



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAWANE FABRÍCIO MOURA

**TRATAMENTO COM TOPIRAMATO NA ADOLESCÊNCIA:
EFEITOS AGUDOS E TARDIOS SOBRE A REATIVIDADE DA
AORTA**



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

KAWANE FABRICIO MOURA

**TRATAMENTO COM TOPIRAMATO NA ADOLESCÊNCIA:
EFEITOS AGUDOS E TARDIOS SOBRE A REATIVIDADE DA
AORTA**

Londrina
2019

KAWANE FABRICIO MOURA

**TRATAMENTO COM TOPIRAMATO NA ADOLESCÊNCIA:
EFEITOS AGUDOS E TARDIOS SOBRE A REATIVIDADE DA AORTA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziela Sciantti Ceravolo

Londrina
2019

KAWANE FABRICIO MOURA

**TRATAMENTO COM TOPIRAMATO NA ADOLESCÊNCIA:
EFEITOS AGUDOS E TARDIOS SOBRE A REATIVIDADE DA AORTA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andressa de Freitas Mendes
Dionísio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eduardo Jose de Almeida Araujo,
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Suplentes

Profa. Dra. Gisele Lopes Bertolini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo A. Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de novembro de 2019.

DEDICO

Aos meus pais, como uma demonstração de amor e gratidão por tudo que fizeram e fazem para que eu realize meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me proporcionar vivenciar o Seu amor em cada momento da execução deste trabalho e por me guiar diante de todas as dificuldades.

Agradecer de maneira especial aos meus pais, por serem meus exemplos de profissionalismo, honestidade e dedicação. Gostaria também, de estender o agradecimento ao meu namorado e aos meus familiares, pela presença tão forte em minha vida, pelo amor e incentivo a seguir os meus sonhos e me realizar profissionalmente sempre.

A minha orientadora, professora Graziela, por todos esses anos em que acreditou em mim, me ensinou e motivou. Mas especialmente pela oportunidade de fazer o mestrado sob a orientação de uma profissional que me inspira a ser melhor, em todos os sentidos, todos os dias.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório (em ordem hierárquica): Carolina, Camila, Daniela, Deborah, Amanda, Juliana e Rafaela. Que se tornaram uma família durante esse período e me ajudaram com a amizade mas também ativamente na execução deste trabalho, tornando assim meu sonho possível.

Gostaria de agradecer também, aos bons colegas de departamento, professores, funcionários e amigos de longa data. Todas essas pessoas, citadas até aqui, sabendo ou não me deram motivos para sorrir e acreditar: me dando todo o suporte de que precisei, sendo muitas vezes o meu abrigo, meu consolo, minha motivação e grande parte do tempo minha alegria.

Por fim, gostaria de agradecer a agência de fomento, CNPq, pela bolsa disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

MOURA, Kawane Fabricio. **Tratamento com Topiramato na adolescência**: efeitos agudos e tardios sobre a reatividade vascular da aorta. 2019. 44 p. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR – Brasil.

RESUMO

O endotélio vascular tem papel importante sobre a manutenção da homeostasia cardiovascular. Estudos demonstram que a disfunção das células endoteliais pode favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O topiramato (TOP) é um fármaco aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para profilaxia de enxaqueca em adolescentes. É descrito que o tratamento com TOP, em diferentes faixas etárias, aumenta o risco de doenças vasculares em humanos. Entretanto, o efeito do tratamento com TOP na adolescência sobre a função do endotélio vascular ainda não foi investigado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a função endotelial, utilizando a reatividade da aorta, e o perfil biométrico de ratos adolescentes e adultos após tratamento com TOP durante a adolescência. Para tanto, ratos Wistar foram tratados com TOP (41 mg/Kg/dia) ou veículo (grupo CTR) por gavagem do dia pós-natal (DPN) 28 ao 50, período de adolescência. Durante o tratamento o ganho de massa corpórea e nos últimos sete dias consumo de ração foi acompanhado. No DPN 51 e 120 foram avaliados a reatividade da aorta *in vitro* para vasoconstritores e vasodilatadores, índice de Lee, peso do tecido adiposo visceral e marrom, pressão arterial e frequência cardíaca. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via para comparação da resposta máxima (R_{max}) e $-\log$ da concentração de droga que causa 50% da R_{max} (pD_2) para as curvas de fenilefrina e teste T-Student para os demais dados. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (CEUA: 9379.2018.26). Foi possível observar que não houve diferença entre os grupos CTR e TOP para o consumo de ração e acompanhamento do ganho de massa corpórea. Os ratos TOP apresentaram diminuição do índice de Lee e tecido adiposo retroperitoneal no DPN 51, sem alterações do perfil antropométrico na vida adulta (DPN 120). Também não houve diferença entre CTR e TOP quanto à pressão arterial e frequência cardíaca nos dois períodos avaliados. Quanto a reatividade da aorta, no DPN 51 e na presença do endotélio, a R_{max} para o vasoconstritor, fenilefrina, foi maior para o grupo TOP quando comparada a R_{max} do CTR e a remoção do endotélio aboliu esta diferença. A resposta vasodilatadora foi semelhante entre os grupos TOP e CTR no DPN 51. No DPN 120, os anéis de aorta dos ratos TOP e CTR, na presença ou ausência do endotélio, apresentaram respostas similares para fenilefrina. Quanto a vasodilatação, os anéis do grupo TOP apresentaram diminuição da pD_2 para ACh, sem alteração de R_{max} . Nossos resultados demonstram que o tratamento de ratos com TOP durante a adolescência, na dose de 41mg/Kg/dia, causa efeitos biométricos discretos logo após o tratamento (DPN 51), o que não se mantém na vida adulta (DPN 120). Este tratamento também causa alterações na função endotelial que parecem ser permanentes.

Palavras Chaves: topiramato; adolescência; alterações vasculares; alterações metabólicas.

MOURA, Kawane Fabricio. **Topiramate treatment in adolescence**: acute and late effects on aortic vascular. 2019. 40 p. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR – Brasil.

ABSTRACT

The vascular endothelium plays an important role in the maintenance of cardiovascular homeostasis. Studies have shown that endothelial cell dysfunction may favor the development of cardiovascular disease. Topiramate (TOP) is a Food and Drug Administration (FDA) approved drug for migraine prophylaxis in adolescents. Treatment with TOP has been reported to increase the risk of vascular disease in humans. However, the effect of TOP treatment in adolescence on vascular endothelium function has not been investigated. Thus, the aim of this study was to evaluate endothelial function using aortic reactivity and anthropometric profile of adolescent and adult rats after TOP treatment during adolescence. For this, Wistar rats were treated with TOP (41 mg / kg / day) or vehicle (CTR group) by postnatal day gavage (PND) 28 to 50, adolescence period. During treatment, body mass gain and feed intake were followed. In DPN 51 and 120 the groups were evaluated: in vitro aortic reactivity for vasoconstrictors and vasodilators, Lee index, visceral and brown adipose tissue weight, blood pressure and heart rate. For statistical analysis, one-way ANOVA was used to compare the maximum response (Rmax) and -log of the drug concentration causing 50% of the Rmax (pD2) for the phenylephrine curves and the Student T-test for the other results. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (CEUA: 9379.2018.26). It was observed that there was no difference between the CTR and TOP groups for feed intake and follow-up of body mass gain. TOP rats showed decreased Lee index and retroperitoneal adipose tissue at PND 51, without changes in anthropometric profile in adulthood (PND 120). There was also no difference between CTR and TOP regarding blood pressure and heart rate in the two periods evaluated. Regarding the aortic reactivity at PND 51 and in the presence of endothelium, the Rmax for vasoconstrictor phenylephrine was higher for the TOP group compared to CTR Rmax and endothelium removal abolished this difference. The vasodilator response was similar between the TOP and CTR groups at PND 51. Also, at PND 120, the aortic rings of the TOP and CTR rats, in the presence or absence of the endothelium, showed similar responses to phenylephrine. Regarding vasodilation, the rings of the TOP group presented a decrease in pD2 for ACh, without alteration of Rmax. Our results demonstrated that treatment of rats with TOP during adolescence, using 41 mg/kg/day, caused mild metabolic effects just after treatment (PND 51), which was not maintained in the adulthood (PND 120). This treatment also causes changes in endothelial function that appear to be permanent.

Keywords: topiramate; adolescence; vascular changes; metabolic changes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1.	Acompanhamento do ganho de massa corpórea (g) de ratos tratados com topiramato ou água.....	21
Figura 2.	Consumo de ração de ratos tratados com topiramato ou água.....	22
Tabela 1.	Parâmetros biométricos avaliados em ratos tratados com topiramato ou água (Controle) durante adolescência	23
Tabela 2.	Parâmetros biométricos avaliados em ratos adultos que foram tratados com água (Controle) ou topiramato na adolescência	24
Tabela 3.	Pressão arterial e frequência cardíaca em ratos tratados com topiramato ou água (controle)	24
Tabela 4.	Pressão arterial e frequência cardíaca de ratos adultos tratados com topiramato ou água (controle) durante a adolescência.....	25
Figura 3.	Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta	26
Figura 4.	Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina e (B) nitroprussiato de sódio obtidos em anéis de aorta	27
Tabela 5.	Resposta de anéis de aorta para fenilefrina.....	28
Tabela 6.	Resposta de anéis de aorta para acetilcolina e nitroprussiato de sódio.....	28
Figura 5.	Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta de ratos adultos tratados com água (controle) ou topiramato durante adolescência	29
Figura 6.	Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina e (B) nitroprussiato de sódio obtidos em anéis de aorta de ratos adultos.....	30
Tabela 7.	Resposta da aorta de ratos adultos para fenilefrina	31
Tabela 8.	Resposta de anéis de aorta de ratos adultos para acetilcolina e nitroprussiato de sódio	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil- 4-isoxazol-propiónico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Ang II	Angiotensina II
COBEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTR	Controle
CCEC	Curvas concentração-efeito cumulativas
DPN	Dias pós-natal
E+	Endotélio foi preservado
E-	Endotélio removido
EDCFs	Fatores constritores derivados do endotélio
EDRFs	Fatores relaxantes derivados do endotélio
EROs	Espécies reativas do oxigênio
ET-1	Endotelina-1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fenil	Fenilefrina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IMC	índice de massa corporal
K-H	Solução nutriente de Krebs-Henseleit
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
pD2 -	Log da concentração do agonista, resultando em 50% da Rmax
PGC1 α – Co	ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PGI2	Prostaciclina
Rmax	Resposta máxima
TOP	Topiramato
UCP-1	Edaproteínadesacopladora1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Modelo Animal	17
3.2 Avaliações durante o tratamento.....	17
3.2.1 Acompanhamento da Massa Corpórea e Consumo de Ração.....	17
3.3 Protocolos utilizados para avaliações agudas e tardias.....	18
3.3.1 Perfil Biométrico.....	18
3.3.2 Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca.....	18
3.3.3 Reatividade da aorta torácica	19
3.4 Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS	21
4.1 Avaliações durante o tratamento.....	21
4.1.1 Acompanhamento da massa corpórea e consumo de ração.....	21
4.2 Perfil Biométrico	22
4.2.1 Avaliação Aguda: DPN 51	22
4.3.2 Avaliação Tardia: DPN 120.....	23
4.3 Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca.....	24
4.3.1 Avaliação Aguda: DPN 51	24
4.3.2 Avaliação Tardia: DPN 120.....	25
4.4 Reatividade Vascular	25
4.4.1 Avaliação Aguda: DPN 51	25
4.4.2 Avaliação Tardia: DPN 120.....	28
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO A -COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	41

1. INTRODUÇÃO

O topiramato (TOP) é um fármaco aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de epilepsia em crianças maiores de 2 anos de idade (A.M.; L.S., 2008; BEN-MENACHEM et al., 2008). Entretanto, alguns ensaios clínicos têm sugerido que este fármaco pode ser uma alternativa para o tratamento de epilepsia em crianças menores de 2 anos de idade (GLASS; POULIN; SHEVELL, 2011; KUGLER; SACHDEO, 1998; VALENCIA et al., 2005; VEGGIOTTI et al., 2004; WATEMBERG et al., 2003), embora o perfil de eficácia e de efeitos adversos do TOP não sejam completamente estabelecidos. Além de ser útil como terapia anticonvulsivante, em 2014, o TOP foi aprovado para a profilaxia de enxaqueca em adolescentes com idade entre 12 e 18 anos (FDA, 2014; SAKULCHIT; MECKLER; GOLDMAN, 2017).

Este fármaco possui múltiplos mecanismos de ação: bloqueio dos canais para sódio dependentes de voltagem; efeito modulador sobre os receptores GABA-A com consequente potencialização do ácido gama-aminobutírico (GABA); redução da atividade excitatória do glutamato através de sua ação inibitória nos receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil- 4-isoxazol-propiónico (AMPA) e cainato, inibição de canais para cálcio tipo L e inibição da anidrase carbônica, especificamente II e IV (A.M.; L.S., 2008; CLARK et al., 2013; LIN, 2011; SILBERSTEIN, 2017; ZHANG et al., 2000).

Em 1996, foi reconhecido pela primeira vez que o TOP causa perda de massa corpórea, sendo este um efeito colateral comum nos pacientes tratados com o fármaco (BEN-MENACHEM et al., 1996); a partir de então, têm sido investigados os mecanismos pelos quais o TOP leva a perda de massa corpórea, diminuição na adiposidade e seus efeitos na regulação do metabolismo energético (CARICILLI et al., 2012; HUSUM et al., 2003; MCELROY et al., 2003; PICARD et al., 2000b; RICHARD et al., 2002; YORK et al., 2000).

Em crianças entre 4 e 12 anos com epilepsia foi demonstrado que o tratamento com TOP diminui significativamente o índice de massa corporal (IMC), a relação insulina/glicose em jejum, a concentração sérica de cortisol e de leptina no 3º e 6º mês de tratamento comparado aos valores de pré-tratamento, sugerindo que este fármaco pode ter efeitos importantes sobre o metabolismo energético

(OZCELIK et al., 2014). Além disso, foi demonstrado aumento na concentração plasmática de adiponectina em crianças entre 6 e 8 anos tratadas com TOP, sendo sugerido pelos autores que o aumento de adiponectina pode ser um fator importante relacionado à perda de massa corpórea nesses pacientes (LI et al., 2009).

Em ratos geneticamente obesos, com 4 a 5 semanas de idade, o tratamento com TOP resulta em diminuição na ingestão alimentar, diminuição no gasto energético total e diminuição na concentração de insulina plasmática em jejum (PICARD et al., 2000b). Em ratos com dieta rica em lipídeos o tratamento com TOP causa diminuição na massa corporal e também de triglicérides, glicose, insulina e aumento das concentrações séricas de adiponectina (ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011), além de reduzir de leptina, insulina e corticosterona (YORK et al., 2000). É necessário destacar que estes efeitos promovidos pelo TOP podem ser positivos para indivíduos obesos; entretanto, em crianças e adolescentes não obesas a perda de massa corporal, decorrente do tratamento com TOP, pode trazer repercussões metabólicas e cardiovasculares deletérias a curto e longo prazo.

De fato, atualmente é reconhecido que as condições adversas em fases iniciais da vida, como a adolescência, podem afetar significativamente a saúde dos adultos (MARTIN et al., 2000; OSMOND; BARKER, 2000; VOHR et al., 2010). Assim, a perda de massa associada à diminuição de ingestão alimentar, decorrente do tratamento com TOP em janela crítica do desenvolvimento do organismo pode influenciar ou programar a saúde do indivíduo tardiamente (WATERLAND; JIRTLE, 2004). Esse conceito é denominado "programação do desenvolvimento da saúde e da doença" e descreve que as adaptações às perturbações ambientais durante os períodos de plasticidade do desenvolvimento podem ter impacto em longo prazo na saúde do indivíduo (PRIOR; ARMITAGE, 2009). Entretanto, as consequências a curto e longo prazo em adolescentes tratados com TOP não foram investigadas, sendo necessário avaliar se possíveis alterações seriam permanentes e se poderiam estar associadas a doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta.

Neste sentido, vem sendo descrito que alterações do endotélio vascular podem contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento de doenças cardiovasculares e metabólicas (KONUKOGLU; UZUN, 2016; MARTIN et al., 2000; STAPLETON et al., 2008). Este tecido, 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 (CARVALHO et al., 2001).

Para desenvolver estes papéis, o endotélio produz e libera substâncias que modulam o tônus vascular. Essas substâncias são conhecidas como fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). Os EDRFs são óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Os EDCFs compreendem a angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1), as espécies reativas do oxigênio (EROs) e os prostanoídes vasoconstritores (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Desequilíbrios na produção e/ou ação desses fatores caracteriza um quadro de disfunção endotelial, o que predispõe o indivíduo às doenças cardiovasculares e metabólicas.

Quanto a relação do tratamento com TOP e alterações cardiovasculares, um estudo em pacientes epiléticos de ambos os sexos, que faziam uso do TOP, descreve aumento na concentração sérica da homocisteína, um conhecido indutor de estresse oxidativo e relacionado à disfunção endotelial (BELCASTRO et al., 2010). Além disso, outro estudo realizado com crianças e adolescentes epiléticos tratados com TOP demonstrou aumento da espessura das camadas íntima e média da artéria carótida nos pacientes, sendo este um importante marcador de risco de doença vascular (EL-FARAHATY et al., 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre os impactos do tratamento com TOP na adolescência sobre o sistema vascular e suas possíveis consequências a curto e longo prazo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Os objetivos deste trabalho foram avaliar em ratos se o tratamento com TOP durante a adolescência, dia pós-natal (DPN) 28 a 50, causaria alterações na função do endotélio vascular, utilizando a reatividade da aorta como modelo experimental, e se essas alterações se manifestam logo após o tratamento (DPN 51) e na vida adulta (DPN 120). Paralelamente, também buscou-se caracterizar, nos DPN 51 e DPN 120, o perfil biométrico e parâmetros cardiovasculares nos ratos tratados com TOP.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram avaliar, no DPN 51 e DPN 120, em ratos os efeitos do tratamento com TOP durante a adolescência sobre:

- O perfil biométrico: analisando a massa corpórea, comprimento naso-anal, índice de Lee e massa de tecidos adiposos branco e marrom.
- A pressão arterial e frequência cardíaca;
- A reatividade da aorta torácica ao agente vasoconstritor, fenilefrina (fenil), e vasodilatadores, acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo Animal

Ratos obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina com 26 dias pós-natal (DPN) foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos/caixa) sob condições padronizadas (temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e água e ração padrão à vontade. Após período de adaptação, os ratos com DPN 28 foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais que receberam diariamente os seguintes tratamentos via gavagem:

- Controle (CTR): água do DPN 28 – DPN 50.
- TOP: 41,0 mg/kg/dia de topiramato (Topamax® comprimido, suspenso em água), do DPN 28 - DPN 50.

A duração do tratamento corresponde ao período de adolescência no rato, DPN 28 ao DPN 50 (MARCO et al., 2011; SPEAR, 2000) . A escolha da dose foi baseada nas doses utilizadas para o tratamento de epilepsia em crianças e enxaqueca em adolescentes. Nestes casos as doses de manutenção do tratamento variam de 3-9mg/kg/dia (LEWIS et al., 2009; LI et al., 2009). Realizando ajuste dosimétrico utilizando a escala BW^{3/4} (EPA, 2006), para a maior dose (9mg/kg/dia) e considerando o peso de uma criança de 3 anos como 12 kg e o de um roedor com 16 dias de 30 g, obtemos o valor de 41 mg/kg/dia.

Ao final do período de tratamento os animais foram novamente distribuídos em dois grupos: avaliações agudas, onde para evitar o efeito direto da administração de TOP os ratos foram avaliados 24 horas após o término do tratamento (DPN 51); avaliações tardias, onde os protocolos foram realizados na vida adulta (DPN 120). Todos os protocolos experimentais estão de acordo com o preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comissão de Ética da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL: 9379.2018.26), conforme anexo A.

3.2 Avaliações durante o tratamento

3.2.1 Acompanhamento da Massa Corpórea e Consumo de Ração

Os animais de ambos os grupos foram pesados diariamente durante o período de tratamento (DPN 28 – DPN 50) para o ajuste de volume e acompanhamento do ganho de peso ao longo do tempo, os valores estão expressos em gramas (g).

O consumo de ração foi avaliado nos últimos 7 dias de tratamento (DPN 44 – DPN 50) com os animais em gaiolas coletivas. Para tanto o cálculo de consumo de ração foi realizado pela seguinte fórmula: Consumo de ração = (peso inicial – peso após 24 h) / 5 animais por caixa.

3.3 Protocolos utilizados para avaliações agudas e tardias

Todos os protocolos a seguir foram realizados nos animais CTR e TOP logo após o tratamento, DPN 51, para as avaliações agudas e no DPN 120, para as avaliações na vida adulta.

3.3.1 Perfil biométrico

Para caracterização do perfil biométrico dos diferentes grupos, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, ip), pesados e o comprimento naso-anal (cm) medido com o auxílio de uma régua. Também foi realizado o cálculo do índice de Lee: [raiz cúbica da massa corporal (g)/comprimento naso-anal (cm)x100]. Ainda, o tecido adiposo visceral (perigonadal e retroperitoneal) e marrom (escapular) foram retirados e pesados. Os tecidos tiveram sua massa corrigida pela massa corporal total do animal, sendo os valores expressos como peso do tecido adiposo por 100 g da massa corpórea.

3.3.2 Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram determinadas indiretamente por pletismografia de cauda. Para tanto, os ratos foram alocados em um tubo de plástico com saída para a cauda e o focinho, um oclisor e um sensor foram ajustados à porção proximal da cauda do rato. Este sensor estava acoplado ao esfigmomanômetro conectado a um sistema de transdução de sinal (CODA, Kent Scientific, USA). O valor final da pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca

(batimentos por minuto – bpm) de cada animal está representada pela média de 10 medidas sequenciais.

3.3.3 *Reatividade da aorta torácica*

Os ratos, de ambos os grupos, foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, ip), e após toracotomia, a porção torácica da aorta foi removida, dissecada e seccionada em quatro anéis transversais (3 mm de comprimento). Dois dos anéis de aorta tiveram o endotélio removido (E-) por fricção, com o auxílio de uma haste fina de metal revestida por uma camada de algodão. Nos outros dois anéis o endotélio foi preservado (E+). Ambos os anéis foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável, um fixo a base da cuba para órgãos isolados e o outro conectado a um transdutor isométrico (FT03, Grass), acoplado a um amplificador de sinal (AECAD 04, AVS Projetos) e este a um computador.

Os seguimentos de aorta permaneceram sob tensão de 1,5 g em solução nutriente de Krebs-Henseleit (K-H) modificada (concentrações em mM: 130 NaCl, 14,9 NaHCO₃; 4,7 KCl; 1,18 KH₂PO₄; 1,17 MgSO₄·7H₂O; 5,5 glicose; 1,56 CaCl₂·2H₂O e 0,026 EDTA), gaseificada com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ e aquecidos a 37°C durante todo o protocolo experimental, como previamente descrito pelo nosso grupo (CERAVOLO et al., 2013; HIGASHI et al., 2016).

Após 60 min de estabilização, com trocas da solução de K-H a cada 20 min, os anéis de aorta foram encubados com solução de cloreto de potássio (90 mM) por 15 min para avaliar a viabilidade muscular. Após este tempo, a solução nutriente foi trocada a cada 10 min por 30 min. Após, a integridade do endotélio foi testada pela adição de 3 µM de acetilcolina (ACh) em anéis de aorta contraídos com 3 µM de fenilefrina (Fenil). O endotélio foi considerado intacto quando o relaxamento induzido pela ACh foi maior que 80% em relação a pré-contracção e removido quando o relaxamento foi menor que 5%. A seguir, mais 3 lavagens com solução de K-H a cada 10 min foram feitas.

Para avaliação da capacidade contrátil, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas (CCEC) para o agonista α 1-adrenérgico: Fenil (1 nM - 30 µM) e a contracção expressa em gramas de tensão. Para avaliar a função relaxante, CCEC foram construídas para ACh (1 nM - 30 µM) nos anéis E+ e para nitroprussiato de sódio (NPS) (0.1nM - 3µM) em anéis E-, ambos após pré-contracção

de Fenil (3 μ M). Os resultados de relaxamento foram expressos como porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração.

3.4 Análise Estatística

Para as CCEC para Fenil, ACh e NPS a resposta máxima (R_{max}) e o $-\log$ da concentração do agonista, resultando em 50% da R_{max} (pD_2) foram calculadas utilizando uma análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism software, USA.

Para as comparações entre os grupos, inicialmente uma análise exploratória foi realizada para avaliar o tipo de distribuição (Shapiro–Wilk test) e homogeneidade de variância (Levene's test) de cada variável. As variáveis apresentaram distribuição e homogeneidade normal e foram analisadas por: ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey (reatividade da aorta para Fenil); teste T-Student (reatividade da aorta para ACh e NPS, pressão arterial e frequência cardíaca) e múltiplos testes-T para avaliar ponto a ponto o ganho de peso e o consumo de ração. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 6 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA).

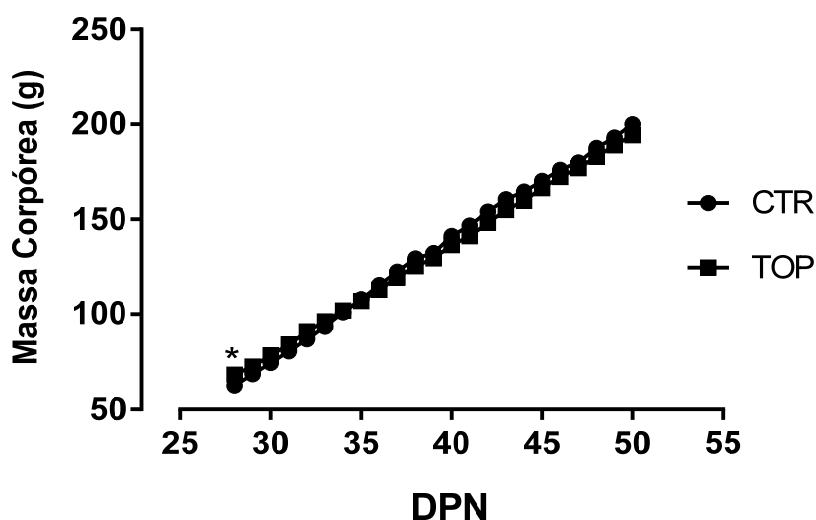
4. RESULTADOS

4.1 Avaliações durante o tratamento

4.1.1 Acompanhamento da massa corpórea e consumo de ração

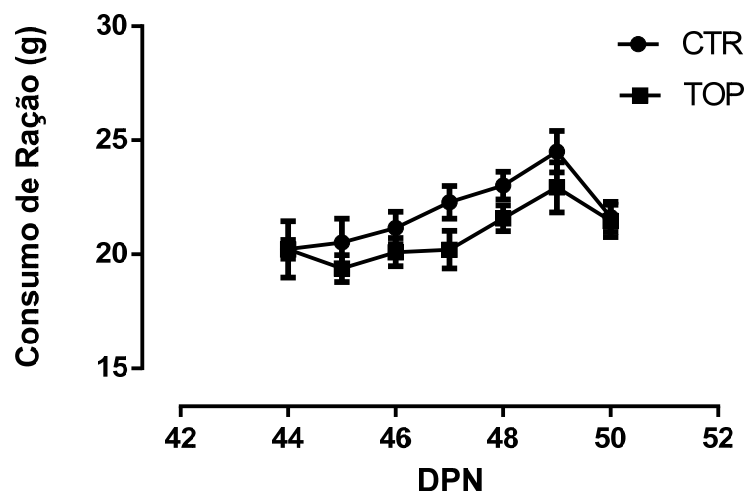
Houve diferença na massa corpórea apenas no primeiro dia de tratamento, sendo o ganho de massa corpórea durante o período de tratamento, DPN 29 - DPN50 (Figura 1) semelhantes entre os grupos TOP e CTR. Ainda, o consumo de ração (Figura 2), nos últimos sete dias de tratamento, foi similar entre os grupos CTR e TOP.

Figura 1. Acompanhamento do ganho de massa corpórea (g) de ratos tratados com topiramato ou água



Ganho de peso (g) durante adolescência (DPN 28 – 50) tratados com topiramato (TOP) ou água (CTR). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M, n = 10-11, *p < 0,05 (Múltiplos testes T).

Figura 2. Consumo de ração de ratos tratados com topiramato ou água



Consumo de ração (g) durante os últimos sete dias de tratamento (DPN - dia pós-natal 44 - 50) de ratos adolescentes com topiramato (TOP) ou água (CTR). Dados foram expressos como média \pm E.P.M, n = 6/grupo, $p > 0,05$ (Múltiplos testes T ponto a ponto).

4.2 Perfil Biométrico

4.2.1 Avaliação Aguda: DPN 51

Os ratos tratados com TOP apresentaram no DPN 51 diminuição do índice de Lee, parâmetro que relaciona massa e comprimento naso-anal dos animais. O grupo TOP apresentou menor quantidade de tecido adiposo branco retroperitoneal quando comparado com o CTR. Já os valores de massa corpórea, comprimento naso-anal, tecido adiposo perigonadal e marrom foram similares entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos avaliados em ratos tratados com topiramato ou água (Controle) durante adolescência

Parâmetros	Grupo (DPN 51)	
	Controle (16)	Topiramato (14)
Massa Corpórea (g)	213,5 ± 5,06	205,4 ± 4,25
Comprimento naso-anal (cm)	18,74 ± 0,17	18,87 ± 0,17
Índice de Lee	31,87 ± 0,16	31,30 ± 0,19*
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100g)	0,35 ± 0,01	0,27 ± 0,03*
Tecido adiposo perigonadal (g/100g)	0,57 ± 0,02	0,53 ± 0,03
Tecido adiposo marrom (g/100g)	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00

DPN: dia pós-natal. Dados expressos como a média ± E.P.M. (n) é o número de ratos/grupo. *p<0,05 vs controle (Teste T Student).

4.3.2 Avaliação Tardia: DPN 120

O tratamento com TOP durante a adolescência não alterou o perfil antropométrico dos animais na vida adulta (DPN 120) quando comparado com o do CTR. Sendo assim, massa corpórea, comprimento naso-anal e índice de Lee foram semelhantes entre os grupos. Ainda, não houve diferença na quantidade de tecido adiposo branco e marrom entre CTR e TOP (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biométricos avaliados em ratos adultos que foram tratados com água (Controle) ou topiramato

Parâmetros	Grupo (DPN 120)	
	Controle (13)	Topiramato (13)
Massa Corpórea (g)	360 ± 9,58	365,2 ± 8,59
Comprimento naso-anal	23,04 ± 0,20	23,04 ± 0,11
Índice de Lee	30,90 ± 0,14	31,01 ± 0,21
Tecido Adiposo Retroperitoneal (g/100g)	1,09 ± 0,10	0,99 ± 0,10
Tecido Adiposo Perigonadal (g/100g)	1,31 ± 0,07	1,29 ± 0,05
Tecido Adiposo Marrom (g/100g)	0,073 ± 0,003	0,071 ± 0,003

DPN: dia pós-natal. Dados expressos como a média ± E.P.M. (n) é o número de ratos/grupo. (Teste T Student).

4.3 Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

4.3.1 Avaliação Aguda: DPN 51

As pressões arteriais sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca não foram diferentes entres os grupos TOP e CTR no DPN 51 (Tabela 3).

Tabela 3. Pressão arterial e frequência cardíaca em ratos tratados com topiramato ou água (controle)

Grupos (DPN 51)	Parâmetros			
	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Controle (7)	130,6±3,0	89,3±1,4	102,7±2,4	376,6±17,4
Topiramato (9)	130,8±5,0	95,1± 3,6	102,0±4,3	370,9±13,1

DPN: dia pós-natal. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca. Dados foram expressos como a média ± E.P.M e analisadas por teste T Student. (n) é o número de ratos/grupo.

4.3.2 Avaliação Tardia: DPN 120

As pressões arteriais sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca foram similares entre os grupos TOP e CTR na vida adulta, DPN 120 (Tabela 6).

Tabela 4. Pressão arterial e frequência cardíaca de ratos adultos tratados com topiramato ou água (controle) durante a adolescência

Grupos (DPN 120)	Parâmetros			
	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Controle (7)	132,6 ± 3,52	89,91 ± 2,32	104,6 ± 3,39	344,1 ± 6,12
	127,4 ± 3,72	90,31 ± 2,553	99,00 ± 2,47	327,9 ± 7,05

DPN: dia pós-natal. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca. Dados foram expressos como a média ± E.P.M e analisadas por teste T Student. (n) é o número de ratos/grupo.

4.4 Reatividade Vascular

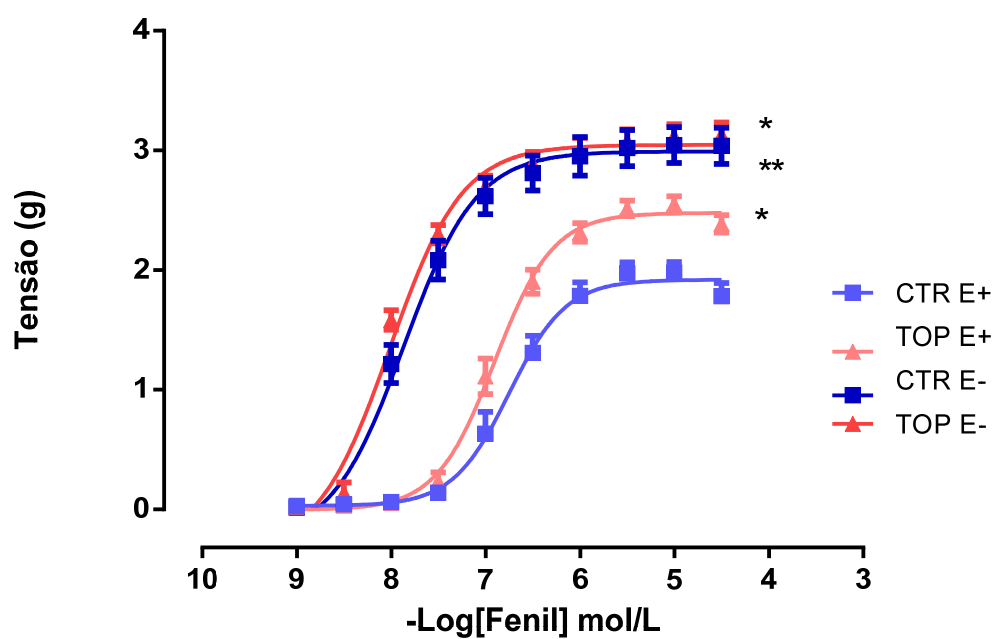
4.4.1 Avaliação Aguda: DPN 51

Os anéis de aorta torácica E+ e E-, isolados de ratos adolescentes de ambos os grupos experimentais no DPN 51, apresentaram resposta concentração-dependente aos fármacos Fenil, ACh e NPS (figuras 3 e 4).

A remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil e a sensibilidade à Fenil em anéis de aorta isolados dos ratos CTR e TOP quando comparados aos seus respectivos anéis E + (Tabela 5).

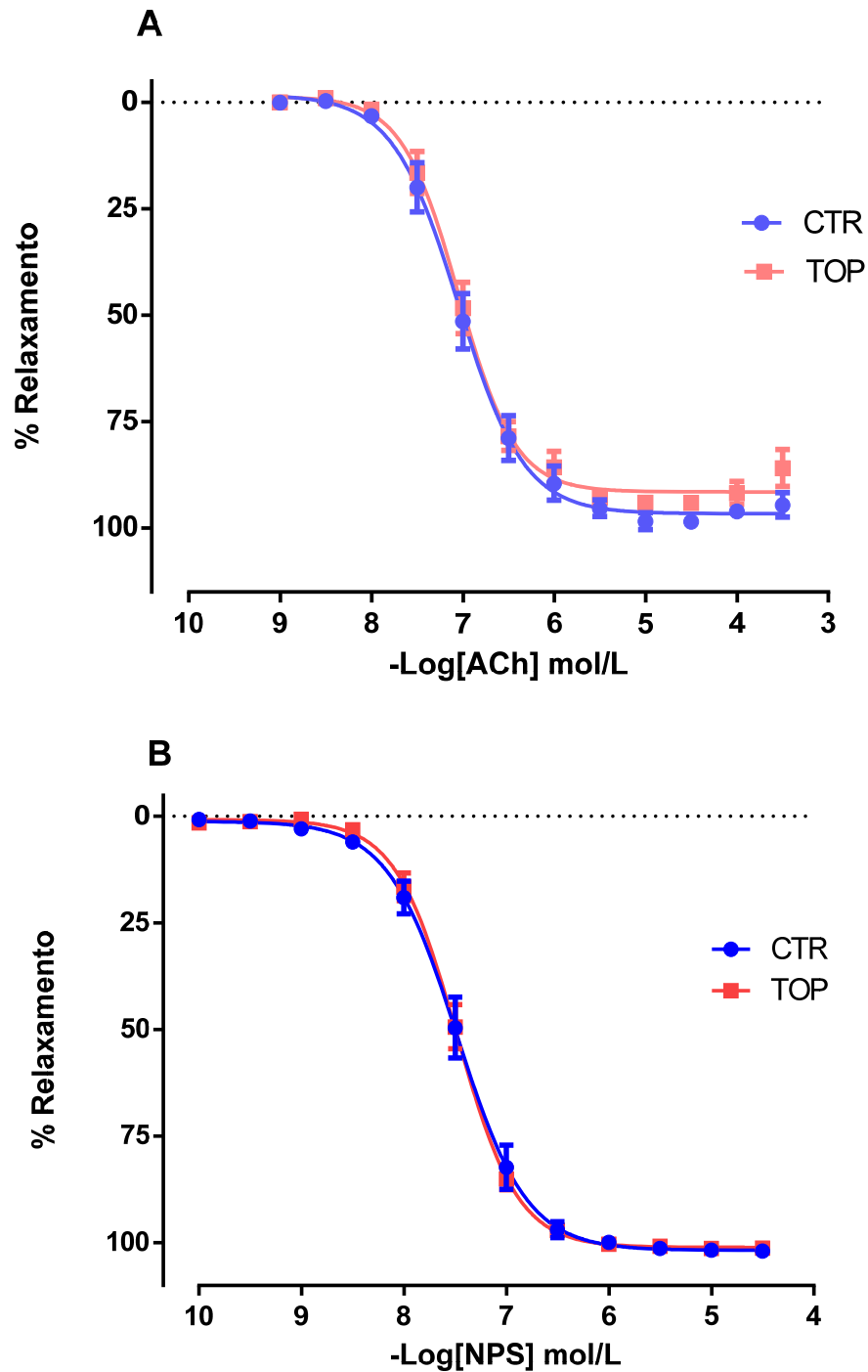
Em anéis de aorta E+, o tratamento com TOP durante a adolescência, aumentou a Rmax para Fenil sem alterar a pD2 quando comparados os mesmos parâmetros do CTR. Com a remoção do endotélio os valores de Rmax e pD2 foram similares entre os grupos CTR e TOP (Tabela 5). Em relação as curvas de relaxamento, tanto as curvas para ACh quanto para NPS foram semelhantes entre os grupos CTR e TOP (Tabela 6).

Figura 3. Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta de ratos no dia pós-natal 51



Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil) em anéis de aorta com (E+) e sem endotélio (E-) isolados de ratos adolescentes tratados com topiramato (TOP) ou água (CTR). Dados foram expressos como a média \pm E.P.M., $n = 10/\text{grupo}$. * vs CTR E+; ** vs TOP E+ $p < 0,05$ (ANOVA de uma via, pós-teste: Tukey, para Rmax e pD2).

Figura 4. Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina e (B) nitroprussiato de sódio obtidos em anéis de aorta de ratos no dia pós-natal 51



Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina (ACh) e (B) nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de ratos adolescentes tratados com topiramato (TOP) ou água (CTR). Dados foram expressos como a média \pm E.P.M. da porcentagem de relaxamento em relação à pré-contracção com fenilefrina (3 μ M), n = 8-11, p>0.05 (teste T-Student para Rmax e pD2).

Tabela 5. Resposta da aorta para fenilefrina

Grupos (DPN 51)	Rmax (g)		pD2	
	E+	E-	E+	E-
Controle (10)	1,98±0,06	2,98±0,15*	6,77±0,08	7,87±0,04*
Topiramato (10)	2,51±0,05*	3,03±0,01**	6,93±0,07	8,08±0,10**

Resposta máxima (Rmax) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmax) para fenilefrina em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio isolados de ratos adolescentes tratados com topiramato ou água (controle). DPN: dia pós-natal. Dados foram expressos como a média ± E.P.M. (n) é o número de ratos/grupo. *p<0,05 vs controle E +; **p<0,05 vs topiramato E +; (ANOVA de uma via, pós-teste: Tukey).

Tabela 6. Resposta de anéis de aorta para acetilcolina e nitroprussiato de sódio

Grupos (DPN 51)	Rmax		pD2	
	ACh (%)	NPS (%)	ACh	NPS
Controle	94,97± 1,78 (8)	98,86±1,42 (8)	7,05±0,10 (8)	7,48± 0,08 (8)
Topiramato	91,94± 1,02 (8)	98,08±0,76 (11)	7,04±0,08 (8)	7,49± 0,05 (11)

Resposta máxima (Rmax) e pD2 (-log da concentração do fármaco que causa 50% da Rmax) para acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato (NPS) em anéis de aorta de ratos adolescentes tratados com topiramato ou água (controle). DPN: dia pós-natal. Dados foram expressos como a média ± E.P.M da % de relaxação a contração com fenilefrina. Dados analisados por teste T Student. (n) é o número de ratos/grupo.

4.4.2 Avaliação Tardia: DPN 120

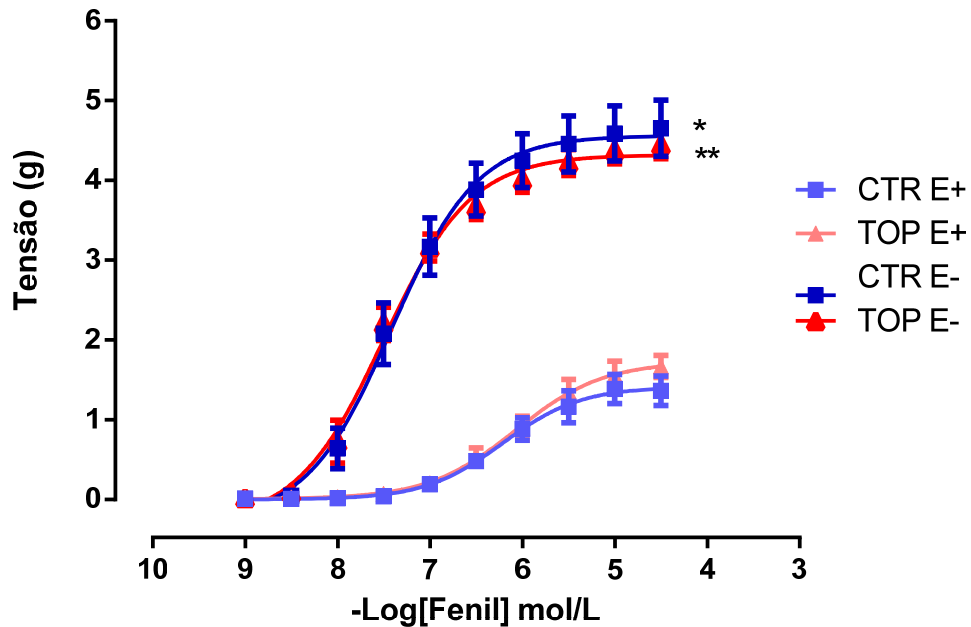
Os anéis de aorta E+ e E- isolados dos ratos adultos de ambos os grupos responderam de forma concentração-dependente aos fármacos Fenil, ACh e NPS (figuras 5 e 6).

A Rmax e pD2 para Fenil foram similares os grupos CTR e TOP na presença ou ausência do endotélio (Figura 5, Tabela 7). Os anéis E- dos ratos adultos dos grupos CTR e TOP apresentaram aumento da resposta contrátil e sensibilidade à Fenil quando comparados aos seus respectivos anéis E + (Tabela 7).

Quanto as curvas de relaxamento, os anéis de aorta de ratos adultos tratados com TOP durante a adolescência apresentaram diminuição de sensibilidade para

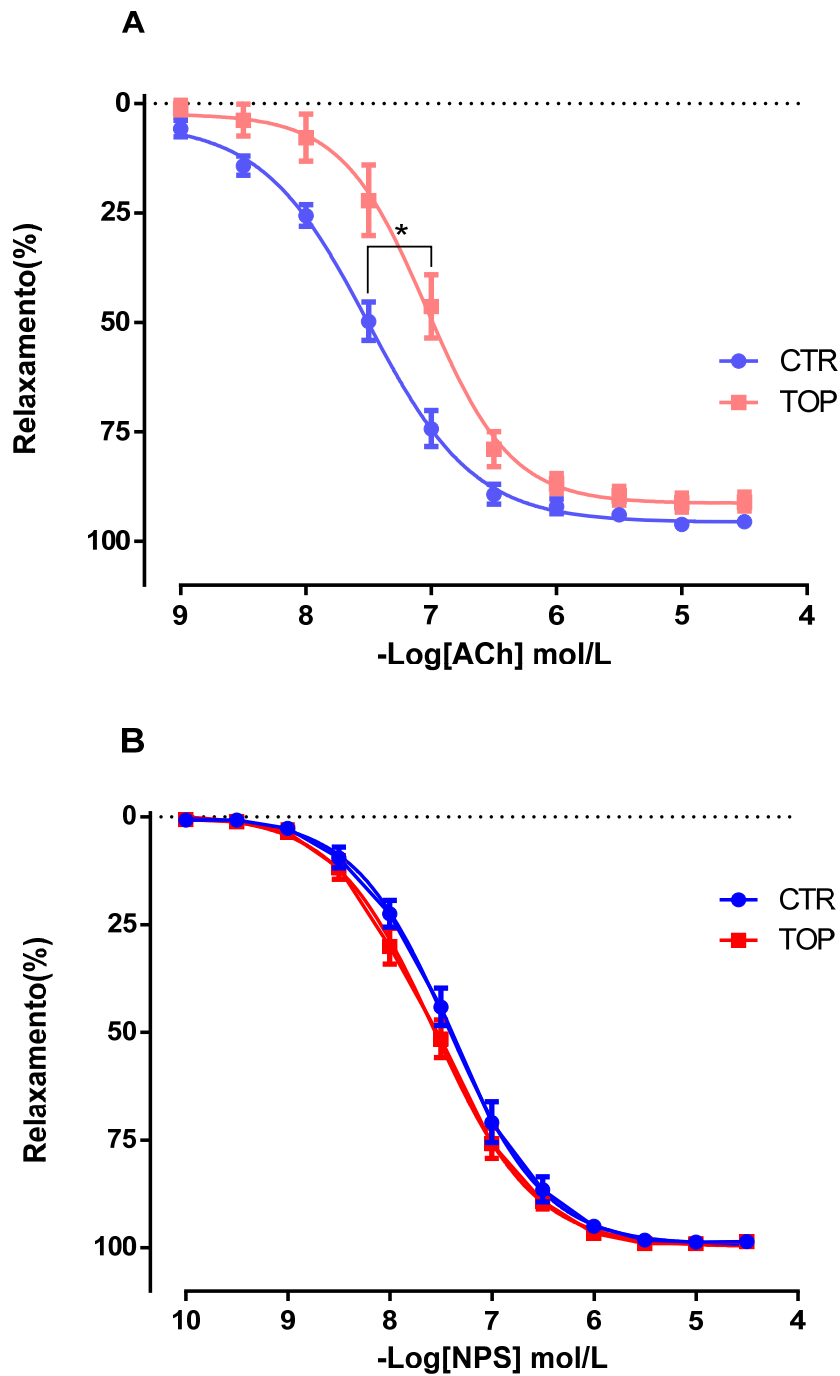
ACh, observada pela pD₂, sem alteração de R_{max}. Os valores de R_{max} e pD₂ para NPS foram similares entre os grupos (Figura 6, Tabela 8).

Figura 5. Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta de ratos adultos tratados com água (controle) ou topiramato durante adolescência



Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil) em anéis de aorta com (E+) e sem endotélio (E-) isolados de ratos adultos tratados com topiramato (TOP) ou água (CTR) durante a adolescência. Dados foram expressos como a média \pm e.p.m., n = 7-8/grupo.

Figura 6. Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina e (B) nitroprussiato de sódio obtidos em anéis de aorta de ratos adultos



Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina (ACh) e (B) nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de ratos adultos tratados com topiramato (TOP) ou água (CTR) durante a adolescência. Dados foram expressos como a média \pm E.P.M. da porcentagem de relaxamento em relação à pré-contracção com fenilefrina (3 μ M), ACh n=9, NPS n=7-8. *p<0,05 comparando -log da concentração de ACh que causa 50% da resposta máxima (pD₂) de CTR e TOP.

Tabela 7. Resposta da aorta de ratos adultos para fenilefrina

Grupos (DPN 120)	Rmax (g)		pD2	
	E+	E-	E+	E-
Controle (7)	1,38±0,17	4,78± 0,21*	6,17±0,09	7,42±0,10*
Topiramato (8)	1,76±0,15	4,40± 0,17**	6,01±0,11	7,51±0,09**

Resposta máxima (Rmax) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmax) para fenilefrina em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio isolados de ratos adultos tratados durante adolescência com topiramato ou água (controle). DPN: dia pós-natal. Dados foram expressos como a média ± E.P.M. (n) é o número de ratos/grupo. *p<0,05 vs controle E +; **p<0,05 vs topiramato E +; (ANOVA de uma via, pós-teste: Tukey).

Tabela 8. Resposta de anéis de aorta de ratos adultos para acetilcolina e nitroprussiato de sódio

Grupos (DPN 120)	Rmax		pD2	
	ACh (%) (9)	NPS (%) (10)	ACh (9)	NPS (10)
Controle	92,32 ± 1,29	96,96 ± 0,95	7,48 ± 0,07	7,40 ± 0,07
Topiramato	88,66 ± 1,86	95,93 ± 0,90	7,11 ± 0,11*	7,55 ± 0,06

Resposta máxima (Rmax) e pD2 (-log da concentração do fármaco que causa 50% da Rmax) para acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato (NPS) em anéis de aorta de ratos adultos tratados durante adolescência com topiramato ou água (controle). DPN: dia pós-natal. Dados foram expressos como a média ± E.P.M da % de relaxamento em relação a contração com fenilefrina. *p<0,05 vs controle. Dados analisados por teste T-Student. (n) é o número de ratos/grupo.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que o tratamento com TOP durante a adolescência reduz a modulação endotelial sobre o controle da reatividade da aorta a curto e longo prazo em ratos. Paralelamente, foi demonstrado que logo após este tratamento na adolescência há redução do depósito de tecido adiposo branco, o que não se mantém na vida adulta.

A relação do tratamento com TOP e perda de massa corporal vem sendo feita desde 1996 (BEN-MENACHEM et al., 1996). Um estudo realizado em ratos Zucker magros e obesos demonstrou que o tratamento com TOP (60 mg/kg) reduz o ganho de massa corpórea em ambos os modelos, mas não afeta a ingestão alimentar em ratos magros (PICARD et al., 2000a). Tais resultados corroboram, em parte, com os encontrados em nosso estudo, quando a ingestão alimentar não se mostrou alterada em ratos Wistar tratados com TOP durante a adolescência. Entretanto, em nosso estudo foi observado que o tratamento não modifica o ganho de massa corpórea. Esta divergência entre os estudos pode ser justificada por diferenças metodológicas que influenciam os resultados como o modelo animal: em nosso caso machos Wistar e no outro estudo fêmeas Zucker; o período de tratamento: 4 semanas nos Zucker e 22 dias no presente estudo, além das diferentes doses usadas.

Nossos estudos demonstraram que o tratamento com TOP durante a adolescência em ratos não modificou o ganho de massa corpórea e comprimento naso-anal e causou uma discreta redução do índice de Lee acompanhada de diminuição do tecido adiposo retroperitoneal, logo após o tratamento. De forma semelhante, um estudo realizado com adolescentes com IMC superior a 35, demonstrou que o tratamento apenas com TOP e TOP associado à reeducação alimentar leva a diminuição do IMC em ambos os grupos (FOX et al., 2015). Em outro estudo conduzido com ratos Wistar adultos magros e obesos tratados com TOP (40mg/kg ou 100mg/kg por 14 dias) demonstrou que o tratamento não interferiu com ganho de massa corpórea e tecidos adiposos nos ratos magros assim como não alterou ganho de massa corpórea dos ratos obesos mas diminuiu o tecido adiposo (EL-ABHAR; SCHAALAN, 2012). Até o momento, o mecanismo mais aceito para a influência do TOP sobre o tecido adiposo na obesidade seria por melhorar o

gasto energético, favorecendo a termogênese ao aumentar nos níveis do co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α) e da proteína desacopladora 1 (UCP-1) no tecido adiposo marrom, resultando em aumento da termogênese. O TOP também aumenta a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no fígado, tecido adiposo e coração, o que pode estar associado com melhora do metabolismo nesses animais (CARICILLI et al., 2012). Frente aos diferentes achados quanto ao perfil biométrico e o uso do TOP, é possível sugerir que as alterações estão relacionadas com: a dose, com o período de tratamento e comorbidades, sendo que menores períodos de tratamento em ratos magros, como o demonstrado em nossos estudos, não são capazes de causar alterações a longo prazo no perfil biométrico de ratos.

Ainda não existe consenso sobre os efeitos do tratamento com TOP sobre a pressão arterial. O presente estudo demonstrou que ratos tratados durante a adolescência não apresentaram alteração de pressão arterial (sistólica, diastólica e média) e de frequência cardíaca logo após o tratamento e na vida adulta. De forma semelhante, ratas obesas adultas tratadas com TOP também não apresentaram alterações nos valores de pressão arterial (ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011). Nossos resultados ainda corroboram com os descritos em humanos, nos quais descreve-se que adolescentes normotensos não apresentaram alterações de pressão arterial e frequência cardíaca durante tratamento com TOP (FOX et al., 2015).

Em pacientes adultos, esquizofrênicos tratados com olanzapina, a associação com TOP causou menor ganho de massa corporal e preveniu os aumentos na pressão arterial sistólica e diastólica, comumente encontradas nos pacientes tratados com olanzapina (NARULA et al., 2010). Ainda, pacientes obesos hipertensos ao serem tratados com topiramato ou topiramato associado a fenitoína apresentam da pressão arterial sistólica associada a diminuição de massa corpórea (COHEN; GADDE, 2019). Assim, as divergências entre os efeitos do TOP sobre a pressão arterial provavelmente estão relacionadas com a espécie avaliada (humanos ou roedores), com idade do paciente, período e tipo de tratamento, além do tipo de doença de base (obesidade, esquizofrenia).

No presente estudo foi demonstrado pela primeira vez que o tratamento com TOP em ratos adolescentes reduziu a modulação do endotélio sobre a resposta

contrátil causada pela Fenil em anéis de aorta, sem alterar a resposta em anéis sem endotélio, sugerindo que este tratamento pode causar disfunção do endotélio vascular. Entretanto, esta alteração endotelial não se manteve na vida adulta.

A modulação da contração pelo endotélio é feita, em maior parte, pelo NO e, além disso, fatores que interfiram em sua produção e/ou biodisponibilidade podem comprometer esta ação e favorecer a disfunção endotelial. Dentre os fatores que podem interferir no controle do NO sobre a contração estão as espécies reativas de oxigênio, que oxidam o NO a peroxinitrito, reduzindo assim a biodisponibilidade deste gás (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1999; RUBANYI, 1991; VANHOUTTE et al., 2017).

A disfunção endotelial é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças vasculares, como aterosclerose (KONUKOGLU; UZUN, 2016). Diversos fatores podem levar a disfunção endotelial, dentre estes está a hiperhomocisteinemia, que favorece o aumento de estresse oxidativo e a perda de função da enzima óxido nítrico sintase endotelial (GANGULY; ALAM, 2015). Nesse sentido, pacientes epilépticos de ambos os sexos, tratados com TOP, apresentam aumento na concentração sérica da homocisteína (BELCASTRO et al., 2010). Isso ocorre pela ação do TOP em aumentar a atividade da enzima responsável pela desmetilação da metionina à homocisteína, reação intermediária pertencente a biossíntese de cisteína (BELCASTRO et al., 2010; GANGULY; ALAM, 2015). Ainda, crianças e adolescentes epilépticos tratados com TOP apresentam aumento da espessura das camadas íntima e média da artéria carótida (EL-FARAHATY et al., 2015), sendo este um preditor de disfunção endotelial.

Assim, apesar das importantes diferenças metodológicas entre nosso estudo e os descritos em humanos, é possível aventar a hipótese de que o tratamento com TOP em ratos possa causar aumento da homocisteína plasmática durante o tratamento e assim favorecer o estresse oxidativo e a disfunção endotelial. Entretanto, esta hipótese ainda não foi testada.

A resposta ao agente vasodilatador dependente do endotélio, ACh, e para o doador de NO, NPS, não foi alterada. A ACh realiza vasodilatação por se ligar a receptores muscarínicos no endotélio, levando ao aumento de influxo de cálcio e produção do NO. O NO por sua vez, no músculo liso, aumenta as concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que levam ao

relaxamento do músculo liso (FURCHGOTT; PM, 1989). No entanto, ao contrário da ACh, a fenil parece não ser capaz de aumentar as concentrações de GMPc na aorta de ratos (FILIPPI et al., 2001). Desta forma, o endotélio da aorta de ratos modula as respostas contráteis através de uma produção contínua de NO, ou melhor, uma produção basal (VAN LANGEN et al., 2013). Com isso, é possível que a produção de NO gerada pela ACh nos anéis dos ratos tratados com TOP supere a oxidação que diminui a biodisponibilidade de NO. Ainda, a sensibilidade do músculo liso para o NO está inalterada uma vez que não houve diferença na resposta para o NPS.

A longo prazo, o tratamento com TOP durante a adolescência não interferiu na vasoconstrição dos ratos adultos, mas levou a uma diminuição da pD2 para ACh, sem alterar a Rmax. A pD2 é um parâmetro utilizado para avaliar a potência de um agonista, no caso acetilcolina, considerando a sensibilidade do tecido ao agonista e a afinidade deste agonista ao seu receptor (ARAUJO et al., 2013; MONCADA; VANE, 1979). Sendo assim, nossos estudos demonstraram que o tratamento com TOP durante a adolescência diminui a potência da ACh, sem interferir na eficácia. Considerando o mecanismo de ação da ACh no vaso, algumas hipóteses poderiam ser aventadas para explicar os resultados descritos. A primeira seria a diminuição na expressão de receptores muscarínicos no endotélio (FURCHGOTT; PERSPECTIVE, 1988; TANGSUCHARIT et al., 2016), a segunda a diminuição da sensibilidade do músculo liso para NO, e terceira redução na biodisponibilidade de NO. Dentre as hipóteses é possível afirmar que não houve alteração da sensibilidade do músculo para NO, uma vez que não houve diferença na vasodilatação para NPS, fármaco doador de NO (TINKER; MICHENFELDER, 1976), sendo necessário testar as demais hipóteses.

Assim, o tratamento com TOP durante a adolescência parece prejudicar a função endotelial de ratos logo após o tratamento e na vida adulta, estas alterações endoteliais se manifestam de forma diferente nos períodos avaliados e os mecanismos envolvidos ainda precisam ser esclarecidos.

6. CONCLUSÃO

Nossos estudos demonstraram que o tratamento com TOP em ratos no período da adolescência leva a disfunção endotelial na aorta, logo após o tratamento (DPN 51), com aumento da resposta contrátil da aorta sem interferir na vasodilatação e na vida adulta há diminuição da sensibilidade à ACh na aorta dos ratos TOP. Esses resultados demonstram que o tratamento com TOP promove repercussões sobre a reatividade vascular, que se relacionam com prejuízo na função endotelial, logo após o tratamento e 80 dias após o término do tratamento. Ainda, alguns parâmetros do perfil biométrico destes animais como redução do tecido adiposo retroperitoneal e índice de Lee são reduzidos logo após o tratamento, mas não são afetados na vida adulta. Considerando que a disfunção endotelial é um fator de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas conhecer os efeitos vasculares do tratamento com TOP pode ajudar na prevenção de efeitos indesejáveis a curto e longo prazo.

REFERÊNCIAS

- A.M., C.; L.S., E. Use of second-generation antiepileptic drugs in the pediatric population. **Pediatric Drugs**, v. 10, n. 4, p. 217–254, 2008.
- 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. 1187–1195, 2011.
- ARAUJO, A. J. S. DE et al. Resistance Training Controls Arterial Blood Pressure in Rats with L-NAME- Induced Hypertension. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 339–346, 2013.
- BELCASTRO, V. et al. Hyperhomocysteinemia in epileptic patients on new antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 51, n. 2, p. 274–279, 2010.
- BEN-MENACHEM, E. et al. Double-blind, placebo-controlled trial of topiramate as add-on therapy in patients with refractory partial seizures. **Epilepsia**, v. 37, n. 6, p. 539–543, 1996.
- 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, 2008.
- 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.
- CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial : o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.
- 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.
- 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, mar. 2013.
- COHEN, J. B.; GADDE, K. M. Weight Loss Medications in the Treatment of Obesity and Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 21, n. 2, p. 16, 12 fev. 2019.
- 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.
- FDA. FDA approves Topamax for migraine prevention in adolescents. **Journal of pain & palliative care pharmacotherapy**, v. 28, n. 2, p. 191, jun. 2014.

- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **J Physiol Pharmacol.**, v. 50, n. 4, p. 525–534, 1999.
- FILIPPI, S. et al. alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 296, n. 3, p. 869–86975, 2001.
- FOX, C. K. et al. Topiramate for Weight Reduction in Adolescents With Severe Obesity. **Clinical Pediatrics**, v. 54, n. 1, p. 19–24, 14 jan. 2015.
- FURCHGOTT, R. F.; PERSPECTIVE, H. Endothelium-Dependent Relaxation in Systemic Arteries. p. 1–26, 1988.
- 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.
- FURCHGOTT, R.; PM, V. Endothelium-derived factors. **Faseb J.**, v. 3, n. 9, p. 2007–2018, 1989.
- GANGULY, P.; ALAM, S. F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 1, p. 6, 10 dez. 2015.
- GLASS, H. C.; POULIN, C.; SHEVELL, M. I. Topiramate for the Treatment of Neonatal Seizures. **Pediatric Neurology**, v. 44, n. 6, p. 439–442, jun. 2011.
- HIGASHI, C. M. et al. Does fish oil or folic acid prevent vascular changes in female progeny caused by maternal exposure to fluoxetine? **Life Sciences**, v. 152, p. 165–170, 2016.
- HUSUM, H. et al. Topiramate Normalizes Hippocampal NPY-LI in Flinders Sensitive Line ‘Depressed’ Rats and Upregulates NPY, Galanin and CRH-LI in the Hypothalamus: Implications for Mood-Stabilizing and Weight Loss-Inducing Effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 7, p. 1292–1299, jul. 2003.
- KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. In: **Springer International Publishing**. [s.l: s.n.]. v. 54p. 511–540.
- KUGLER, S. L.; SACHDEO, R. C. Topiramate efficacy in infancy. **Pediatric Neurology**, v. 19, n. 4, p. 320–322, out. 1998.
- LEWIS, D. et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Topiramate for Migraine Prevention in Pediatric Subjects 12 to 17 Years of Age. **Pediatrics**, v. 123, n. 3, p. 924–934, 2009.
- LI, H. F. et al. Effects of topiramate on weight and metabolism in children with epilepsy. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 98, n. 9, p. 1521–1525, 2009.
- LIN, K. Topiramato: Uma Molécula Multifacetada. **Revista Neurociência**, v. 19, n. 1, p. 8–9, 2011.
- MARCO, E. M. et al. Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: The issue of early adolescent exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 8, p. 1722–1739, 2011.
- MARTIN, H. et al. Impaired endothelial function and increased carotid stiffness in 9-

year-old children with low birthweight. **Circulation**, v. 102, n. 22, p. 2739–2744, 2000.

MCELROY, S. L. et al. Topiramate in the Treatment of Binge Eating Disorder Associated With Obesity: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 2, p. 255–261, fev. 2003.

MONCADA, S.; VANE, J. R. The role of prostacyclin in vascular tissue. **Federation proceedings**, v. 38, n. 1, p. 66–71, jan. 1979.

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, 2010.

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.

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, 2014.

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, 2000a.

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. 2000b.

PRIOR, L. J.; ARMITAGE, J. A. Neonatal overfeeding leads to developmental programming of adult obesity: You are what you ate. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 11, p. 2419, 2009.

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.

RUBANYI, G. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 27–36, maio 1991.

SAKULCHIT, T.; MECKLER, G. D.; GOLDMAN, R. D. Topiramate for pediatric migraine prevention. **Canadian Family Physician**, v. 63, n. 7, p. 529–535, 2017.

SILBERSTEIN, S. D. Topiramate in Migraine Prevention: A 2016 Perspective. **Headache**, v. 57, n. 1, p. 165–178, 2017.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417–463, jun. 2000.

STAPLETON, P. A. et al. Obesity and vascular dysfunction. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP**, v. 15, n. 2, p. 79–89, 2008.

TANGSUCHARIT, P. et al. Muscarinic acetylcholine receptor M1 and M3 subtypes mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric arteries. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 130, n. 1, p. 24–32,

jan. 2016.

TINKER, J. H.; MICHENFELDER, J. D. Sodium nitroprusside: pharmacology, toxicology and therapeutics. **Anesthesiology**, v. 45, n. 3, p. 340–54, set. 1976.

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, ago. 2005.

VAN LANGEN, J. T. H. et al. Contribution of α -adrenoceptor stimulation by phenylephrine to basal nitric oxide production in the isolated mouse aorta. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 318–323, 2013.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.

VEGGIOTTI, P. et al. Topiramate efficacy in an infant with partial seizures refractory to conventional antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 13, n. 4, p. 241–243, jun. 2004.

VOHR, B. R. et al. Early predictors of hypertension in prematurely born adolescents. **Acta Paediatrica**, v. 99, n. 12, p. 1812–1818, dez. 2010.

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, abr. 2003.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 63–68, 2004.

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, 2000.

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.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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 Sciantti 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 heterogênico (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 marrom, 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,


Prof.ª Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 95/2018

Londrina, 07 de Junho de 2018.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UUEL reunida em 05 de Junho de 2018 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Avaliações agudas e tardias do metabolismo e dos sistemas cardiovascular e reprodutor de ratos tratados com topiramato na infância ou adolescência." registrado sob processo CEUA nº9379.2018.26 do Centro Ciências Biológicas, pesquisa desenvolvida sob sua responsabilidade, sendo julgado como **pendente**. Para que esta comissão possa avaliar novamente o protocolo supracitado, são necessárias as seguintes correções/esclarecimentos, por favor:

- Item 9.4: Justificar a previsão do número de animais segundo a variabilidade dos parâmetros a serem avaliados de acordo com a literatura científica pertinente: favor inserir referência de literatura.
- Item 11: Favor justificar a necessidade de retirada de sangue por punção cardíaca juntamente à retirada de sangue periférico.
- Item 13: Favor esclarecer se a permanência do animal em gaiola metabólica por 48h representaria um fator de estresse, uma vez que a gaiola será utilizada somente para registro do consumo de ração

A CEUA/UUEL pede ao proponente que nos envie: carta resposta às pendências solicitadas e uma cópia do formulário corrigido, impresso, via malote para a CEUA. Além disso, envie também para o e-mail da CEUA (ceua@uel.br) uma cópia dos arquivos para serem anexados ao CD que consta do processo.

Conforme estabelece a Resolução CEPE e CA 100/2011, em seu artigo 9º, o pesquisador dispõe de, no máximo, 60 dias para apresentar a CEUA/UUEL resposta a essa solicitação, sendo bastante encaminhar um documento que contenha os esclarecimentos solicitados, o qual ficará arquivado juntamente com o projeto de pesquisa, como um complemento do mesmo.

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

Maria Fernanda R. Graciano

Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano.
Coordenadora da CEUA/UUEL.