



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KENNY GUTEMBERG NUNES SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES EM
RATOS ADULTOS TRATADOS COM TOPIRAMATO
DURANTE A INFÂNCIA**

Londrina
2022

KENNY GUTEMBERG NUNES SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES EM
RATOS ADULTOS TRATADOS COM TOPIRAMATO
DURANTE A INFÂNCIA**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Garcia Pelosi Gomes.

Londrina
2022

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

K36a Silva, Kenny Gutemberg Nunes.
Avaliação dos efeitos cardiovasculares em ratos adultos tratados com topiramato durante a infância / Kenny Gutemberg Nunes Silva. - Londrina, 2022.
59 f.

Orientador: Gislaine Garcia Pelosi.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Topiramato - Tese. 2. Fisiologia Cardiovascular - Tese. 3. Farmacologia Cardiovascular - Tese. 4. Teoria desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD) - Tese. I. Pelosi, Gislaine Garcia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.
CDU 61

KENNY GUTEMBERG NUNES SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES EM
RATOS ADULTOS TRATADOS COM TOPIRAMATO
DURANTE A INFÂNCIA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra Gislaine Garcia Pelosi
Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Graziela Scianti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves
Universidade Federal de Lavras – UFLA

Prof^a. Dra Daniela C. Ceccatto Gerardin C.
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 05 de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Márcio e Roniram. Sou grato pelo incentivo e por me proporcionarem a possibilidade de ter um bom estudo e formação. Grato por todo o carinho, amor e puxões de orelha, por tanto cuidarem de mim e me apoiarem na minha jornada profissional mesmo sem entenderem muito bem o que é essa vida acadêmica. Vocês são tudo para mim.

Aos meus irmãos Kedy, Kaio e Kaká. Todos chatos, mas amo vocês. Em especial ao Preto que me ajudava nos tratamentos nos fins de semana, anotando os pesos dos filhotes, ficando a 2 metros da caixa com medo dos ratos e por ter me ensinado andar de moto enquanto me trazia para os experimentos aos fins de semana e feriados.

A todos os meus amigos e amigas que direta ou indiretamente me apoiaram e acreditaram em mim. Obrigado por momentos de parceria desde a escola até a graduação.

Ao meu psicólogo, Felipe Machado, por me acompanhar na caminhada e ouvir as inúmeras questões que surgiam no percurso.

Aos docentes do departamento de Ciências Fisiológicas da UEL que dedicaram seu tempo e compartilharam seus conhecimentos, contribuindo para minha melhor formação enquanto profissional e até mesmo em aconselhamentos da carreira. Obrigado!

A professora Marli e sua equipe de pessoas queridas e acolhedoras. Obrigado Blenda, Gabi e Lorena por cederem o laboratório de vocês para os registros cardiovasculares, por dividirem as escalas dos dias e me deixarem basicamente monopolizar o espaço. Vocês foram demais. Valeu pelos desabafos, Lorena!

Ao laboratório de Farmacologia Vascular os meus sinceros agradecimentos. Em meio a pandemia vocês foram minha companhia para o desespero de muitas vezes eu perdido em experimentos e milhões de tratamentos e etc. Obrigado professora Graziela por me possibilitar integrar o projeto de vocês. Aprendi muito! Obrigado

meninas pela convivência, Camila, Juliana, Carol Higashi, Kaw (maravilhosa), e em especial a minha pequena grande mulher little Debra.

Aos técnicos de laboratório que muito nos auxiliam no cuidado com os animais, limpeza, e etc. Em especial à Fujiko que sempre nos socorria em situações, por vezes, muito inesperadas nessa UEL.

As minhas companheiras do nosso laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Neurociências, Amanda e Maria Vitória que tanto me ajudaram nos experimentos, estabeleceram confiança e amizade em mim nesse período e vieram assim que puderam após essa pandemia trabalhar comigo e fazer momentos de alimentação gostosos (saudades tortas da Amanda). Obrigado de coração.

Ao Luiz Fernando. Muito obrigado por ter sido tão solícito e gentil comigo, por me ensinar toda a coleta e análise de dados e dispor o seu tempo para compartilhar todos os seus conhecimentos. Esse trabalho também é todo seu.

Aos membros da banca avaliadora, professora Dra. Graziela e professor Dr. Fernando Henrique por aceitarem avaliar o presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do presente trabalho e concessão da bolsa.

E por último e não menos importante à minha orientadora, professora Gislaine. Obrigado por permitir com que eu participasse do seu time de alunos, onde pude crescer e aprender bastante. Sou muito grato pelos ensinamentos.

SILVA, Kenny Gutemberg Nunes. **Avaliação dos efeitos cardiovasculares em ratos adultos tratados com Topiramato durante a infância**. 2022. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O Topiramato (TOP) é um fármaco antiepiléptico prescrito para o tratamento da epilepsia em crianças partir dos dois anos de idade. A administração de drogas antiepilépticas tem sido relacionada com prejuízos da função cardiovascular verificados através de alterações de parâmetros metabólicos de risco para saúde vascular, do controle autonômico cardíaco, bem como efeitos pró-arritmogênicos e aumento do risco de morte súbita. Contudo, estudos sobre os possíveis efeitos sobre o sistema cardiovascular a longo prazo após a administração de TOP durante um período crítico do desenvolvimento, como a infância, ainda são escassos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os possíveis efeitos a longo prazo da administração de TOP durante a infância sobre parâmetros cardiovasculares de ratas e ratos. Ratas e ratos Wistar foram alocados em gaiolas comuns para que acasalassem e a prole proveniente foi randomizada em 4 grupos experimentais, sendo estes: grupos controle: CTR₁ ou CTR₂, fêmeas e machos, respectivamente, que receberam água de torneira por gavagem e grupos TOP₁ e TOP₂, fêmeas e machos que receberam TOP 41 mg/kg/dia, respectivamente. As administrações tiveram início no dia pós-natal 16 (DPN16) e término no DPN28. Na vida adulta (fêmeas a partir do DPN 85 na fase estro e machos DPN 119), os animais foram submetidos à cateterização da artéria e veia femoral e, 24 horas, os registros cardiovasculares foram realizados. A administração de TOP durante a infância não alterou os parâmetros cardiovasculares basais, como pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) na vida adulta para ambos os sexos. Da mesma forma, não houve alteração na variabilidade da pressão arterial sistólica (VAPS), variabilidade da frequência cardíaca (VFC), na efetividade do barorreflexo em repouso, nas respostas hemodinâmicas a drogas vasoativas (fenilefrina ou nitroprussiato de sódio) ou ainda sobre as respostas pressora e taquicárdica frente ao estresse de restrição agudo. Entretanto, em ratas, a avaliação da atividade do barorreflexo mostrou elevação do slope bradicárdico (slope CTR₁= -2,164 ± 0,3034; n= 7; slope TOP₁= -3,221 ± 0,3639; n= 6; p=0,0458; t= 2,251) e do ganho (CTR₁: -1,427 ± 0,158 bpm/mmHg; TOP₁: -2,402 ± 0,224 bpm/mmHg; p=0,0033). Em machos, a sensibilidade e ganho do barorreflexo e os parâmetros obtidos da curva sigmoide não diferiram entre os grupos CTR₂ e TOP₂. Assim, concluímos que a administração de TOP durante a infância apresenta um perfil seguro em contexto de programação do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, uma vez que, não promove alterações a longo prazo do controle da função deste sistema, tanto em repouso, quanto sob estresse em ratos e ratas, mas eleva o ganho do barorreflexo de ratas na vida adulta. Entretanto, mais estudos são necessários para responder os mecanismos envolvidos na diferença da resposta barorreflexa em ratas tardiamente.

Palavras-chave: topiramato; antiepilépticos; infância; barorreflexo; DOHaD.

SILVA, Kenny Gutemberg Nunes. **Evaluation of cardiovascular effects in adult rats treated with topiramate during childhood.** 2022. 58 f. Dissertation (Master's in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Topiramate (TOP) is an antiepileptic drug approved by Food and Drug Administration (FDA) for the epilepsy treatment in children. Previously data have been correlated antiepileptic drugs (AEDs) therapy with cardiovascular impairments and increased metabolic markers for cardiovascular risk and cardiovascular autonomic dysfunction. However, the long-term effects of TOP administration in critical windows of development, such as in the infancy is still unknown. Therefore, we sought to assess the long-term cardiovascular effects of TOP administration during infancy in adult male and female rats. Wistar rats were subjected to mating and the offspring were randomized into 4 experimental groups: control groups; CTR₁ or CTR₂, females and males, respectively, treated with tap water; TOP₁ and TOP₂ groups, females and males submitted to administration of TOP 41 mg/kg/day, respectively. The administrations took place via gavage and started on postnatal day 16 (PND16) and ended on PND28. In adulthood, male and female rats underwent to femoral artery and vein catheterization (females from PND 85 in estrus and males PND 119) and after 24 hours, cardiovascular records were obtained. TOP administration during childhood did not change cardiovascular baseline parameters, such as mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) in adulthood females and males Wistar rats. No changes were observed in the variability of systolic blood pressure (VAPS), heart rate variability (HRV), in the effectiveness of the baroreflex, in the hemodynamic responses by vasoactive drugs (phenylephrine or sodium nitroprusside) or in the pressor and tachycardic response acute restraint stress, both male and female. However, in female rats, baroreflex assessment by vasoactive drugs in adulthood increased the bradycardic slope (slope CTR₁= -2.164 ± 0.3034 ; n= 7; slope TOP₁= -3.221 ± 0.3639 ; n= 6; p=0.0458; t= 2.251) and gain (CTR₁: -1.427 ± 0.158 bpm/mmHg; TOP₁: -2.402 ± 0.224 bpm/mmHg; p=0.0033), after phenylephrine infusion. In adult males, the baroreflex sensitivity, gain and the parameters obtained from the sigmoid curve did not differ between the CTR₂ and TOP₂ groups. We conclude that TOP administration during childhood presents a safe profile in developmental programming context, since it does not promote long-term changes of cardiovascular function, both in rest and stressed in rats, but it increases the baroreflex gain of female rats in adult life. However, more studies are required to answer the mechanisms involved in the difference in the baroreflex gain in female rats later.

Key words: topiramate; antiepileptic drug; childhood; baroreflex; DOHaD.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros cardiovasculares basais de ratas adultas (a partir DPN85) tratadas com TOP na infância	29
Tabela 2 – Parâmetros cardiovasculares basais de ratos adultos (DPN120) tratados com TOP na infância.....	29
Tabela 3 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência da VFC de ratas tratadas com TOP durante a infância.....	30
Tabela 4 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência da VFC de ratos tratados com TOP durante a infância.....	31
Tabela 5 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência sobre a VAPS de ratas tratadas com TOP na infância.....	31
Tabela 6 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência sobre a VAPS de ratos tratados com TOP na infância.....	32
Tabela 7 – Parâmetros derivados da curva sigmoide do barorreflexo de ratas adultas após administração de TOP na infância	36
Tabela 8 – Parâmetros derivados da curva sigmoide do barorreflexo de ratos adultos após administração de TOP na infância	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Análise do barorreflexo espontâneo de ratas adultas (a partir DPN85) após o tratamento com TOP durante a infância 33
- Figura 2** – Análise do barorreflexo espontâneo de ratos adultos (DPN120) após o tratamento com TOP durante a infância..... 34
- Figura 3** – Curvas sigmoide e regressões lineares do barorreflexo de ratas pertencentes aos grupos controle (CTR₁) e topiramato (TOP₁)35
- Figura 4** – Curvas sigmoide e regressões lineares do barorreflexo de ratos pertencentes aos grupos controle (CTR₂) e topiramato (TOP₂)37
- Figura 5** – Alterações nas variações da pressão arterial média de ratas (Δ PAM) causadas pelo aumento da concentração de fenilefrina (5A) ou de nitroprussiato de sódio (5B).....39
- Figura 6** – Alterações nas variações da pressão arterial média de ratos (Δ PAM) causadas pelo aumento da concentração de fenilefrina (6C) ou de nitroprussiato de sódio (6D)40
- Figura 7** – Análise temporal das variações de pressão arterial média (Δ PAM) (7A) e frequência cardíaca (Δ FC) (7B) de ratas adultas durante 60 minutos de estresse de restrição agudo41
- Figura 8** – Análise temporal das variações de pressão arterial média (Δ PAM) (8C) e frequência cardíaca (Δ FC) (8D) de ratos adultos durante 60 minutos de estresse de restrição agudo42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	ANIMAIS	24
3.2	TRATAMENTO.....	24
3.3	CIRURGIA PARA CANULAÇÃO DE ARTERIA E VEIA FEMORAL	25
3.4	REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES BASAIS	26
3.5	ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (VPS) DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC)	26
3.6	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO – MÉTODO DA SEQUÊNCIA.....	27
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO BARORREFLEXO.....	27
3.8	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO	27
3.9	AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA A DROGAS VASOATIVAS	28
3.10	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES OCACIONADOS PELO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO.....	28
3.11	DROGAS.....	29
3.12	EUTANÁSIA.....	29
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Efeitos Tardios Sobre Parâmetros Basais Cardiovasculares de Animais Tratados com TOP Durante a Infância	30
4.2	Efeitos do Tratamento com TOP Durante a Infância Sobre a Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) e Variabilidade da Pressão Arterial Sistólica (VPAS) de Animais Adultos	31
4.3	Análise do Barorreflexo Espontâneo de Animais Adultos Tratados com TOP Durante a Infância	33

4.4	Avaliação dos Efeitos Tardios do Tratamento com TOP Durante a Infância no Controle Barorreflexo da Frequência Cardíaca dos Animais.....	34
4.5	Resposta Hemodinâmica da Infusão de Drogas Vasoativas de Animais Adultos Tratados com TOP Durante a Infância.....	38
4.6	Efeitos a Longo Prazo da Administração de TOP Durante a Infância Sobre as Respostas Cardiovasculares de Animais Adultos Submetidos ao Estresse de Restrição Agudo	40
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXO	59

1. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular exerce diversas funções na manutenção da homeostase, uma vez que é responsável por garantir ações como, o transporte de gases, transporte hormônios, controle da temperatura, além de garantir a distribuição apropriada do fluxo sanguíneo aos tecidos e órgãos. O controle das funções cardiovasculares pode ser subdividido em três níveis básicos, sendo estes, o controle local, que inclui componentes metabólicos, endoteliais e miogênicos; a regulação central desempenhada por meio de estímulos periféricos enviados a núcleos localizados no bulbo; bem como o controle central dado por integração com regiões supra bulbares. A manutenção da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) conta com regulações a curto e longo prazo devido à integração dos reflexos periféricos ao sistema nervoso central, modulando a resposta autonômica eferente sobre os vasos e o coração (FOLKOW, 1987; DUMPNEY, 2016).

O coração é innervado por neurônios pós-ganglionares que realizam ações antagônicas sobre a atividade cardíaca. A inervação vagal é representada pelo sistema nervoso autônomo parassimpático que, por meio da liberação de acetilcolina nos terminais sinápticos, diminui a FC via receptores muscarínicos presentes no nó atrioventricular e sino atrial, sendo responsável pelo controle do tônus cardíaco. Já o sistema nervoso autônomo simpático promove elevação da FC através da liberação da noradrenalina nos terminais sinápticos permitindo sua ação sobre receptores β_1 adrenérgicos, tanto sobre o nó sinoatrial e atrioventricular quanto sobre ação direta da noradrenalina sobre o miocárdio. Deste modo, tanto o sistema nervoso autônomo parassimpático, quanto simpático modulam a atividade cardíaca frente a estímulos levando a alterações da FC (cronotropismo), velocidade de condução dos impulsos elétricos (dromotropismo) e força de contração cardíaca (inotropismo), variando de acordo com a preponderância da atividade simpática ou parassimpática (DUMPNEY, 2016; SALMAN, 2016).

Ademais, o sistema nervoso autônomo simpático inerva diretamente as artérias, arteríolas e veias que, através da ação da noradrenalina via receptores α_1 adrenérgicos, eleva a PA. Contudo, já se tem estabelecido que as terminações nervosas simpáticas também exercem efeitos vasopressores através da liberação de neuropeptídeo Y e ou adenosina trifosfato (ATP) sobre receptores Y1 e purinérgicos (P2X), respectivamente (SALMAN, 2016).

Além disso, o sistema cardiovascular conta com o barorreflexo que consiste em mecanorreceptores localizados no seio carotídeo e arco aórtico que promovem o controle momento a momento da PA. A elevação de PA sobre os barorreceptores estimulam vias aferentes excitatórias que se direcionam a núcleos bulbares promovendo a liberação de glutamato no núcleo do trato solitário (NTS) que, também via ação glutamatérgica, é capaz de estimular áreas como, o núcleo ambíguo (NA) e núcleo motor dorsal do vago (NMDV) ou bulbo ventrolateral caudal (CVLM), sendo os dois primeiros responsáveis por modular o tônus parassimpático sobre o coração através da acetilcolina nos seus terminais sinápticos, enquanto que o último promove modulação do tônus simpático sobre os vasos através da inibição (via uma sinapse gabaérgica) dos neurônios do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (DAMPNEY et al., 2002; DAMPNEY, 2016). Os neurônios pré motores simpáticos do RVLM apresentam atividade tônica que é importante para a manutenção do tônus vasomotor simpático e da pressão arterial basal (DAMPNEY et al., 2016).

O quimiorreflexo, também localizado no seio carotídeo e arco aórtico, é composto por terminações nervosas sensíveis as reduções da pressão parcial de oxigênio no sangue e, de mesmo modo, as aferências provenientes deste sistema estimulam o NTS que, posteriormente, e diferentemente do barorreflexo, estimula de maneira direta, via ação glutamatérgica, os neurônios pré-sinápticos do RVLM aumentando a saída simpática sobre os vasos e o coração (GUYENET; KOSHIYA, 1995).

Está bem estabelecido na literatura que os estímulos periféricos advindos dos mecanorreceptores e quimiorreceptores também são transmitidos às regiões supra bulbares (DAMPNEY et al., 2002) e que algumas dessas regiões, tais como, o núcleo Kolliker-Fuse, córtex cerebral e hipotálamo, por exemplo, são capazes de modular a atividade dos neurônios do RVLM frente à diversas situações comportamentais (DAMPNEY et al., 1994).

Já a regulação cardiovascular a longo prazo conta com fatores neuro-humorais, como alteração de hormônios circulantes a partir da ativação do sistema simpatoadrenal ou do sistema renina-angiotensina-aldosterona que atuam periféricamente e/ou centralmente sobre a PA e FC. O sistema simpatoadrenal, aumenta a secreção de catecolaminas das células cromafins adrenais que atuam sobre receptores adrenérgicos modulando respostas cardíacas e pressoras. Já o

sistema renina-angiotensina-aldosterona promove o aumento de angiotensina II que exerce inúmeras funções, tais como, a vasoconstrição direta ao se ligar aos seus receptores (AT1), elevando a resistência vascular periférica; aumento da secreção de aldosterona, contribuindo para o aumento da volemia por ação nos túbulos renais; acentua a liberação de norepinefrina nos terminais sinápticos dos neurônios simpáticos; ou ainda através da atuação central sobre órgãos circunventriculares, como a área postrema e o órgão subfornical que também favorece a atividade simpática sobre o sistema cardiovascular (SALMAN, 2016).

Além disso, a regulação do sistema cardiovascular pode apresentar diferenças entre indivíduos do sexo masculino e feminino. Em mulheres, observa-se maior atividade parassimpática sobre o coração, maior FC e variabilidade da frequência cardíaca (VFC), além de menor PA quando estes parâmetros são comparados a homens de mesma idade (KOENIG; THAYER, 2016; KITTNAR, 2019). Ademais, o sistema cardiovascular feminino sofre influências das flutuações hormonais decorrentes do ciclo menstrual, sendo que mulheres na idade reprodutiva apresentam menores índices de doenças cardiovasculares, comparativamente a homens na mesma idade, devido ao papel protetor desempenhado pelos estrogênios sobre o sistema cardiovascular (KITTNAR, 2020).

Os estrógenos participam do controle do tônus vasomotor, uma vez que, promovem alteração da expressão gênica após sua ligação com receptores intracelulares presentes na musculatura lisa das células vasculares e do endotélio, tais como ER β e EB α (MENDELSON; KARAS, 1999). A ligação de 17 β - estradiol (E2), em ambos os receptores, é capaz de promover a síntese de óxido nítrico (NO), aumento da expressão do RNAm da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), além de induzir rápida ativação da eNOS e aumentar a sensibilidade das células da musculatura lisa à fatores vasodilatadores, como acetilcolina e prostaglandinas, levando assim a um relaxamento da vasculatura (USSELMAN; STACHENFELD; BENDER, 2016).

Junto a isso, ensaios utilizando cardiomiócitos isolados de ratas demonstraram que administração de estrógenos foi capaz de evitar danos as células decorrentes da exposição a agentes responsáveis por promover estresse oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (WANG et al., 2010). O aumento da produção de espécies reativas de O₂ danifica as células endoteliais, comprometendo o controle da contratilidade

vascular, uma vez que leva à redução da biodisponibilidade de NO (VIRDIS et al., 2000; USSELMAN; STACHENFELD; BENDER, 2016). Além disso, mulheres que foram ovariectomizadas, exibiram menor resposta vasodilatadora à acetilcolina (VIRDIS et al., 2000).

Assim, mulheres durante a menopausa exibem decréscimo das concentrações de hormônios sexuais, levando assim a maior incidência de doenças cardiovasculares nesse período (HURTADO; CELANI; GEBER, 2016). Estudos têm demonstrado que mulheres que realizam reposição hormonal exibiram aumento das concentrações plasmáticas de HDL e menor incidência de doenças cardiovasculares, reforçando assim a importância da manutenção dos níveis de estrógenos para saúde cardiovascular (MOREAU et al., 2013).

A progesterona também exerce efeitos cardioprotetores, desencadeando aumento da síntese de NO decorrente da maior atividade da eNOS, após a sua ligação com receptores de membrana alfa ($mPR\alpha$), mediado pelas vias da fosfoinositídeo 3-quinase/ proteína quinase B (PI3K/Akt) e MAP quinase (PANG; DONG; THOMAS, 2015). Junto a isso, os androgênios exercem efeitos sobre o sistema cardiovascular de maneira direta após a sua ligação com receptores intracelulares ou ainda após a conversão da di-hidrotestosterona em E2 pela aromatase, sendo que, concentrações normais de androgênios em homens estiveram associadas com diminuído risco para o desenvolvimento de aterosclerose enquanto seu decréscimo com maior risco da ocorrência de doença cardíaca coronariana. Já em mulheres, os androgênios estão associados com prejuízos da função cardiovascular, pois reduzem a biodisponibilidade de NO e eleva as concentrações de citocinas pró inflamatórias, bem como o estresse oxidativo (STANHEWICZ; WENNER; STACHENFELD, 2018).

Adicionalmente aos fatores mencionados, diversas condições fisiológicas como a menopausa (HURTADO; CELANI; GEBER, 2016), sedentarismo e obesidade (WANG et al., 2019), doenças neuropsiquiátricas (KIDWELL, ELLENBROEK, 2018) e a exposição a agentes estressores durante o desenvolvimento (BARRETO et al., 2016), por exemplo, são capazes de trazer prejuízos a saúde e ao desenvolvimento da função cardiovascular.

Desde a década de 80, tem se consolidado a associação entre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ao longo da vida decorrente da

exposição a condições estressoras em períodos críticos do desenvolvimento. Indivíduos nascidos das mulheres expostas a fome Holandesa, após a segunda guerra mundial, apresentaram maior incidência no surgimento de doenças crônicas como, câncer de mama, diabetes tipo 2, acidente vascular encefálico, doenças cardiovasculares e hipertensão (BARKER, OSMOND, 1986; KOUPIL et al., 2007; PORTRAIT; TEEUWISZEN; DEEG, 2011).

Diante disso, estabeleceu-se que exposição a agentes estressores durante períodos críticos do desenvolvimento do organismo, como o período intrauterino, infância e adolescência, é capaz de programar a saúde do indivíduo aumentando a sua susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER et al., 1993; KUHLE et al., 2017). Nesse contexto, se estabelece o conceito DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*) o qual têm buscado compreender origem e progressão de doenças crônicas não transmissíveis (HAUGEN et al., 2014; ISGANAITIS, 2019).

Atualmente, já se é estabelecido que o surgimento tardio de doenças crônicas não transmissíveis está correlacionado com alterações epigenéticas. Modificações epigenéticas consistem em mudanças na expressão de genes, sem mudanças na sequência do DNA, tais como a metilação do DNA, modificação de histonas por metilação, acetilação ou fosforilação de aminoácidos constituintes, além do silenciamento gênico por RNAs não codificantes como os microRNAs, levando a programações a longo prazo da saúde (BIANCO-MIOTTO et al., 2017).

Junto a isso, a literatura tem reportado que drogas antiepiléticas são capazes de alterar a expressão de genes, promovendo hipo ou hipermetilação de *loci* específicos através da inibição e ou ativação dos subtipos de DNA metiltransferases, ou ainda por meio da desacetilação de histonas (KONG; MA; ZONG, 2020). A administração *in vitro* de ácido valpróico para neurônios e células da glia de ratos, reduziu a metilação de regiões promotoras para a síntese de proteínas associadas à migração neuronal, como Reelina e ácido glutâmico descarboxilase 67 (Gad67) (DONG et al., 2010). Ademais, o uso de fármacos antiepiléticos em crianças e adolescentes, como o topiramato (TOP), esteve relacionado com modificações epigenéticas da expressão de enzimas correlacionadas a fatores de risco para saúde cardiovascular (CHENG, PRASAD; RIEDER, 2010).

O TOP é um dos fármacos que compõe a nova geração de drogas antiepilépticas (AEDs), aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de epilepsia em crianças a partir de 2 anos de idade, tanto para uso em monoterapia, quanto para terapia adjuntiva (DODGSON; SHANK; MARYANOFF, 2000; SHANK et al., 2000). Suas características farmacodinâmicas incluem uma gama de mecanismos de ação tais como, o bloqueio dos canais de Na⁺ e Ca⁺² dependentes de voltagem, o efeito antagonista sobre um subtipo de receptor para o glutamato, o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e cainato, além da potencialização da ação do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) sobre seu receptor GABA_A (SHANK; GARDOCKI; VAUGHT, 1994). Tais ações farmacológicas são responsáveis por diminuir a hiperexcitabilidade neuronal, uma vez que levam a hiperpolarização celular, reduzindo as crises convulsivas associadas ao quadro epiléptico (SHANK et al., 2000). O TOP também é aprovado pela FDA para a profilaxia da enxaqueca para adolescentes entre 12 e 18 anos de idade (FDA, 2014).

Nas últimas décadas, a literatura vem reportando associações entre o uso de AEDs com prejuízos na função cardiovascular. Os efeitos adversos dos AEDs incluem alterações de marcadores metabólicos considerados de risco para a saúde cardiovascular. A administração de carbamazepina em homens e mulheres foi responsável pela elevação das concentrações séricas de lipoproteína de baixa densidade (LDL), HDL e de colesterol total (TC) (SVALHEIM et al., 2010). Chuang e colaboradores (2011) também observaram elevações nas concentrações de TC e LDL em adultos epilépticos tratados com carbamazepina ou fenitoína.

Alterações do perfil lipídico a partir da administração de AEDs também foram observadas em crianças epilépticas, uma vez que o tratamento com carbamazepina ou ácido valpróico após 6, 12 e 24 meses (VOUDRIS et al., 2006), ou ainda, fenobarbital, carbamazepina ou ácido valpróico por mais de 12 meses (TUMER et al., 2002), levaram a elevações das concentrações séricas de lipoproteína A. A farmacoterapia com carbamazepina resultou no aumento das concentrações de triglicerídeos, TC e conseqüente alteração da razão colesterol/ HDL (KEENAN, SADLIER, WILSHIRE, 2014). A monoterapia com fenitoína em crianças epilépticas resultou em elevações das concentrações de HDL, já para o tratamento com carbamazepina verificou-se aumento do TC, HDL e LDL (SHANKYAN et al., 2013).

Junto a isso, um estudo prospectivo observou elevações das concentrações de apolipoproteína B, bem como da razão apolipoproteína B/ apolipoproteína A a partir da administração de TOP (KIM et al., 2014). El-Farathy e colaboradores (2015) apontaram ainda para aumento das concentrações séricas de lipoproteína A, LDL e diminuição de HDL durante a monoterapia com TOP em pacientes com menos de 18 anos.

O uso de AEDs em pacientes epiléticos têm sido correlacionados com alterações da espessura da camada íntima média da artéria carótida (CA-IMT). O tratamento com carbamazepina, fenitoína, ácido valpróico foi responsável pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e proteína C reativa na artéria carótida e maior espessamento da CA-IMT (CHUANG et al., 2011; MEHRPOUR et al., 2013; SHANKYAN et al., 2013; LAI et al., 2017). A administração de TOP também foi responsável por promover elevação do espessamento da CA-IMT, os quais foram considerados como fatores preditores dessa alteração, o aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos e HDL resultantes do tratamento (EL-FARAHATY et al., 2015). Ademais, um maior espessamento da CA-IMT foi observado em homens que realizavam o tratamento com AEDs, incluindo o TOP, comparativamente as mulheres presentes no estudo (TAN et al., 2009).

Modificações das concentrações plasmáticas de homocisteína também foram observadas a partir da farmacoterapia com AEDs em crianças e adolescentes (KURUL et al., 2007; CHENG, PRASAD; RIEDER, 2010). A administração de ácido valpróico (NI et al., 2014), leviracetam, oxcarbazepina e TOP também causou aumento das concentrações plasmáticas de homocisteína em adultos epiléticos (KIM et al., 2014; EL-FARAHATY et al., 2015).

Modificações do perfil lipídico e nas concentrações plasmáticas de homocisteína são considerados marcadores de risco para o desenvolvimento de distúrbios cerebrovasculares e aterosclerose (DJURIC et al., 2018) já que favorecem o desenvolvimento de prejuízos da função vascular, decorrente da alteração da permeabilidade endotelial pelo acúmulo de lipoproteínas, ocasionando lesão na CA-IMT, levando à uma maior incidência para ocorrência de acidente vascular isquêmico e infarto do miocárdio (DANIELS; GREER, 2008).

O processo aterosclerótico subclínico também esteve correlato com alterações autonômicas cardíacas em crianças já que as alterações na CA-IMT e hiperhomocisteïnemia foram relacionadas com decréscimo de índices que apontam a modulação parassimpática sobre o coração (CELIK; ÇELIK, 2018).

Modificações das respostas autonômicas em pacientes epiléticos também foram observadas a partir do tratamento com AEDs. O tratamento com carbamazepina em indivíduos jovens, sem histórico de doenças cardiovasculares, esteve relacionada com o desenvolvimento de taquicardia sinusal. Já para indivíduos idosos, a carbamazepina esteve envolvida com o surgimento de atrasos na condução átrio ventricular e bradiarritimias (KASARKIS et al., 1992) apontando para diferentes implicações do uso dos AEDs na saúde cardiovascular de acordo com a faixa etária.

A atividade cardíaca apresenta variâncias em seus intervalos de batimentos, coordenados através da integração dos estímulos periféricos ao sistema nervoso central os quais podem ser representados por quatro componentes oscilatórios de frequência e amplitude principais: 1) o componente de alta frequência (HF), que representa o tônus parassimpático; 2) componente de baixa frequência (LF), o que representa a atuação simpática; 3) a razão LF/HF, definindo o balanço simpato-vagal cardíaco; e por fim, 4) componente de muito baixa frequência (VLF) que parece refletir a atividade simpática (VANDERLEI et al., 2009; SÁ et al., 2013). Há evidência na literatura de que o uso de AEDs está associado com reduções no HF, LF e VLF, na frequência cardíaca (FC) e na pressão arterial média (PAM) (PERSSON; ERICSON; TOMSOM, 2003).

Além disso, alterações em registros eletrocardiográficos foram constatadas a partir do uso de AEDs em indivíduos epiléticos que realizavam politerapia com AEDs bloqueadores de canais de Na⁺, como lamotrigina e fenitoína, ou apenas com monoterapia com fenitoína levando ao desnivelamento das ondas ST, semelhantes à síndrome de Brugada, e das ondas J sugerindo maior risco para o desenvolvimento de alterações da condução elétrica cardíaca e arritmias (ISHIZUE et al., 2016). Adicionalmente, o tratamento com carbamazepina foi responsável pela redução dos intervalos RR em pacientes recentemente diagnosticados com epilepsia após 1 mês de adesão ao tratamento farmacológico (PERSSON; ERICSON; TOMSOM, 2003) ou ainda associado com encurtamento dos intervalos QT em indivíduos idosos (SAETRE et al., 2009).

Ademais, ensaios *in vitro* demonstraram que a exposição de células embrionárias humanas à lamotrigina, fenobarbital ou fenitoína esteve associada com potenciais efeitos pró-arritmogênicos dessas drogas, uma vez que levaram a inibição da corrente retificadora de íons K^+ (I_{kr}) (DANIELSSON et al., 2003). Ainda, a administração de lamotrigina também esteve relacionada maior ocorrência de morte súbita inesperada em pacientes epiléticos devido a alterações na repolarização cardíaca (AURLIEN; TAUBOLL; GJERSTAD, 2007).

Outras investigações em ensaios *in vitro* com células tronco também reportaram prejuízos na atividade contrátil de cardiomiócitos, após a exposição a AEDs. A administração de ácido valpróico levou à inibição do desenvolvimento de batimentos espontâneos de cardiomiócitos de forma dose dependente, bem como da cardiomiogênese nos corpos embriões cultivados a partir de células tronco de camundongos devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (NA et al., 2003).

Ademais, AEDs como ácido valpróico, fenitoína e fenobarbital, administrados em culturas de células cardíacas embrionárias de galinha, foram responsáveis pelo decréscimo significativo da atividade contrátil de cardiomiócitos após 48 horas de exposição a droga. A administração de trimetadiona em culturas de células cardíacas embrionárias de galinha inibiu a capacidade contrátil após 144 horas. Além disso, a administração de ácido valpróico, fenitoína, fenobarbital e trimetadiona em células troncos de ratos diferenciadas em cardiomiócitos também promoveu uma inibição da capacidade contrátil de maneira dose dependente e conseqüente queda de viabilidade celular (AHIR; PRATTEN; 2014).

Assim, diante do exposto, verifica-se que diversos AEDs apresentam possíveis impactos prejudiciais sobre o funcionamento do sistema cardiovascular, a curto e a longo prazo. Contudo, ainda não há investigações a respeito das possíveis influências do TOP sobre o funcionamento do sistema cardiovascular decorrente da farmacoterapia durante a infância, bem como os seus impactos a longo prazo. Desta forma, a hipótese do presente trabalho é que a administração de TOP em período crítico do neurodesenvolvimento, como a infância, pode ocasionar prejuízos cardiovasculares na vida adulta. 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito tardio do tratamento com TOP durante a infância sobre o sistema cardiovascular de ratas e ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar os efeitos tardios da administração de TOP durante a infância de ratos e ratas sobre:

1. Parâmetros cardiovasculares basais (repouso) – pressão arterial média, frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica;
2. Análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica;
3. Análise da sensibilidade do barorreflexo através do método da sequência;
4. Análise da atividade barorreflexa a partir da administração de drogas vasoativas;
5. Resposta hemodinâmica de drogas vasoativas;
6. Respostas cardiovasculares causadas pelo estresse de restrição agudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos e ratas Wistar (70 dias) obtidos do biotério central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram transferidos para o biotério setorial para um período de aclimação de 7 dias até o início dos acasalamentos. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com máximo de cinco animais por caixa, condições de ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$, água e ração ofertadas *ad libitum*. Após 7 dias, um rato foi colocado com duas fêmeas por gaiola para o acasalamento, *overnight*, e separados no período da manhã para realização do esfregaço vaginal. A confirmação da prenhez foi verificada a partir da observação de células cornificadas do ciclo estral somada à presença de espermatozoides após observação em microscopia óptica (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). Uma vez confirmada a prenhez (dia gestacional zero: DG 0), o acompanhamento das ratas prenhas foi realizado até o nascimento dos filhotes (dia pós-natal 0: DPN0). No DPN 0, a prole foi contada, pesada e teve o sexo identificado. Foram mantidos um número mínimo de 8 e máximo de 10 filhotes (5 machos e 5 fêmeas, sempre que possível), a fim de garantir homogeneidade durante o período de amamentação. As ninhadas com número excedentes de filhotes tiveram os mesmos eutanasiados por decapitação em guilhotina no DPN 4. O desmame da prole restante deu-se no DPN 21.

3.2. Tratamento

No DPN 16, os animais foram randomizados em quatro grupos experimentais com tratamento realizado no período correspondente ao da infância em humanos, DPN 16 ao 28 (MARCO *et al.*, 2011):

Grupo controle₁: fêmeas CTR₁, tratadas com água de torneira e submetidas aos protocolos de avaliação cardiovascular na vida adulta (a partir do DPN 85).

Grupo topiramato₁: fêmeas TOP₁ (41mg/kg/dia) (Topamax®, Janssen-Cilag, Brasil). Submetidas à administração de TOP com protocolos de avaliação cardiovascular na vida adulta (a partir DPN 85).

Grupo controle₂: machos CTR₂, tratados com água de torneira, posteriormente submetidos aos protocolos de avaliação cardiovascular (DPN 120).

Grupo topiramato₂: machos TOP₂ (41mg/kg/dia) (Topamax®, Janssen-Cilag, Brasil), posteriormente submetidos aos protocolos de avaliação cardiovascular (DPN 120).

Conforme previamente descrito por Vidigal e colaboradores (2022), a dose de TOP escolhida foi baseada nas doses aprovadas para o tratamento de epilepsia em crianças, sendo que as doses terapêuticas variam de 3 a 9 mg/kg/dia. Diante disso, foi realizado um ajuste dosimétrico com o auxílio da escala *body weight*^{3/4}. Foram considerados os valores de peso corpóreo de crianças de aproximadamente 3 anos de idade por volta de 12 kg e para roedores no período equivalente (13 dias) igual a 30g, atingindo a dose de 40 mg/kg/dia.

A administração de água e do TOP em todos os tratamentos foi realizada por via oral utilizando o método de gavagem.

3.3. Cirurgia para canulação de artéria e veia femoral

Os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (100 mg/kg quetamina e 20 mg/kg xilazina, i.p) (Ceva Santé Animale® 12, São Paulo, Brasil) para a implantação de uma cânula na artéria femoral, a fim de se obter os registros de PA e frequência cardíaca FC. A veia femoral também foi canulada para a administração de drogas vasoativas. As cânulas foram compostas por um segmento de polietileno PE-10 de 4,5 cm de comprimento soldado a outro segmento de polietileno PE-50 (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) contendo 13 cm de comprimento, anteriormente preenchidas com salina e heparina (heparina a 0,25%) e obstruídas com um pino de metal. Após a canulação da artéria e da veia femoral, os segmentos PE-50 foram exteriorizados na região dorsal dos animais com auxílio de um trocater e fixados à pele com auxílio de uma sutura cirúrgica. Ao fim da cirurgia, foi administrado o analgésico fluxinina meglumina para analgesia (Banamine®, Schering Plough, Santo Amaro, Brazil - 2,5 mg/kg, sc). A recuperação pós cirúrgica se deu em um período de 24 horas, onde os animais permaneceram em caixas individuais.

A canulação dos vasos femorais foi realizada em ratas com idade pós-natal a partir dos 85 dias de vida e em ratos aos 119 dias, de modo que as ratas foram destinadas à cateterização somente após a verificação da fase do ciclo estral (fase estro), através de esfregaço vaginal e observação das células características da fase de estro em microscópio (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007).

3.4. Registro dos parâmetros cardiovasculares basais

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

3.5. Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (VPS) e da frequência cardíaca (VFC)

Um período mínimo de 10 minutos de registro da PAS e da FC foi utilizado, a análise da variabilidade da pressão sistólica e do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo e da frequência foram realizadas pelo programa CardioSeries v2.4 (Daniel Penteadó Martins Dias, Ribeirão Preto, Brasil), series temporais batimento-a-batimento foram geradas através do programa LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Australia). As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo *spline*, para regularização do intervalo de tempo entre os batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). Os valores interpolados de IP, os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3,00 Hz), para os valores de PAS, os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas de muito baixa frequência (VLF: 0,02 – 0,2 Hz) e baixa frequência (LF: 0,2 – 0,6 Hz), e os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e normalizadas (nu). Os valores normalizados foram obtidos por meio do cálculo da potência relativa das bandas LF e HF levando em consideração a potência total do espectro menos a potência da banda de muito baixa frequência (VLF: < 0,20 Hz). Para avaliar o balanço simpátovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência das bandas LF e HF (LF/HF) do espectro do IP.

3.6. Análise da sensibilidade do barorreflexo – método da sequência

Séries temporais batimento-a-batimento de valores de IP e PAS foram analisados utilizando o programa CardioSeries v2.4 e a sensibilidade do barorreflexo foi avaliada através do método da sequência. A série temporal foi escaneada em busca de sequências com pelo menos três aumentos progressivos na PAS acompanhado de três reduções progressivas no IP ou três reduções progressivas da PAS acompanhada de aumentos progressivos no IP. Para detectar as alterações na PAS e IP, os limiares de 0 mmHg e 0 ms foram utilizados, respectivamente. As sequências que apresentaram o coeficiente de correlação (r) entre PAS e IP maior ou igual a 0,8 foram consideradas sequências barorreflexas. A sensibilidade do barorreflexo foi determinada pelo slope da regressão linear das linhas entre PAS e IP de cada sequência barorreflexa. O índice de efetividade do barorreflexo (*baroreflex effectiveness index* - BEI) foi calculado dividindo o número de sequências barorreflexas pelo número de rampas da PAS (sequências de no mínimo três aumentos ou reduções progressivas).

3.7. Avaliação da atividade do barorreflexo

A atividade do barorreflexo foi testada através da infusão intravenosa do agonista seletivo para receptor adrenérgico α_1 , fenilefrina (50 $\mu\text{g/ml/kg}$, iv; 0,34ml/min) (Sigma-Aldrich) ou do doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (50 $\mu\text{g/ml/kg}$, iv; 0,8ml/min) (Sigma-Aldrich), usando uma bomba de infusão (Insight, Brasil) (HEAD; MCCARTY, 1987; RESSTEL; CORRÊA, 2006). Duas infusões de fenilefrina e duas infusões de nitroprussiato de sódio foram randomizadas e finalizadas após 50-60 segundos de duração com a obtenção de consideráveis respostas pressoras ou depressoras, respectivamente.

3.8. Métodos de avaliação do barorreflexo

As curvas de barorreflexo foram construídas combinando as variações de pressão arterial média com as respostas de frequência cardíaca. Foram emparelhados os valores das variações da pressão arterial média (ΔPAM) e da frequência cardíaca (ΔFC) e foram plotados para criar curvas sigmóides para cada rato utilizados para determinar a atividade do barorreflexo (HEAD; MCCARTY, 1987). A análise do barorreflexo usando curvas sigmóides foi caracterizada por quatro parâmetros: (i) P1 (bpm) menor platô da frequência cardíaca e P2 (bpm) maior platô

da frequência cardíaca; (ii) *Range* ou faixa de frequência cardíaca (bpm), ou seja, diferença entre os valores do platô superior com o inferior; (iii) o ganho (G, bpm/mmHg), que é o declive médio de entre as curvas +1 e -1 das derivações padrão de BP50. Para analisar as respostas de bradicardia e taquicardia separadamente, foi combinado os valores de frequência cardíaca dos períodos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mmHg da pressão arterial média e as variações foram calculadas. Os valores foram traçados para criar curvas de regressão linear para cada rato e as suas inclinações foram comparadas para verificar modificações no ganho do barorreflexo (CRESTANI et al., 2011).

3.9. Avaliação da resposta hemodinâmica a drogas vasoativas

Para avaliação hemodinâmica, aumentos e reduções na pressão arterial média causados pela infusão intravenosa de fenilefrina (50 µg/ml/kg, iv; 0,34ml/min) (Sigma-Aldrich) e nitroprussiato de sódio (50 µg/ml/kg, iv; 0,8ml/min) (Sigma-Aldrich), respectivamente, foram obtidos para a construção das curvas dose-resposta para cada droga. Os valores de PAM foram amostrados a cada 5 segundos cumulativamente desde o início da infusão até o platô da resposta vasoativa para cada droga. O efeito máximo (Emax) e a dose necessária para gerar 50% da resposta (ED50) de cada droga vasoativa foram comparadas entre os grupos experimentais (CRESTANI et al., 2011).

3.10. Avaliação dos efeitos cardiovasculares ocasionados pelo estresse de restrição agudo

Após o período mínimo (30 min) de registro basal de PAM e FC basais, o animal foi introduzido em um tubo cilíndrico plástico (diâmetro 6.5 cm e comprimento de 15 cm), ventilado por furos, onde permaneceram durante 60 min. A PAM e FC foram registradas durante todo o tempo. Ao final do período de 60 minutos os animais foram realocados à suas caixas e transferidos para outra sala para eutanásia. Cada animal foi submetido apenas a uma sessão de estresse de restrição (BUSNARDO et al., 2010; CRESTANI et al., 2010).

3.11 Drogas

Topiramato (Topamax®, Janssen-Cilag, Brasil) foi dissolvido em água. O hidrocloreto de fenilefrina (antagonista seletivo para receptor α 1-adrenérgico; Sigma-Aldrich) e nitroprussiato de sódio desidratado (doador de óxido nítrico; Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em salina (0,9%). Quetamina e xilazina (Ceva Santé Animale® 12, São Paulo, Brasil) foram utilizadas como anestésicos. Flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Santo Amaro, Brasil) foi utilizada como analgésico.

3.12. Eutanásia

Ao fim dos protocolos experimentais, os animais foram transferidos para outra sala onde foram submetidos a eutanásia por decapitação em guilhotina.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA/UEL 100/2018; ANEXO).

3.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software Prism 6.0 (GraphPad Software, USA). A distribuição normal (teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste Levene's) das amostras foram checadas. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e os testes que apresentaram o valor de p menor do que 0,05 foram considerados significantes. Não houve comparação entre machos e fêmeas; apenas os dados do grupo CTR versus o grupo TOP para cada sexo foram avaliados. Para a análise dos parâmetros basais, análise espectral da variabilidade da FC e PAS, BEI e ganho no método da sequência, parâmetros das curvas lineares e não lineares do barorreflexo e os parâmetros $E_{máx}$ e ED_{50} da resposta hemodinâmica foi utilizado o teste t de Student's não pareado. A curva hemodinâmica e a resposta cardiovascular do estresse agudo por restrição foram analisadas pelo teste ANOVA de duas vias, via seguido pelo pós-teste de Tukey e as curvas da atividade do barorreflexo a partir da análise de regressão linear e não linear.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos tardios sobre parâmetros basais cardiovasculares de animais tratados com TOP durante a infância

A administração de TOP na infância não promoveu alterações à longo prazo sobre os parâmetros cardiovasculares basais, tais como, a PAM, FC, PAS e PAD quando comparados ao grupo CTR para ambos os sexos (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Parâmetros cardiovasculares basais de ratas adultas (a partir DPN85) tratadas com TOP na infância.

Parâmetros	CTR₁	TOP₁	p=	t=
<i>PAM (mmHg)</i>	100,7 ± 2,856	96,70 ± 2,205	0,2736	1,129
<i>FC (bpm)</i>	383,5 ± 12,97	391,0 ± 13,61	0,6999	0,3917
<i>PAS (mmHg)</i>	122,5 ± 3,631	118,5 ± 4,192	0,4916	0,7020
<i>PAD (mmHg)</i>	84,71 ± 3,561	80,81 ± 2,623	0,3797	0,9005

Valores: média ± erro padrão da média. CTR₁= ratas controle (tratadas com água); TOP₁= ratas tratadas com topiramato; PAM= pressão arterial média; FC= frequência cardíaca; PAS= pressão arterial sistólica; PAD=pressão arterial diastólica. CTR₁ (n= 9) vs TOP₁ (n= 11); teste t de Student's não pareado, p< 0,05.

Tabela 2 – Parâmetros cardiovasculares basais de ratos adultos (DPN120) tratados com TOP na infância.

Parâmetros	CTR₂	TOP₂	p=	t=
<i>PAM (mmHg)</i>	101,1 ± 1,809	100,3 ± 2,113	0,7674	0,2984
<i>FC (bpm)</i>	344,0 ± 11,75	354,5 ± 9,802	0,5092	0,6678
<i>PAS (mmHg)</i>	116,4 ± 2,571	114,8 ± 3,455	0,7053	0,3816
<i>PAD (mmHg)</i>	89,34 ± 2,336	88,09 ± 2,104	0,6989	0,3904

Valores: média ± erro padrão da média. CTR₂= ratos controle (tratado com água); TOP₂= ratos tratados com topiramato; PAM= pressão arterial média; FC= frequência cardíaca; PAS= pressão arterial sistólica; PAD=pressão arterial diastólica. CTR (n= 18) vs TOP (n= 15); teste t de Student's não pareado, p< 0,05.

4.2. Efeitos do tratamento com TOP durante a infância sobre a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da pressão arterial sistólica (VPS) de animais adultos

O tratamento com TOP durante a infância não foi capaz de promover alterações nas análises espectrais da VFC (tabelas 3 e 4) ou da VAPS (tabelas 5 e 6) dos animais na vida adulta quando comparados ao grupo CTR.

Tabela 3 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência da VFC de ratas tratadas com TOP durante a infância.

Componentes do				
VFC	CTR₁	TOP₁	p=	t=
SD (ms)	5,286 ± 0,5654	6,125 ± 1,025	0,5038	0,6876
RMSSD (ms)	4,906 ± 0,5297	5,854 ± 0,9095	0,4020	0,8664
LF abs (ms ²)	3,036 ± 0,7669	5,045 ± 1,493	0,2730	1,145
HF abs (ms ²)	7,163 ± 1,444	9,868 ± 2,091	0,3203	1,033
LF (nu)	28,57 ± 5,014	31 ± 4,606	0,7267	0,3572
HF (nu)	71,43 ± 5,014	64,25 ± 6,011	0,3839	0,9012
LF/HF	0,5100 ± 0,1556	0,5138 ± 0,1030	0,9839	0,0205

Valores: média ± EPM. CTR₁= ratas controle (tratadas com água); TOP₁= grupo topiramato. SD= desvio padrão da média; RMSSD= raiz quadrada das médias de sucessivas diferenças; LF abs = banda do espectro de baixa frequência em unidades absolutas; HF abs = banda do espectro de alta frequência em unidades absolutas; LF (nu) = banda do espectro de baixa frequência em unidades normalizadas; HF (nu) = banda do espectro de alta frequência em unidades normalizadas; HF/LF= relação entre o poder das bandas LF e HF. CTR (n=7) vs TOP (n=8), teste t de Student's não pareado, p< 0,05.

Tabela 4 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência da VFC de ratos tratados com TOP durante a infância.

Componentes do				
VFC	CTR₂	TOP₂	p=	t=
SD (ms)	6.771 ± 0.8890	8.253 ± 1.041	0.3064	1.065
RMSSD (ms)	6,131 ± 0,7184	7,923 ± 1,642	0,3596	0,9497
LF abs (ms ²)	4,083 ± 0,9161	3,873 ± 0,8055	0,8652	0,1732
HF abs (ms ²)	11,06 ± 2,090	11,54 ± 3,204	0,9050	0,1217
LF (nu)	27,14 ± 5,280	26,63 ± 4,777	0,9430	0,07291
HF (nu)	72,86 ± 5,280	73,38 ± 4,777	0,9430	0,07291
LF/HF	0,4814 ± 0,1371	0,4650 ± 0,1301	0,9321	0,08685

Valores: média ± EPM. CTR₂ = ratos controle (tratados com água); TOP₂ = grupo topiramato. SD = desvio padrão da média; RMSSD = raiz quadrada das médias de sucessivas diferenças; LF abs = banda do espectro de baixa frequência em unidades absolutas; HF abs = banda do espectro de alta frequência em unidades absolutas; LF (nu) = banda do espectro de baixa frequência em unidades normalizadas; HF (nu) = banda do espectro de alta frequência em unidades normalizadas; HF/LF = relação entre o poder das bandas LF e HF. CTR (n=7) vs TOP (n=8), teste t de Student's não pareado, p < 0,05.

Tabela 5 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência sobre a VPS de ratas tratadas com TOP na infância

Componentes da				
VAPS	CTR₁	TOP₁	p=	t=
SD (mmHg)	4,13 ± 0,4122	4,39 ± 0,5412	0,7073	0,3839
VLF abs (mmHg ²)	6,35 ± 0,9322	7,86 ± 1,457	0,4138	0,8442
LF abs (mmHg ²)	4,04 ± 1,018	4,59 ± 1,156	0,7315	0,3507

Valores: média ± EPM. CTR₁ = ratas controle (tratadas com água); TOP₁ = grupo topiramato. SD = desvio padrão da média; VLF abs = banda do espectro de muito baixa frequência em unidades absolutas; LF abs = bandas do espectro de baixa frequência; CTR₁ (n=7) vs TOP₁ (n=8), teste de t Student's não pareado, p < 0,05.

Tabela 6 – Componentes obtidos das análises de domínio do tempo e domínio da frequência sobre a VPS de ratos tratados com TOP na infância

Componentes da				
VAPS	CTR₂	TOP₂	p=	t=
SD (mmHg)	5.79 ± 0.7857	5.46 ± 0.736	0.7662	0.3037
VLF abs (mmHg ²)	9,18 ± 1,819	7,85 ± 1,598	0,5909	0,5512
LF abs (mmHg ²)	11,08 ± 4,053	11,04 ± 4,04	0,9948	0,006643

Valores: média ± EPM. CTR₂ = ratos controle (tratados com água); TOP₂ = grupo topiramato. SD= desvio padrão da média; VLF abs = banda do espectro de muito baixa frequência em unidades absolutas; LF abs = bandas do espectro de baixa frequência; CTR₂ (n=7) vs TOP₂ (n=8), teste de t Student's não pareado, p< 0,05.

4.3. Análise do barorreflexo espontâneo de animais adultos tratados com TOP durante a infância.

A administração de TOP durante a infância não alterou o barorreflexo espontâneo dos animais adultos, como observado no índice de efetividade do barorreflexo das ratas (BEI) (CTR₁: 0,7461 ± 0,1384; n = 8; TOP₁: 0,7640 ± 0,075; p= 0,9112), nas sequências “up” (CTR₁: 7,244 ± 0,8223; n = 8; TOP₁: 5,726 ± 0,702; p= 0,1902), nas sequências “down” (CTR₁: 7,309 ± 0,8427; n = 8; TOP₁: 6,512 ± 1,449; p= 0,6418) ou no ganho total (CTR₁: 7,286 ± 0,8265 ms/mmHg; n = 8; TOP₂: 6,655 ± 1,340; p= 0,6944) (Figura 1); e nos ratos (BEI) (CTR₂: 0,4243 ± 0,02924; n = 8; TOP₂: 0,3788 ± 0,03335; n = 8; p= 0,3224), nas sequências “up” (CTR₂: 9,603 ± 2,394; n = 8; TOP₂: 6,134 ± 1,510; n = 8; p= 0,2405), nas sequências “down” (CTR₂: 3,333 ± 0,7896; n = 8; TOP₂: 2,274 ± 0,4438; n = 8; p= 0,2622) ou no ganho total (CTR₂: 0,7493 ± 1,850 ms/mmHg; n = 8; TOP₂: 4,648 ± 1,002; n = 8; p= 0,1977) (Figura 2) quando comparados com o respectivo grupo CTR.

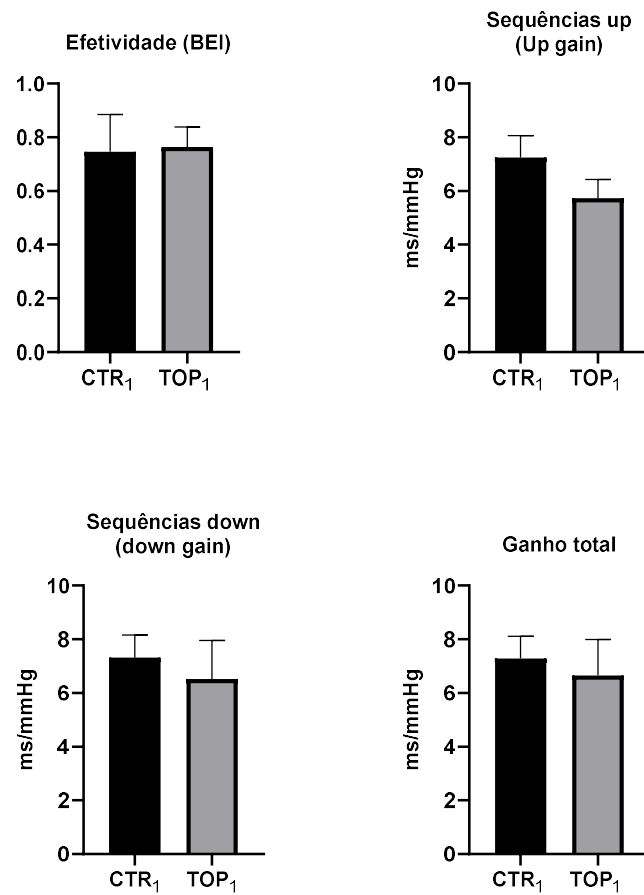


Figura 1: Análise do barorreflexo espontâneo de ratas adultas (a partir DPN85) após o tratamento com TOP na infância. CTR₁ = ratas controle (tratadas com água); TOP₁ = grupo topiramato. CTR₁; n= 8; TOP₁; n= 8. Valores: média ± EPM. Teste t de Student's não pareado; p< 0,05.

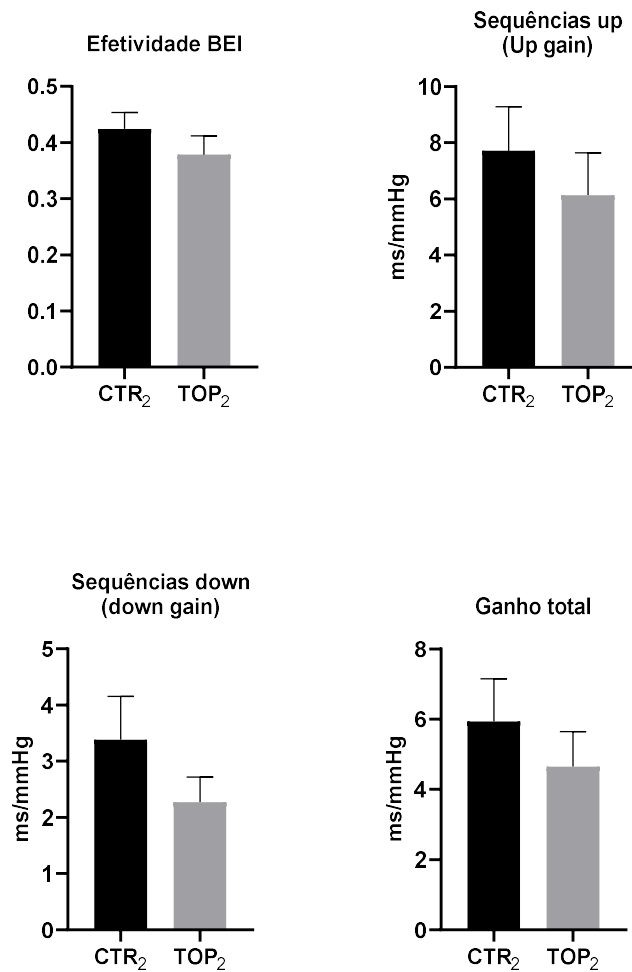


Figura 2: Análise do barorreflexo espontâneo de ratos adultos (DPN120) após o tratamento com TOP durante a infância. CTR₂ = ratos controle (tratados com água); TOP₂ = grupo topiramato. CTR₂; n= 8; TOP₂; n= 8. Valores: média ± EPM. Teste t de Student's não pareado; p< 0,05.

4.4. Avaliação dos efeitos tardios do tratamento com TOP durante a infância no controle barorreflexo da frequência cardíaca dos animais

A administração de TOP em ratas não promoveu alterações a longo prazo sobre o slope taquicárdico (slope CTR₁= -2,553 ± 0,6379, n= 7; slope TOP₁= -2,313 ± 0,7016; n= 6; p=0,8205, t=0,2324; figura 3.B), contudo houve elevação no slope bradicárdico das ratas TOP₁ (slope CTR₁= -2,164 ± 0,3034; n= 7; slope TOP₁= -3,221 ± 0,3639; n= 6; p=0,0458*; t= 2,251; Figura 3.B) quando comparado ao grupo CTR₁. Além disso, o tratamento com TOP não alterou a maioria dos parâmetros obtidos a partir da curva sigmoide barorreflexa, com exceção do ganho (Figura 3.A -Tabela 7). A análise de regressão linear das curvas mostrou um aumento no slope bradicárdico

em ratas tratadas com TOP na infância (r^2 0,66 e 0,81 para os grupos CTR1 e TOP1, $*p<0,05$)

Em contrapartida, em ratos a administração de TOP na infância não modificou o slope taquicárdico (slope CTR₂= $-2,617 \pm 0,3469$, n= 13; slope TOP₂= $-2,834 \pm 0,3625$; n= 13; p=0,6519, t=0,4569; figura 4.D), o slope bradicárdico (slope CTR₂= $-2,270 \pm 0,3408$; n= 13; slope TOP₂= $-2,569 \pm 0,4273$; n= 13; p=0,589; t= 0,547; figura 4.D) e os parâmetros obtidos a partir da curva sigmoide (Figura 4.C – Tabela 7) quando comparados ao grupo CTR₂. Em ratos, a análise de regressão linear das curvas não mostrou alterações.

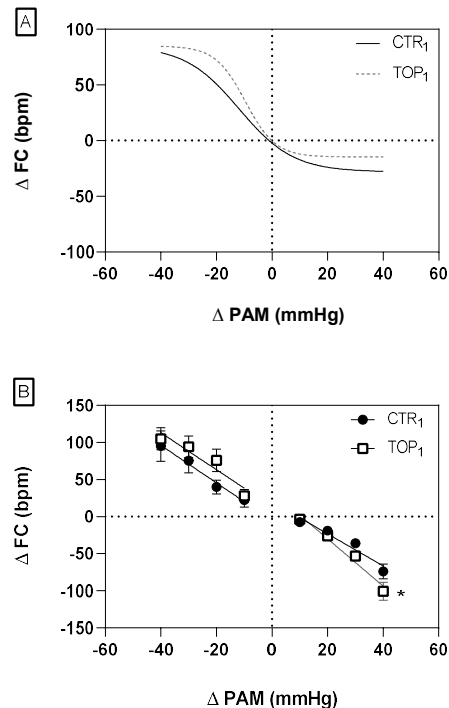


Figura 3. Curvas sigmoide e regressões lineares do baroreflexo de ratas pertencentes aos grupos controle (CTR₁) e topiramato (TOP₁). Círculos e quadrados representam a média e barras o EPM. (A) Curva sigmoide barorreflexa relacionando os valores das variações de pressão arterial média (ΔPAM) e variações da resposta de frequência cardíaca (ΔFC) entre os grupos CTR₁ ($r^2= 0,703$; linha preta) e TOP₁ ($r^2=0,675$; linha cinza tracejada). (B) Regressão linear das curvas barorreflexas relacionando ΔPAM e as respostas ΔFC dos grupos CTR₁ (círculos pretos) e TOP₁ (quadrados com delimitações pretas). A correlação entre os valores das curvas bradicárdicas foram de 0,66 e 0,81 para os grupos CTR₁ e TOP₁, respectivamente; correlação dos valores de r^2 curvas taquicárdicas foram de 0,38 e 0,43, respectivamente. $*p<0,05$.

Tabela 7. Parâmetros derivados da curva sigmoide do barorreflexo de ratas adultas após administração de topiramato na infância.

Parâmetros da curva sigmoide	CTR₁	TOP₁	p=	t=
<i>Ganho (bpm/mmHg)</i>	-1,427 ± 0,1582	-2,402 ± 0,2247	0,0033*	3,662
<i>P1 (bpm)</i>	-73,84 ± 10,13	-100,7 ± 12,25	0,1163	1,705
<i>P2 (bpm)</i>	95,02 ± 37,50	101,8 ± 43,98	0,8110	0,245
<i>Range FC (bpm)</i>	168,9 ± 24,75	205,5 ± 18,65	0,2751	1,149

Valores: média ± EPM. CTR₁ = ratas controle (tratadas com água); TOP₁ = grupo topiramato. P1= platô inferior; P2= platô superior; Range FC= diferença entre os valores do platô superior com o inferior; p < 0,05; CTR (n= 6) vs TOP (n= 7), teste t de Student's não pareado. * p < 0,05.

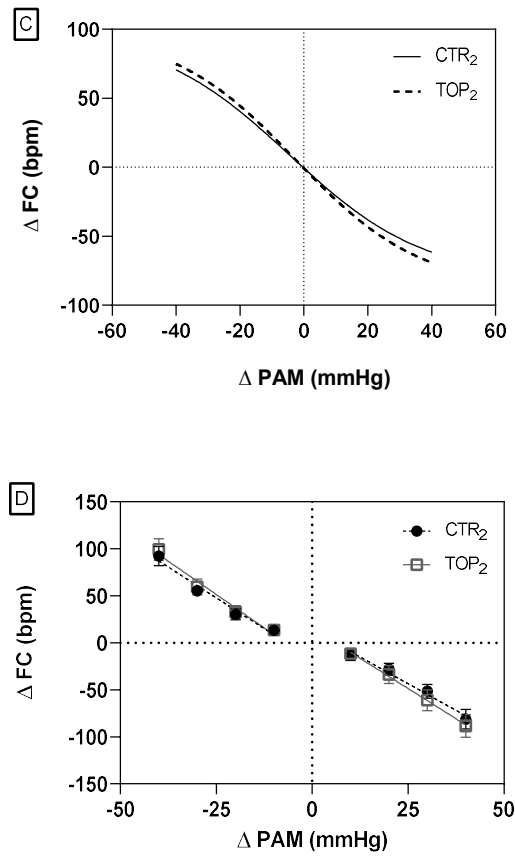


Figura 4. Curvas sigmoide e regressões lineares do barorreflexo de ratos pertencentes aos grupos controle (CTR₂) e topiramato (TOP₂). Círculos e quadrados representam a média e barras o EPM. (C) Curva sigmoide barorreflexa relacionando os valores das variações de pressão arterial média (ΔPAM) e variações da resposta de frequência cardíaca (ΔFC) entre os grupos CTR₂ ($r^2= 0,769$; linha preta) e TOP₂ ($r^2=0,725$; linha preta tracejada). (D) Regressão linear das curvas barorreflexas relacionando ΔPAM e as respostas ΔFC dos grupos CTR₂ (círculos pretos) e TOP₂ (quadrados com delimitações cinzas). A correlação entre os valores das curvas bradicárdicas foram de 0,47 e 0,42 para os grupos CTR₂ e TOP₂, respectivamente; correlação dos valores de r^2 curvas taquicárdicas foram de 0,59 e 0,55, respectivamente.

Tabela 8. Parâmetros derivados da curva sigmoide do barorreflexo de ratos adultos dos grupos controle (CTR₂) e topiramato (TOP₂).

<i>Parâmetros da curva sigmoide</i>	<i>CTR₂</i>	<i>TOP₂</i>	<i>p=</i>	<i>t=</i>
<i>Ganho (bpm/mmHg)</i>	-1,406 ± 0,1370	-1,479 ± 0,1479	0,7204	0,3621
<i>P1 (bpm)</i>	-81,14 ± 37,50	-88,17 ± 43,98	0,9204	0,1217
<i>P2 (bpm)</i>	92,19 ± 37,11	99,21 ± 41,40	0,9006	0,1262
<i>Range FC (bpm)</i>	173,5 ± 15,52	187,5 ± 16,08	0,5353	0,6290

Valores: média ± EPM. CTR₂ = ratos controle (tratados com água); TOP₂ = grupo topiramato. P1= platô inferior; P2= platô superior; Range FC= diferença entre os valores do platô superior com o inferior. p < 0,05; CTR (n= 13) vs TOP (n= 13), teste t de Student's não pareado.

4.5. Resposta hemodinâmica da infusão de drogas vasoativas de animais adultos tratados com TOP durante a infância

A infusão intravenosa de fenilefrina (Phe) ocasionou uma resposta pressora dose-dependente, tanto nos grupos CTR₁ e CTR₂, quanto nos grupos TOP₁ e TOP₂, sem apresentar diferenças estatísticas quando comparados os grupos CTR₁ e TOP₁ ou CTR₂ e TOP₂; (Curva ratas: Interação: p= 0,6748; F_(10, 110) = 0,7514; Concentração: p= < 0,0001, F_(10, 110) = 85,38; Tratamento: p= 0,7443; F_(1,11) = 0,1119. CTR₁; n= 7. TOP₁; n= 6) (Emáx: CTR₁: 64,30 ± 7,353 mmHg, n=7; TOP₁: 56,06 ± 2,913 mmHg, n= 6; p= 0,3493; t= 0,9775) (EC50: CTR₁: 0,5345 ± 0,0367 µg/kg, n= 7; TOP₁: 0,5337 ± 0,0168 µg/kg, n= 6; p= 0,9854; t= 0,0187) (Figura 5.A).(Curva ratas: Interação: p= 0,5740; F_(10, 220) = 0,8574; Concentração: p= < 0,0001, F_(10, 220) = 85,61; Tratamento: p= 0,8139 F_(1, 22) = 0,05677. CTR₂; n= 12. TOP₂; n= 12). (Emáx: CTR₂: 67,66 ± 30,34 mmHg, n=12; TOP₂: 44,37 ± 3,965 mmHg, n= 12; p= 0,4546; t= 0,7612) (EC50: CTR₂: 1,737 ± 0,2065 µg/kg, n= 12; TOP₂: 1,534 ± 0,03551 µg/kg, n= 12; p= 0,3432; t= 0,969) (Figura 6.C).

A infusão de NPS promoveu uma resposta dose-dependente depressora nos animais sem apresentar diferenças estatísticas significativas quando comparados os grupos CTR₁ e TOP₁ ou CTR₂ e TOP₂. (Curva ratas: Interação: p= 0,9988; F_(10, 110) =

0,1487; Concentração: $p = < 0,0001$, $F_{(10,110)} = 73,21$; Tratamento: $p = 0,5045$, $F_{(1,11)} = 0,476$. CTR₂; $n = 6$. TOP₂; $n = 7$). (Emáx: CTR₂: $-59,15 \pm 6,013$ mmHg, $n = 6$; TOP₂: $-62,42 \pm 8,26$ mmHg, $n = 7$; $p = 0,7502$; $t = 0,356$) (EC50: CTR₂: $0,929 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 6$; TOP₂: $0,905 \pm 0,056$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 7$; $p = 0,7281$; $t = 0,3566$) (Figura 5.B). (Curva ratos: Interação: $p = 0,7585$; $F_{(10,220)} = 0,6627$; Concentração: $p = < 0,0001$, $F_{(2,271)} = 103,1$; Tratamento: $p = 0,2855$ $F_{(1,22)} = 1,198$. CTR₂; $n = 12$. TOP₂; $n = 12$). (Emáx: CTR₂: $-68,82 \pm 6,88$ mmHg, $n = 12$; TOP₂: $-67,62 \pm 5,950$ mmHg, $n = 12$; $p = 0,9135$; $t = 0,1099$) (EC50: CTR₂: $2,053 \pm 0,06$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 12$; TOP₂: $1,875 \pm 0,06$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 8$; $p = 0,07$; $t = 0,1934$) (Figura 6.D).

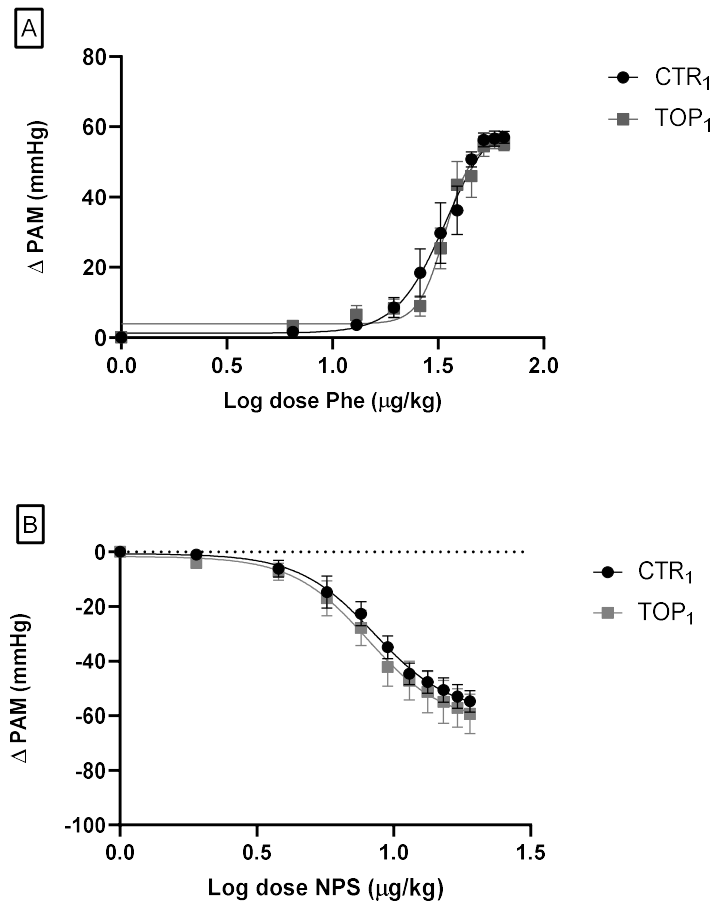


Figura 5. Alterações nas variações da pressão arterial média (Δ PAM) ocasionadas pelo aumento da concentração de fenilefrina (Phe – figura 5.A) ou de nitroprussiato de sódio (NPS – Figura 5.B). Círculos e quadrados representam a média e barras o EPM. Comparação entre ratos do grupo controle (CTR₁ - círculos e linhas pretas; $n = 6$) e do grupo topiramato (TOP₁ – quadrados e linhas cinzas; $n = 7$).

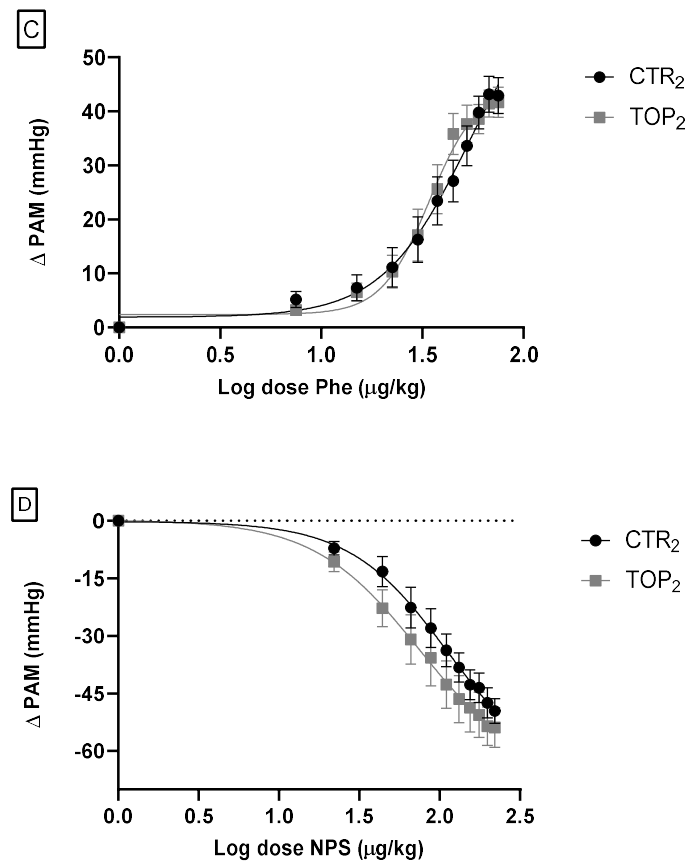


Figura 6. Alterações nas variações da pressão arterial média (Δ PAM) ocasionadas pelo aumento da concentração de fenilefrina (Phe – figura 6.C) ou de nitroprussiato de sódio (NPS – Figura 6.D). Círculos e quadrados representam a média e barras o EPM. Comparação entre ratos do grupo controle (CTR₂ - círculos e linhas pretas; n=12) e do grupo topiramato (TOP₂ – quadrados e linhas cinzas; n=12).

4.6. Efeitos a longo prazo da administração de TOP durante a infância sobre as respostas cardiovasculares de animais adultos submetidos ao estresse de restrição agudo.

A administração de TOP na infância não foi capaz de alterar a resposta pressora (Tempo: PAM; $p < 0,0001$, $F_{(25,400)} = 13,25$; Tratamento: PAM; $p = 0,8469$, $F_{(1,16)} = 0,03851$ – Interação: PAM: $p = 0,9690$, $F_{(25,400)} = 0,5359$; n= CTR₁: 8, TOP₁: 10) (Figura 7.A) e taquicárdica (Tempo: PAM; $p < 0,0001$, $F_{(25,400)} = 11,74$; Tratamento: PAM; $p = 0,7536$, $F_{(1,16)} = 0,1019$ – Interação: PAM: $p = 0,7501$, $F_{(25,400)} = 0,7945$; n= CTR₁: 8, TOP₁: 10) (Figura 7.B) das ratas adultas submetidas ao estresse agudo de restrição agudo.

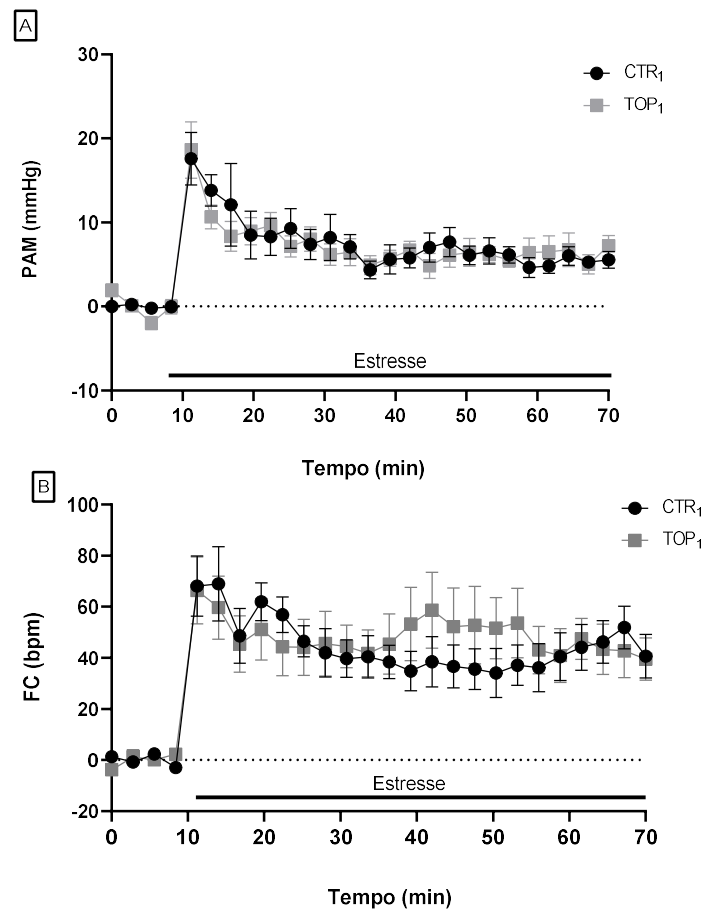


Figura 7. Análise temporal das variações de pressão arterial média (Δ PAM) (Figura 7.A) e frequência cardíaca (Δ FC) de ratas adultas (Figura 7.B) com duração de 60 minutos de estresse de restrição agudo. Círculos e quadrados representam a média e barras o EPM. Grupo controle (CTR₁; círculos e linhas pretas; n=8); grupo topiramato (TOP₁; quadrados e linhas cinzas; n= 10).

Similarmente, o tratamento com TOP durante a infância não levou a alterações da resposta pressora (Tempo: PAM; $p < 0,0001$, $F_{(25,550)} = 10,83$; Tratamento: PAM; $p = 0,6787$, $F_{(1,22)} = 0,1763$ – Interação: PAM: $p = 0,8215$, $F_{(25,550)} = 0,7361$; n= CTR₂: 13, TOP₂: 11) (Figura 8.C) ou taquicárdica (Tempo: PAM; $p < 0,0001$, $F_{(25,550)} = 9,612$; Tratamento: PAM; $p = 0,9446$, $F_{(1,22)} = 0,004131$ – Interação: PAM: $p = 0,8548$, $F_{(25,550)} = 0,7047$; n= CTR₂: 13, TOP₂: 11) causada pelo estresse de restrição agudo em ratos adultos (Figura 8.D)

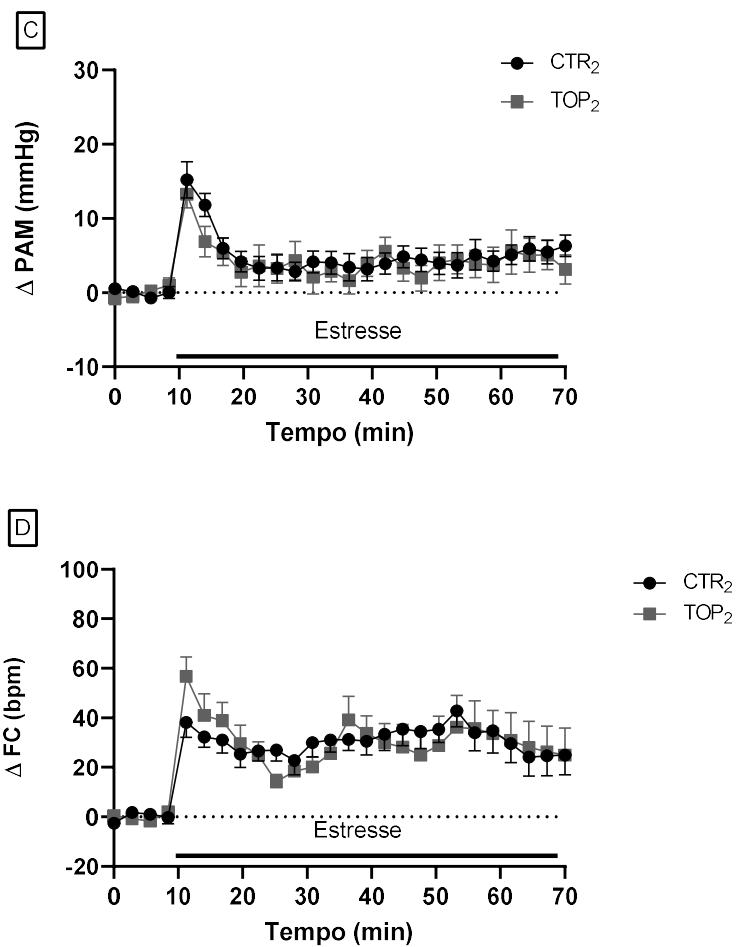


Figura 8. Análise temporal das variações de pressão arterial média (Δ PAM) (Figura 8.C) e frequência cardíaca (Δ FC) de ratos adultos (Figura 8.D) com duração de 60 minutos de estresse de restrição agudo. Círculos e quadrados representam a média e barras o EPM. Grupo controle (CTR₂; círculos e linhas pretas; n=8); grupo topiramato (TOP₂; quadrados e linhas cinzas; n= 10).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou investigar os possíveis impactos à longo prazo da administração de TOP durante a infância sobre o controle da função cardiovascular de ratas e ratos. Já está estabelecido na literatura que a exposição a diversos agentes estressores em fases consideradas críticas para o desenvolvimento, como o período intrauterino, a infância e a adolescência, pode impactar de maneira negativa a saúde dos indivíduos tardiamente (BARKER et al., 1993; ISGANAITIS, 2019). Adicionalmente, diversos estudos têm demonstrado efeitos deletérios sobre a neurogênese e proliferação neuronal, resultantes da administração de drogas antiepilépticas durante a infância, como o TOP, fator importante a ser considerado, uma vez que, o controle das respostas cardiovasculares, tanto em repouso, quanto no estresse, é realizado através da integração com núcleos do sistema nervoso central (BITTIGAU; SIFRINGER; IKONOMIDOU, 2003; SHI et al., 2010; DUMPNEY, 2016).

Deste modo, verificamos, em um contexto de programação do desenvolvimento, que a administração de TOP não esteve correlacionada com prejuízos a longo prazo sobre os parâmetros basais cardiovasculares, no controle autonômico cardíaco em repouso, nas variabilidades PAS e FC, na resposta hemodinâmica a drogas vasoativas ou ainda nas respostas cardiovasculares frente ao estresse de restrição agudo em ratas e ratos.

A administração de TOP na infância não promoveu alterações de PAM, FC, PAS ou PAD de ratas e ratos na vida adulta. Nossos dados corroboram com resultados previamente apontados na literatura, uma vez que, o uso de AEDs, como carbamazepina ou fenitoína em crianças, não levou a alterações de PAS e PAD após o tratamento (SHANKYAN et al., 2013). Além disso, a administração de TOP em ratas obesas (ALBO-ELMATTY & ZAITONE, 2011) ou porcos em modelo de hipóxia por injúria cerebral (GALINKIN et al., 2004) ou em humanos saudáveis (CLARK et al., 2013) também não modificou parâmetros cardiovasculares basais. Contudo, a maioria dos trabalhos, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, realizaram a administração da droga e avaliação cardiovascular na vida adulta e reportaram a ausência de prejuízos da administração de AEDs sobre parâmetros basais apenas a curto prazo. Assim, pela primeira vez, apontamos a ausência de efeitos tardios em parâmetros cardiovasculares basais após o uso de TOP durante infância.

Ademais, trabalhos previamente realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a ausência de efeitos sobre os parâmetros cardiovasculares basais (PAM, FC, PAS e PAD) ao fim do tratamento (DPN50) e na vida adulta (DPN90 e DPN120) em animais tratados com TOP durante a adolescência, tanto em machos (MOURA, 2019) quanto em fêmeas (SILVA, 2021), reforçando a segurança a curto e longo prazo após o uso do TOP sobre tais parâmetros.

A variabilidade da FC é considerada um indicador preditivo da atividade autonômica cardíaca consistindo nas variações dos intervalos de batimento e das respostas cardiovasculares frente à diferentes estímulos ambientais, bem como o balanço simpato-vagal sobre o nodo sinusal cardíaco (RAJENDRA ACHARYA et al., 2006). Aumentos na VPS e VFC indicam um controle autonômico eficiente sobre os vasos sanguíneos e coração, respectivamente, enquanto as reduções desses parâmetros apontam para prejuízos do controle autonômico cardiovascular e elevado risco para o desenvolvimento de doenças, como arritmias (VANDERLEI et al., 2009). Adicionalmente, alterações dos componentes VLF e LF da VPS estão correlacionadas com ineficiente controle autonômico cardiovascular (SPALLONE et al., 2018).

A administração de AEDs causou uma tendência a elevação da atividade simpática cardíaca, observada pelo aumento do componente LF em indivíduos epiléticos (LOTUFO et al., 2018). Além disso, também ocorre o decréscimo do componente VLF, assim como o aumento da razão LF/HF, em pacientes epiléticos tratados com AEDs comparativamente ao grupo não medicado (YU et al., 2018). Em contrapartida, investigações anteriores demonstraram que a farmacoterapia com AEDs em crianças epiléticas foi responsável pela melhora da atividade autonômica parassimpática cardíaca observadas a partir de índices, como RMSSD e HF (HALLIOGLU et al., 2008). Contudo, no presente trabalho, a administração de TOP durante a infância, em ratas e ratos, não levou a alterações dos índices de VPS e VFC na vida adulta demonstrando um uso seguro durante a infância, bem como a ausência de prejuízos a longo prazo no controle autonômico cardíaco. Ademais, uma possibilidade é que as flutuações das variabilidades observadas na literatura possam estar relacionadas à patologia de base, como a epilepsia, e não se aplicariam ao nosso modelo experimental, uma vez que a administração de TOP ocorreu em animais saudáveis.

O barorreflexo integra as alterações periféricas de PAM a variações de FC momento a momento com auxílio dos barorreceptores presentes no arco aórtico e no seio carotídeo que, através de vias aferentes, comunicam-se com núcleos encefálicos, como núcleo do trato solitário, bulbo ventrolateral rostral e caudal, promovendo as respostas barorreflexas cardíacas (DAMPNEY et al., 2002; DAMPNEY, 2016). Alterações da sensibilidade barorreflexa têm sido reportadas como um marcador precoce de disfunções autonômicas relacionadas à falência cardíaca (WATSO et al., 2017).

Diante disso, o método da sequência é considerado uma metodologia de mensuração sensível para a detecção e avaliação das variações espontâneas de PA e alterações de FC correspondentes a partir da verificação do número de vezes em que o barorreflexo foi efetivo no controle da FC frente as flutuações de PA momento a momento (DI RENZO et al., 2001). Assim, os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que a administração de TOP na infância não causou modificações na programação do controle autonômico cardiovascular em repouso sugerindo um controle eficiente do barorreflexo espontâneo em repouso, tanto em ratos quanto em ratas.

A atividade do barorreflexo foi testada ainda a partir do método de infusão de drogas vasoativas, o qual provoca uma maior resposta reflexa devido a modificações intensas da PA (HEAD; MCCARTY, 1987; RESSTEL; CORRÊA, 2006). Em ratos adultos, a infusão de Phe ou NPS não modificou as respostas barorreflexas dos animais tratados com TOP na infância. No entanto, a administração de TOP em ratas, no mesmo período, aumentou o slope bradicárdico e o ganho barorreflexo. As modificações nas Δ PAM promoveram uma resposta mais rápida na Δ FC de ratas TOP₁ em relação ao grupo CTR₁, contudo, sem uma maior resposta bradicárdica, já que não houve aumento significativo no valor do platô inferior (P1).

Reduções no ganho do barorreflexo são correlacionadas com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão, infarto do miocárdio e falência cardíaca (MCCUBIN; GREEN; PAGE, 1956; LA ROVERE; PINNA; RACZAK, 2008).

Já se tem esclarecido que o ganho barorreflexo apresenta flutuações durante todo o ciclo estral em ratas na idade reprodutiva, atingindo um pico na fase de pró-

estrogeno, resultante do aumento da liberação de estrógenos (BROOKS et al., 2012). Entretanto, acreditamos que a elevação do ganho barorreflexo tardiamente em fêmeas não esteve relacionada com aumento na liberação e/ou sinalização estrogênica sobre o sistema nervoso central, uma vez que, nossas ratas foram submetidas aos protocolos de avaliação cardiovasculares 24 horas após o procedimento cirúrgico que ocorria na fase de estro. Ademais, a duração do pico estrogênico observado na fase de pró-estro apresenta duração de apenas 1 dia não atingindo o dia das obtenções dos nossos registros cardiovasculares (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). No entanto, o fato de ratos adultos não apresentarem aumento do ganho na avaliação da atividade barorreflexa não desconsidera totalmente a participação concomitante dos estrógenos sobre a modulação do ganho barorreflexo em ratas adultas. Assim, outros estudos serão necessários para esclarecer tais hipóteses.

Outra possível explicação para o aumento do ganho barorreflexo em ratas seria o metabolismo da insulina. Estudos prévios mostraram que a farmacoterapia com TOP, em diferentes condições, como a obesidade (ALBO-ELMATTY & ZAITONE, 2011; ALLISON et al., 2012; GARVEY et al., 2014), epilepsia (OZCELIK et al., 2014) e esquizofrenia (ZHENG et al al., 2016) está relacionada com melhorias no metabolismo da glicose devido ao aumento da sensibilidade à insulina. Além disso, a infusão intracerebroventricular de insulina em ratas prenhes foi responsável pelo aumento da sensibilidade barorreflexa, verificada pelo aumento do ganho (AZAR; BROOKS, 2012).

Em humanos saudáveis, testes responsáveis pelo estímulo à secreção de insulina, como o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico e o teste de tolerância à refeição mista, foram responsáveis pela acentuação do ganho da atividade simpática do nervo lombar (YOUNG et al., 2010). Assim, esses dados também apontam para efeitos potencializadores da insulina sobre a atividade barorreflexa de indivíduos saudáveis. Além disso, a microinjeção de tolbutamida, um inibidor específico de canais de K^+ dependentes de ATP (K^+_{ATP}), no ventrículo lateral de ratos previamente tratados com TOP promoveu reversão da sensibilidade à insulina sobre o tecido cardíaco e tecido adiposo resultantes do tratamento (COOMANS et al., 2013). Deste modo, sugere-se que a melhora da sensibilidade a insulina após o tratamento com TOP envolva ativação de canais de K^+_{ATP} no sistema nervoso central.

A insulina exerce efeitos centrais sobre o controle do barorreflexo, uma vez que, é transportada através da barreira hematoencefálica e promove excitação do núcleo arqueado que, por conseguinte, envia estímulos para o núcleo paraventricular do hipotálamo, que por último, é responsável pela excitação dos neurônios do bulbo ventrolateral rostral levando a maior ativação simpática e aumento do ganho barorreflexo (BANKS, 2004; CASSAGLIA et al., 2011).

A administração de TOP em ratas Zucker esteve correlacionada com alterações a curto prazo do perfil da expressão de RNAm no hipotálamo, fígado e tecido adiposo branco, além do decréscimo na expressão do RNAm de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos, como acetil coA carboxilase, auxiliando na redução plasmática de triglicerídeos (LIANG et al., 2006), evidenciando assim, possíveis efeitos epigenéticos da administração do TOP sobre a consequente melhoria da resistência à insulina. Além disso, também já se tem estabelecido o efeito central da insulina sobre o aumento do ganho barorreflexo em indivíduos saudáveis (YOUNG et al., 2010).

Diante disso, uma hipótese é que o aumento do ganho barorreflexo em ratas TOP₁ está relacionado com alterações a longo prazo da sensibilidade do sistema nervoso central à insulina decorrentes da farmacoterapia com TOP durante a infância. Entretanto, ensaios futuros ainda são necessários para responder a essa hipótese.

A infusão de drogas vasoativas em ratas e ratos adultos não promoveu alterações nas respostas pressoras ou depressoras por Phe e NPS, respectivamente, quando comparados os animais dos grupos. Em contrapartida, dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo, demonstraram aumento da resposta contrátil à Phe em anéis de aorta de ratos e ratas adultos tratados com TOP durante a infância (DPN16 – DPN28) (VIDIGAL, 2022).

Em machos, a hiperreatividade à Phe foi correlacionada com o aumento da expressão da NOX-2, um subtipo de NADPH oxidase, bem como de sua subunidade regulatória, a p47phox, promovendo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido. Além disso, ratos TOP exibiram aumento da espessura da artéria aorta, comparativamente ao grupo CTR. Já em fêmeas, a hiperreatividade da aorta à Phe reverteu-se através da inibição da COX-2 sugerindo

participação desta enzima na produção/estimulação de fatores vasoconstritores em ratas tardiamente (VIDIGAL, 2022).

Já se tem estabelecido que alterações metabólicas como, aumento da produção de espécies reativas de O₂ e espessamento de vasos, podem comprometer a modulação do tônus vascular favorecendo a ação de fatores contráteis sobre a vasculatura e hipertensão (DANIELS; GREER, 2008; DJURIC et al., 2018), e que a administração de AEDs em indivíduos epiléticos (CHUANG et al., 2011), incluindo o TOP (EL-FARAHATY et al., 2015), está correlacionada com tais alterações após o tratamento.

Contudo, o presente trabalho foi pioneiro em demonstrar que a administração de TOP durante a infância, não acarreta alterações da resposta hemodinâmica em ratos e ratas na vida adulta representando uma segurança a longo prazo da administração de TOP durante a infância sobre a modulação autonômica nos vasos sanguíneos. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar possíveis influências das alterações metabólicas obtidas em ratos e ratas na vida adulta sobre a modulação autonômica vascular após o tratamento com o TOP durante a infância.

O estresse agudo de restrição é estabelecido na literatura como um evento psicogênico e inescapável capaz de evocar respostas endócrinas e autonômicas, como o aumento da liberação de corticosterona e norepinefrina, envolvidos na modulação da resposta pressora e cardíaca (LODHI et al., 2014), além do ajuste do barorreflexo para os valores de PAM mais acentuados (CRESTANI et al., 2010). Já se tem estabelecido que a modulação das magnitudes das respostas cardiovasculares durante o estresse de restrição se dá por diversos núcleos encefálicos em ratos, tais como, córtex insular (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010), núcleo leito da estria terminal (CRESTANI et al., 2009), núcleo paraventricular do hipotálamo (TAVARES; PELOSI; CORRÊA, 2008; BUSNARDO et al., 2010), córtex pré-frontal medial (TAVARES; CORRÊA, 2006) e hipocampo (HARTMANN et al., 2019).

A administração de AEDs, como fenobarbital, em ratos e durante a infância, foi responsável pela redução significativa da neurogênese e da proliferação neuronal de áreas envolvidas com o processamento de estímulos emocionais aversivos, bem como da regulação das respostas cardiovasculares durante estresse de restrição, como o hipocampo (CHEN et al., 2009; HARTMANN et al., 2019). Ainda na infância,

a farmacoterapia com AEDs em ratos, resultou em neurodegeneração apoptótica generalizada, redução da expressão do RNAm de neurotrofina 3 e do fator neurotrófico derivado do cérebro em ratos (BDNF) (BITTIGAU; SIFRINGER; IKONOMIDOU, 2003). O mesmo grupo relacionou tais achados com a diminuição de mediadores de sinalização intracelular, como as proteínas quinase B (AKT) e quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Adicionalmente, Stefovská e colaboradores sugeriram que potencialização de GABA_A, após a administração de fenobarbital em ratos entre os DPN 6 e DPN 10, esteve correlacionada com prejuízos na neurogênese, devido à redução da proliferação neuronal (BITTIGAU; SIFRINGER; IKONOMIDOU, 2003).

Por fim, a administração de TOP durante a infância, também foi capaz de levar à redução da expressão gênica do RNAm de BDNF e neurotrofina 3, ambos envolvidos com crescimento dendrítico e diferenciação neuronal encefálica (SHI et al., 2010), apontando assim para riscos no neurodesenvolvimento de áreas encefálicas envolvidas no controle das respostas cardiovasculares no estresse, a partir do uso de AEDs na infância em ratos. No entanto, o presente trabalho foi pioneiro em evidenciar que a administração de TOP durante a infância, em ratas e ratos, não causou alterações tardias nas variações das respostas pressoras (Δ PAM) ou taquicárdicas (Δ FC) frente ao estresse de restrição agudo. Diante disso, nossos dados apontam para segurança do uso desse AEDs, especificamente do TOP, no controle central das respostas cardiovasculares tardiamente também em condições de estresse.

6. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho podemos concluir que a administração de TOP, durante a infância apresenta um perfil seguro em um contexto de programação de desenvolvimento de doenças no sistema cardiovascular, uma vez que não prejudicou a função cardiovascular a longo prazo. O uso do TOP na infância não promoveu alterações de PAM, FC, PAS e PAD, bem como na VAPS e VFC, no barorreflexo espontâneo, na resposta hemodinâmica a drogas vasoativas, nas respostas pressoras e taquicárdicas frente ao estresse de restrição em ratas e ratos adultos. Em relação a atividade do barorreflexo, verificou-se uma elevação do ganho barorreflexo a partir da infusão intravenosa de Phe somente nas fêmeas. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos envolvidos no aumento do ganho barorreflexo de ratas adultas tratadas com TOP na infância.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBO-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.
- AHIR, B. K.; PRATTEN, M. K. Developmental cardiotoxicity effects of four commonly used antiepileptic drugs in embryonic chick heart micromass culture and embryonic stem cell culture systems. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 5, p. 948–960, 2014.
- ALLISON, D. B. *et al.* Controlled-Release Phentermine/Topiramate in Severely Obese Adults: A Randomized Controlled Trial (EQUIP). **Obesity**, v. 20, n. 2, p. 330–342, 2012.
- ALVES, F.H.F.; CRESTANI, C. C.; CORRÊA, F. M.A. The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Brain Research**, v. 1333, p. 57–63, 2010.
- AURLIEN, D.; TAUBØLL, E.; GJERSTAD, L. Lamotrigine in idiopathic epilepsy? increased risk of cardiac death? **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 115, n. 3, p. 199–203, 2007.
- AZAR, A. S.; BROOKS, V. L. Impaired Baroreflex Gain During Pregnancy in Conscious Rats: Role of Brain Insulin. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 283–288, 2011.
- BANKS, W. A. The source of cerebral insulin. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, n. 1–3, p. 5–12, 2004.
- BARKER, D J; OSMOND, C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 40, n. 1, p. 37–44, 1986.
- BARKER, D. J. *et al.* Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet (London, England)**, v. 341, n. 8850, p. 938–941, 1993.
- BARRETO, G. C.; *et al.* Impact of malnutrition on cardiac autonomic modulation in children. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 6, p. 638–644, 2016.
- BITTIGAU, P.; SIFRINGER, M.; IKONOMIDOU, C. Antiepileptic Drugs and Apoptosis in the Developing Brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 993, n. 1, p. 103–114, 2003.
- BROOKS, V. L., *et al.* Baroreflex Function in Females: Changes With the Reproductive Cycle and Pregnancy. **Gender Medicine**, v. 9, n. 2, p. 61–67, 2012.

- BUSNARDO, C. *et al.* Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 158, n. 1–2, p. 51–57, 2010.
- CASSAGLIA, P. A.; HERMES, S. M.; AICHER, S. A., *et al.* Insulin acts in the arcuate nucleus to increase lumbar sympathetic nerve activity and baroreflex function in rats: Insulin acts in the arcuate nucleus to increase LSNA baroreflex gain. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 7, p. 1643–1662, 2011.
- CELIK, S. F.; ÇELIK, E. Subclinical atherosclerosis and impaired cardiac autonomic control in pediatric patients with Vitamin B12 deficiency. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 21, n. 8, p. 1012–1016, 2018.
- CHEN, J. *et al.* Long-term antiepileptic drug administration during early life inhibits hippocampal neurogenesis in the developing brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 13, p. 2898–2907, 2009.
- CHENG, L. S.; PRASAD, A. N.; RIEDER, M. J. Relationship between antiepileptic drugs and biological markers affecting long-term cardiovascular function in children and adolescents. **The Canadian Journal of Clinical Pharmacology = Journal Canadien De Pharmacologie Clinique**, v. 17, n. 1, p. e5-46, 2010.
- CHUANG, Y.C. *et al.* Effects of long-term antiepileptic drug monotherapy on vascular risk factors and atherosclerosis: Antiepileptic Drugs and Atherosclerosis. **Epilepsia**, v. 53, n. 1, p. 120–128, 2012.
- CLARK, A. M. *et al.* Intravenous topiramate: Comparison of pharmacokinetics and safety with the oral formulation in healthy volunteers. **Epilepsia**, v. 54, n. 6, p. 1099–1105, 2013.
- COOMANS, C P; GEERLING, J J; VAN DEN BERG, S A A; *et al.* The insulin sensitizing effect of topiramate involves K_{ATP} channel activation in the central nervous system: Topiramate improves insulin sensitivity via CNS. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 4, p. 908–918, 2013.
- CRESTANI, C. C. *et al.* Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. *European journal of pharmacology*, v. 670, n. 2–3, p. 527–33, 30 nov. 2011.
- CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H. F.; TAVARES, R. F.; *et al.* Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 3, p. 268–278, 2009.

- CRESTANI, C. C.; TAVARES, R. F.; ALVES, F. H. F.; *et al.* Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress**, v. 13, n. 1, p. 61–72, 2010.
- DAMPNEY, R. A. L. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Advances in Physiology Education**, v. 40, n. 3, p. 283–296, 2016.
- DAMPNEY, R., *et al.* Central Mechanisms Underlying Short- And Long-Term Regulation of The Cardiovascular System. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 261–268, 2002.
- DANIELS, S. R.; GREER, F. R. Lipid Screening and Cardiovascular Health in Childhood. **PEDIATRICS**, v. 122, n. 1, p. 198–208, 2008.
- DANIELSSON, B. R. *et al.* Phenytoin and phenobarbital inhibit human HERG potassium channels. **Epilepsy Research**, v. 55, n. 1–2, p. 147–157, 2003.
- DI RIENZO, M., *et al.* Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 3, p. R744–R751, 2001.
- DJURIC, D. *et al.* Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 96, n. 10, p. 991–1003, 2018.
- DODGSON, S. J.; SHANK, R. P.; MARYANOFF, B. E. Topiramate as an Inhibitor of Carbonic Anhydrase Isoenzymes. **Epilepsia**, v. 41, n. s5, p. S35–S39, 2000.
- DONG, E. *et al.* Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. **Epigenetics**, v. 5, n. 8, p. 730–735, 2010.
- 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.
- FDA. FDA approves Topamax for migraine prevention in adolescents. **Journal of pain & palliative care pharmacotherapy**, v. 28, n. 2, p. 191, jun. 2014.
- GALINKIN, Jeffrey L., *et al.* The plasma pharmacokinetics and cerebral spinal fluid penetration of intravenous topiramate in newborn pigs. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 25, n. 6, p. 265–271, 2004.
- GARVEY, W. *et al.* Prevention of type 2 diabetes in subjects with prediabetes and metabolic syndrome treated with phentermine and topiramate extended release. **Diabetes Care**, v. 37, n. 4, p. 912–921, 2014.

- GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.
- HALLIOGLU, O. *et al.* Effects of antiepileptic drug therapy on heart rate variability in children with epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 79, n. 1, p. 49–54, 2008.
- HARTMANN, A. *et al.* Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 33, n. 5, p. 606–614, 2019.
- HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 21, n. 2–3, p. 203–213, dez. 1987.
- HURTADO, R.; CELANI, M.; GEBER, S. Effect of short-term estrogen therapy on endothelial function: a double-blinded, randomized, controlled trial. **Climacteric**, v. 19, n. 5, p. 448–451, 2016.
- ISGANAITIS, E. Developmental Programming of Body Composition: Update on Evidence and Mechanisms. **Current Diabetes Reports**, v. 19, n. 8, p. 60, 2019.
- ISHIZUE, N. *et al.* Polytherapy with sodium channel-blocking antiepileptic drugs is associated with arrhythmogenic ST-T abnormality in patients with epilepsy. **Seizure**, v. 40, p. 81–87, 2016.
- KASARSKIS, E. J.; *et al.* Carbamazepine-Induced Cardiac Dysfunction: Characterization of Two Distinct Clinical Syndromes. **Archives of Internal Medicine**, v. 152, n. 1, p. 186, 1992.
- KEENAN, N; SADLIER, L. G.; WILTSHIRE, E. Vascular function and risk factors in children with epilepsy: Associations with sodium valproate and carbamazepine. **Epilepsy Research**, v. 108, n. 6, p. 1087–1094, 2014.
- 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. e146–e149, 2013.
- KITTNAR, O. Selected Sex Related Differences in Pathophysiology of Cardiovascular System. **Physiological Research**, p. 21–31, 2020.

- KOUPIL, I. *et al.* Blood pressure, hypertension and mortality from circulatory disease in men and women who survived the siege of Leningrad. **European Journal of Epidemiology**, v. 22, n. 4, p. 223–234, 2007.
- KURUL, S.; UNALP, A.; YIŞ, U. Homocysteine levels in epileptic children receiving antiepileptic drugs. **Journal of Child Neurology**, v. 22, n. 12, p. 1389–1392, 2007.
- LA ROVERE, M. T., PINNA, G. D.; RACZAK, G. Baroreflex Sensitivity: Measurement and Clinical Implications. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 13, n. 2, p. 191–207, 2008.
- LAI, Q., *et al.* Effects of Antiepileptic Drugs on the Carotid Artery Intima-Media Thickness in Epileptic Patients. **Journal of Clinical Neurology**, v. 13, n. 4, p. 371, 2017.
- LIANG, Y., *et al.* The messenger RNA profiles in liver, hypothalamus, white adipose tissue, and skeletal muscle of female Zucker diabetic fatty rats after topiramate treatment. **Metabolism**, v. 55, n. 10, p. 1411–1419, 2006.
- LODHI, G. M., *et al.* Effect of ascorbic acid and alpha tocopherol supplementation on acute restraint stress induced changes in testosterone, corticosterone and nor epinephrine levels in male Sprague Dawley rats. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC**, v. 26, n. 1, p. 7–11, 2014.
- LOTUFO, P. A. *et al.* A systematic review and meta-analysis of heart rate variability in epilepsy and antiepileptic drugs: HRV in Epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 2, p. 272–282, 2012.
- MARCO, E. M. *et al.* Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: The issue of early adolescent exposure. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 8, p. 1722–1739, ago. 2011.
- MCCUBBIN, J. W.; GREEN, J. H.; PAGE, I. H. Baroreceptor Function in Chronic Renal Hypertension. **Circulation Research**, v. 4, n. 2, p. 205–210, 1956.
- MEHRPOUR, M., *et al.* Atherogenic consequence of antiepileptic drugs: a study of intima-media thickness. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 253–257, 2014.
- MENDELSON, M.; KARAS, R. H. The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801–1811, 1999.
- MOREAU, K. L. *et al.* Essential Role of Estrogen for Improvements in Vascular Endothelial Function With Endurance Exercise in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 11, p. 4507–4515, 2013.

- MOURA, K.F. Tratamento com topiramato na adolescência: efeitos agudos e tardios sobre a reatividade da aorta [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2019.
- NA, L., *et al.* Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 67, n. 3, p. 174–180, 2003.
- NI, G. *et al.* Increased homocysteine levels in valproate-treated patients with epilepsy: a meta-analysis. **BMJ Open**, v. 4, n. 7, p. e004936–e004936, 2014.
- 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.
- PANG, Y; DONG, J; THOMAS, P. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 10, p. E899–E911, 2015.
- PERSSON, H.; ERICSON, M.; TOMSON, T. Carbamazepine affects autonomic cardiac control in patients with newly diagnosed epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 57, n. 1, p. 69–75, 2003.
- PORTRAIT, F.; TEEUWISZEN, E; DEEG, D. Early life undernutrition and chronic diseases at older ages: The effects of the Dutch famine on cardiovascular diseases and diabetes. **Social Science & Medicine**, v. 73, n. 5, p. 711–718, 2011.
- RAJENDRA ACHARYA, U. *et al.* Heart rate variability: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 44, n. 12, p. 1031–1051, 2006.
- SAETRE, E. *et al.* Cardiac function and antiepileptic drug treatment in the elderly: A comparison between lamotrigine and sustained-release carbamazepine. **Epilepsia**, v. 50, n. 8, p. 1841–1849, 2009.
- SANKHYAN, N., *et al.* Noninvasive screening for preclinical atherosclerosis in children on phenytoin or carbamazepine monotherapy: A cross sectional study. **Epilepsy Research**, v. 107, n. 1–2, p. 121–126, 2013.
- SHANK, P., *et al.* An Overview of the Preclinical Aspects of Topiramate: Pharmacology, Pharmacokinetics, and Mechanism of Action. **Epilepsia**, v. 41, n. s1, p. 3–9, 2000.
- SHANK, R. P. *et al.* Topiramate: Preclinical Evaluation of a Structurally Novel Anticonvulsant. **Epilepsia**, v. 35, n. 2, p. 450–460, 1994.

- SHI, X. *et al.* Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. **Brain and Development**, v. 32, n. 3, p. 229–235, 2010.
- SILVA, D. G. A exposição de ratas Wistar ao topiramato durante a adolescência não causa alterações cardiovasculares e biométricas a curto e a longo prazo [s.l.], 2021.
- SPALLONE, V. Blood Pressure Variability and Autonomic Dysfunction. **Current Diabetes Reports**, v. 18, n. 12, p. 137, 2018.
- STANHEWICZ, A. E.; WENNER, M. M.; STACHENFELD, N. S. Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 315, n. 6, p. H1569–H1588, 2018.
- STEFOVSKA, V. G., *et al.* Sedative and anticonvulsant drugs suppress postnatal neurogenesis. **Annals of Neurology**, v. 64, n. 4, p. 434–445, 2008.
- SVALHEIM, S. *et al.* Cardiovascular risk factors in epilepsy patients taking levetiracetam, carbamazepine or lamotrigine. **Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum**, n. 190, p. 30–33, 2010.
- 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.
- TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 143, n. 1, p. 231–240, 2006.
- TAVARES, R. F.; PELOSI, G. G.; CORRÊA, F. M. A. The paraventricular nucleus of the hypothalamus is involved in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 2, p. 178–185, 2009.
- TÜMER, L.; SERDAROĞLU, A.; HASANOĞLU, A.; *et al.* Plasma homocysteine and lipoprotein (a) levels as risk factors for atherosclerotic vascular disease in epileptic children taking anticonvulsants. **Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, v. 91, n. 9, p. 923–926, 2002.
- USSELMAN, C. W.; STACHENFELD, N. S.; BENDER, J. R. The molecular actions of oestrogen in the regulation of vascular health: Oestrogen and vascular health. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 3, p. 356–361, 2016.
- VANDERLEI, L. *et al.* Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, n. 2, p. 205-217, 2009.

- VIDIGAL, C. B.; *et al.* Topiramate treatment in wistar rats during childhood induces sex-specific vascular dysfunction in adulthood. **Life Sciences**, v. 288, 2022.
- VIRDIS, A. *et al.* Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. **Circulation**, v. 101, n. 19, p. 2258–2263, 2000.
- VOUDRIS, K. A.; *et al.* Early and persistent increase in serum lipoprotein (a) concentrations in epileptic children treated with carbamazepine and sodium valproate monotherapy. **Epilepsy Research**, v. 70, n. 2–3, p. 211–217, 2006.
- WANG, F. *et al.* Female Adult Mouse Cardiomyocytes Are Protected Against Oxidative Stress. **Hypertension**, v. 55, n. 5, p. 1172–1178, 2010.
- WANG, M.; *et al.* Body mass index percentiles and elevated blood pressure among children and adolescents. **Journal of Human Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 319–325, 2020.
- WATSO, J. *et al.* The baroreflex effectiveness index as an early marker of autonomic dysfunction in heart failure: Journal Club. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 15, p. 5013–5014, 2017.
- YOUNG, C. N., *et al.* Insulin enhances the gain of arterial baroreflex control of muscle sympathetic nerve activity in humans: Insulin and sympathetic baroreflex gain. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 18, p. 3593–3603, 2010.
- YU, Y. *et al.* Analysis of heart rate variability-related indexes in the interictal period in patients with focal epilepsy. **Life Sciences**, v. 209, p. 403–408, 2018.

8. ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 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 n° 9379.2018.26, sob a responsabilidade de Graziela Sciantti Ceravolo, que envolve a produção, manutenção e 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 n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em 14/06/2018.

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

Viência 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/UEL anteriormente à execução das modificações.

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


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

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Graziela Sciantti 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