



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DEBORAH GOMES DA SILVA

**A EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR AO TOPIRAMATO  
DURANTE A ADOLESCÊNCIA NÃO CAUSA ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES E BIOMÉTRICAS A CURTO E A  
LONGO PRAZO**

---

Londrina  
2021

DEBORAH GOMES DA SILVA

**A EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR AO TOPIRAMATO  
DURANTE A ADOLESCÊNCIA NÃO CAUSA ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES E BIOMÉTRICAS A CURTO E A  
LONGO PRAZO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Graziela Sciantti Ceravolo.

Londrina  
2021

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

S586e Silva, Deborah Gomes da.  
A exposição de ratas Wistar ao topiramato durante a adolescência não causa alterações cardiovasculares e biométricas a curto e a longo prazo / Deborah Gomes da Silva. - Londrina, 2021.  
65 f. : il.

Orientador: Graziela Sciantti Ceravolo.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD) - Tese. 2. Sistema vascular: estudos de reatividade vascular - Tese. 3. Tratamento durante a adolescência - Tese. 4. Hormônios sexuais femininos - Tese. I. Ceravolo, Graziela Sciantti. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

DEBORAH GOMES DA SILVA

**A EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR AO TOPIRAMATO  
DURANTE A ADOLESCÊNCIA NÃO CAUSA ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES E BIOMÉTRICAS A CURTO E A  
LONGO PRAZO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Graziela Scianti  
Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Maria do Carmo Pinho Franco  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

---

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves  
Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine  
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 26 de agosto de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e souberam me amar independente das minhas escolhas.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado e me guiar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, por todo incentivo e suporte que me proporcionaram para que eu realizasse os meus sonhos. Obrigada por todo amor que depositaram a me criar, devo a vocês grande parte do ser humano que sou hoje.

A minha orientadora, prof<sup>a</sup> Graziela Scianti Ceravolo, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Obrigada por ter aceitado a me orientar durante todos esses anos, foi um prazer aprender a ser cientista com você.

As minhas irmãs, que estiveram ao meu lado durante todos os processos da minha vida. Obrigada por apoiarem minhas decisões e trazerem alegria para os momentos mais difíceis.

A minha namorada, por toda paciência e companheirismo. Obrigada por todos os finais de semana passados na UEL e por sempre apoiar minhas decisões profissionais.

Aos meus amigos de laboratório e departamento, Kawane, Carolina, Camila, Kenny, Amanda, Daniela, Juliana e Rafaella, obrigada por me presentear com uma segunda família, vocês são para mim sinônimos de aprendizado, perseverança e inspiração.

A prof<sup>a</sup> Maria do Carmo Pinho Franco, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), obrigada pelo apoio ideológico referente ao tema abordado em minha pesquisa.

Aos funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina (CIF – UEL), em especial a Fujiko, Wagner e dona Tereza, obrigada por fornecerem suporte técnico para a realização desse trabalho e sempre me ajudarem com prontidão.

Aos demais professores do departamento (CIF – UEL), obrigada pelos exemplos extraordinários de profissionais com quem tive a oportunidade de aprender e crescer durante essa experiência acadêmica.

E por fim, a agência de fomento CAPES, obrigada pelo auxílio financeiro que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho.

SILVA, Deborah Gomes da. **A exposição de ratas Wistar ao topiramato durante a adolescência não causa alterações cardiovasculares e biométricas a curto e a longo prazo.** 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

Atualmente, é reconhecido que as condições ambientais no início da vida contribuem para o desenvolvimento de doenças na vida adulta. A exposição a fármacos, por exemplo, em estágios iniciais do desenvolvimento biológico, como a adolescência, pode favorecer o estabelecimento de doenças. Nesse contexto, o topiramato (TOP) é um agente terapêutico aprovado para o tratamento de epilepsia e profilaxia da enxaqueca em adolescentes. Recentemente, tem sido descrito que o tratamento com esse fármaco pode contribuir com o desenvolvimento de doenças vasculares por aumentar fatores de risco vascular. O aumento desses fatores está associado com disfunção endotelial. Entretanto, pelo menos em fêmeas, os efeitos do tratamento com TOP durante a adolescência sobre a função do endotélio vascular ainda não foram investigados. Além disso, os poucos dados sobre este tratamento na literatura não fazem distinção entre os sexos e desconsideram que os hormônios sexuais femininos, como os estrógenos, possuem papel modulador sobre o sistema cardiovascular. Assim, este estudo objetivou avaliar a função do endotélio vascular, o papel dos receptores estrogênicos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e  $\beta$  (ER $\beta$ ) em modular a resposta contrátil e relaxante e parâmetros biométricos e cardiovasculares de ratas adolescentes e adultas tratadas com TOP durante a adolescência. Para isso, ratas Wistar foram tratadas com TOP (41 mg/kg) ou veículo (grupo CTR) por gavagem do dia pós-natal (DPN) 28 ao 50 (adolescência em roedores). No final do tratamento, os grupos TOP e CTR foram distribuídos e avaliados no DPN 51 ou 90 (na fase estro). A massa corporal e o consumo de ração foram monitorados diariamente durante o tratamento (DPN 28-50) e semanalmente (DPN 57, 64, 71, 78 e 85) até o DPN 90. Em ambos os períodos, DPN 51 e 90, as ratas foram avaliadas quanto: reatividade da aorta torácica para fenilefrina (Fenil), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS), reatividade de anéis de aorta com endotélio para Fenil e ACh após antagonismo dos ER $\alpha$  e ER $\beta$ , índice de Lee (IL), depósitos de tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM), pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). Como resultado, não houve diferença na massa corporal e consumo de ração monitorados diariamente durante o tratamento ou semanalmente até o DPN 90. A resposta vascular para Fenil, ACh e NPS também foi similar entre os grupos TOP e CTR no DPN 51 e 90. Ainda, o antagonismo dos ER $\alpha$  e ER $\beta$  não alterou a resposta para Fenil e ACh a curto e longo prazo. Entretanto, o tratamento com TOP aumentou o depósito de TAM no DPN 51 – o que não se manteve no DPN 90, sem interferir no TAB, IL, PA e FC a curto e longo prazo. Em conclusão, o tratamento com TOP durante a adolescência não causa disfunção do endotélio vascular ou altera a modulação estrogênica via ER $\alpha$  e ER $\beta$  em ratas Wistar adolescentes e adultas. Entretanto, ele aumenta apenas o depósito de TAM a curto prazo, sem alterar outros parâmetros biométricos e cardiovasculares. Esses resultados sugerem que o TOP não afeta o padrão saúde-doença, em relação aos parâmetros avaliados, no período e dose utilizado.

**Palavras-chave:** DOHaD; reatividade vascular; disfunção endotelial; hormônios sexuais femininos; adolescentes.

SILVA, Deborah Gomes da. **The exposition of Wistar rats to topiramate during adolescence does not cause cardiovascular and biometric alterations in the short and long term.** 2021. 65 p. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Currently, it is recognized that environmental conditions in early life contribute to the development of disease in adult life. Exposure to drugs, for example, at initial stages of biological development, such as adolescence, can favor the onset of diseases. In this context, topiramate (TOP) is a therapeutic agent approved for epilepsy treatment and migraine prophylaxis in adolescents. Recently, it has been described that treatment with this drug can contribute with the development of vascular diseases by increasing vascular risk factors. The increase in these factors is associated with the endothelial dysfunction development. However, at least in females, the effects of TOP treatment during adolescence on vascular endothelial function have not been investigated yet. Moreover, the few data about this treatment in the literature do not distinguish between the sexes and disregard that female sex hormones, such as estrogen, have modulatory effect on the cardiovascular system. Thus, this study aimed to evaluate the vascular endothelium function, the role of  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) estrogen receptors in modulating the contractile and relaxing response, and cardiovascular and biometric parameters in adolescent and adult female rats treated with TOP during adolescence. For this, female Wistar rats were treated with TOP (41 mg/kg) or vehicle (CTR group) by gavage from postnatal day (PND) 28 to 50 (adolescence in rodents). At the end of the treatment, TOP and CTR groups were distributed and evaluated at PND 51 or 90 (in the estrus phase). Body mass and food intake were monitored daily during treatment (PND 28-50) and weekly (PND 57, 64, 71, 78, and 85) until PND 90. In both periods, PND 51 and 90, the rats were evaluated for: thoracic aorta reactivity to phenylephrine (Phenyl), acetylcholine (ACh), and sodium nitroprusside (SNP), reactivity of aortic rings with endothelium to Phenyl and ACh after ER $\alpha$  and ER $\beta$  antagonism, Lee index (LI), white (WAT) and brown (BAT) adipose tissue deposits, blood pressure (BP) and heart rate (HR). As a result, there was no difference in body mass and feed intake monitored daily during treatment or weekly until PND 90. The vascular response to Phenyl, ACh e SNP also was similar between TOP and CTR groups at PND 51 and 90. Still, the ER $\alpha$  and ER $\beta$  antagonism did not alter the response to Phenyl and ACh in the short and long term. However, TOP treatment increased the BAT deposit at PND 51 - which did not persist at PND 90, without interfering in WAT, LI, BP, and HF in the short and long term. In conclusion, TOP treatment during adolescence does not cause vascular endothelial dysfunction or alter estrogen modulation via ER $\alpha$  and ER in adolescent and adult female Wistar rats. However, it increases the BAT deposit only in the short term without changing other biometric and cardiovascular parameters. These results suggest that TOP does not affect the health/disease pattern, concerning the parameters evaluated, in the period and dose used.

**Key-words:** DOHaD; vascular reactivity; endothelial dysfunction; female sex hormones; adolescents.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Delineamento experimental.....	25
<b>Figura 2.</b>	Acompanhamento diário da massa corpórea de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.....	30
<b>Figura 3.</b>	Consumo diário de ração de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....	31
<b>Figura 4.</b>	Acompanhamento semanal da massa corpórea de ratas adultas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.....	32
<b>Figura 5.</b>	Consumo semanal de ração de ratas adultas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....	32
<b>Figura 6.</b>	Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta isolados ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....	34
<b>Figura 7.</b>	Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina e nitroprussiato de sódio em anéis de aorta isolados ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.....	36
<b>Figura 8.</b>	Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.....	38
<b>Figura 9.</b>	Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina e nitroprussiato de sódio em anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....	39
<b>Figura 10.</b>	Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratas ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ .....	41
<b>Figura 11.</b>	Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de aorta isolados de ratas ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ .....	43

<b>Figura 12.</b> Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ .....	45
<b>Figura 13.</b> Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ .....	47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Pressão arterial e frequência cardíaca aferidas ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.....33
- Tabela 2.** Pressão arterial e frequência cardíaca aferidas na vida adulta (a partir do dia pós-natal 90) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....33
- Tabela 3.** Resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta isolados ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.....35
- Tabela 4.** Resposta relaxante à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta isolados ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....37
- Tabela 5.** Resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....38
- Tabela 6.** Resposta relaxante à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.....40
- Tabela 7.** Resposta para fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratas ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ . ....42
- Tabela 8.** Resposta para acetilcolina de anéis de aorta isolados de ratas ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ . ....44
- Tabela 9.** Resposta para fenilefrina de anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ . ....46
- Tabela 10.** Resposta para acetilcolina de anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ . ....48

<b>Tabela 11.</b> Parâmetros biométricos avaliados entre os dias pós-natais 51 e 56 em ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....	49
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros biométricos avaliados em ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato ou água durante a adolescência. ....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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
CNA:	comprimento naso-anal
COBEA:	Conselho Nacional de Controle de Experimentação
CTR:	grupo controle
DMSO:	dimetilsulfóxido
DOHAD:	Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (do termo em inglês <i>Developmental Origins of Health and Disease</i> )
DPN:	dia pós-natal
E-:	sem endotélio
E+:	com endotélio
E <sub>1</sub> :	estrona
E <sub>2</sub> :	estradiol
E <sub>3</sub> :	estriol
E <sub>4</sub> :	estretol
eNOS:	óxido nítrico sintase endotelial
EPM:	erro padrão da média
ER:	receptores estrogênicos (do termo em inglês <i>estrogen receptor</i> )
ER $\alpha$ :	receptor estrogênico alfa
ER $\beta$ :	receptor estrogênico beta
ERE:	elemento de resposta estrogênica
FC:	frequência cardíaca
FDA:	<i>Food and drug administration</i>
Fenil:	fenilefrina
GABA:	ácido gama-aminobutírico
GPR30:	receptor estrogênico acoplado a proteína G
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
MPP:	metil-piperidinopirazol
NO:	óxido nítrico
NPS:	nitroprussiato de sódio
PAD:	pressão arterial diastólica
PAM:	pressão arterial média
PAS:	pressão arterial sistólica
pD2:	-log da concentração do agonista que causa 50% da resposta máxima
PGC1 $\alpha$ :	co-ativador alfa-1 do receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PHTPP:	4-(2-fenil-5,7 bis(trifluorometil)pirazol[1,5-a]pirimidina-3-il)fenol
R <sub>máx</sub> :	resposta máxima
ROS:	espécies reativas de oxigênio
TAM:	tecido adiposo marrom
TAP:	tecido adiposo perigonadal
TAR:	tecido adiposo retroperitoneal
TOP:	topiramato/grupo topiramato
UCP-1:	proteína desacopladora 1
UEL:	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	TOPIRAMATO E METABOLISMO .....	15
1.2	TOPIRAMATO E SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	18
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	JUSTIFICATIVA .....	22
2.2	OBJETIVO GERAL .....	22
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	MODELO ANIMAL E EXPOSIÇÃO .....	24
3.2	ACOMPANHAMENTO DA MASSA CORPÓREA E CONSUMO DE RAÇÃO .....	25
3.2.1	Acompanhamento Diário Durante o Tratamento .....	25
3.2.2	Acompanhamento Semanal .....	26
3.3	PARÂMETROS AVALIADOS AO FINAL DO TRATAMENTO E NA VIDA ADULTA .....	26
3.3.1	Pressão Arterial e Frequência Cardíaca .....	26
3.3.2	Reatividade da Aorta Torácica .....	26
3.3.2.1	Resposta contrátil e relaxante de anéis de aorta isolados .....	26
3.3.2.2	Papel dos receptores estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ em modular a resposta contrátil e relaxante de anéis de aorta isolados .....	27
3.3.3	Parâmetros Biométricos .....	28
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	30
4.1	ACOMPANHAMENTO DA MASSA CORPÓREA E CONSUMO DE RAÇÃO .....	30
4.1.1	Acompanhamento Diário Durante o Tratamento .....	30
4.1.2	Acompanhamento Semanal .....	31
4.2	PARÂMETROS AVALIADOS AO FINAL DO TRATAMENTO E NA VIDA ADULTA .....	32
4.2.1	Pressão Arterial e Frequência Cardíaca .....	32
4.2.2	Reatividade da Aorta Torácica .....	33
4.2.2.1	Resposta contrátil e relaxante de anéis de aorta isolados .....	33

4.2.2.1.1	<i>Resposta vascular ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) .....</i>	<i>33</i>
4.2.2.1.2	<i>Resposta vascular na vida adulta (a partir do dia pós-natal 90).....</i>	<i>37</i>
4.2.2.2	Papel dos receptores estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ na modulação da resposta contrátil e relaxante de anéis de aorta isolados.....	40
4.2.2.2.1	<i>Resposta vascular ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) .....</i>	<i>40</i>
4.2.2.2.2	<i>Resposta vascular na vida adulta (a partir do dia pós-natal 90).....</i>	<i>44</i>
4.2.3	Parâmetros Biométricos .....	48
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO A – CEUA/UEL.....</b>	<b>65</b>

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 De acordo com as Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença, do  
3 termo em inglês *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), eventos  
4 adversos ocorridos em fases críticas do desenvolvimento corporal podem influenciar  
5 o padrão de saúde e doença ao longo da vida (SILVEIRA et al., 2007). Caracterizadas  
6 por alta plasticidade, fases iniciais como a pré-natal, infância e adolescência, quando  
7 associadas a fatores ambientais significativos, podem tornar o indivíduo susceptível  
8 ao desenvolvimento de doenças (BARKER et al., 1993; CREWS; HE; HODGE, 2007).

9 A susceptibilidade desenvolvida à determinadas doenças ao longo da vida  
10 tem sido associada às alterações epigenéticas, descritas como alterações na  
11 expressão gênica não relacionadas a sequência nucleotídica (GLUCKMAN et al.,  
12 2009). Influenciadas por fatores ambientais, essas alterações podem ser  
13 desencadeadas durante fases iniciais do desenvolvimento corporal resultando em  
14 efeitos duradouros ou persistentes sobre o organismo (SILVEIRA et al., 2007).  
15 Atualmente, é reconhecido que a exposição precoce a diversos xenobióticos, como  
16 drogas, poluentes e medicamentos, pode influenciar o padrão de saúde e doença  
17 tardiamente (HAUGEN et al., 2015).

18 Nesse contexto, o topiramato (TOP) é um medicamento aprovado pelo  
19 *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de epilepsia e profilaxia da  
20 enxaqueca em adolescentes entre 12 e 17 anos (SAKULCHIT; MECKLER;  
21 GOLDMAN, 2017). É um fármaco que apresenta múltiplos mecanismos de ação, os  
22 quais resultam em atenuação da excitabilidade neuronal: bloqueio de canais para  
23 sódio dependentes de voltagem, potencialização da ação do ácido gama-  
24 aminobutírico (GABA) em receptores GABA-A, inibição dos receptores  
25 glutamatérgicos  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e cainato,  
26 inibição de canais para cálcio do tipo L e inibição da anidrase carbônica, tipo II e IV  
27 (SHANK et al., 2000).

### 28 1.1 TOPIRAMATO E METABOLISMO ENERGÉTICO

29 Ao contrário de outras drogas antiepilépticas, o tratamento com TOP tem  
30 sido associado a um efeito redutor na massa corporal (BROWN et al., 2002). De fato,  
31 pacientes tratados com esse fármaco relatam que perda de peso e anorexia são um

1 dos efeitos adversos mais comumente associados com a terapia (CHO et al., 2009).  
2 Devido a complexidade dos efeitos farmacológicos e bioquímicos do TOP, os  
3 mecanismos envolvidos em tais alterações têm sido amplamente investigados.

4 Estudos conduzidos em animais de experimentação têm evidenciado a  
5 capacidade do TOP em reduzir eficiência energética, resultando em reduções no  
6 depósito de tecido adiposo, massa corporal e ganho de energia total (LALONDE et al.,  
7 2004; PICARD et al., 2000; YORK et al., 2000). Representada como uma estimativa  
8 da quantidade de energia ingerida que de fato é armazenada nos tecidos, a eficiência  
9 energética (PICARD et al., 2000) pode ser influenciada pelo tratamento com TOP pela  
10 diminuição da ingestão alimentar (quantidade de energia ingerida) (LALONDE et al.,  
11 2004) e/ou aumento de gasto energético, alterando a quantidade de energia  
12 armazenada (PICARD et al., 2000; RICHARD et al., 2002; YORK et al., 2000), sendo  
13 que esse último pode refletir na habilidade do TOP em estimular o processo de  
14 termogênese no tecido adiposo marrom (TAM) (RICHARD et al., 2000, 2002).

15 Diferentemente do tecido adiposo branco (TAB), responsável por  
16 estocar energia em forma de triglicerídeos, o TAM é responsável por dissipar energia  
17 em forma de calor, tendo papel crucial no combate a hipotermia e obesidade (LUO;  
18 LIU, 2016). Diferenças morfológicas e composicionais entre os adipócitos, células que  
19 compõem ambos os subtipos, são as responsáveis por atribuírem atividades distintas  
20 para os dois tecidos (LUO; LIU, 2016). Enquanto o TAB é unilocular, com poucas  
21 mitocôndrias e baixa taxa de oxidação (JEANSON; CARRIÈRE; CASTEILLA, 2015),  
22 o TAM é multilocular, com quantidade abundante de mitocôndrias e expressão  
23 enriquecida de proteína desacopladora 1 (UCP-1), o que confere a característica  
24 termogênica ao subtipo (AHERNE; HULL, 1966; JEANSON; CARRIÈRE; CASTEILLA,  
25 2015).

26 Em roedores, está bem estabelecido que o TAM exerce um papel  
27 termogênico importante para a sobrevivência desses animais (JEANSON;  
28 CARRIÈRE; CASTEILLA, 2015; LUO; LIU, 2016). Embora o efeito do tratamento com  
29 TOP sobre o TAM seja pouco compreendido, o uso do fármaco foi associado a  
30 alterações na atividade e expressão de moléculas envolvidas no processo de  
31 termogênese (CARICILLI et al., 2012; RICHARD et al., 2002), sugerindo que o TOP  
32 pode influenciar o gasto energético por ação neste tecido. No que diz respeito ao TAB,  
33 a perda de peso relacionada ao tratamento com TOP tem sido fortemente associada  
34 a reduções no seu depósito (LALONDE et al., 2004; PICARD et al., 2000), de forma

1 que, o fármaco demonstrou reduzir a deposição tanto de TAB visceral quanto  
2 subcutâneo, principalmente em animais obesos (PICARD et al., 2000).

3 Em relação ao efeito do tratamento com TOP sobre a ingestão calórica,  
4 estudos em humanos e modelos experimentais têm associado o uso do fármaco a  
5 reduções no apetite e ingestão alimentar (KLEIN et al., 2008; LALONDE et al., 2004).  
6 Devido a uma ação indireta sobre o centro da fome, que está localizado no hipotálamo,  
7 o TOP parece inibir a via estimuladora do apetite, resultando em redução da ingestão  
8 alimentar e conseqüentemente perda de peso (STAHL, 2013). Recentemente, devido  
9 a esse mecanismo, o TOP foi aprovado para adultos como tratamento farmacológico  
10 da obesidade em associação com um derivado anfetamínico, fentermina (CAMERON;  
11 WHITESIDE; MCKEAGE, 2012), sendo que ambos parecem agir sinergicamente  
12 modulando o apetite (STAHL, 2013).

13 Embora aprovado para o tratamento farmacológico da obesidade em  
14 adultos (CAMERON; WHITESIDE; MCKEAGE, 2012), o efeito redutor do TOP sobre  
15 a massa corporal também tem sido descrito nas demais faixas etárias (CHO et al.,  
16 2009; POWERS et al., 2017). De fato, crianças epiléticas de 4 à 12 anos apresentam  
17 reduções no índice de massa corporal (IMC) após 3 (OZCELIK et al., 2014) ou 6  
18 meses de uso do TOP (LI et al., 2009; OZCELIK et al., 2014), sendo que a longo prazo,  
19 adolescentes avaliados no 12<sup>o</sup>, 24<sup>o</sup> e 36<sup>o</sup> mês de tratamento apresentam diminuição  
20 significativa do índice antropométrico com até mesmo 24 meses de uso do fármaco  
21 (REITER et al., 2004).

22 Torna-se claro que os efeitos na redução da massa corpórea e a melhora  
23 no equilíbrio energético promovidos pelo TOP podem ser positivos para indivíduos  
24 obesos. Entretanto, em indivíduos não obesos, que estão em uma janela crítica do  
25 desenvolvimento corporal, as conseqüências do tratamento com TOP sobre a perda  
26 de massa corporal e redução na ingestão alimentar não estão totalmente  
27 compreendidas. Ainda, considerando que estudos epidemiológicos indicam que o  
28 crescimento desacelerado durante a infância predispõe o indivíduo tardiamente à  
29 obesidade (LAW et al., 1992) e doenças cardiovasculares (BARKER et al., 2005), é  
30 importante investigar se o uso de TOP durante fases importantes de plasticidade pode  
31 influenciar ou programar alterações na saúde do indivíduo, aumentando assim o risco  
32 de doenças (WATERLAND; JIRTLE, 2004).

## 1 1.2 TOPIRAMATO E SISTEMA CARDIOVASCULAR

2 Vem sendo descrito, em diferentes faixas etárias, que o tratamento com  
3 TOP pode favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. De fato,  
4 humanos adultos tratados com esse fármaco apresentam níveis reduzidos de  
5 lipoproteína de alta densidade (HDL) (GENC et al., 2010; ROSENSTOCK et al., 2007),  
6 o que é considerado um fator de risco para tais doenças (RADER; HOVINGH, 2014).  
7 Em adolescentes, tratados com o fármaco por pelo menos 2 anos, além da redução  
8 de HDL, o tratamento também resulta em aumento de lipoproteína de baixa densidade  
9 (LDL) e espessamento da camada íntima-média da artéria carótida (EL-FARAHATY  
10 et al., 2015), sugerindo que o tratamento com TOP pode predispor o indivíduo a outras  
11 alterações vasculares.

12 Em relação aos vasos sanguíneos, sabe-se que alterações no endotélio  
13 podem contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento de doenças  
14 cardiovasculares e metabólicas (KONUKOGLU; UZUN, 2016; MARTIN et al., 2000;  
15 STAPLETON et al., 2008). Essas células, além de proporcionarem uma barreira física  
16 entre o lúmen e a parede do vaso, apresentam papel importante na manutenção da  
17 homeostase cardiovascular liberando substâncias contráteis e relaxantes que regulam  
18 ativamente o tônus basal e a reatividade vascular (HELENA et al., 2001). Dentre as  
19 substâncias liberadas pelo endotélio que promovem vasodilatação, as principais são:  
20 óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio e prostaciclina;  
21 enquanto que dentre as substâncias que promovem vasoconstrição, estão:  
22 prostaglandina H<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>, angiotensina II (Ang II), e espécies reativas de  
23 oxigênio (ROS) (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989).

24 A principal substância dilatadora envolvida com a homeostase vascular é o  
25 NO (INCALZA et al., 2018). No endotélio, esse gás é formado por uma enzima  
26 denominada óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que converte o aminoácido L-  
27 arginina em L-citrulina e NO (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Agonistas  
28 como acetilcolina (ACh), catecolaminas, Ang II ou até mesmo estímulos mecânicos,  
29 como a força de cisalhamento, promovem a ativação da eNOS com consequente  
30 produção de NO (HELENA et al., 2001). Por ser o principal fator relacionado com a  
31 manutenção da homeostase vascular, redução na biodisponibilidade desse gás é um  
32 dos eventos mais importantes que caracterizam o início da disfunção endotelial  
33 (INCALZA et al., 2018).

1 A disfunção endotelial é essencialmente definida como um desequilíbrio  
2 entre a produção e/ou ação de fatores contráteis e relaxantes liberados pelo endotélio  
3 (MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999). A condição de disfunção dessas células  
4 predispõe a vasculatura a um perfil pró-trombótico e pró-aterogênico, envolvendo  
5 vasoconstrição, adesão leucocitária, ativação plaquetária, mitogênese, pró-oxidação,  
6 coagulação prejudicada, inflamação vascular, aterosclerose e trombose  
7 (DHANANJAYAN et al., 2016).

8 A homocisteína é um aminoácido que em altas concentrações pode  
9 favorecer o desenvolvimento de disfunção endotelial. Considerada um fator de risco  
10 independente para aterosclerose, parece estar associada à produção aumentada de  
11 EROs, prejuízo nos mecanismos antioxidantes e maior liberação de mediadores  
12 inflamatórios (TYAGI et al., 2006). Pacientes que fazem uso de drogas antiepiléticas  
13 consideradas indutoras enzimáticas podem apresentar hiper-homocisteïnemia (TAN  
14 et al., 2009). O TOP, apesar de possuir menor atividade indutora em comparação aos  
15 anticonvulsivantes mais antigos, também foi associado a níveis séricos aumentados  
16 desse aminoácido em pacientes tratados com doses maiores que 200 mg/dia  
17 (BELCASTRO et al., 2010). Entretanto, no que diz respeito ao efeito do tratamento  
18 com TOP sobre a função do endotélio vascular, essa variável tem sido pouco  
19 explorada.

20 Recentemente, tem sido descrito que machos Wistar tratados com TOP (41  
21 mg/kg) durante a adolescência apresentam disfunção do endotélio vascular (MOURA,  
22 2019). Avaliados 24 horas após o último dia de tratamento, anéis de aorta isolados  
23 dos animais TOP apresentam resposta aumentada ao vasoconstritor fenilefrina  
24 (Fenil), indicando prejuízo na modulação endotelial sobre a resposta contrátil.  
25 Ademais, quando avaliados na vida adulta – com 120 dias de idade e na ausência de  
26 níveis plasmáticos do fármaco, os anéis isolados dos animais tratados com TOP  
27 apresentam sensibilidade reduzida ao vasodilatador dependente do endotélio - ACh,  
28 indicando que o tratamento com o fármaco durante a adolescência programa  
29 disfunção endotelial permanente em machos.

30 Está bem descrito que o sistema vascular é distintamente influenciado  
31 pelos hormônios sexuais (ORSHAL; KHALIL, 2004; SCHWERTZ; PENCKOFER,  
32 2001). Estudos em humanos e em modelos experimentais, avaliando múltiplos leitos  
33 vasculares, têm descrito que diversos processos no sistema vascular ocorrem de  
34 forma sexo-dependente, sendo que mulheres em idade reprodutiva são

1 fisiologicamente beneficiadas pela produção dos hormônios sexuais femininos  
2 (BARRETT-CONNOR; BUSH, 1991; SCHWERTZ; PENCKOFER, 2001). Nesse  
3 sentido, estudos epidemiológicos têm demonstrado que homens apresentam maior  
4 incidência de doenças cardiovasculares em relação às mulheres de mesma idade. E  
5 que ainda, comparando mulheres pré e pós-menopausa, a incidência dessas doenças  
6 é maior após o término do período reprodutivo (GREEN et al., 2016).

7 Os hormônios sexuais femininos, também conhecidos como “estrógenos”,  
8 são um grupo de compostos orgânicos que incluem estrona ( $E_1$ ), estradiol ( $E_2$ ), estriol  
9 ( $E_3$ ) e estretol ( $E_4$ ). Enquanto a  $E_1$  é encontrada predominantemente durante a  
10 menopausa (BULUN et al., 1999), o  $E_3$  e o  $E_4$  estão associados ao período gestacional  
11 (COELINGH BENNINK et al., 2008; WILSON; ERIKSSON; DICZFALUSY, 1964) e o  
12  $E_2$ , ao período reprodutivo (BULUN et al., 1999). Também conhecido como  $17\beta$ -  
13 estradiol, o  $E_2$  é o estrógeno circulante mais abundante e relevante fisiologicamente,  
14 sendo o hormônio sexual feminino com maior impacto sobre o sistema cardiovascular  
15 (IORGA et al., 2017).

16 Os efeitos fisiológicos do  $E_2$  sobre o sistema cardiovascular são mediados  
17 pela ativação de receptores estrogênicos (ER, do inglês *estrogen receptor*), que  
18 podem tanto alterar a transcrição de gene quanto ativar cascatas de sinalização  
19 celular (MURPHY, 2011). Conhecidos como ER do tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  e acoplado a proteína G  
20 (GPR30), a ativação das três formas são responsáveis por modular as ações  
21 genômicas e não-genômicas do  $E_2$  (BOESE et al., 2017).

22 Denominada como via clássica dos hormônios, a via genômica é  
23 desencadeada pela ligação de  $E_2$  aos  $ER\alpha$  e  $ER\beta$ . A formação do complexo  $E_2$ -ER dá  
24 origem a formação de hetero ou homodímeros que podem alterar a expressão de gene  
25 ao se ligarem diretamente ao DNA, via elemento de resposta estrogênica (ERE), ou  
26 indiretamente, através de fatores de transcrição como a proteína AP1 e Sp1. Já na via  
27 não-genômica, relacionada a ativação de mecanismos rápidos de transdução de  
28 sinais, a ligação de  $E_2$  aos seus receptores GPR30, bem como  $ER\alpha$  e  $ER\beta$ , associados  
29 à membrana, ativa cascatas de sinalização intracelular (IORGA et al., 2017; MURPHY,  
30 2011). Adicionalmente, também tem sido descrito que os efeitos de  $E_2$  podem ocorrer  
31 de maneira independente de ligante ou ER.

32 É reconhecido que os ER são expressos em número variável nas células  
33 endoteliais e musculares lisas dos vasos sanguíneos (ORSHAL; KHALIL, 2004). De  
34 fato, no músculo liso, o  $E_2$  tem sido associado a um efeito antiproliferativo e

1 anticontrátil, alterando transcrição gênica e resposta de contração muscular. Nas  
2 células endoteliais, exercendo uma série de efeitos genômicos e não-genômicos, o E<sub>2</sub>  
3 tem sido relacionado à ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK),  
4 aumento da transcrição de gene, proliferação celular, aumento na expressão e  
5 ativação de eNOS, redução na expressão de NADPH oxidase – prevenindo a geração  
6 de ânion superóxido e promoção de outros fatores relaxantes derivados do endotélio  
7 (ORSHAL; KHALIL, 2004; TOSTES et al., 2003), resultando em melhora da função  
8 endotelial, responsividade vascular e resposta inflamatória e antioxidante (BOESE et  
9 al., 2017; MURPHY, 2011).

10 A proteção vascular relacionada ao E<sub>2</sub> em mulheres pré-menopausa, tem  
11 sido atribuída aos níveis plasmáticos desse hormônio e expressão aumentada de ER  
12 sobre esse sistema (ORSHAL; KHALIL, 2004). Embora o E<sub>2</sub> seja sintetizado e liberado  
13 predominantemente pelos ovários em mulheres em idade reprodutiva, outros tecidos  
14 e células, como o tecido adiposo, mamário e cerebral e células do endotélio vascular  
15 e músculo liso, são responsáveis pela produção extragonadal de E<sub>2</sub> (SIMPSON,  
16 2003). Nesses tecidos e células, o hormônio age localmente como um fator parácrino  
17 ou intracrino, compondo a única origem endógena de E<sub>2</sub> em homens e mulheres pós-  
18 menopausa (SIMPSON, 2003).

19 É evidente que os hormônios sexuais femininos apresentam efeitos  
20 importantes sobre o sistema vascular. Considerando que o tratamento com TOP  
21 durante a adolescência causa disfunção endotelial a curto prazo e de forma  
22 permanente em machos (MOURA, 2019), torna-se importante compreender os efeitos  
23 desse fármaco sobre o sistema vascular de fêmeas.

## 1 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2 2.1 JUSTIFICATIVA

3 Considerando que o TOP é aprovado para o tratamento de epilepsia  
4 e profilaxia da enxaqueca em adolescentes; que seu uso tem sido associado à  
5 alterações metabólicas e ao aumento de fatores de risco cardiovascular, o que pode  
6 predispor o indivíduo a alterações vasculares; que os poucos dados sobre este  
7 tratamento na literatura não fazem distinção entre os sexos e desconsideram a  
8 modulação do E<sub>2</sub> sobre a vasculatura; e que ainda não se conhece em fêmeas as  
9 repercussões sobre o sistema cardiovascular do tratamento com TOP durante fase  
10 importante do desenvolvimento corporal, o presente estudo justifica-se pela busca de  
11 possíveis alterações, a curto e longo prazo, na reatividade vascular, na modulação  
12 estrogênica sobre a vasculatura via ER clássicos e em parâmetros biométricos e  
13 cardiovasculares de ratas tratadas com TOP durante a adolescência.

### 14 2.2 OBJETIVO GERAL

15

16 Avaliar em ratas as repercussões a curto e longo prazo do tratamento com  
17 TOP durante a adolescência, caracterizando parâmetros cardiovasculares e  
18 biométricos e investigando possíveis alterações na resposta do endotélio vascular e  
19 na modulação estrogênica sobre essa resposta via ER $\alpha$  e ER $\beta$ .

### 20 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

21 a) Avaliar massa corpórea e consumo de ração diariamente durante o  
22 período de tratamento – do dia pós-natal (DPN) 28 ao 50;

23 b) Avaliar massa corpórea e consumo de ração semanalmente nos DPN  
24 57, 64, 71, 78 e 85;

25 c) Avaliar a curto (DPN 51-56) ou a longo prazo (a partir do DPN 90), os  
26 efeitos do tratamento com TOP durante a adolescência sobre:

27 • Pressão arterial e frequência cardíaca;

- 1 • Parâmetros biométricos como: massa corpórea, comprimento naso-anal
- 2 (CNA), índice de Lee (IL) e massa dos tecidos adiposos viscerais branco
- 3 (retroperitoneal e perigonadal) e marrom (interescapular);
- 4 • Reatividade da aorta torácica ao agente vasoconstritor Fenil e aos
- 5 agentes vasodilatadores ACh e nitroprussiato de sódio (NPS);
- 6 • E papel dos ER $\alpha$  e ER $\beta$  em modular a resposta contrátil e relaxante na
- 7 presença do endotélio.

### 1 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2 3.1 MODELO ANIMAL E EXPOSIÇÃO

3 No DPN 26, ratas Wistar obtidas do Biotério Central da Universidade  
4 Estadual de Londrina (UEL) foram transferidas para o Biotério Setorial do  
5 Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram mantidas em gaiolas coletivas (5  
6 ratas/caixa), sob condições padronizadas (temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de  
7 12h claro/12h escuro) e água e ração padrão *ad libitum*. No DPN 28, essas ratas foram  
8 distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais e receberam, via gavagem,  
9 água ou TOP, como descrito a seguir:

- 10 a) Grupo controle (CTR): água do DPN 28 ao 50 (n=46);
- 11 b) Grupo TOP: 41 mg/kg de topiramato (Topamax®, Janssen-Cilag, Brasil)
- 12 suspenso em água do DPN 28 ao 50 (n=45).

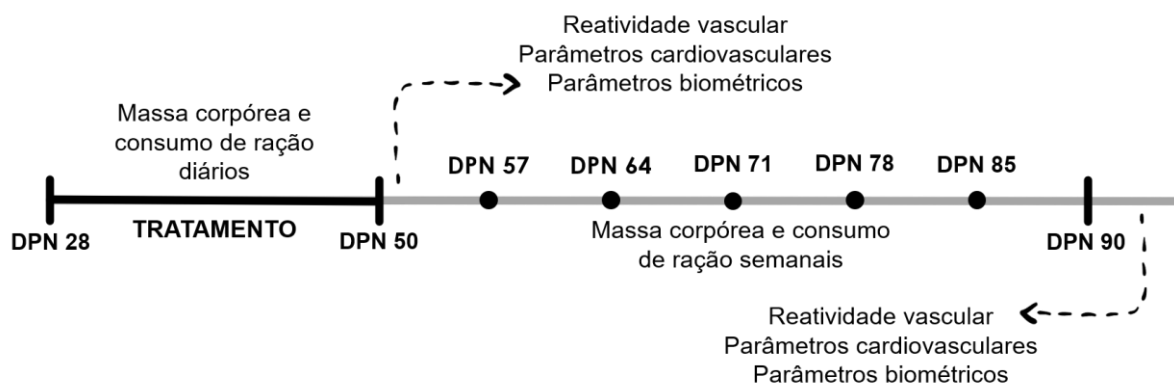
13 A duração do tratamento corresponde ao período de adolescência em  
14 roedores (MARCO et al., 2011; SPEAR, 2000) e a escolha da dose foi baseada nas  
15 doses utilizadas para o tratamento de epilepsia em crianças e adolescentes, que  
16 variam de 3 à 9 mg/kg/dia (BOUILLON-PICHAULT et al., 2011). Considerando a dose  
17 máxima de manutenção, 9 mg/kg/dia, foi realizado o ajuste dosimétrico utilizando a  
18 escala *body weight*  $\frac{3}{4}$  (BW  $\frac{3}{4}$ ) (EPA, 2006), para qual considerou-se o peso  
19 aproximado de uma criança de 3 anos como 12 kg e o de um roedor no período  
20 equivalente (16 dias) de 30 g. A dose obtida para o tratamento nos roedores foi de 41  
21 mg/kg/dia de TOP.

22 Ao final do tratamento, as ratas de ambos os grupos foram novamente  
23 distribuídas e avaliadas em períodos distintos. Para análise a curto prazo, as ratas  
24 foram avaliadas logo após o término do tratamento – 24h após a última administração  
25 do fármaco ou veículo (água); e para avaliação a longo prazo, as ratas foram avaliadas  
26 na vida adulta a partir dos 90 dias de idade. Nos dois períodos, os experimentos foram  
27 realizados com as ratas de ambos os grupos na fase estro do ciclo estral.  
28 Considerando que o objetivo da avaliação a curto prazo era investigar os efeitos do  
29 TOP 24h após a sua última administração, as ratas que estavam na fase estro no DPN  
30 51 foram conduzidas para os experimentos e as que não estavam continuaram sendo  
31 tratadas diariamente com fármaco ou veículo até a detecção do estro. Foi considerado  
32 um período máximo de 5 dias de extrapolação do tratamento – nesse período todas

1 as ratas foram avaliadas entre o DPN 51 e 56.

2 Todos os protocolos apresentados (Figura 1) foram aprovados pela  
3 Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA: 100/2018 – ver Anexo A) e  
4 estavam de acordo com o preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de  
5 Experimentação Animal (COBEA).

6 **Figura 1.** Delineamento experimental.



7  
8 **Fonte:** próprio autor. DPN: dia pós-natal.

## 9 3.2 ACOMPANHAMENTO DA MASSA CORPÓREA E CONSUMO DE RAÇÃO

### 10 3.2.1 Acompanhamento Diário Durante o Tratamento

11 Foi realizado acompanhamento da massa corpórea das ratas, do DPN 28  
12 ao 50, para monitoramento do ganho de peso e ajuste do volume de droga  
13 administrada. A quantidade de ração consumida também foi avaliada durante esse  
14 período, sendo que diariamente uma quantidade conhecida de ração foi colocada em  
15 cada caixa e após 24 horas a ração restante foi pesada. Considerando a alocação das  
16 ratas em gaiolas coletivas (5 ratas/caixa), o consumo por animal foi calculado  
17 conforme demonstrado na Equação 1. Ao final do tratamento, também foi realizado o  
18 cálculo da variação ( $\Delta$ ) do ganho de massa corpórea e do consumo cumulativo de  
19 ração dos 23 dias de avaliação.

20 **CONSUMO DE RAÇÃO:** 
$$\frac{[\text{Ração disponibilizada (g)} - \text{Ração após 24 horas (g)}]}{\text{Número de ratas na caixa}}$$

**(Equação 1)**

### 1 3.2.2 Acompanhamento Semanal

2           Nos DPN 57, 64, 71, 78 e 85 as ratas foram pesadas e uma quantidade  
3 conhecida de ração foi colocada em cada caixa. Após 24 horas, a ração restante foi  
4 pesada e o consumo foi calculado conforme demonstrado anteriormente na Equação  
5 1. Também foi realizado o cálculo do consumo cumulativo de ração nos 5 dias de  
6 avaliação.

## 7 3.3 PARÂMETROS AVALIADOS AO FINAL DO TRATAMENTO E NA VIDA ADULTA

### 8 3.3.1 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

9           A pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e a  
10 frequência cardíaca (FC) foram determinadas por método indireto através de um  
11 pletismógrafo de cauda. Para tanto, os animais foram alocados em contêntores de  
12 acrílico apropriados ao seu tamanho e posicionados sobre um bioaquecedor, a fim de  
13 atingir e manter a dilatação da artéria caudal. O registro das variáveis foi realizado  
14 com o auxílio de um oclisor e um sensor ajustados na porção proximal da cauda do  
15 animal, sendo estes acoplados à um esfigmomanômetro já conectado à um sistema  
16 de transdução (CODA, Kent Scientific, USA). Os registros iniciais de cada rata foram  
17 considerados de caráter adaptativo e os posteriores foram utilizados para cálculo do  
18 valor final da pressão arterial (PA) (mmHg) e FC (batimentos por minuto – bpm), aqui  
19 representados pela média de 10 medidas.

### 20 3.3.2 Reatividade da Aorta Torácica

#### 21 3.3.2.1 Resposta contrátil e relaxante de anéis de aorta isolados

22           Após anestesia com tiopental sódico (40 mg/kg, ip), as ratas foram  
23 submetidas ao procedimento de toracotomia e a porção torácica da aorta foi removida,  
24 dissecada e seccionada em quatro anéis transversais de 3 mm de comprimento. Dois  
25 dos anéis de aorta tiveram o endotélio removido por fricção, com o auxílio de uma  
26 haste fina de metal revestida por uma camada de algodão e os outros dois, tiveram o  
27 endotélio preservado. Os anéis foram mantidos em um banho para órgãos isolados  
28 (76-00xx series, Panlab) montados através de uma haste inferior acoplada ao banho

1 e uma haste superior conectada à um transdutor de força isométrico (MLT0201,  
2 ADInstruments). O sinal de força convertido em sinal elétrico pelo transdutor, foi então  
3 captado por um amplificador (PowerLab26T, ADInstruments) e transmitido para um  
4 computador.

5 Durante todo o protocolo experimental, os anéis permaneceram sob tensão  
6 basal de 1,5 g, em solução nutriente de Krebs-Henseleit (K-H) modificada  
7 (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>-  
8 7H<sub>2</sub>O; 5,5 glicose; 1,60 CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O e 0,026 EDTA), gaseificada com uma mistura de  
9 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e aquecidos a 37°C, como previamente descrito pelo nosso  
10 grupo (CERAVOLO et al., 2013; HIGASHI et al., 2018).

11 Após período de estabilização de 1 hora, testou-se a viabilidade muscular  
12 dos anéis de aorta encubando-os com solução de cloreto de potássio (90 mM) por 15  
13 minutos. A integridade do endotélio vascular também foi testada após novo período  
14 de estabilização, adicionando 3 µM de ACh nos anéis de aorta previamente contraídos  
15 com 3 µM de Fenil. O endotélio foi considerado intacto quando o relaxamento induzido  
16 pela ACh foi maior que 80% em relação a contração, e removido, quando o  
17 relaxamento foi menor que 5%.

18 Para avaliação da capacidade contrátil, foram realizadas curvas  
19 concentração-efeito cumulativas para Fenil (1 nM - 30 µM), um agonista α1-  
20 adrenérgico, na presença (E+) e ausência de endotélio (E-), sendo a contração  
21 resultante expressa em gramas de tensão. E para avaliação da função relaxante,  
22 foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para ACh (0,1 nM - 30 µM)  
23 nos anéis E+, um vasodilatador dependente do endotélio, e curvas para o NPS (0,1  
24 nM – 30 µM) em anéis E-, um agente doador de NO. Ambas as curvas de relaxamento  
25 foram realizadas após contração com 10 µM de Fenil e tiveram seus resultados  
26 expressos como porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração.

27 Para comparação entre as curvas dos grupos CTR e TOP foram utilizadas  
28 a resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a pD<sub>2</sub> para cada fármaco, sendo que a pD<sub>2</sub> corresponde  
29 ao -log da concentração do agonista necessária para alcançar 50% da R<sub>máx</sub>. Ambas  
30 foram calculadas utilizando uma análise de regressão não-linear (GraphPad Prism  
31 software, USA).

32

33 3.3.2.2 Papel dos receptores estrogênicos α e β em modular a resposta contrátil e

1 relaxante de anéis de aorta isolados

2 Em outra série de experimentos, foi avaliado o papel dos ER $\alpha$  e ER $\beta$  em  
3 modular a resposta contrátil à Fenil e relaxante à ACh. Para tanto, utilizou-se a porção  
4 torácica da aorta dissecada e seccionada em seis anéis E+ de 3 mm de comprimento,  
5 que foram preparados para estudo de reatividade vascular como descrito no item  
6 1.3.2.1.

7 Nos 30 minutos que antecederam o início das curvas concentração-efeito  
8 cumulativas para ACh (0,1 nM - 30  $\mu$ M) e Fenil (1 nM – 30  $\mu$ M), os anéis de aorta  
9 foram incubados com os antagonistas de ER $\alpha$  e ER $\beta$ , o metil-piperidinopirazol (MPP,  
10 1 $\mu$ M) e o 4-(2-fenil-5,7 bis(trifluorometil)pirazol[1,5-a]pirimidina-3-il)fenol (PHTPP, 1  
11  $\mu$ M), respectivamente, ou ainda com o veículo dos antagonistas, o dimetilsulfóxido  
12 (DMSO, 0,02%). Em cada curva um anel de aorta foi utilizado como controle, conforme  
13 descrito a seguir:

14 a) anel 1: (sem incubação) + Curva para ACh

15 b) anel 2: (DMSO) + Curva para ACh

16 c) anel 3: (MPP + PHTPP) + Curva para ACh

17 d) anel 4: (sem incubação) + Curva para Fenil

18 e) anel 5: (DMSO) + Curva para Fenil

19 f) anel 6: (MPP + PHTPP) + Curva para Fenil

### 20 3.3.3 Parâmetros Biométricos

21 As ratas já anestesiadas com tiopental sódico (40 mg/kg, ip), foram  
22 pesadas e medidas quanto ao comprimento naso-anal (CNA) para cálculo do Índice  
23 de Lee (IL) (Equação 2). Os tecidos adiposos perigonadal (TAP), retroperitoneal (TAR)  
24 e marrom interescapular (TAM) também foram removidos dos animais e pesados,  
25 sendo a massa destes corrigida pela massa corporal total do animal e expressa como  
26 peso do tecido por 100 g de massa corpórea.

27 
$$\text{ÍNDICE DE LEE: } \left( \frac{\sqrt[3]{\text{Massa corpórea do animal (g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (cm)}} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

### 1 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2 Inicialmente, realizou-se uma análise exploratória para avaliação da  
3 normalidade (teste Shapiro–Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) dos  
4 dados. As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de  
5 variância foram analisadas por ANOVA de duas vias (reatividade vascular para Fenil a  
6 curto e longo prazo), ANOVA de uma via (reatividade vascular para Fenil e ACh  
7 avaliando o papel dos ER a curto e longo prazo), ANOVA de medidas repetidas  
8 (acompanhamento diário e semanal da massa corpórea e consumo de ração) ou teste  
9 T-Student ( $\Delta$  do ganho de massa corpórea durante a exposição, consumos cumulativos  
10 de ração, parâmetros cardiovasculares e biométricos e reatividade vascular para ACh  
11 e NPS a curto e longo prazo). As demais análises foram realizadas por *Mann-Whitney*  
12 *U* (massa corpórea e IL a curto prazo e PAD e PAM a longo prazo) ou Kruskal Wallis  
13 (pD2 para ACh a curto prazo e Rmáx para ACh a longo prazo avaliando o papel dos  
14 ER no grupo TOP). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média  
15 (EPM) ou mediana (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartil) e os valores foram considerados estatisticamente  
16 significantes quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o  
17 software SPSS (IBM, SPSS Statistics v20, NY, USA).

## 1 4 RESULTADOS

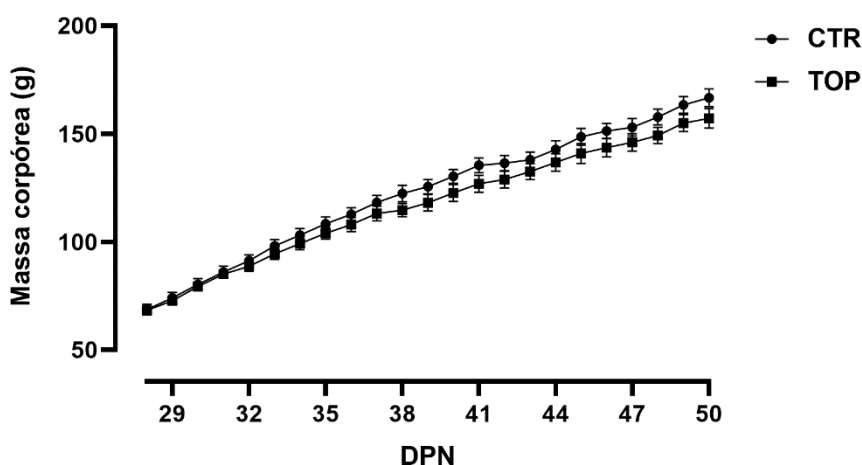
### 2 4.1 ACOMPANHAMENTO DA MASSA CORPÓREA E CONSUMO DE RAÇÃO

#### 3 4.1.1 Acompanhamento Diário Durante o Tratamento

4 O ganho de massa corpórea (g) entre o início e término do tratamento não  
5 diferiu entre os grupos [CTR:  $97,88 \pm 2,76$  (10) vs TOP:  $88,82 \pm 3,67$  (9)]. Embora as  
6 ratas tratadas com TOP tenham apresentado discreta redução no ganho de massa  
7 corporal em comparação ao grupo CTR, não houve diferença estatística ( $p=0,0622$ ).  
8 Em concordância, o acompanhamento diário da massa corpórea durante os 23 dias  
9 de tratamento, ilustrou uma curva de crescimento semelhante entre os grupos (Figura  
10 2).

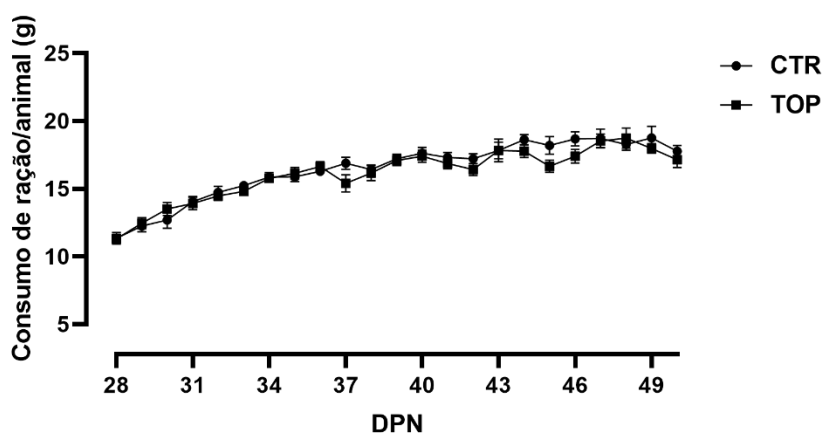
11 Em relação ao consumo de ração, a quantidade diária de ração consumida  
12 por animal (g) durante o tratamento não diferiu entre as ratas TOP e CTR (Figura 3).  
13 Em termos absolutos, o consumo cumulativo por animal (g) ao término do tratamento  
14 também foi semelhante entre os grupos [CTR:  $377,8 \pm 4,9$  (8) vs TOP:  $370,3 \pm 5,7$  (9)].

15 **Figura 2.** Acompanhamento diário da massa corpórea de ratas tratadas com  
16 topiramato ou água durante a adolescência.



17  
18 DPN: dia pós-natal; CTR: grupo controle; TOP: grupo topiramato; Número de ratas/grupo  
19 experimental: 9-10. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de  
20 medidas repetidas ( $p>0,05$ ).

- 1 **Figura 3.** Consumo diário de ração de ratas tratadas com topiramato ou água durante  
2 a adolescência.

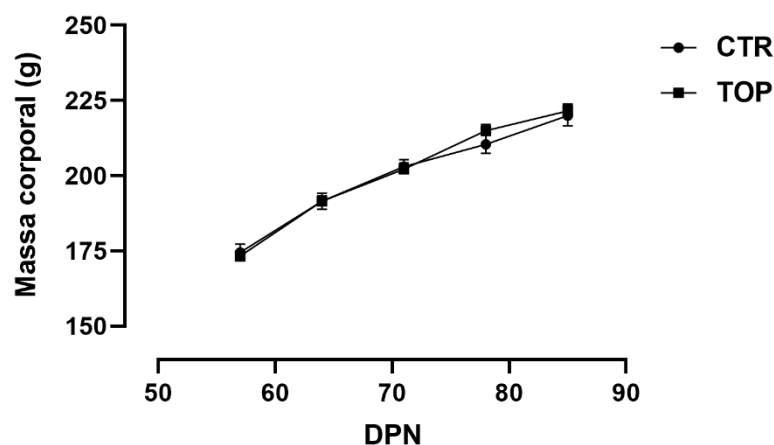


- 3  
4 DPN: dia pós-natal; CTR: grupo controle; TOP: grupo topiramato; Número de ratas/grupo  
5 experimental: 8-9. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de medidas  
6 repetidas ( $p > 0,05$ ).

#### 7 4.1.2 Acompanhamento Semanal

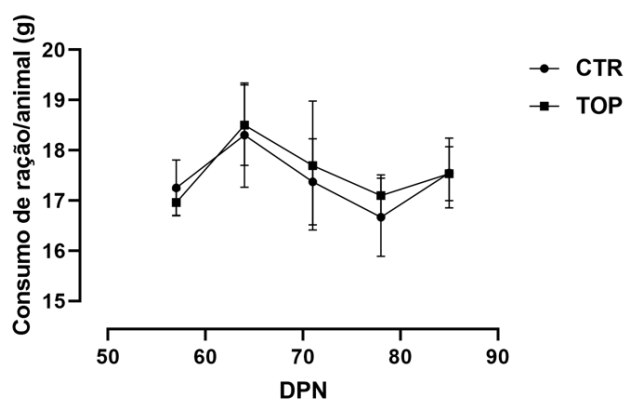
- 8 A massa corpórea (g) (Figura 4) e o consumo de ração (g) (Figura 5)  
9 avaliados semanalmente no DPN 57, 64, 71, 78 e 85 não diferiram entre as ratas CTR  
10 e TOP. Em termos absolutos, a quantidade total de ração consumida (g) nos 5 dias  
11 avaliados também foi semelhante entre os grupos [CTR:  $87,15 \pm 2,92$  (6) vs TOP:  
12  $87,79 \pm 2,32$  (6)].

- 1 **Figura 4.** Acompanhamento semanal da massa corpórea de ratas adultas tratadas  
2 com topiramato ou água durante a adolescência.



- 3 Massa corpórea avaliada nos dias pós-natais (DPN) 57, 64, 71, 78 e 85 de ratas controle  
4 (CTR) ou tratadas com topiramato (TOP) durante a adolescência. Número de ratas/grupo  
5 experimental: 12. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de medidas  
6 repetidas ( $p > 0,05$ ).

- 7 **Figura 5.** Consumo semanal de ração de ratas adultas tratadas com topiramato ou  
8 água durante a adolescência.



- 9 Consumo de ração avaliado nos dias pós-natais (DPN) 57, 64, 71, 78 e 85 de ratas controle  
10 (CTR) ou tratadas com topiramato (TOP) durante a adolescência. Número de ratas/grupo  
11 experimental: 6. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de medidas  
12 repetidas ( $p > 0,05$ ).

## 13 4.2 PARÂMETROS AVALIADOS AO FINAL DO TRATAMENTO E NA VIDA ADULTA

### 14 4.2.1 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

- 15 As PAS, PAD e PAM, assim como a FC não diferiram entre as ratas dos  
16 grupos CTR e TOP quando avaliadas ao final do tratamento (Tabela 1). Similarmente,

1 na vida adulta, as ratas de ambos os grupos apresentaram valores semelhantes de  
2 PAS, PAD, PAM e FC (Tabela 2).

3 **Tabela 1.** Pressão arterial e frequência cardíaca aferidas ao final do tratamento (entre  
4 os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a  
5 adolescência.

Parâmetros	Grupos	
	CTR [11]	TOP [9]
PAS (mmHg)	125,0 ± 1,9	123,6 ± 2,3
PAD (mmHg)	85,4 ± 0,9	85,6 ± 1,5
PAM (mmHg)	98,3 ± 1,1	97,9 ± 1,7
FC (bpm)	393,5 ± 7,5	397,4 ± 10,2

6 PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média;  
7 FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; CTR: grupo controle; TOP: grupo  
8 topiramato; [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM e  
9 analisados por teste t-Student ( $p > 0,05$ ).

10 **Tabela 2.** Pressão arterial e frequência cardíaca aferidas na vida adulta (a partir do  
11 dia pós-natal 90) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.

Parâmetros	Grupos	
	CTR [9]	TOP [11]
PAS (mmHg)	121,2 ± 1,4	123,5 ± 1,1
PAD (mmHg)	84,0 (80,0 – 88,5) <sup>#</sup>	85,0 (85,0 – 87,0) <sup>#</sup>
PAM (mmHg)	96,0 (91,5 – 100,5) <sup>#</sup>	98,0 (97,0 – 99,0) <sup>#</sup>
FC (bpm)	361,7 ± 7,4	352,7 ± 5,3

12 PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média;  
13 FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; CTR: grupo controle; TOP: grupo  
14 topiramato; [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM  
15 ou <sup>#</sup>mediana (1º e 3º quartil) e analisados por teste t-Student ou <sup>#</sup>Mann-Whitney U ( $p > 0,05$ ).

## 16 4.2.2 Reatividade da Aorta Torácica

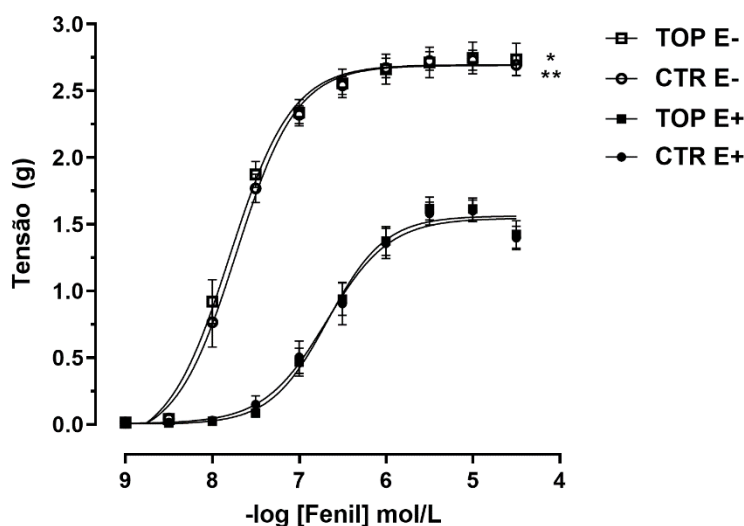
### 17 4.2.2.1 Resposta contrátil e relaxante de anéis de aorta isolados

#### 18 4.2.2.1.1 Resposta vascular ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56)

19 Os anéis de aorta torácica, E+ e E-, isolados das ratas do grupo CTR e

1 TOP ao final do tratamento apresentaram resposta concentração-dependente ao  
 2 vasoconstritor Fenil (Figura 6) e aos vasodilatadores ACh e NPS (Figura 7). Nas  
 3 curvas realizadas para avaliar a resposta contrátil da artéria, observou-se que, tanto  
 4 no grupo CTR quanto no grupo TOP, os anéis de aorta E- apresentaram aumento da  
 5 R<sub>máx</sub> e da pD<sub>2</sub> em comparação aos respectivos anéis E+ (Tabela 3). Entretanto, a  
 6 variável tratamento não interferiu na resposta. Em relação as curvas de relaxamento,  
 7 tanto a resposta ao vasodilatador ACh quanto ao NPS foram semelhantes entre os  
 8 grupos CTR e TOP (Tabela 4).

9 **Figura 6.** Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta  
 10 isolados ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas  
 11 com topiramato ou água durante a adolescência.



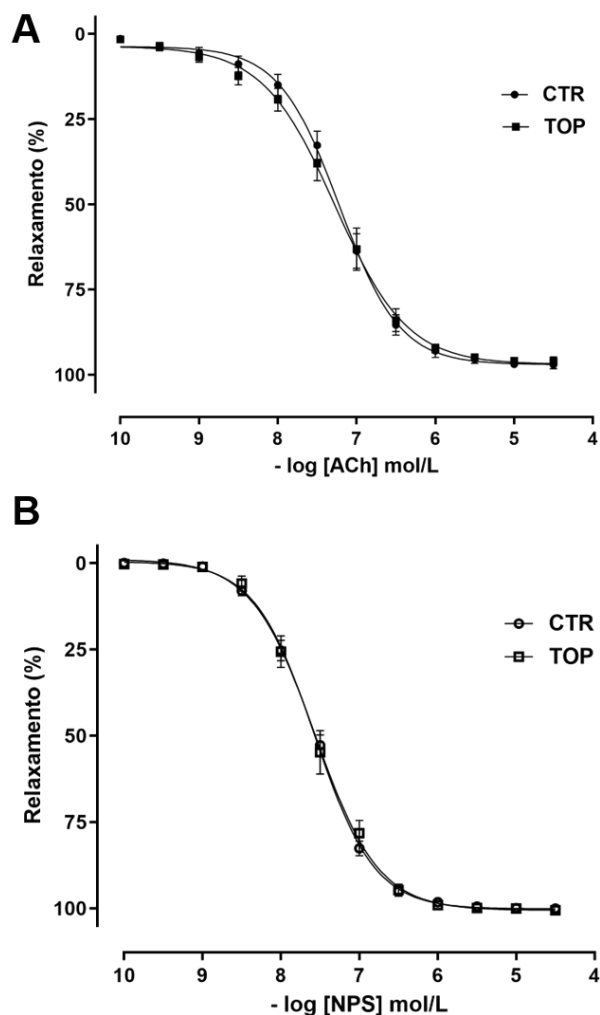
12 Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil: 1 nM – 30 μM) em anéis de  
 13 aorta com (E+) e sem endotélio (E-). CTR: grupo controle; TOP: grupo topiramato; Número de  
 14 ratas/grupo experimental: 11-12. Dados expressos como média ± EPM e analisados por  
 15 ANOVA de duas vias (\*p<0,05 vs CTR E+; \*\*p<0,05 vs TOP E+).

1 **Tabela 3.** Resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta isolados ao final do  
 2 tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas tratadas com topiramato ou  
 3 água durante a adolescência.

Grupos	R <sub>máx</sub> (g)		pD <sub>2</sub>	
	E+	E-	E+	E-
<b>CTR</b>	1,61 ± 0,08 [11]	2,63 ± 0,07* [11]	6,66 ± 0,14 [11]	7,75 ± 0,07* [11]
<b>TOP</b>	1,62 ± 0,08 [12]	2,59 ± 0,12** [12]	6,63 ± 0,08 [12]	7,82 ± 0,06** [12]

4 Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e pD<sub>2</sub> (-log da concentração do agonista que causa 50% da R<sub>máx</sub>)  
 5 para fenilefrina em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio. CTR: grupo controle; TOP:  
 6 grupo topiramato; [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ±  
 7 EPM e analisados por ANOVA de duas vias (\*p<0,05 vs CTR E+; \*\*p<0,05 vs TOP E+).

- 1 **Figura 7.** Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina e nitroprussiato de  
2 sódio em anéis de aorta isolados ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e  
3 56) de ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.



- 4 Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina (ACh: 0,1 nM – 30  $\mu$ M) e (B)  
5 nitroprussiato de sódio (NPS: 0,1 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de aorta. CTR: grupo controle; TOP:  
6 grupo topiramato; Número de ratas/grupo experimental: 8-9. Dados expressos como média  $\pm$   
7 EPM e analisados por teste t-Student ( $p > 0,05$ ). As % de relaxamento foram determinadas em  
8 relação à pré-contracção com fenilefrina (10  $\mu$ M).

1 **Tabela 4.** Resposta relaxante à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de  
 2 aorta isolados ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) de ratas  
 3 tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.

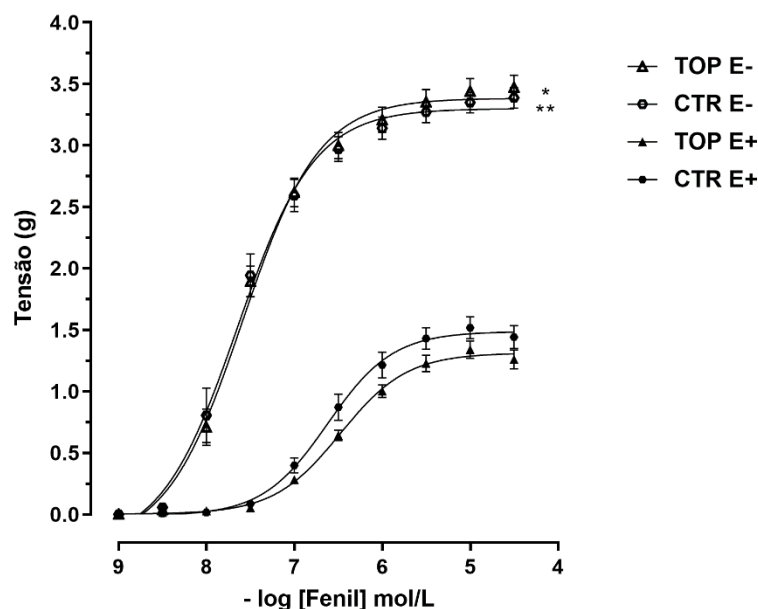
Grupos	R <sub>máx</sub> (%)		pD <sub>2</sub>	
	ACh	NPS	ACh	NPS
<b>CTR</b>	93,47 ± 1,25 [9]	96,24 ± 0,76 [9]	7,22 ± 0,07 [9]	7,57 ± 0,05 [9]
<b>TOP</b>	92,45 ± 1,16 [8]	97,76 ± 0,63 [9]	7,25 ± 0,11 [8]	7,56 ± 0,08 [9]

4 Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e pD<sub>2</sub> (-log da concentração do agonista que causa 50% da R<sub>máx</sub>)  
 5 para acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta. CTR: grupo  
 6 controle; TOP: grupo topiramato; [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos  
 7 como média ± EPM e analisados por teste t-Student (p>0,05). As % de relaxamento foram  
 8 determinadas em relação à pré-contracção com fenilefrina (10 µM).

#### 9 4.2.2.1.2 Resposta vascular na vida adulta (a partir do dia pós-natal 90)

10 Os anéis de aorta torácica, E+ e E-, isolados das ratas dos grupos CTR e  
 11 TOP na vida adulta, apresentaram resposta concentração-dependente para Fenil,  
 12 ACh e NPS (Figuras 8 e 9). Nas curvas realizadas para avaliar a resposta contrátil da  
 13 aorta, observou-se que, a remoção do endotélio aumentou a R<sub>máx</sub> e a pD<sub>2</sub> para Fenil  
 14 no grupo CTR e TOP (Tabela 5). No entanto, não houve diferença na R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>  
 15 entre CTR E+ vs TOP E+ ou CTR E- vs TOP E-. Quanto às curvas de relaxamento,  
 16 as R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub> para ACh e NPS foram semelhantes entre os grupos (Tabela 6).

- 1 **Figura 8.** Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta  
 2 isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato ou  
 3 água durante a adolescência.



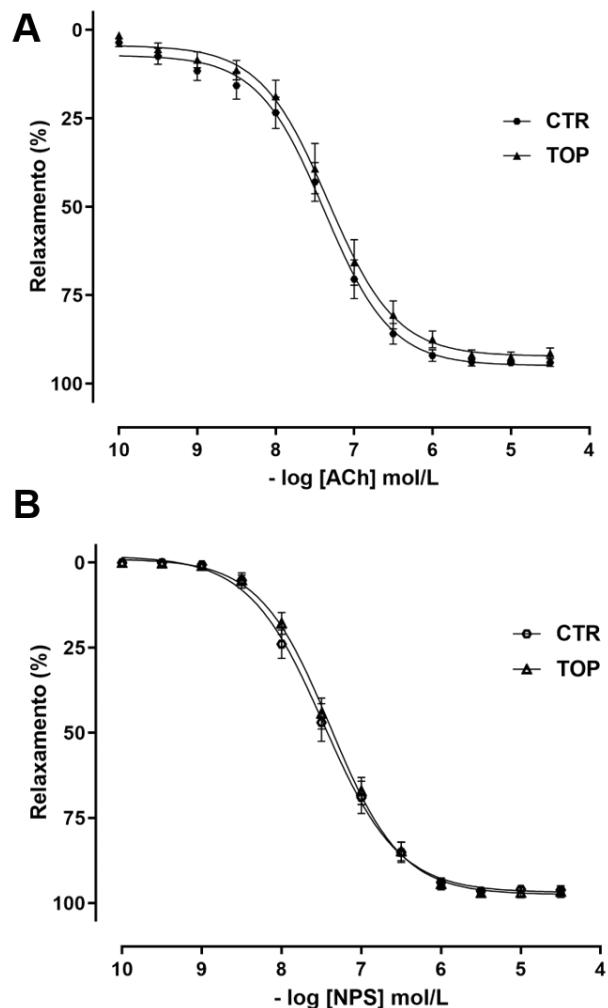
- 4  
 5 Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil: 1 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de  
 6 aorta com (E+) e sem endotélio (E-). CTR: grupo controle; TOP: grupo topiramato; Número de  
 7 ratas/grupo experimental: 9. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA  
 8 de duas vias (\* $p < 0,05$  vs CTR E+; \*\* $p < 0,05$  vs TOP E+).

- 9 **Tabela 5.** Resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratas adultas  
 10 (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.

Grupos	R <sub>máx</sub> (g)		pD <sub>2</sub>	
	E+	E-	E+	E-
<b>CTR</b>	1,51 $\pm$ 0,09 [9]	3,16 $\pm$ 0,07* [9]	6,60 $\pm$ 0,07 [9]	7,65 $\pm$ 0,08* [9]
<b>TOP</b>	1,34 $\pm$ 0,07 [9]	3,28 $\pm$ 0,08** [9]	6,48 $\pm$ 0,04 [9]	7,59 $\pm$ 0,06** [9]

- 11 Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e pD<sub>2</sub> (-log da concentração do agonista que causa 50% da R<sub>máx</sub>)  
 12 para fenilefrina em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio. CTR: grupo controle; TOP:  
 13 grupo topiramato; [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média  $\pm$   
 14 EPM e analisados por ANOVA de duas vias (\* $p < 0,05$  vs CTR E+; \*\* $p < 0,05$  vs TOP E+).

- 1 **Figura 9.** Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina e nitroprussiato de  
2 sódio em anéis de aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas  
3 com topiramato ou água durante a adolescência.



- 4 Curvas concentração-efeito cumulativas para (A) acetilcolina (ACh: 0,1 nM – 30  $\mu$ M) e (B)  
5 nitroprussiato de sódio (NPS: 0,1 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de aorta. CTR: grupo controle; TOP:  
6 grupo topiramato; Número de ratas/grupo experimental: 8-12. Dados expressos como média  
7  $\pm$  EPM e analisados por teste t-Student ( $p > 0,05$ ). As % de relaxamento foram determinadas  
8 em relação à pré-contração com fenilefrina (10  $\mu$ M).

1 **Tabela 6.** Resposta relaxante à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de  
 2 aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) tratadas com topiramato  
 3 ou água durante a adolescência.

Grupos	R <sub>máx</sub> (%)		pD <sub>2</sub>	
	ACh	NPS	ACh	NPS
<b>CTR</b>	92,59 ± 1,10 [8]	95,04 ± 0,86 [12]	7,39 ± 0,12 [8]	7,45 ± 0,10 [12]
<b>TOP</b>	90,20 ± 1,19 [8]	95,61 ± 1,05 [10]	7,34 ± 0,11 [8]	7,39 ± 0,07 [10]

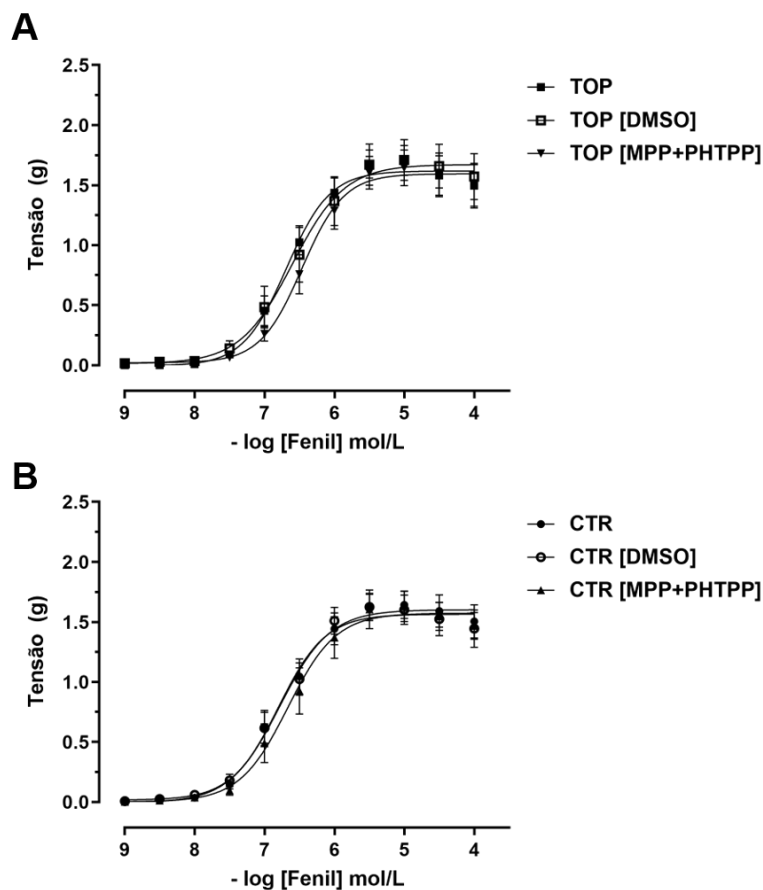
4 Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e pD<sub>2</sub> (-log da concentração do agonista que causa 50% da R<sub>máx</sub>)  
 5 para acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta. CTR: grupo  
 6 controle; TOP: grupo topiramato; [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos  
 7 como média ± EPM e analisados por teste t-Student (p>0,05). As % de relaxamento foram  
 8 determinadas em relação à pré-contracção com fenilefrina (10 µM).

9 4.2.2.2 Papel dos receptores estrogênicos α e β na modulação da resposta contrátil  
 10 e relaxante de anéis de aorta isolados

11 4.2.2.2.1 Resposta vascular ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56)

12 As R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub> para Fenil (Figura 10A) e ACh (Figura 11A) das ratas  
 13 adolescentes tratadas com TOP não foram alteradas pela incubação com os  
 14 antagonistas dos ERα e ERβ, tão pouco pelo veículo DMSO (Tabelas 7 e 8). As R<sub>máx</sub>  
 15 e pD<sub>2</sub> para o vasoconstritor (Figura 10B) e vasodilatador (Figura 11B) nas ratas CTR  
 16 também não foram alteradas (Tabelas 7 e 8).

- 1 **Figura 10.** Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta  
2 isolados de ratas ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) incubados  
3 com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ .



4

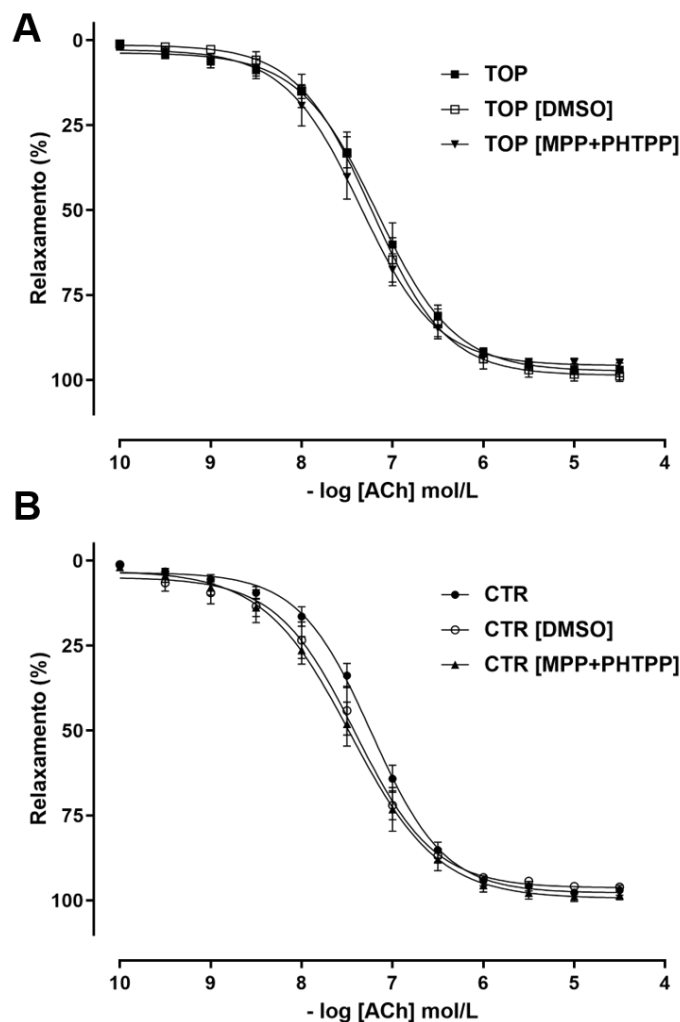
- 5 Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil: 1 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de  
6 aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$  (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo  
7 (DMSO). Resposta vasoconstritora de anéis isolados ao final do tratamento de ratas tratadas  
8 com topiramato (A) (TOP) ou água (B) (CTR) durante a adolescência. Número de ratas/grupo  
9 experimental: 6. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de uma via  
10 ( $p > 0,05$ ).

1 **Tabela 7.** Resposta para fenilefrina em anéis de aorta isolados de ratas ao final do  
 2 tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) incubados com antagonistas de  
 3 receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ .

Incubadores	TOP		CTR	
	Rmáx (g)	pD2	Rmáx (g)	pD2
<b>Sem incubação</b>	1,71 ± 0,11 [6]	6,68 ± 0,10 [6]	1,66 ± 0,11 [6]	6,75 ± 0,10 [6]
<b>DMSO</b>	1,68 ± 0,17 [6]	6,55 ± 0,12 [6]	1,63 ± 0,11 [6]	6,78 ± 0,09 [6]
<b>MPP+PHTPP</b>	1,63 ± 0,14 [6]	6,43 ± 0,07 [6]	1,66 ± 0,14 [6]	6,64 ± 0,13 [6]

4 Resposta máxima (Rmáx) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx)  
 5 para fenilefrina em anéis de aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$   
 6 (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo (DMSO). Resposta vasoconstritora de anéis isolados ao final  
 7 do tratamento de ratas tratadas com topiramato (TOP) ou água (CTR) durante a adolescência.  
 8 [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM e analisados  
 9 por ANOVA de uma via ( $p > 0,05$ ).

- 1 **Figura 11.** Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de  
 2 aorta isolados de ratas ao final do tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56)  
 3 incubados com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ .



- 4 Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina (ACh: 0,1 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de  
 5 aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$  (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo  
 6 (DMSO). Resposta vasodilatadora de anéis isolados ao final do tratamento de ratas tratadas  
 7 com topiramato (A) (TOP) ou água (B) (CTR) durante a adolescência. Número de ratas/grupo  
 8 experimental = 6. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de uma via  
 9 ou teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). As % de relaxamento foram determinadas em relação à  
 10 pré-contracção com fenilefrina (10  $\mu$ M).  
 11

1 **Tabela 8.** Resposta para acetilcolina de anéis de aorta isolados de ratas ao final do  
 2 tratamento (entre os dias pós-natais 51 e 56) incubados com antagonistas de  
 3 receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ .

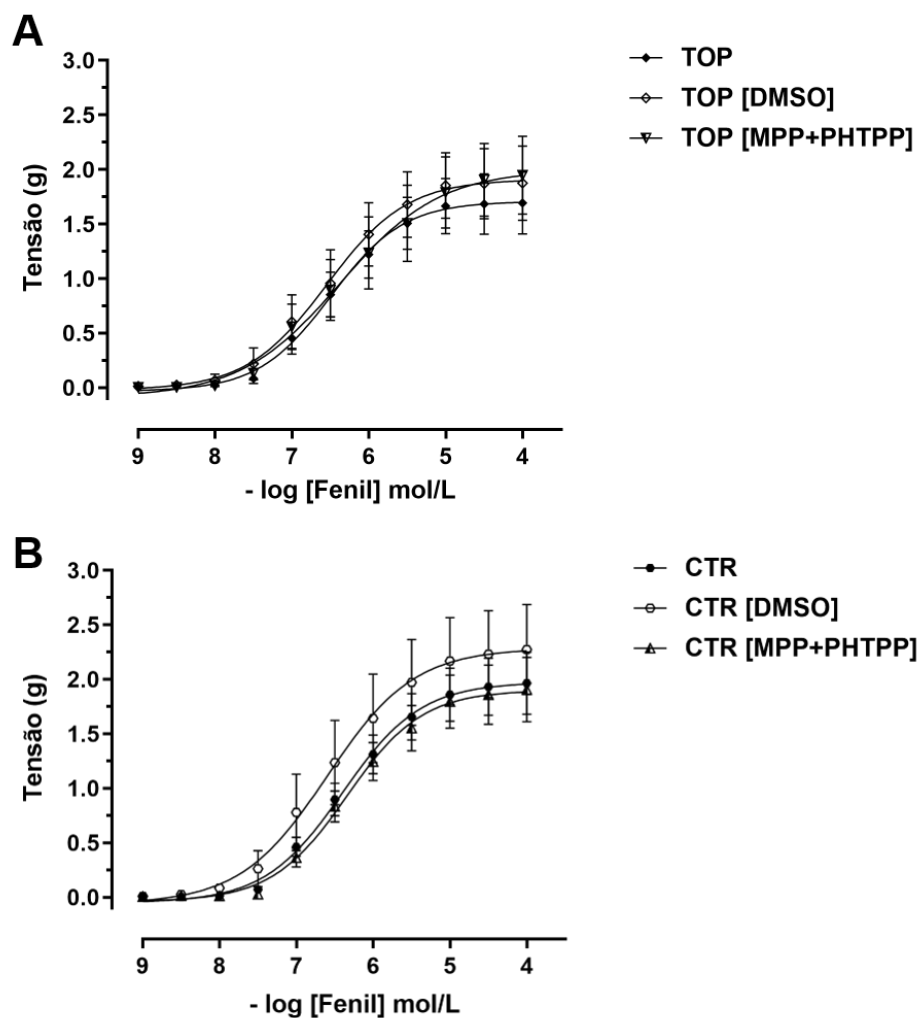
Incubadores	TOP		CTR	
	Rmáx (%)	pD2	Rmáx (%)	pD2
<b>Sem incubação</b>	93,50 ± 2,10 [6]	7,23 (6,91 – 7,37)# [6]	94,15 ± 1,38 [6]	7,23 ± 0,06 [6]
<b>DMSO</b>	95,11 ± 2,46 [6]	7,20 (7,00 – 7,50)# [6]	92,86 ± 0,59 [6]	7,45 ± 0,10 [6]
<b>MPP+PHTPP</b>	94,07 ± 1,14 [6]	7,28 (7,21 – 7,44)# [6]	96,21 ± 2,31 [6]	7,46 ± 0,10 [6]

4 Resposta máxima (Rmáx) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx)  
 5 para acetilcolina em anéis de aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$   
 6 (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo (DMSO). Resposta vasodilatadora de anéis isolados ao final  
 7 do tratamento de ratas tratadas com topiramato (TOP) ou água (CTR) durante a adolescência.  
 8 [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM ou #mediana  
 9 (1º e 3º quartil) e analisados por ANOVA de uma via ou #teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). As  
 10 % de relaxamento foram determinadas em relação à pré-contração com fenilefrina (10  $\mu$ M).

#### 11 4.2.2.2.2 Resposta vascular na vida adulta (a partir do dia pós-natal 90)

12 As incubações com MPP e PHTPP ou veículo DMSO não alteraram a Rmáx  
 13 e a pD2 para Fenil (Figura 12A, Tabela 9) ou ACh (Figura 13A, Tabela 10) nos anéis  
 14 E+ de ratas adultas tratadas com TOP durante a adolescência. Similarmente, as  
 15 incubações também não interferiram na Rmáx e pD2 de ratas CTR adultas (Figuras  
 16 12B e 13B, Tabelas 9 e 10).

- 1 **Figura 12.** Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta  
2 isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) incubados com antagonistas de  
3 receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ .



4

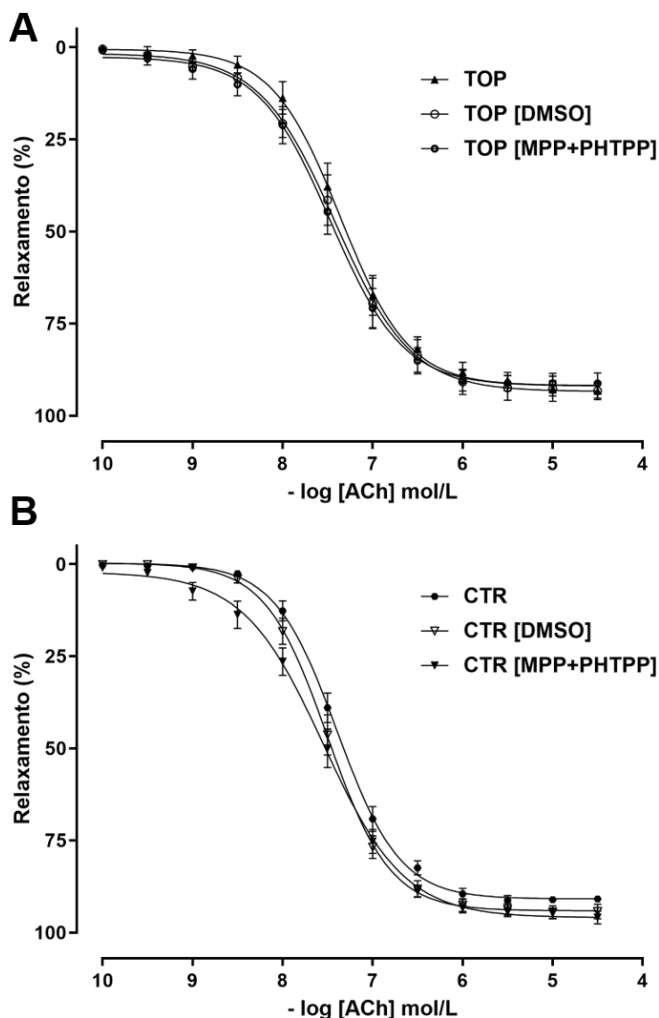
- 5 Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil: 1 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de  
6 aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$  (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo  
7 (DMSO). Resposta vasoconstritora de anéis isolados de ratas adultas tratadas com topiramato  
8 (A) (TOP) ou água (B) (CTR) durante a adolescência. Número de ratas/grupo experimental:  
9 5. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de uma via ( $p > 0,05$ ).

1 **Tabela 9.** Resposta para fenilefrina de anéis de aorta isolados de ratas adultas (a  
 2 partir do dia pós-natal 90) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$   
 3 e  $\beta$ .

Incubadores	TOP		CTR	
	Rmáx (g)	pD2	Rmáx (g)	pD2
<b>Sem incubação</b>	1,66 ± 0,25 [5]	6,46 ± 0,07 [5]	1,89 ± 0,26 [5]	6,39 ± 0,04 [5]
<b>DMSO</b>	1,85 ± 0,30 [5]	6,51 ± 0,14 [5]	2,15 ± 0,37 [5]	6,49 ± 0,18 [5]
<b>MPP+PHTPP</b>	1,85 ± 0,32 [5]	6,27 ± 0,20 [5]	1,83 ± 0,27 [5]	6,33 ± 0,04 [5]

4 Resposta máxima (Rmáx) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx)  
 5 para fenilefrina em anéis de aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$   
 6 (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo (DMSO). Resposta vasoconstritora de anéis isolados de ratas  
 7 adultas tratadas com topiramato (TOP) ou água (CTR) durante a adolescência. [n]: número  
 8 de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM e analisados por ANOVA  
 9 de uma via ( $p > 0,05$ ).

1 **Figura 13.** Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de  
 2 aorta isolados de ratas adultas (a partir do dia pós-natal 90) incubados com  
 3 antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$ .



4 Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina (ACh: 0,1 nM – 30  $\mu$ M) em anéis de  
 5 aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$  (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo  
 6 (DMSO). Resposta vasodilatadora de anéis isolados de ratas adultas tratadas com topiramato  
 7 (A) (TOP) ou água (B) (CTR) durante a adolescência. Número de ratas/grupo experimental:  
 8 6. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de uma via ou teste de  
 9 Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). As % de relaxamento foram determinadas em relação à pré-  
 10 contração com fenilefrina (10  $\mu$ M).  
 11

1 **Tabela 10.** Resposta para acetilcolina de anéis de aorta isolados de ratas adultas (a  
 2 partir do dia pós-natal 90) incubados com antagonistas de receptores estrogênicos  $\alpha$   
 3 e  $\beta$ .

Incubadores	TOP		CTR	
	Rmáx (%)	pD2	Rmáx (%)	pD2
<b>Sem incubação</b>	88,80 (85,60 – 93,66) <sup>#</sup> [6]	7,35 ± 0,09 [6]	89,93 ± 1,75 [6]	7,39 ± 0,06 [6]
<b>DMSO</b>	94,98 (83,89 – 95,89) <sup>#</sup> [6]	7,38 ± 0,11 [6]	92,11 ± 1,71 [6]	7,50 ± 0,08 [6]
<b>MPP+PHTPP</b>	90,94 (86,51 – 93,45) <sup>#</sup> [6]	7,47 ± 0,09 [6]	91,70 ± 1,05 [6]	7,55 ± 0,08 [6]

4 Resposta máxima (Rmáx) e pD2 (-log da concentração do agonista que causa 50% da Rmáx)  
 5 para acetilcolina em anéis de aorta incubados com antagonistas do receptor estrogênico  $\alpha$   
 6 (MPP) e  $\beta$  (PHTPP) ou veículo (DMSO). Resposta vasodilatadora de anéis isolados de ratas  
 7 adultas tratadas com topiramato (TOP) ou água (CTR) durante a adolescência. [n]: número  
 8 de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM ou <sup>#</sup>mediana (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup>  
 9 quartil) e analisados por ANOVA de uma via ou <sup>#</sup>teste de Kruskal-Wallis (p>0,05). As % de  
 10 relaxamento foram determinadas em relação à pré-contracção com fenilefrina (10  $\mu$ M).

#### 11 4.2.3 Parâmetros Biométricos

12 Ao final do tratamento, entre o DPN 51 e 56, as ratas tratadas com TOP  
 13 apresentaram aumento no depósito de TAM quando comparadas com as ratas CTR.  
 14 Em relação aos demais parâmetros, como: massa corpórea, CNA, IL e depósito de  
 15 TAR e TAP os valores foram semelhantes entre os grupos (Tabela 11). Na vida adulta  
 16 (a partir do DPN 90), nenhum dos parâmetros avaliados diferiu entre as ratas TOP e  
 17 CTR (Tabela 12).

1 **Tabela 11.** Parâmetros biométricos avaliados entre os dias pós-natais 51 e 56 em  
 2 ratas tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.

Parâmetros biométricos	Grupos	
	CTR [9]	TOP [10]
Massa corpórea (g)	172,12 (169,70 – 185,04) <sup>#</sup>	164,08 (162,94 – 183,20) <sup>#</sup>
CNA (cm)	18,40 ± 0,15	18,18 ± 0,18
IL	30,35 (30,13 – 30,59) <sup>#</sup>	30,88 (30,45 – 30,95) <sup>#</sup>
TAR (g/100g)	0,258 ± 0,036	0,321 ± 0,027
TAP (g/100g)	0,166 ± 0,012	0,189 ± 0,017
TAM (g/100g)	0,091 ± 0,005	0,111 ± 0,007*

3 CNA: comprimento naso-anal; IL: Índice de Lee; TAR: tecido adiposo retroperitoneal; TAP:  
 4 tecido adiposo perigonadal; TAM: tecido adiposo marrom; CTR: grupo controle; TOP: grupo  
 5 topiramato. [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM  
 6 ou <sup>#</sup>mediana (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartil) e analisados por teste t-Student ou <sup>#</sup>Mann-Whitney U (\*p<0,05  
 7 vs grupo CTR).

8 **Tabela 12.** Parâmetros biométricos avaliados em ratas adultas (a partir do dia pós-  
 9 natal 90) tratadas com topiramato ou água durante a adolescência.

Parâmetros biométricos	Grupos	
	CTR [9]	TOP [8]
Massa corpórea (g)	211,25 ± 3,58	220,77 ± 7,06
CNA (cm)	19,44 ± 0,13	19,65 ± 0,17
IL	30,63 ± 0,20	30,73 ± 0,16
TAR (g/100g)	0,602 ± 0,056	0,607 ± 0,074
TAP (g/100g)	0,479 ± 0,046	0,535 ± 0,056
TAM (g/100g)	0,091 ± 0,004	0,092 ± 0,002

10 CNA: comprimento naso-anal; IL: Índice de Lee; TAR: tecido adiposo retroperitoneal; TAP:  
 11 tecido adiposo perigonadal; TAM: tecido adiposo marrom; CTR: grupo controle; TOP: grupo  
 12 topiramato; [n]: número de ratas/grupo experimental. Dados expressos como média ± EPM e  
 13 analisados por teste t-Student (p>0,05).

## 1 5 DISCUSSÃO

2 No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que o tratamento  
3 com TOP durante a adolescência não altera a reatividade da aorta e nem a modulação  
4 estrogênica via ER $\alpha$  e ER $\beta$  sobre a resposta contrátil e relaxante de ratas Wistar  
5 adolescentes e adultas. Entretanto, o uso de TOP aumenta o depósito de TAM ao final  
6 do tratamento – o que não se mantém na vida adulta, sem interferir, a curto e longo  
7 prazo, com o TAB, massa corporal, consumo de ração, IL, PA e FC.

8 O efeito redutor de massa corpórea do tratamento com TOP tem sido  
9 relatado desde 1996 (BEN-MENACHEM et al., 1996). Estudos em roedores que  
10 buscaram investigar a ação desse fármaco sobre o metabolismo energético,  
11 demonstraram a habilidade do TOP em diminuir ingestão alimentar, adiposidade e  
12 ganho de energia total (LALONDE et al., 2004; RICHARD et al., 2002; YORK et al.,  
13 2000), favorecendo principalmente animais obesos. Avaliando ratas Wistar saudáveis,  
14 no entanto, foi demonstrado que o tratamento com TOP durante a adolescência não  
15 altera, a curto e longo prazo, ingestão alimentar, massa corporal e depósito de TAB,  
16 tanto o retroperitoneal quanto o perigonadal.

17 Os efeitos divergentes do TOP em animais obesos e magros já têm sido  
18 relatados por autores que compararam ambos os fenótipos sob a mesma dose e  
19 período de tratamento (LALONDE et al., 2004; RICHARD et al., 2002; YORK et al.,  
20 2000). Ao que tudo indica, os efeitos do TOP sobre os animais magros parecem ser  
21 mais brandos comparados aos encontrados nos obesos. Com efeito, avaliando  
22 humanos epiléticos fazendo uso do fármaco, Bem-Menachem et al. (2003)  
23 demonstraram diferença no padrão de perda de massa corpórea dependente do IMC  
24 basal, de modo que pacientes obesos experimentaram maior perda de massa durante  
25 a terapia continuada. Dessa forma, os efeitos do TOP sobre animais não-obesos  
26 parecem ser mais brandos e sob alguns aspectos divergentes.

27 Os dados do presente estudo corroboram El-Abhar & Schaalán (2012) que  
28 ao avaliarem machos Wistar adultos saudáveis tratados com TOP (40 ou 100 mg/kg)  
29 por 14 dias também não encontraram alterações na massa corpórea e no depósito de  
30 tecido adiposo visceral e epididimal. De maneira semelhante, Lalonde et al. (2004)  
31 avaliando camundongos machos não-obesos (dose: 60 mg/kg/dia) relataram que  
32 embora esses animais tenham apresentado reduções no ganho de massa e consumo  
33 de ração após tratamento com TOP, ambas reduções não foram estatisticamente

1 significantes. No presente estudo, pelo menos no que diz respeito ao ganho de massa  
2 corpórea durante o tratamento, foi observado efeito semelhante na administração de  
3 TOP para ratas Wistar ( $p=0,0622$ ), concordando com achados descritos anteriormente  
4 para roedores não obesos.

5 Em contraste aos resultados apresentados, Picard et al. (2000)  
6 demonstraram em ratas Zucker magras tratadas por 28 dias que o tratamento com  
7 TOP reduz ganho de massa corporal nas doses de 15 e 60 mg/kg, além de diminuir o  
8 depósito de TAR na dose de 60 mg/kg. Ainda, Abo-Elmatty et al. (2011), avaliando  
9 ratas tratadas com 50 mg/kg por 2 meses demonstraram redução no ganho de massa  
10 corpórea, mas sem alteração no depósito de TAR. A diferença encontrada entre os  
11 estudos e o presente trabalho pode ser explicada pelas diferentes doses de TOP,  
12 período de tratamento e linhagens de roedores utilizados.

13 Adicionalmente, também foi demonstrado pela primeira vez que o  
14 tratamento com TOP durante a adolescência não programa alterações biométricas em  
15 fêmeas avaliadas na vida adulta. Considerando a importância do período plástico de  
16 tratamento com o fármaco, esses resultados sugerem que o uso de TOP durante a  
17 adolescência não influencia o padrão de saúde e doença ao longo da vida, pelo menos  
18 em relação a esses parâmetros, em ratas Wistar tratadas com 41 mg/kg/dia.

19 Em relação a alteração observada no TAM, embora ainda discutido, alguns  
20 estudos têm sugerido que um dos efeitos do TOP sobre o equilíbrio energético está  
21 relacionado com o aumento da termogênese. Estudos que buscaram entender a ação  
22 do TOP sobre esse tecido, descrevem a habilidade do fármaco em aumentar a  
23 atividade da lipoproteína lipase (RICHARD et al., 2002) e a expressão de duas outras  
24 moléculas envolvidas na geração de calor, a UCP-1 e o co-ativador alfa-1 do receptor  
25 ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1 $\alpha$ ) (CARICILLI et al., 2012). Quanto as  
26 alterações relacionadas à massa do TAM os resultados permanecem divergentes.

27 No presente estudo, avaliando ratas Wistar saudáveis, foi demonstrado que  
28 a administração de TOP durante a adolescência resulta em maior deposição de TAM  
29 ao final do tratamento. Em contraste a esse achado, Richard et al. (2002) não  
30 encontraram alteração de peso neste tecido após tratar ratas Wistar recebendo 60  
31 mg/kg de fármaco por 35 dias. Picard et al. (2000), ainda relataram que o TOP causa  
32 redução no depósito de TAM em ambas as doses avaliadas (15 e 60 mg/kg/dia),  
33 evidenciando que o efeito do TOP sobre esse tecido ainda precisa ser esclarecido.

1 Sobre o tecido adiposo, sabe-se que ele é altamente dinâmico e responde  
2 à estímulos externos ambientais e dietéticos (CHRISTIAN, 2017). De fato, a alta  
3 plasticidade do TAB dá origem a um terceiro tipo de tecido adiposo também  
4 denominado de bege (“brown-like-in-white”), no qual estímulos adequados convertem  
5 adipócitos brancos em células fenotipicamente semelhantes às do TAM, tendo muitas  
6 mitocôndrias, gotículas multiloculares de lipídios e expressão de UCP-1 (WU et al.,  
7 2012). O processo pelo qual essas células alteram suas características morfológicas  
8 e metabólicas também é denominado de “browning”, sendo este estimulado por  
9 exposição sustentada ao frio, agonistas adrenérgicos  $\beta 3$  e outros moduladores  
10 (CHRISTIAN, 2017; YOUNG; ARCH; ASHWELL, 1984). É reconhecido que o depósito  
11 de TAB subcutâneo é o mais reativo em adquirir características do TAM, sendo esse  
12 processo caracterizado como reversível (CHRISTIAN, 2017).

13 Considerando que alguns estudos têm associado o tratamento com TOP  
14 ao aumento da termogênese e que o TAM em roedores é circundado por TAB  
15 subcutâneo, é possível sugerir que o aumento no depósito de TAM em ratas Wistar  
16 adolescentes, após tratamento com o fármaco, seja decorrente da conversão de  
17 adipócitos brancos em adipócitos bege. Ademais, considerando a ausência de  
18 alteração no depósito deste tecido nas ratas avaliadas na vida adulta, o processo de  
19 conversão entre os dois tipos celulares parece ser revertido durante a janela entre as  
20 duas avaliações. Entretanto, análises histológicas e moleculares são necessárias para  
21 confirmar determinada hipótese e compreender a importância desta alteração.

22 Embora o efeito sobre o metabolismo energético do tratamento com TOP  
23 venha sendo bem explorado, existe uma escassez de estudos avaliando a relação do  
24 tratamento com esse fármaco à possíveis efeitos sobre o sistema vascular. Em meio  
25 a esse contexto, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que o tratamento de  
26 ratas Wistar com TOP durante a adolescência não altera, a curto e longo prazo, a  
27 reatividade da aorta torácica, sugerindo que o TOP não afeta a função vascular desses  
28 animais.

29 O uso prolongado de fármacos antiepilépticos tem sido associado ao  
30 desenvolvimento de doenças vasculares em diferentes faixas etárias (SARECKA-  
31 HUJAR et al., 2019). Antiepiléticos mais antigos, conhecidos por influenciarem o  
32 sistema enzimático hepático estão fortemente relacionados com alterações de  
33 biomarcadores que predisõem o indivíduo a risco vascular aumentado (CHUANG et  
34 al., 2012; LOPINTO-KHOURY; MINTZER, 2010). Como resultado, os novos

1 antiepiléticos, como o TOP, têm surgido como uma alternativa a esses antigos  
2 fármacos por possuírem menos efeitos sobre esse sistema (MINTZER et al., 2009,  
3 2012). Entretanto, recentemente, o uso de TOP também foi relacionado ao risco de  
4 desenvolvimento de doenças vasculares (EL-FARAHATY et al., 2015; KIM et al.,  
5 2013).

6 Estudos conduzidos com pacientes epiléticos têm associado o tratamento  
7 com TOP a concentrações plasmáticas reduzidas de HDL (GENC et al., 2010;  
8 ROSENSTOCK et al., 2007), aumento de LDL (EL-FARAHATY et al., 2015), hiper-  
9 homocisteínemia (BELCASTRO et al., 2010; KIM et al., 2013) e espessamento da  
10 camada íntima-média da artéria carótida (EL-FARAHATY et al., 2015). Alterações nos  
11 níveis de HDL, LDL e homocisteína são considerados fatores de risco para o  
12 desenvolvimento de disfunção endotelial por aumentarem estresse oxidativo e  
13 consequentemente, diminuir a biodisponibilidade de NO (DAVIGNON; GANZ, 2004;  
14 TAN et al., 2009). No presente estudo, no entanto, foi demonstrado que o tratamento  
15 com TOP durante a adolescência não causa disfunção endotelial em ratas Wistar  
16 adolescentes e adultas.

17 Em contraste ao achado em fêmeas, tem sido demonstrado que machos  
18 Wistar tratados com TOP durante o mesmo período e dose, apresentam redução na  
19 modulação endotelial sobre a resposta contrátil logo após o término do tratamento e  
20 sensibilidade diminuída à ACh na vida adulta, indicando que, o tratamento com o  
21 fármaco durante a adolescência causa disfunção do endotélio em machos (MOURA,  
22 2019). Está bem descrito que os hormônios sexuais femininos, como os estrógenos,  
23 exercem modulação fisiológica benéfica sobre o sistema cardiovascular (SCHWERTZ;  
24 PENCKOFER, 2001). De fato, mulheres em idade reprodutiva produzem mais NO do  
25 que homens de mesma idade e apresentam menor incidência de doenças  
26 cardiovasculares (GREEN et al., 2016). Dessa forma, os resultados distintos entre a  
27 modulação endotelial de ratos e ratas sugerem que os efeitos do TOP sobre o sistema  
28 vascular podem ser influenciados pelos hormônios sexuais femininos.

29 Para testar determinada hipótese, foi avaliado o papel dos ER $\alpha$  e ER $\beta$  em  
30 modular a resposta contrátil e relaxante de anéis E+ isolados das ratas ao final do  
31 tratamento e na vida adulta. Como resultado, o antagonismo de ambos os receptores  
32 não alterou a resposta contrátil à Fenil e nem a resposta relaxante à ACh, indicando  
33 que o tratamento com o fármaco durante a adolescência não altera, a curto e longo  
34 prazo, a modulação estrogênica *in vitro* via esses receptores. Ademais, considerando

1 a ausência de alterações na resposta vascular após antagonismo desses receptores,  
2 pode-se inferir que a função endotelial, que modula ativamente o tônus basal e a  
3 reatividade vascular – liberando substâncias contráteis e relaxantes (FURCHGOTT,  
4 1996), permanece intacta nas ratas CTR e TOP.

5 Sobre a modulação estrogênica, sabe-se que ela desempenha papel  
6 importante na regulação da fisiologia, envelhecimento e de muitos estados de doença  
7 (PROSSNITZ; BARTON, 2014). Sobre a vasculatura, o E<sub>2</sub> desencadeia efeitos  
8 positivos sobre a função endotelial, responsividade vascular e resposta inflamatória e  
9 antioxidante, sendo estes efeitos mediados por ER do tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  e GPR30 (BOESE et  
10 al., 2017; MURPHY, 2011). Embora demonstrado no presente estudo que o  
11 tratamento com TOP não altera a modulação estrogênica de ratas adolescentes e  
12 adultas via receptores clássicos, não pode-se descartar o envolvimento do E<sub>2</sub> sobre  
13 os efeitos vasculares do TOP em fêmeas, visto que não foi investigado o papel do ER  
14 acoplado a proteína G, também associado com efeitos sobre a vasodilatação,  
15 liberação de NO e inibição da proliferação de células musculares lisas (PROSSNITZ;  
16 BARTON, 2014).

17 Em humanos, os efeitos do tratamento com TOP sobre o sistema  
18 cardiovascular ainda parecem divergentes. Embora alguns estudos apresentem  
19 alterações prejudiciais no perfil lipídico (EL-FARAHATY et al., 2015; KIM et al., 2013),  
20 Narula et al. (2010) ao avaliarem pacientes esquizofrênicos usando a combinação de  
21 olanzapina e TOP, demonstraram que, em relação ao grupo controle (olanzapina e  
22 placebo), o uso do antiepiléptico diminui colesterol total e triglicerídeos. Com efeito,  
23 pacientes que faziam monoterapia com carbamazepina ou fenobarbital e trocaram a  
24 medicação pela monoterapia com TOP, depois de 6 meses ou mais apresentaram  
25 reduções significantes no colesterol total e suas frações, triglicerídeos e proteína C  
26 reativa, indicando que o uso do TOP nesses pacientes diminui marcadores de risco  
27 vascular (MINTZER et al., 2012).

28 Torna-se claro que mais estudos precisam ser realizados para melhor  
29 compreensão dos efeitos do TOP sobre o sistema vascular. Considerando que esse  
30 fármaco é utilizado por diferentes faixas etárias (BEN-MENACHEM et al., 2008;  
31 CHUNG; EILAND, 2008; FDA, 2014), que seu uso ocorre de forma prolongada e que  
32 tem sido associado à aceleração do processo aterosclerótico (EL-FARAHATY et al.,  
33 2015; KIM et al., 2013), o tratamento com TOP precisa ser realizado com cautela. No  
34 presente estudo, considerando a ausência de alteração na reatividade vascular ao

1 constritor e dilatadores analisados, sob antagonismo ou não de ER $\alpha$  e ER $\beta$ , pode-se  
2 inferir que o TOP não interferiu na funcionalidade vascular e nem na modulação  
3 estrogênica via tais receptores em ratas tratadas durante a adolescência.

4 Por fim, em relação a PA e FC, os estudos indicam que os efeitos do  
5 tratamento com TOP sobre tais parâmetros ainda precisam ser esclarecidos. Em um  
6 estudo randomizado e controlado por placebo, Tonstad et al. (2005) descreveram que  
7 o tratamento com TOP diminui a PAS e PAD em pacientes com hipertensão essencial.  
8 Em pacientes adultos esquizofrênicos que usam a combinação de olanzapina e TOP,  
9 o medicamento também melhora os parâmetros de PA em comparação aos pacientes  
10 que usam apenas olanzapina (NARULA et al., 2010). Em contrapartida, em ratos e  
11 humanos normotensos, o tratamento com TOP não demonstrou efeitos sobre esses  
12 parâmetros (ABO-ELMATTY; ZAITONE, 2011; FOX et al., 2015), corroborando os  
13 resultados aqui apresentados e sugerindo um efeito do TOP dependente das  
14 condições basais de PA e da espécie avaliada.

15 Juntos, esses resultados indicam que o tratamento com TOP durante a  
16 adolescência não causa disfunção do endotélio vascular e não altera a modulação  
17 estrogênica via ER clássicos em ratas Wistar adolescentes e adultas. Entretanto,  
18 aumenta depósito de TAM apenas ao término do tratamento, sem alterar outros  
19 parâmetros biométricos e cardiovasculares em ambos os períodos de avaliação.

## 1 **6 CONCLUSÃO**

2           Este trabalho investigou os efeitos a curto e longo prazo do tratamento com  
3 TOP durante a adolescência em ratas Wistar. Foi observado que o tratamento com  
4 este fármaco não alterou a reatividade da aorta e nem o papel dos ER $\alpha$  e ER $\beta$  em  
5 modular a resposta contrátil e relaxante de ratas adolescentes e adultas, sugerindo  
6 que o tratamento com TOP não causa disfunção do endotélio vascular e nem altera a  
7 modulação estrogênica via tais receptores. Adicionalmente, foi demonstrado que o  
8 uso de TOP durante a adolescência aumentou a deposição de TAM ao final do  
9 tratamento – o que não foi mantido na vida adulta, sem interferir com outros  
10 parâmetros biométricos e cardiovasculares a curto e longo prazo. Esses resultados  
11 indicam que o tratamento de fêmeas com TOP durante a adolescência não afeta o  
12 padrão de saúde e doença, em relação aos parâmetros avaliados, no período e dose  
13 utilizados.

## 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. 1187–1195, 2011.

AHERNE, W.; HULL, D. Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 91, n. 1, p. 223–234, 1966.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.

BARKER, D. J. P. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **The Lancet**, v. 341, n. 8850, p. 938–941, 1993.

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, 2005.

BARRETT-CONNOR, E.; BUSH, T. L. Estrogen and Coronary Heart Disease in Women. **Jama**, v. 265, n. 14, p. 1861–7, 1991.

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. Predictors of weight loss in adults with topiramate-treated epilepsy. **Obesity Research**, v. 11, n. 4, p. 556–562, 2003.

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.

BOESE, A. C. et al. Sex differences in vascular physiology and pathophysiology:

Estrogen and androgen signaling in health and disease. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 3, p. 524–545, 2017.

BOUILLON-PICHAULT, M. et al. Topiramate pharmacokinetics in infants and young children: Contribution of population analysis. **Epilepsy Research**, v. 93, n. 2–3, p. 208–211, 2011.

BROWN, R. O. et al. Topiramate and weight loss in patients with neurodevelopmental disabilities. **Pharmacotherapy**, v. 22, n. 7, p. 831–835, 2002.

BULUN, S. E. et al. Aromatase in aging women. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 17, n. 4, p. 349–358, 1999.

CAMERON, F.; WHITESIDE, G.; MCKEAGE, K. Phentermine and topiramate extended release (qsymia™): First global approval. **Drugs**, v. 72, n. 15, p. 2033–2042, 2012.

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, 2012.

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, 2013.

CHO, Y. J. et al. Long-term efficacy and tolerability of topiramate as add-on therapy in refractory partial epilepsy: An observational study. **Epilepsia**, v. 50, n. 8, p. 1910–1919, 2009.

CHRISTIAN, M. The browning of white fat. **The Endocrinologist: The magazine of the society for endocrinology**, v. Winter, n. 126, p. 15–16, 2017.

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.

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.

COELINGH BENNINK, F. et al. Maternal and fetal estetrol levels during pregnancy.

**Climacteric**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 69–72, 2008.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 2, p. 189–199, 2007.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 SUPPL., 2004.

DHANANJAYAN, R. et al. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 372–379, 2016.

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.

FOX, C. K. et al. Topiramate for weight reduction in adolescents with severe obesity. **Clinical Pediatrics**, v. 54, n. 1, p. 19–24, 2015.

FURCHGOTT, R. F. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. **Journal of the American Medical Association**, v. 276, n. 14, p. 1186–1188, 1996.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived factors. **Faseb J**, v. 3, n. 9, p. 2007–2018, 1989.

GENC, B. O. et al. Anthropometric indexes, insulin resistance, and serum leptin and lipid levels in women with cryptogenic epilepsy receiving topiramate treatment. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 1256–1259, 2010.

GLUCKMAN, P. D. et al. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 401–408, 2009.

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, 2016.

HAUGEN, A. C. et al. Evolution of DOHaD: The impact of environmental health sciences. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 6, n. 2, p. 55–64, 2015.

HELENA, M. et al. Hipertensão arterial : o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

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. March, p. 67–73, 2018.

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.

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, 2017.

JEANSON, Y.; CARRIÈRE, A.; CASTEILLA, L. A new role for browning as a redox and stress adaptive mechanism? **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. OCT, p. 1–11, 2015.

KIM, D. W. et al. Effects of new antiepileptic drugs on circulatory markers for vascular risk in patients with newly diagnosed epilepsy. **Epilepsia**, v. 54, n. 10, p. 146–149, 2013.

KLEIN, K. M. et al. Topiramate, nutrition and weight change: A prospective study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 79, n. 5, p. 590–593, 2008.

KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelium Dysfunction and Hypertension. **Springer**

**International Publishing**, v. 54, p. 511–540, 2016.

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. 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.

LOPINTO-KHOURY, C.; MINTZER, S. Antiepileptic drugs and markers of vascular risk. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 12, n. 4, p. 300–308, 2010.

LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 231, n. 3, p. R77–R99, 2016.

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.

MINTZER, S. et al. Effects of antiepileptic drugs on lipids, homocysteine, and C-reactive protein. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 4, p. 448–456, 2009.

MINTZER, S. et al. Conversion from enzyme-inducing antiepileptic drugs to topiramate: Effects on lipids and c-reactive protein. **Epilepsy Research**, v. 98, n. 1, p. 88–93, 2012.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 61–74, 1999.

MOURA, K. F. **Tratamento com topiramato na adolescência: efeitos agudos e tardios sobre a reatividade da aorta.** [s.l.] Universidade Estadual de Londrina,

2019.

MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 109, n. 6, p. 687–696, 2011.

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.

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 55-2, 2004.

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, 2000.

POWERS, S. W. et al. Trial of amitriptyline, topiramate, and placebo for pediatric migraine. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 2, p. 115–124, 2017.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1–2, p. 71–83, 2014.

RADER, D. J.; HOVINGH, G. K. HDL and cardiovascular disease. **The Lancet**, v. 384, n. 9943, p. 618–625, 2014.

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, 2004.

RICHARD, D. et al. Influence of topiramate in the regulation of energy balance. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 961–966, 2000.

RICHARD, D. et al. The effects of topiramate and sex hormones on energy balance of male and female rats. **International Journal of Obesity**, v. 26, n. 3, p. 344–353, 2002.

ROSENSTOCK, J. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to assess the efficacy and safety of topiramate controlled release in the treatment of obese type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 30, n. 6, p. 1480–1486, 2007.

SAKULCHIT, T.; MECKLER, G. D.; GOLDMAN, R. D. Topiramate for pediatric migraine prevention. **Canadian family physician Medecin de famille canadien**, v. 63, n. 7, p. 529–531, jul. 2017.

SARECKA-HUJAR, B. et al. Concentrations of the Selected Biomarkers of Endothelial Dysfunction in Response to Antiepileptic Drugs: A Literature Review. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 25, p. 1–9, 2019.

SCHWERTZ, D. W.; PENCKOFER, S. Sex differences and the effects of sex. v. 30, n. 6, p. 401–428, 2001.

SHANK, R. P. et al. An overview of the preclinical aspects of topiramate: Pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. **Epilepsia**, v. 41, n. 4 SUPPL., 2000.

SILVEIRA, P. P. et al. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494–504, 2007.

SIMPSON, E. R. Sources of estrogen and their importance. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 225–230, 2003.

SPEAR, L. P. **The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.** [s.l: s.n.]. v. 24

STAHL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications.** [s.l: s.n.].

STAPLETON, P. A. et al. Obesity and vascular dysfunction. **Pathophysiology**, v. 15, n. 2, p. 79–89, 2008.

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.

TONSTAD, S. et al. Efficacy and safety of topiramate in the treatment of obese subjects with essential hypertension. **American Journal of Cardiology**, v. 96, n. 2, p. 243–251, 2005.

TOSTES, R. C. et al. Effects of estrogen on the vascular system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 9, p. 1143–1158, 2003.

TYAGI, N. et al. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1150–1162, 2006.

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.

WILSON, R.; ERIKSSON, G.; DICZFALUSY, E. Oestriol metabolism in pregnant women. **Acta Endocrinologia**, v. 46, p. 525–543, 1964.

WU, J. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366–376, 2012.

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.

YOUNG, P.; ARCH, J. R. S.; ASHWELL, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. **FEBS Letters**, v. 167, n. 1, p. 10–14, 1984.

## ANEXO A – CEUA/UUEL



## 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 Scialanti 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/UUEL) 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

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL 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/UUEL

**Ilmo.(a) Sr.(a)**  
**Prof. (a) Dr. (a). Graziela Scialanti Ceravolo**  
 Responsável pelo projeto  
 Departamento de Ciências Fisiológicas CCB  
 C/C para a Chefia do Depto de Fisiológica CCB  
 C/C para a Direção do CCB  
 C/C para Biotério do CCB