has been associated with increased vascular risk markers, such as elevated levels of homocysteine and dyslipidemia, remodeling of the carotid artery [7], and reduced levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) [8]. Together, these changes may contribute to the development of endothelial dysfunction, which in turn can be the earliest event that signals the onset of cardiovascular disease, such as atherosclerosis and hypertension [9,10]. The early effects of TPM treatment on endothelial

\* Corresponding author at: Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB-Uel-Campus Universitário, 86051-980 Londrina, PR, Brazil.

E-mail address: [gsceravolo@uel.br](mailto:gsceravolo@uel.br) (G.S. Ceravolo).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120189>

Received 9 September 2021; Received in revised form 23 November 2021; Accepted 25 November 2021

Available online 1 December 2021

0024-3205/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

function have not been evaluated in humans or experimental animals. In addition, the studies that associate the use of TPM with increased vascular risk markers do not distinguish sex-dependent effects [9,10], which are very important in vascular function as well as in cardiovascular disease-associated vascular dysfunction [11]. Thus, the aim of the present study was to determine, in male and female rats, potential late vascular adverse effects of treatment with TPM during childhood.

## 2. Methods

### 2.1. Animal model

Male ( $n = 9$ ) and female ( $n = 18$ ) naive Wistar rats were mated overnight. In the morning of the next day, a vaginal smear was performed to determine the pregnancy diagnosis. For this procedure, a sterile cotton-tipped swab wetted in saline solution was introduced into the vaginal orifice and then carefully rotated against the vaginal wall. The collected sample of vaginal epithelial cells was placed on glass slides and viewed immediately under a light microscope with 40 $\times$  objective lenses. The pregnancy diagnosis, considered gestational day zero, was determined when the microscopic analysis showed the presence of sperm and the estrus phase (characterized by presence of predominately anucleate keratinized epithelial cells) of the estrous cycle [12]. The day of the pups' birth was denominated postnatal day (PND) zero. On PND1, the pups were counted, identified by sex, and weighed. On PND4, the litter was reduced to 10 animals (5 males and 5 females). On PND16, the pups were distributed into two experimental groups: i) Control group (CTR): received water by gavage from PND16 to 28; ii) TPM group: received 41 mg/kg/day of topiramate (Topamax®, Janssen-Cilag, Brazil) suspended in water, by gavage, from PND16 to 28. The treatment time corresponds to the period of childhood in rats [13]. The pups were weaned on PND21 and housed with their respective groups (5 rats/cage). The animals were weighed daily for correction of the volume of drug administered (data not shown).

The dose used in this study was based on the doses used to treat epilepsy in children, with maintenance doses ranging from 3 to 9 mg/kg/day [14–20]. Dosimetry adjustments were made for the dose of 9 mg/kg using the Body Weight  $\frac{3}{4}$  Scale [21]. Considering the approximate weight of a 3-year-old child as 12 kg and the rodent in the equivalent period (16 days) of 30 g, the dose of TPM for treatment of rodents was 41 mg/kg/day. After the end of treatment, the rats were followed until adulthood, when the vascular function was assessed. Male rats were evaluated on PND 120 and female rats on PND 85, always in the physiological estrus phase.

All animals had free access to water and regular laboratory chow (Nuvital, Brazil). The rats were maintained at  $21 \pm 2$  °C in a room with a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 06:00 AM). All experimental protocols were approved by the State University of Londrina Ethics Committee for Animal Research CEUA/UEL: 100/2018.

### 2.2. Vascular reactivity studies

The rats were anesthetized with sodium thiopental (40 mg/kg, i.p., Cristália, Brazil) and intact segments (3 mm) of dissected thoracic aorta with (Endo+) and without (Endo–) endothelium were set up in tissue baths for measurement of isometric contractile force. The tissue baths, containing Krebs–Henseleit solution (containing in mM: 130 NaCl, 14.9 NaHCO<sub>3</sub>; 4.7 KCl; 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.17 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 5.5 glucose; 1.60 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; and 0.026 EDTA – reagents, obtained from Labsynth, Brazil) at 37 °C and pH 7.4, were gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, and aortic segments were maintained at a resting tension of 1.5 g [22].

The integrity of smooth muscle cells was tested with potassium chloride (KCl, 90 mM; Labsynth, Brazil) and endothelial integrity was tested with acetylcholine (3  $\mu$ M; #A-6625 Sigma-Aldrich, USA). The endothelium was considered intact if the acetylcholine-induced relaxation was greater than 70%. Vessels exhibiting less than 5% relaxation in

response to acetylcholine were considered endothelium-denuded. Vessels were contracted with phenylephrine (phenyl, 3  $\mu$ M; #P-6126, Sigma-Aldrich, USA). Cumulative concentration–effect curves to phenyl (1 nM–30  $\mu$ M) were also performed in Endo+ in the absence or presence of: apocynin (30  $\mu$ M, #PHL83252, Sigma-Aldrich, USA); tempol (30  $\mu$ M; #581500, Calbiochem, USA); NS-398 (1  $\mu$ M; #N194, Sigma-Aldrich, USA); dimethyl sulfoxide (DMSO, the vehicle for NS-398; Labsynth, Brazil); and indomethacin (30  $\mu$ M for female rats, 1  $\mu$ M for male rats; #I-7378, Sigma-Aldrich, USA). The differences in indomethacin concentrations used in male and female aortic rings preparation is due to the results obtained in pilot experiments using different concentrations of indomethacin on phenyl curves. After that, to perform the experiments we chose an indomethacin concentration that did not interfere with the aortic contractile response in control rats. The maximal response (maxR, expressed in grams of tension) and the pD<sub>2</sub> (negative logarithm of the agonist concentration resulting in 50% of the maxR) to phenyl were calculated using non-linear regression analysis (GraphPad Prism software, USA).

### 2.3. Western blot

The aorta was homogenized and equal aliquots corresponding to 30  $\mu$ g of proteins were resolved by SDS-PAGE on 10% gels and electroblotted onto nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with the primary antibodies anti-NOX2 (1:2000 #ab4380, ABCam), anti-p47<sup>phox</sup> (1:2000 #sc17844, Santa Cruz), anti-cyclooxygenase 1 (COX1, 1:1000 #4841S, Cell Signaling), and anti-COX2 (1:2000 #ab15191, ABCam) and later with the respective (1:10000 dilution of horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit (#ab6717) or goat anti-mouse (#12-349 Millipore) secondary antibody. The chemiluminescent signal was visualized by the LAS4000 imaging system (GE Headquarter Life Science, USA). Ponceau staining was used to normalize expression of the evaluated proteins in each sample. Densitometry analyses of Western blots were performed using an ImageQuant analysis (GE Headquarter Life Science, USA).

### 2.4. Evaluation of superoxide anion concentration

Superoxide anion assay was performed through the nitroblue tetrazolium assay (NBT, Sigma Chemical Co., USA). Serum samples from male rats were centrifuged and for the reaction, the supernatant was incubated in microplates with NBT reagents. The compound formed by the reduction of NBT (formazan) was solubilized with 2 M potassium hydroxide (KOH) and DMSO (Labsynth, Brazil). The reduction of NBT to formazan was measured in a microplate spectrophotometer reader (Enspire, Perkin Elmer) at 620 nm and the results are presented as NBT reduction (Optic Density) per mg of protein.

### 2.5. Histological analysis

The thoracic aorta was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), embedded in paraffin, cut into transversal sections (7  $\mu$ m) and stained with hematoxylin and eosin [23]. All reagents were obtained from Labsynth, Brazil. In the sections, the images were captured at 400 $\times$  magnification for analysis of the thickness of the middle layer of the thoracic aorta. From each captured image, four measurements of the thickness were made: upper measurement, lower measurement, right lateral measurement, and left lateral measurement, following the aortic ends. An average was then calculated, which represented the aortic thickness ( $\mu$ m). Observations, photographic documentation, and histological analyses were performed in Motic Image Plus® 3.0 software, China.

### 2.6. Statistical analysis

An exploratory analysis was performed to evaluate normal

distribution and homogeneity of variance of each variable. All variables presented normal distribution and homogeneity and were analyzed by the Student's *t*-test or two-way and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc*. Comparisons were made between groups of the same sex. The results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The differences were considered significant if  $p < 0.05$ . The statistical analyses were performed using SPSS (IBM, SPSS Statistics v20, USA) and the graphs were performed using software package Prism 6 (GraphPad Software, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Topiramate treatment during childhood caused aortic hyperreactivity to phenyl in female and male adult rats

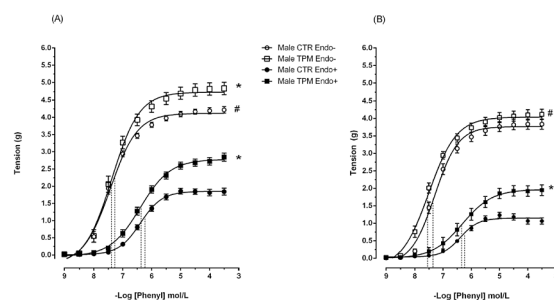
Phenyl evoked concentration-dependent contractions in Endo+ and Endo- aortic rings from the CTR and TPM groups (Fig. 1, Table 1). In TPM male adult rats, the maxR ( $p < 0.05$ ) to phenyl in Endo+ and Endo- rings was increased when compared to the CTR group. In addition, the removal of the endothelium increased the contractile responses to phenyl in both groups. There was no difference in the pD<sub>2</sub> values between the CTR and TPM groups.

In aortic rings of female rats, the maxR ( $p < 0.05$ ) to phenyl in Endo+ rings was increased in TPM when compared to CTR. The removal of endothelium increased the response to phenyl in both groups (Table 1). Regarding the pD<sub>2</sub> values, two-way ANOVA demonstrated an interaction in the variables endothelium and treatment ( $p < 0.05$ ); and one-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc* showed that Endo- rings had higher pD<sub>2</sub> compared to Endo+ rings in both groups (Supplementary material). No differences in pD<sub>2</sub> were detected between the CTR and TPM groups (Supplementary material).

#### 3.2. The role of NADPH oxidase and cyclooxygenases in aortic hyperreactivity to phenyl

In Endo+ vessels from TPM male rats, apocynin ( $p < 0.05$ ) and indomethacin ( $p < 0.05$ ), but not tempol ( $p > 0.05$ ), decreased the maxR to phenyl when compared to the TPM without inhibitors (Fig. 2B, Table 2). In Endo+ aortic rings from CTR male rats, the incubation with these blockers did not interfere with the response to phenyl (Fig. 2A, Table 2). Moreover, apocynin, tempol, and indomethacin did not interfere with pD<sub>2</sub> in Endo+ aortas from male CTR and male TPM rats (Supplementary material).

In relation to TPM female rats, the incubation of Endo+ aortic rings with indomethacin ( $p < 0.05$ ) restored the endothelial modulation to the



**Fig. 1.** Cumulative concentration-effect curves to phenylephrine in aortic rings with (Endo+) or without (Endo-) endothelium from male (panel A) and female (panel B) adult rats treated with topiramate (TPM) or water (CTR) during childhood (postnatal days, 16–28). Data are reported as mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ –12. The maximal response (maxR) and pD<sub>2</sub> (–log of the agonist concentration resulting in 50% of the maxR) were compared by two-way followed by one-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc*. The dashed lines represent the pD<sub>2</sub> of each curve ( $p > 0.05$ ). \* $p < 0.05$  maxR TPM vs CTR. # $p < 0.05$  maxR Endo- rings vs Endo+ rings.

**Table 1**

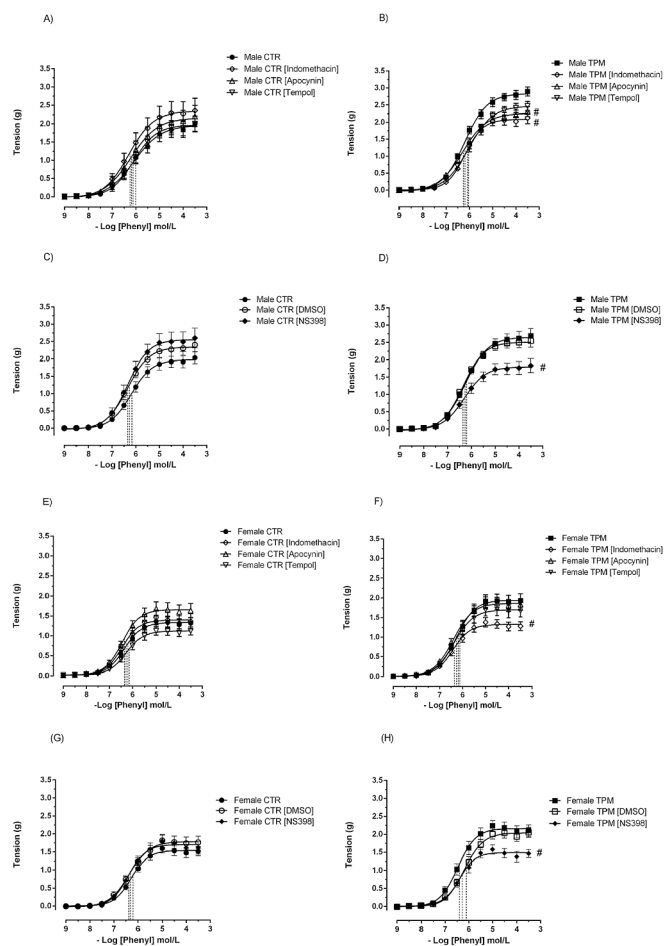
Phenylephrine-induced contraction in aortic rings isolated from adult rats treated with topiramate or water during childhood.

	Male (maxR)		Female (maxR)	
	CTR	TPM	CTR	TPM
Endo+	1.87 $\pm$ 0.09	2.78 $\pm$ 0.11*	1.15 $\pm$ 0.09	1.97 $\pm$ 0.15*
Endo-	4.11 $\pm$ 0.08#	4.72 $\pm$ 0.17*#	3.76 $\pm$ 0.14#	4.03 $\pm$ 0.14#

The maximal response (maxR, g of tension) to phenylephrine in aortic rings with (Endo+) and without (Endo-) endothelium, isolated from adult rats treated with topiramate (TPM) or water (CTR) during childhood. Data are reported as means  $\pm$  SEM. The number of rats/group was 10–12. Two-way ANOVA followed by one-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc*, comparing the same sex.

\*  $p < 0.05$  TPM vs CTR.

#  $p < 0.05$  Endo- vs Endo+.



**Fig. 2.** Cumulative concentration-effect curves to phenylephrine in aortic rings with endothelium (Endo+) from male and female adult rats treated with topiramate (TPM - B, D, F, H) or water (CTR - A, C, E, G) during childhood. The contraction was evaluated in the absence or presence of indomethacin, apocynin, tempol, NS-398, or DMSO. Data are reported as mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ –11. The maximal response (maxR) and pD<sub>2</sub> (–log of the agonist concentration resulting in 50% of the maxR) were evaluated by one-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc*. The dashed lines represent the pD<sub>2</sub> of each curve ( $p > 0.05$ ). # $p < 0.05$  maxR Endo+ ring with inhibitor vs Endo+ ring without inhibitor.

contractile responses to phenyl, whereas the incubation with both apocynin and tempol did not interfere in the maxR to phenyl (Fig. 2F, Table 2). In female rats from the CTR group, the incubation of Endo+ aortas with these drugs did not interfere with the response to phenyl (Fig. 2E, Table 2). In addition, apocynin, tempol, and indomethacin did not interfere with the pD<sub>2</sub> in Endo+ aortic rings of female rats from the

**Table 2**

Effect of NADPH oxidase and cyclooxygenases inhibition on phenylephrine-induced contraction in aortic rings.

	Male (maxR)		Female (maxR)	
	CTR	TPM	CTR	TPM
Without inhibitors	1.99 ± 0.20	2.87 ± 0.12	1.34 ± 0.14	1.95 ± 0.17
Indomethacin	2.33 ± 0.32	2.09 ± 0.15 <sup>#</sup>	1.41 ± 0.19	1.29 ± 0.11 <sup>#</sup>
Apocynin	2.15 ± 0.29	2.29 ± 0.14 <sup>#</sup>	1.67 ± 0.17	1.84 ± 0.14
Tempol	1.97 ± 0.20	2.47 ± 0.14	1.14 ± 0.10	1.63 ± 0.15

The maximal response (maxR, g of tension) to phenylephrine in aortic rings with endothelium in the absence (without inhibitors) or presence of indomethacin, apocynin, and tempol. The aorta was isolated from adult rats treated with topiramate (TPM) or water (CTR) during childhood. Data are reported as mean ± SEM. The number of rats/group was 9–11. One-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc*, comparing the same sex.

<sup>#</sup>  $p < 0.05$  Endo+ ring with inhibitor vs Endo+ ring without inhibitor.

CTR group and TPM group (Supplementary material).

In male adult rats (Fig. 2C,D, Table 3), NS-398 decreased the maxR to phenyl in Endo+ from TPM rats ( $p < 0.05$ ), while DMSO (NS-398 vehicle) did not interfere with this response ( $p > 0.05$ ). Regarding the CTR group, neither NS-398 nor DMSO interfered in the maxR to phenyl. In addition, NS-398 and DMSO did not interfere with pD<sub>2</sub> in either group, CTR or TPM (Supplementary material).

In females (Fig. 2G,H, Table 3), NS-398 ( $p < 0.05$ ) decreased the maxR to phenyl in the TPM group, while DMSO did not interfere with this response ( $p > 0.05$ ). Neither NS-398 nor DMSO interfered with the maxR, or pD<sub>2</sub> in vessels of female rats from the CTR group or with pD<sub>2</sub> values in the TPM group (Supplementary material).

NOX-2 ( $p < 0.05$ ) and p47phox ( $p < 0.05$ ) expressions were increased in the thoracic aorta from TPM male rats when compared to the CTR group (Fig. 3A,B). However, COX-1 and COX-2 expressions were similar between the groups (Fig. 4A,B). Accordingly, the concentration of reduced NBT in the serum of TPM rats ( $p < 0.05$ ) was increased compared to the CTR rats (Fig. 5), suggesting increased superoxide anion concentrations in TPM rats.

In relation to female adult rats, increased aortic COX-2 expression was observed in the TPM group compared to the CTR group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4D). The aortic expression of COX-1, NOX-2, and p47phox was similar between the groups (Figs. 4A, 3C,D respectively).

### 3.3. Aortic thickness

The aortic thickness (Fig. 6) of TPM male rats ( $69.88 \pm 1.24 \mu\text{m}$ ,  $n = 8$ ) was increased in comparison to the CTR group ( $63.90 \pm 1.26 \mu\text{m}$ ,  $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ). In female adult rats, the aortic thickness was similar between CTR ( $62.22 \pm 1.11 \mu\text{m}$ ,  $n = 7$ ) and TPM groups ( $61.62 \pm 2.69 \mu\text{m}$ ,  $n = 8$ ;  $p > 0.05$ ).

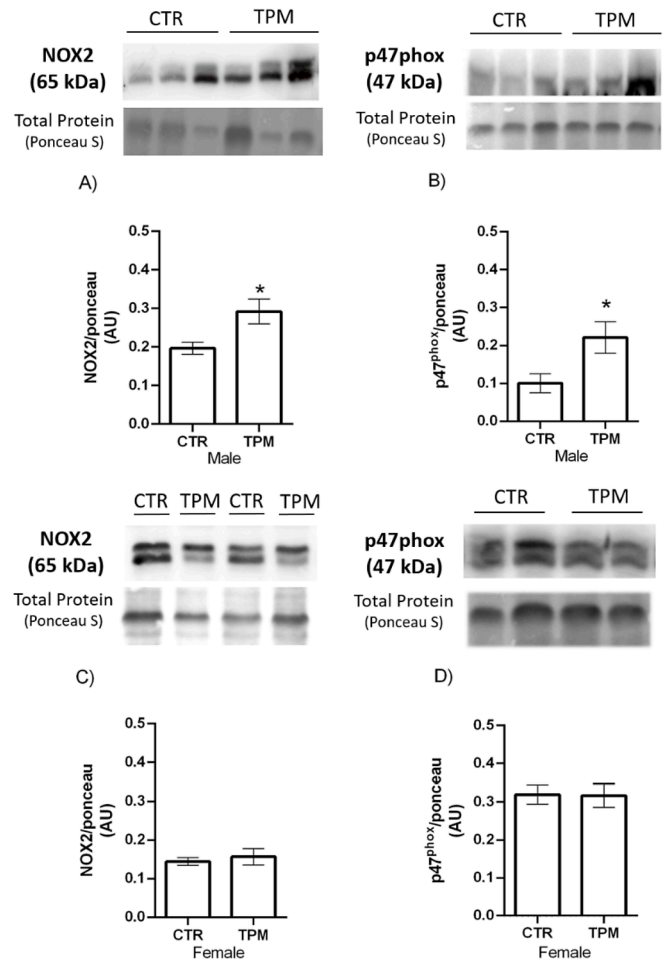
**Table 3**

Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on phenylephrine-induced contraction in aortic rings.

	Male (maxR)		Female (maxR)	
	CTR	TPM	CTR	TPM
Without Inhibitors	1.97 ± 0.17	2.66 ± 0.20	1.55 ± 0.13	2.16 ± 0.16
NS-398	2.54 ± 0.28	1.80 ± 0.18 <sup>#</sup>	1.72 ± 0.17	1.49 ± 0.13 <sup>#</sup>
DMSO	2.34 ± 0.21	2.52 ± 0.15	1.80 ± 0.17	2.05 ± 0.13

The maximal response (maxR, g of tension) to phenylephrine in aortic rings with endothelium in the absence (without inhibitors) or presence of NS-398 and DMSO. The aorta was isolated from adult rats treated with topiramate (TPM) or water (CTR) during childhood. Data are reported as mean ± SEM. The number of rats/group was 6–10. One-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc*, comparing the same sex.

<sup>#</sup>  $p < 0.05$  Endo+ rings with inhibitor vs Endo+ rings without inhibitor.



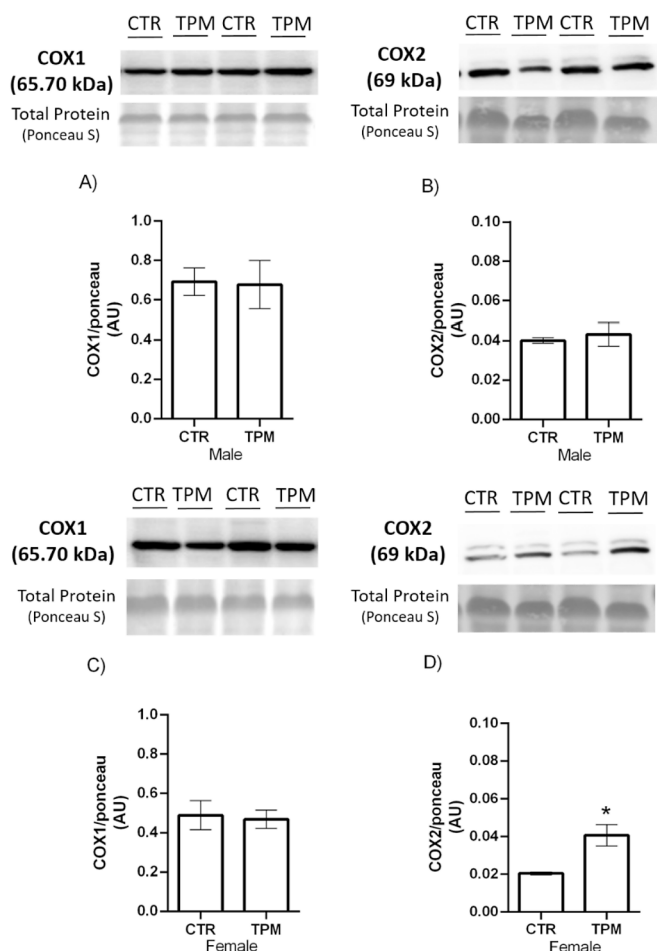
**Fig. 3.** Expression of NOX-2 (panels A,C) and p47phox (panels B,D) in thoracic aorta from male and female adult rats treated with topiramate (TPM) or water (CTR) during childhood. The immunoblots were normalized by Ponceau S total protein content. Student's *t*-test. Data are reported as mean ± SEM,  $n = 4-6$ . \* $p < 0.05$  TPM vs CTR.

## 4. Discussion

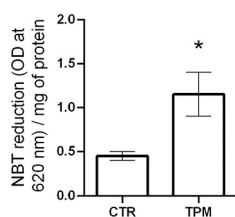
The results of the present study proved the hypothesis that administration of TPM during childhood favors the establishment of vascular dysfunction in adulthood. In addition, it was observed that the mechanisms involved in the vascular dysfunction were different between male and female rats.

In humans, it has been described that monotherapy with TPM is associated with acceleration of atherosclerosis development [7], however the mechanism involved in this increased risk has not yet been described. Endothelial dysfunction is one of the first events related to the vascular disease, and in the present study TPM treated male and female rats presented endothelial dysfunction characterized by aortic hyper-reactivity to phenyl in the presence of endothelium. As far as we know, this is the first study to evaluate endothelial function after treatment with TPM. In addition, it is important to highlight that in the present study the treatment was given in childhood period and the rats were evaluated in adulthood. This finding suggests that the vascular effects of TPM treatment can persist even after the drug is no longer present in the circulation.

The endothelial dysfunction observed in the TPM male rats seems to be mainly related to an increase in the generation of ROS. NADPH oxidase is the main enzymatic source of superoxide anion in the vasculature [24]. Reactive oxygen species (ROS) are able to react with nitric oxide (NO) forming peroxynitrite, favoring endothelial dysfunction [25]. In



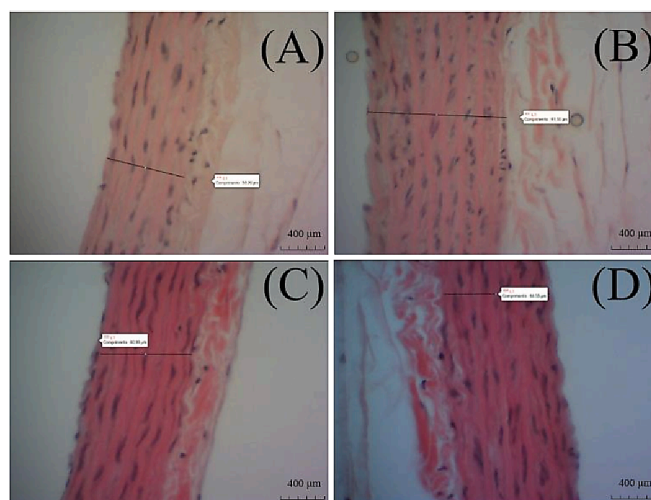
**Fig. 4.** Expression of cyclooxygenases, COX-1 (panels A,C) and COX-2 (panels B,D), in thoracic aorta from male and female adult rats treated with topiramate (TPM) or water (CTR) during childhood. The immunoblots were normalized by Ponceau S total protein content. Student's *t*-test. Data are reported as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4-6$ . \* $p < 0.05$  TPM vs CTR.



**Fig. 5.** Aortic superoxide anion concentration (NBT reduction expressed as optical density at 620 nm/mg of protein) in serum samples from male adult rats treated with topiramate (TPM) or water (CTR) during childhood. Student's *t*-test. Data are reported as mean  $\pm$  SEM,  $n = 7-8$ . \* $p < 0.05$  TPM vs CTR.

addition, NOX2 is a NADPH involved in ROS generation in the vasculature and contributed to endothelial dysfunction in different situations such as in hypertension [26], aging [27], insulin resistance [28], and after exposure to some xenobiotics [29]. In addition to the increase in NOX2 aortic expression, TPM male rats presented an increase in p47<sup>phox</sup> aortic expression, which in turn is an important cytosolic regulatory subunit for the activation of this NADPH isoform [24]. Therefore, the late endothelial dysfunction observed in TPM male rats involves ROS generation, probably produced by NOX2.

Furthermore, superoxide anion may not be the only ROS involved in the vascular dysfunction of TPM male rats. In fact, tempol, a mimetic of



**Fig. 6.** Representative images of thoracic aorta cross-section micrographs stained with hematoxylin-eosin. Male adult rats from CTR (A) and TPM (B) groups and female adult rats from CTR (C) and TPM (D) groups. The line represents the vascular smooth muscle demarcation. Magnifications are  $\times 400$ .  $n = 6-8$ /group.

superoxide dismutase, did not interfere with the aortic hyperreactivity to phenyl in TPM rats, suggesting the participation of hydrogen peroxide in this increased response. In addition, high levels of hydrogen peroxide can activate COX, having a contractile effect in aorta [30]. Indeed, COX-2-derived vasoconstrictor prostanoids are involved in the endothelial dysfunction of TPM animals since indomethacin and NS-398 restored endothelial modulation in these animals. However, the functional findings were not completely supported by molecular data, where the expression of COX-1 and COX-2 expression were not affected by TPM treatment. Interestingly, the activity and expression of COX are not always correlated [22] and the prostanoids derived from COX-2 are able to activate NADPH oxidase [31], which might contribute to the increase in ROS observed in adult male rats treated with TPM during childhood.

The endothelial dysfunction observed in female adult rats from the TPM group was linked with increased COX-2-derived vasoconstrictor prostanoids. In fact, indomethacin and NS-398 restored endothelial modulation in these animals and COX-2 is overexpressed in aorta of TPM. COX-2 is the isoform induced by pro-inflammatory stimuli, cytokines, mitogenic factors, and endotoxins [32]. To our knowledge, there are no studies describing the effects of TPM on vascular inflammation. Although it has not been explored in the vascular system, some studies describe a likely association between the use of TPM and inflammatory mediators [8,33,34]. In this regard, children with epilepsy presented decreases in IL-10 levels after 6 months and 12 months of treatment with TPM when compared to baseline [8]. Furthermore, *in vitro* experiments using blood samples from healthy women demonstrated effects of TPM on cytokine production, such as an increase in IL-22 levels and a decrease in IL-2 levels [34]. To date, these studies cannot be compared with our findings since they were performed in different conditions. However, the present study demonstrates an important involvement of COX-2 in endothelial dysfunction in TPM female rats. Actually, the involvement of COX-2-derived prostanoids has already been described in endothelial dysfunction associated with exposure to xenobiotics, hypertension, and aged animals [35-37]. Together, it is possible to suggest the involvement of this COX isoform in endothelial dysfunction evidenced in female adult rats treated with TPM during childhood.

In contrast to the findings in TPM male rats, endothelial dysfunction in TPM female rats does not seem to involve ROS generation, since the incubation with apocynin or tempol did not interfere in the hyperreactivity to phenyl in these animals. It was described that female sex hormones, especially estrogen, exert a beneficial physiological modulation

on the cardiovascular system [11]. One of the most well established vascular effects of estrogen is the production of NO, which occurs via both genomic and non-genomic mechanisms [11,38]. Furthermore, numerous studies have indicated that estrogen exhibits antioxidant properties [11,39,40], and endogenous estrogen can potentiate constrictor prostanoid function in female rat aorta by a mechanism involving COX-2 and thromboxane synthase pathways [41].

Herein it was demonstrated that aortic thickness was increased in male adult rats treated with TPM during childhood, which can contribute to the hypercontraction observed in aortic rings without endothelium [10]. Unlike the findings in male adult rats, in female rats we did not find this structural alteration in vascular smooth muscle. These results demonstrate the importance of ROS in vascular complications due to TPM treatment during childhood and highlight a possible protective role of female sex hormones on the vascular system in TPM-treated rats. However, further studies are needed to confirm this hypothesis.

## 5. Conclusion

The present study provided evidence, for the first-time, that treatment with TPM during childhood induced vascular dysfunction in adulthood, and that the effects of TPM on the vascular system are sex-specific. Furthermore, these results suggest that early life treatment with TPM can increase the risk of cardiovascular disease-associated vascular dysfunction in adulthood, pointing to the need for cardiovascular monitoring in children treated with this anticonvulsant.

## Declaration of competing interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgment

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil (PhD fellowship to Camila B. Vidigal and Kawane F. Moura).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120189>.

## References

- T.Y. Tan, C.H. Lu, H.Y. Chuang, T.K. Lin, C.W. Liou, W.N. Chang, Y.C. Chuang, Long-term antiepileptic drug therapy contributes to the acceleration of atherosclerosis, *Epilepsia* 50 (2009) 1579–1586, <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02024.x>.
- Y.C. Chuang, H.Y. Chuang, T.K. Lin, C.C. Chang, C.H. Lu, W.N. Chang, S. Der Chen, T.Y. Tan, C.R. Huang, S.H.H. Chan, Effects of long-term antiepileptic drug monotherapy on vascular risk factors and atherosclerosis, *Epilepsia* 53 (2012) 120–128, <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03316.x>.
- E. Ben-Menachem, J.W. Sander, H. Stefan, S. Schwalen, B. Schäuble, Topiramate monotherapy in the treatment of newly or recently diagnosed epilepsy, *Clin. Ther.* 30 (2008) 1180–1195, [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(08\)80045-8](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(08)80045-8).
- N. Watemberg, H. Goldberg-Stern, B. Ben-Zeev, I. Berger, R. Straussberg, S. Kivity, U. Kramer, N. Brand, T. Lerman-Sagie, Clinical experience with open-label topiramate use in infants younger than 2 years of age, *J. Child Neurol.* 18 (2003) 258–262, <https://doi.org/10.1177/08830738030180040901>.
- I. Valencia, C. Fons, S.V. Kothare, D.S. Khurana, S. Yum, H.H. Hardison, A. Legido, Efficacy and tolerability of topiramate in children younger than 2 years old, *J. Child Neurol.* 20 (2005) 667–670, <https://doi.org/10.1177/08830738050200080601>.
- E. Yozawitz, A. Stacey, R.M. Pressler, Pharmacotherapy for seizures in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy, *Pediatr. Drugs* 19 (2017) 553–567, <https://doi.org/10.1007/s40272-017-0250-4>.
- R.M. El-Farahaty, A. El-Mitwalli, H. Azzam, Y. Wasel, M.M. Elrakhawy, B. M. Hasaneen, Atherosclerotic effects of long-term old and new antiepileptic drugs monotherapy: a cross-sectional comparative study, *J. Child Neurol.* 30 (2015) 451–457, <https://doi.org/10.1177/0883073814551388>.
- F.M. Sonmez, H.M. Serin, A. Alver, R. Aliyazicioglu, A. Cansu, G. Can, D. Zaman, Blood levels of cytokines in children with idiopathic partial and generalized epilepsy, *Seizure* 22 (2013) 517–521, <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.03.014>.
- N.D. Vaziri, B. Rodríguez-Iturbe, Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension, *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2 (2006) 582–593, <https://doi.org/10.1038/ncpneph0283>.
- P. Marchio, S. Guerra-Ojeda, J.M. Vila, M. Aldasoro, V.M. Victor, M.D. Mauricio, Targeting early atherosclerosis: a focus on oxidative stress and inflammation, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2019 (2019) 1–32, <https://doi.org/10.1155/2019/8563845>.
- A.E. Stanhewicz, M.M. Wenner, N.S. Stachenfeld, Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 315 (2018) H1569–H1588, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00396.2018>.
- M.C. Cora, L. Kooistra, G. Travlos, Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse, *Toxicol. Pathol.* 43 (2015) 776–793, <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>.
- E.M. Marco, W. Adriani, L.A. Ruocco, R. Canese, A.G. Sadile, G. Laviola, Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: the issue of early adolescent exposure, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (2011) 1722–1739, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.011>.
- I.A. of P. Expert Committee on Pediatric Epilepsy, Guidelines for diagnosis and management of childhood epilepsy, *Indian Pediatr.* 46 (2009) 681–698, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19717860>.
- H. Li, Y. Zou, Z. Xia, F. Gao, J. Feng, C. Yang, Effects of topiramate on weight and metabolism in children with epilepsy, *Acta Paediatr.* 98 (2009) 1521–1525, <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01349.x>.
- E.C. Moreland, D.A. Griesemer, K.R. Holden, Topiramate for intractable childhood epilepsy, *Seizure* 8 (1999) 38–40, <https://doi.org/10.1053/seiz.1998.0212>.
- A.A. Ozelcik, A. Serdaroglu, A. Bideci, E. Arhan, Ş. Soysal, E. Demir, K. Güciyener, The effect of topiramate on body weight and ghrelin, leptin, and neurotrophin-Y levels of prepubertal children with epilepsy, *Pediatr. Neurol.* 51 (2014) 220–224, <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.05.001>.
- F. Ritter, T.A. Glauser, R.D. Elterman, E. Wyllie, Effectiveness, tolerability, and safety of topiramate in children with partial-onset seizures. Topiramate YP Study Group, *Epilepsia* 41 (2000) 82–85, <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02178.x>.
- F.M. Sonmez, D. Zaman, A. Aksoy, O. Deger, R. Aliyazicioglu, G. Karaguzel, K. Fazlioglu, The effects of topiramate and valproate therapy on insulin, c-peptide, leptin, neurotrophin Y, adiponectin, visfatin, and resistin levels in children with epilepsy, *Seizure* 22 (2013) 856–861, <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.07.007>.
- P. Sreenivasan, P.A.M. Kunju, Efficacy of topiramate as an add-on drug in seizures in Indian children—an observational study, *Indian J. Pediatr.* 78 (2011) 1221–1224, <https://doi.org/10.1007/s12098-011-0395-z>.
- Epa, in: Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW 3/4 as Default Method in Derivation of the Oral RfD, 2006, pp. 1–34, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.009>.
- C.M. Higashi, S.M. Sartoretto, C. Echem, B.F.C. Lucchetti, M.H.C.d. Carvalho, G. G. Pelosi, P. Pinge-Filho, D.C.C. Gerardin, E.G. Moreira, E.H. Akamine, G. S. Ceravolo, Intrauterine and lactational exposure to fluoxetine enhances endothelial modulation of aortic contractile response in adult female rats, *Vascul. Pharmacol.* 108 (2018) 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.04.004>.
- C.B. Vidigal, D.R.B.S. Novi, K.F. Moura, R. Picinin, B.G. Montagnini, R.de N.O. da Silva, M.D.V. da Silva, F.G. de Andrade, E.H. Akamine, D.C.C. Gerardin, G. S. Ceravolo, Intrauterine exposure to metformin: evaluation of endothelial and perivascular adipose tissue function in abdominal aorta of adult offspring, *Life Sci.* 207 (2018) 72–79, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.050>.
- B.K. Rodiño-janeiro, B. Paradelado-barro, M.I. Castiñeiras, J.R. González, in: *Current Status of NADPH Oxidase Research in Cardiovascular Pharmacology*, 2013, pp. 401–428.
- M.A. Incalza, R. D’Oria, A. Natalicchio, S. Perrini, L. Laviola, F. Giorgino, Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases, *Vasc. Pharmacol.* 100 (2018) 1–19, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>.
- C.E. Murdoch, S.P. Alom-Ruiz, M. Wang, M. Zhang, S. Walker, B. Yu, A. Brewer, A.M. Shah, Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction, *Basic Res. Cardiol.* (2011) 527–538, <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0179-7>.
- L.M. Fan, L. Geng, S. Cahill-Smith, F. Liu, G. Douglas, C.-A. Mckenzie, C. Smith, G. Brooks, K.M. Channon, J.-M. Li, Nox2 contributes to age-related oxidative damage to neurons and the cerebral vasculature, *J. Clin. Invest.* 129 (2019) 3374–3386, <https://doi.org/10.1172/JCI125173>.
- P. Sukumar, H. Viswambharan, H. Imrie, R.M. Cubbon, N. Yuldasheva, M. Gage, S. Galloway, A. Skromna, P. Kandavelu, C.X. Santos, V.K. Gatenby, J. Smith, D. J. Beech, S.B. Wheatcroft, K.M. Channon, A.M. Shah, M.T. Kearney, Nox2 NADPH oxidase has a critical role in insulin resistance – related endothelial cell dysfunction, *Diabetes* 62 (2013) 2130–2134, <https://doi.org/10.2337/db12-1294>.
- M. Kuntic, M. Oelze, S. Steven, S. Kro, P. Stamm, S. Kalinovic, K. Frenis, K. Vujacic-mirski, M. Teresa, B. Jimenez, M. Kvandova, K. Filippou, O. Hahad, S. Daub, F. Varveri, A. Al Zuabi, V. Bru, T. Gori, R. Huesmann, T. Hoffmann, F.P. Schmidt, J.

- F.K. Jr, A. Daiber, T. Mu, Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2), *Eur. Heart J.* (2020) 2472–2483, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz772>.
- [30] José Gil-Longo, C. González-Vázquez, in: *Characterization of Four Different Effects Elicited by H2O2 in Rat Aorta* 43, 2005, pp. 128–138, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2005.06.001>.
- [31] S. Martínez-Revelles, M.S. Avendaño, A.B. García-Redondo, Y. Álvarez, A. Aguado, J.V. Pérez-Girón, L. García-Redondo, V. Esteban, J.M. Redondo, M.J. Alonso, A. M. Briones, M. Saldaña, Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 51–65, <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4335>.
- [32] J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 97–120, <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97>.
- [33] A. Koçer, R. Memişoğulları, F.M. Domaç, A. İlhan, E. Koçer, Ş. Okuyucu, B. Özdemir, H. Yüksel, IL-6 levels in migraine patients receiving topiramate, *Pain Pract.* 9 (2009) 375–379, <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2009.00301.x>.
- [34] H. Himmerich, S. Bartsch, H. Hamer, R. Mergl, J. Schönherr, C. Petersein, A. Munzer, K.C. Kirkby, K. Bauer, U. Sack, Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro, *J. Psychiatr. Res.* 47 (2013) 1751–1759, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.07.026>.
- [35] M.E. Widlansky, D.T. Price, N. Gokce, R.T. Eberhardt, S.J. Duffy, M. Holbrook, C. Maxwell, J. Palmisano, J.F. Keane, J.D. Morrow, J.A. Vita, Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension, *Hypertension* 42 (2003) 310–315, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000084603.93510.28>.
- [36] S.L. Wong, F.P. Leung, C.W. Lau, C.L. Au, L.M. Yung, X. Yao, Z.-Y. Chen, P. M. Vanhoutte, M. Gollasch, Y. Huang, Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F<sub>2α</sub> mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging, *Circ. Res.* 104 (2009) 228–235, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.179770>.
- [37] F.M. Pecanha, G.A. Wiggers, A.M. Briones, J.V. Perez-Giron, M. Miguel, A. B. Garcia-Redondo, D.V. Vassallo, M.J. Alonso, M. Saldaña, The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration, *J. Physiol. Pharmacol.* 61 (2010) 29–36.
- [38] A.H. Wagner, M.R. Schroeter, M. Hecker, 17β-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells, *FASEB J.* 15 (2001) 2121–2130, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0123com>.
- [39] J. Busserolles, A. Mazur, E. Gueux, E. Rock, Y. Rayssiguier, Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet, *Exp. Biol. Med.* 227 (2002) 837–842, <https://doi.org/10.1177/153537020222700918>.
- [40] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 140 (2005) 47–52, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>.
- [41] M. Li, L. Kuo, J.N. Stallone, Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (2008) 2444–2455, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01121.2007>.