

MAURA REGINA SILVA DA PÁSCOA VILELA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PEPTÍDEO NATRIÚRETICO  
ATRIAL SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE DE CRISES  
AUDIOGÊNICA E INDUZIDA POR PENTILENOTETRAZOL

2012

MAURA REGINA SILVA DA PÁSCOA VILELA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO  
ATRIAL SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE DE CRISES  
AUDIOGÊNICA E INDUZIDA POR PENTILENOTETRAZOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia para Programa de Pós-Graduação Integrada – CNPQ.

Orientação: Dra Maria Carolina Doretto

Co-Orientação: Dra. Adelina Martha Dos Reis

Co-Orientador: Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 141/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação dos efeitos do peptídeo natriurético atrial (ANP) sobre a susceptibilidade de crises audiogênica e induzida por pentilenotetrazol**", que tem como responsável(is) **Maria Carolina Doretto**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **11/ 08/ 2015**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 141/2010**, related to the project entitled "**Evaluation of atrial natriuretic peptide effects on the susceptibility to audiogenic seizures and pentylenetetrazole- induced seizures**", under the supervisors of **Maria Carolina Doretto**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 11, 2010**.

This certificate expires in **August 11, 2015**.

Belo Horizonte, 13 de Agosto de 2010.

**Prof<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

Dedico este trabalho ao meu marido e filhos

## AGRADECIMENTOS

Pela orientação agradeço:

- À professora Dra. Maria Carolina Doretto pela oportunidade da realização desse trabalho, por introduzir-me a equipe do NNC e pelas orientações.

- À professora Dra. Adelina Martha dos Reis pela orientação no âmbito da endocrinologia.

- Ao professor Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes pelo apoio, conselhos, sugestões e críticas extremamente úteis na construção dessa tese.

Aos professores e amigos do NNC pelo companheirismo e amizade.

Aos professores que disponibilizaram os seus laboratórios para a realização dos ensaios.

As minhas amigas eternas, porém *in memoriam*, Suellen e Mariele.

Em especial, as minhas amigas de bancada Gioconda Alves Assumpção, Jerusa Almeida dos Santos e ao meu marido Jefferson José Vilela pelo companheirismo e apoio em todas as etapas desse estudo.

À banca examinadora de qualificação, pela atenção e sugestão na organização da tese.

Ao CNPq e FAPEMIG que subsidiaram esta pesquisa.

À Pró-reitoria de Pós-graduação pelos auxílios concedidos para participação em eventos científicos.

Ao Instituto de Ciências Biológicas pela infraestrutura.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós-graduação.

Aos meus pais, irmãos, cunhadas e sobrinhos. À Catharine, minha irmã querida, sempre presente na minha vida.

Aos meus filhos e a minha família agradeço pelo apoio e compreensão. Em especial, ao amor da vida, alguém cujo conselho, senso de humor e crítica eu admiro tanto.

A todos que participaram direta ou indiretamente neste trabalho, expresso os meus sinceros agradecimentos.

“Campeões não são feitos em academias. Campeões são feitos de algo que eles têm profundamente dentro de si – um desejo, um sonho, uma visão”.

(Muhammad Ali)

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do peptídeo natriurético atrial (ANP) sobre a susceptibilidade a crises audiogênica e induzida por pentilenotetrazol (PTZ). Foi avaliada a relação entre a susceptibilidade à crise audiogênica e o ANP. Ratos Wistar e Wistar Audiogenic Rats (WAR) foram eutanasiados por decapitação e as concentrações de ANP no plasma e átrios foram determinadas por radioimunoensaio. O grupo WAR apresentou maior concentração de ANP no plasma e átrios. A expressão do gene para ANP foi determinada pela técnica de RT-PCR em receptores do tipo A e C, no rim. Não houve diferença entre os grupos para a expressão relativa do RNAm para o receptor do tipo A. Porém, o grupo WAR apresentou maior expressão relativa do RNAm para o receptor do tipo C. O próximo passo foi verificar se o ANP diretamente favoreceria a excitabilidade neuronal no modelo PTZ. Wistar machos receberam agudamente 2  $\mu$ L (icv) de salina (0,9%) ou diferentes doses de ANP (9,8 ; 98 ; 326,5 pmol/animal). O mesmo tratamento foi repetido na presença da isatina. Após o tratamento, os animais receberam PTZ e foi avaliado o limiar de crise. Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos. Como o ANP não favoreceu a excitabilidade neuronal no modelo de crise induzida por PTZ foram investigados as relações entre os parâmetros que controlam o balanço hidroeletrólítico e a excitabilidade neuronal no modelo de crise audiogênica. Ratos Wistar e WAR foram colocados em gaiolas metabólicas. Durante 16 dias os animais receberam água *ad libitum*. Nesse período, ratos WAR ingeriram maior volume de água, excretaram maior volume de urina, com menor osmolalidade e maior quantidade de sódio e apresentaram maior taxa de filtração glomerular. Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de sódio, potássio e osmolalidade e na depuração de água livre. Como não houve diferença nos parâmetros do balanço hidroeletrólítico que indiretamente influenciam a excitabilidade neuronal, a hipótese seguinte foi avaliar os efeitos do ANP na atividade do eixo hipotálamo-hipofisário sobre a homeostase. Os ratos WAR foram submetidos à privação de água por um período de 72 horas. Após a eutanásia foram quantificadas as concentrações de ANP no plasma e nos átrios, a expressão gênica do ANP em receptores do tipo A e C no rim, as concentrações de sódio e osmolalidade no plasma. A privação de água promoveu redução nas concentrações plasmáticas e atriais de ANP. Mesmos desidratados ratos WAR apresentaram maior concentração de ANP no plasma e no átrio. Porém, todas as diferenças observadas anteriormente em relação aos parâmetros do balanço hidroeletrólítico foram extintas. Em síntese, há relação entre a susceptibilidade à crise audiogênica e o ANP. Mas, essa associação não está relacionada com os parâmetros do balanço hidroeletrólítico que favorecem a excitabilidade neuronal. É um mecanismo para compensar a maior ingestão de água. A ativação das estruturas hipotalâmicas que



participam do balanço hidroeletrólítico mostrou que o modelo de crise audiogênica apresenta uma alteração comportamental em relação à ingestão de água. Além disso, o ANP não exerceu efeitos pro ou anticonvulsivante em crises induzidas por PTZ.

Palavras-chave: peptídeo natriurético atrial, equilíbrio hidroeletrólítico, epilepsia, fisiologia, pentilenotetrazol.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of atrial natriuretic peptide (ANP) on the susceptibility to audiogenic seizures and those induced by pentylenetetrazole (PTZ). The relationship between ANP and susceptibility to audiogenic seizure was evaluated. Wistar rats and Wistar Audiogenic Rats (WAR) were sacrificed and the concentrations of ANP in plasma and atria were determined by radioimmunoassay. The WAR group was found to have a higher concentration of ANP in plasma and in the atrium. The expression of the gene for ANP was determined by RT-PCR for receptor type A and C in the kidney. There was no difference between groups for the relative expression of mRNA for the type A receptor. However, the group WAR was found to have a higher relative expression of mRNA the type C receptor. The next step was to determine whether ANP directly favored neuronal excitability in the PTZ model. Wistar rats acutely received 2  $\mu$ L (icv) of saline (0.9%) or different doses of ANP (9.8, 98, 326.5 pmol / animal). The same treatment was repeated in the presence of isatin. After treatment, the animals received PTZ and the seizure threshold was evaluated. No difference was observed between treatments. As the ANP did not favor the neuronal excitability in the model of seizure induced by PTZ, the relationship between the parameters that control the fluid balance and neuronal excitability in the model of audiogenic seizure was investigated. WAR and Wistar rats were placed in metabolic cages. For 16 days the animals received *water ad libitum*. During this period, WAR rats had higher intake of drinking water excreted higher urine volume with lower osmolality and increased amount of sodium and were found to have a higher glomerular filtration rate. There was no difference in plasma concentrations of sodium, potassium and osmolality and free water clearance. Since there was no difference in the parameters of fluid balance that indirectly influences neuronal excitability, the next hypothesis was to evaluate the effects of ANP on the activity on the hypothalamic-pituitary homeostasis. WAR rats underwent water deprivation for a period of 72 hours. After the sacrifice, the concentrations of ANP were quantified in plasma and atrium, the expression of the gene for ANP in the receptors of type A and C in the kidney and sodium and plasma osmolality. The water deprivation promoted a reduction in plasma ANP and in the atrium. However, all previously differences observed in relation to the parameters of fluid balance were extinguished. In short, there is a relationship between susceptibility to audiogenic seizure and the ANP. However this association is not related to the parameters of fluid balance favoring neuronal excitability. It is a mechanism to compensate the higher intake of drinking water. The activation of the hypothalamic structures involved in fluid balance showed that the model of audiogenic seizure presents a behavioral change. In addition, the ANP has no effect pro or anticonvulsant on PTZ-induced seizures.

Key words: atrial natriuretic peptide, fluid balance, epilepsy, physiology and pentylentetrazole.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANP	- Peptídeo natriurético atrial
AP	- Ântero posterior
BSA	- Albumina sérica bovina
BNP	- Peptídeo natriurético cerebral
CEBIO	- Centro de Bioterismo
CNP	- Peptídeo natriurético do tipo C
dB	- Deci Bell
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DEPC	- Dietilpirocarbonato
DV	- Dorso ventral
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	- Erro padrão da média
GABA	- Ácido gama aminobutírico
GMPc	- GMP cíclico
GAPDH	- Gliceraldeído fosfato desidrogenase
ICV	- Intracérebro ventricular
IP	- Intraperitonal
IS	- Índice de gravidade
LL	- Látero lateral
NaCl	- Cloreto de sódio
NMDA	- N-metil-D-aspartado
PB	- Pares de base
PDS	- Padrão paroxístico de despolarização
PE20	- Tubo de polietileno
PEPS	- Potencial excitatório pós-sináptico
PTZ	- Pentilenotetrazol
RNA	- Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	- RNA mensageiro
RT	- Transcriptase reversa
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
sc	- Subcutâneo
SNC	- Sistema nervoso central
SPL	- Nível de pressão sonora

R - Ratos Wistar resistente  
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais  
WAR - Wistar audiogenic rat; rato Wistar audiogênico

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Classificação das crises epilépticas	06
Tabela 2	- Índice de gravidade de crises convulsivas induzidas por PTZ	15
Tabela 3	- Composição dos receptores GABA <sub>A</sub>	14
Tabela 4	- Índice de severidade de crises audiogênicas	32
Tabela 5	- Curva Padrão de Creatinina	38
Tabela 6	- Curva Padrão de Creatinina – acidificação	39
Tabela 7	- Sequência das etapas para seleção dos ratos WAR	43
Tabela 8	- Tratamento para ANP e para a isatina	56
Tabela 9	- Parâmetros do balanço hidroeletrólítico em ratos	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise comportamental da crise audiogênica	45
Figura 2	Concentrações de ANP no plasma e nos tecidos atriais	46
Figura 3	Expressão relativa dos receptores de ANP no ri	47
Figura 4	Limiar de PTZ para crise mínima	59
Figura 5	Limiar de PTZ para crise máxima	61
Figura 6	Peso corporal e ingestão de ração	68
Figura 7	Balanço hidroeletrólítico	71
Figura 8	Ilustração do protocolo utilizado nos experimentos de privação de água realizados em gaiola metabólica	78
Figura 9	Concentração de ANP no plasma e átrio após a privação de água	80
Figura 10	Expressão relativa dos receptores de ANP no rim após a privação de água	81
Figura 11	Balanço hidroeletrólítico após a privação de água: peso corporal e ingestão de ração	83
Figura 12	Balanço hidroeletrólítico: Ingestão de água do grupo sem privação de água	84
Figura 13	Balanço hidroeletrólítico após privação de água: excreção e osmolalidade da urina	86
Figura 14	Balanço hidroeletrólítico após privação de água: osmolalidade plasmática concentração de sódio no plasma	87

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
1.1	REVISÃO DA LITERATURA	5
1.1.1	<i>Epilepsia</i>	5
1.1.1.1	<i>Definição e classificação</i>	5
1.1.1.2	<i>Epidemiologia e qualidade de vida</i>	7
1.1.1.3	<i>Mecanismos da ictogênese</i>	9
1.1.1.4	<i>Fármacos anticonvulsivantes</i>	11
1.1.2	<i>Modelos experimentais</i>	13
1.1.2.1	<i>Modelo de pentilenotetrazol</i>	14
1.1.2.2	<i>Crise audiogênica</i>	16
1.3.1	<i>Balanço hidroeletrólítico e excitabilidade neuronal</i>	18
1.4.1	<i>Peptídeo natriurético atrial</i>	20
1.4.1.1	<i>Características moleculares e funcionais</i>	20
1.1.4.2	<i>Receptores para os peptídeos natriuréticos</i>	22
1.1.4.3	<i>Peptídeo natriurético atrial e o sistema renal</i>	24
1.1.4.4	<i>Peptídeo natriurético atrial e o sistema nervoso central</i>	26
1.2	OBJETIVOS	28
1.2.1	<i>Objetivo geral</i>	28
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	<i>Delineamentos experimentais</i>	30
2.2	<i>Animais</i>	30
2.3	<i>Avaliação comportamental da crise audiogênica</i>	30
2.4	<i>Coleta de materiais</i>	32
2.5	<i>Dosagens de peptídeo natriurético atrial</i>	32
2.6	<i>Dosagem de proteína</i>	33
2.7	<i>Quantificação da expressão gênica para o receptor de ANP</i>	34



2.8 Balanço hidroeletrolítico	37
2.8.1 Osmolalidade	37
2.8.2 Dosagens de sódio e potássio	37
2.8.3 Depuração da creatinina	38
3.1 SUSCEPTIBILIDADE À CRISE AUDIOGÊNCIA E O PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL	41
3.1.1 Considerações iniciais	41
3.1.2 Procedimentos experimentais	43
3.1.3 Resultados	45
3.1.4 Discussão	48
3.2 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL: CAUSA OU CONSEQUÊNCIA DA CRISE CONVULSIVA	52
3.2.1 Considerações iniciais	52
3.2.2 Material e métodos	54
3.2.2.1 Animais	54
3.2.2.2 Anestesia	54
3.2.2.3 Cirurgia para implantação da cânula	54
3.2.2.4 Doses de peptídeo natriurético atrial e isatina	55
3.2.2.5 Limiar de PTZ	55
3.2.2.6 Procedimentos experimentais	56
3.2.2.7 Análise estatística	57
3.2.3 Resultados	58
3.2.4 Discussão	62
3.3 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL: CIRCUITO HIPEREXCITÁVEL	65
3.3.1 Considerações iniciais	65
3.3.2 Procedimentos experimentais	67
3.3.3 Resultados	68
3.4.3 Discussão	72
3.4 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL – EFEITO HOMEOSTÁTICO	75
3.4.1 Considerações iniciais	75

<i>3.4.2 Procedimentos experimentais</i>	77
<i>3.4.3 Resultados</i>	79
<i>3.4.3. Discussão</i>	89
4 DISCUSSÃO GERAL	94
5 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

#### 1.1.1 Epilepsia

##### 1.1.1.1 Definição e classificação

A palavra epilepsia, de origem grega *epilambanien* significa ser invadido, dominado ou apossado. As explicações para os fenômenos epiléticos ao longo da história foram divididos em dois pensamentos, o senso comum e o pensamento científico. Na antiguidade, essa síndrome arraigada às crenças impunha ao paciente epilético a condição de um indivíduo acometido por forças malignas de um mundo sobrenatural, derivada de um castigo divino. Então, a epilepsia era vista como uma condição demoníaca cujo diagnóstico estava associado à magia negra, ciclo lunar, sexo e masturbação. Opondo-se a esse pensamento, alguns registros médicos incluindo-se relatos hipocráticos, o termo epilepsia já era utilizado sem nenhuma conotação divina sendo uma patologia que acomete o encéfalo (ENGEL, 1995; LEES et al., 2000; YACUBIAN, 2000).

A epilepsia é uma síndrome encefálica caracterizada por predisposição persistente a gerar crises epiléticas (BLUME-CHAIR et al., 2001). As crises epiléticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária do encéfalo associados à ocorrência de sinais e ou sintomas decorrentes de uma atividade excessiva ou sincrônica de neurônios encefálicos (FISHER et al., 2005). A epilepsia pode ser expressa por mais de 40 tipos distintos de crises epiléticas (LEES et al., 2000) originadas por diferentes etiologias, anatomia, idade de início, gravidade, comportamento circadiano, prognóstico e características eletroencefalográficas (FISHER et al., 2005).

As crises convulsivas podem afetar a consciência, o estado emocional, a memória, a cognição, o comportamento, as funções sensória, motora e autonômica. Nem todas as crises afetam esses fatores, mas todas influenciam em pelo menos um deles. Portanto, o diagnóstico dessa síndrome requer três elementos fundamentais (FISHER et al., 2005):

- 1 - Histórico de pelo menos uma crise;
- 2 - Alteração contínua no encéfalo capaz de aumentar a susceptibilidade à nova crise;
- 3 – Que o quadro clínico esteja associado às condições neurobiológica, cognitiva e social imposta pela patologia.

A Liga Internacional Contra a Epilepsia propôs um esquema para classificação das crises epiléticas conforme apresentado na tabela 1 (BLUME-CHAIR et al., 2001).

TABELA 1  
Classificação das crises epiléticas

---

1 Crises parciais (focais)
1.1 Crises parciais simples
1.2 Crises parciais complexas
1.3 Crises parciais secundariamente generalizadas
2 Crises generalizadas
2.1 Ausência
2.1.1 Típica
2.1.2 Atípica
2.2 Mioclônica
2.3 Clônica
2.4 Tônica
2.5 Tônico-clônica
3 Não classificadas

---

Fonte: BLUME-CHAIR et al., 2001.

As crises convulsivas são classificadas de acordo com as manifestações clínicas e eletroencefalográficas levando-se em consideração o estado de consciência. As

crises parciais originam-se em áreas corticais localizadas subdivididas em parcial simples (quando há preservação da consciência) e parcial complexa (quando há comprometimento da consciência). As crises parciais simples podem ser caracterizadas por sintomas motores, sensitivos ou sensoriais, psíquicos e autonômicos. As crises parciais complexas envolvendo estruturas mesiais são caracterizadas por atividade motora proeminente, alterações posturais, movimentos excessivos dos membros e vocalizações. As crises generalizadas são caracterizadas por descargas sincrônicas provenientes de ambos os hemisférios encefálicos com ou sem fenômenos motores. O comportamento motor da crise pode ser classificado como (BLUME-CHAIR et al., 2001):

- mioclônico – contração muscular súbita que pode afetar a face, as extremidades ou o tronco;
- clônico – mioclonias repetidas a intervalos regulares envolvendo os mesmos grupos musculares;
- tônico – contração mantida com duração de poucos segundos a minutos que compromete a musculatura axial e de membros;
- tônico-clônico – contração tônica simétrica e bilateral seguida de contração clônica dos membros, associadas a fenômenos autonômicos.

#### 1.1.1.2 Epidemiologia e qualidade de vida

Os dados sobre a frequência das epilepsias são muito variáveis. Essa variação é explicada pelas dificuldades metodológicas, que vão desde a definição adotada de epilepsia até a fonte de obtenção de dados. A epilepsia afeta aproximadamente 1 a 2% da população mundial. Torna-se um importante problema de saúde pública cuja prevalência, em média, é de cinco casos a cada mil habitantes. Sua incidência é de cinquenta novos casos para uma população de cem mil indivíduos por ano. Estima-se que mais de cinquenta milhões de pessoas sejam afetadas no mundo independentemente da idade, gênero, raça e condição socioeconômica (MELO et al., 2006). Estudos consideram que 60 a 80% das crises epiléticas sejam de

natureza idiopática e que as crises generalizadas ocorram em 40 a 60% das epilepsias (HAUSER; KURLAND, 1975; GRANIERI et al., 1983).

A faixa etária mais acometida é a infantil, principalmente nas idades inferiores a dois anos de idade (MUSTZKAT et al., 2002) seguida pelos idosos (ALBUQUERQUE; SCORZA, 2006). Na população pediátrica o grande número de crises epiléticas relaciona-se a fatores neuromaturacionais e fisiológicos próprios do encéfalo em desenvolvimento, como a elevada excitabilidade e a diminuição de circuitos inibitórios (MUSTZKAT et al., 2002). Nos idosos, o acidente vascular encefálico, tumores e demência são as etiologias mais comuns. Nessa população, o tratamento torna-se mais difícil devido aos efeitos adversos da medicação, comorbidades, má aderência ao tratamento decorrente de problemas de memória e regime múltiplos de drogas (ALBUQUERQUE; SCORZA, 2006).

Qualidade de vida é um termo subjetivo capaz de associar percepção individual, expectativa e meta a um contexto de cultura e valores. É um conceito amplo, que agrega saúde física, aspectos psicológicos, nível de independência, sociabilidade e relação com o meio ambiente (ALBUQUERQUE; SCORZA, 2006). Assim, aspectos cognitivos, emocionais, comportamentais e o ajustamento às crises podem ser cruciais para a qualidade de vida das pessoas com epilepsia (BAKER, 2001).

A mensuração da qualidade de vida em indivíduos epiléticos é realizada por questionários específicos capazes de avaliar o impacto da epilepsia na vida de uma pessoa. Diversos instrumentos de avaliação já foram desenvolvidos, entre eles: “Washington psychosocial seizure inventory”, “The social effects scale”, “Epilepsy surgery inventory”, “Quality of life in epilepsy questionnaire” e “Liverpool QOL battery”. Embora, todos os questionários sejam validados há uma grande dificuldade em adaptá-los para populações de língua não inglesa (BAKER, 2001).

Toda condição clínica crônica, de certa forma, promove um impacto na qualidade de vida. O impacto da epilepsia sobre a qualidade de vida é nortado não só por parâmetros físicos (tipo, frequência e gravidade da crise) como também por aspectos psicossociais (BRUCK et al., 2000) que geralmente acarretam pior qualidade de vida quando comparada à população geral e qualidade de vida pior ou semelhante à de pacientes com outras doenças crônicas (AUSTIN et al., 1996).

Apesar de a epilepsia ser controlada na maioria dos casos com drogas antiepilépticas adequadas (ANNEGE et al., 1979) existem pessoas com epilepsia que não respondem ao tratamento constituindo o grupo de pacientes com epilepsia refratária (BERG et al., 1996). De uma forma ou outra, a epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, com crises epiléticas frequentes é uma condição que interfere direta e negativamente, dificultando principalmente a interação social (ALBUQUERQUE; SCORZA, 2006). A natureza e a ocorrência imprevisível das crises epiléticas constituem fatores-chave que impõem limitações na realização de tarefas cotidianas, domésticas ou profissionais (BAKER, 2001; McKEOWN; McNAMARA, 2001)

#### 1.1.1.3 Mecanismos da ictogênese

Existem varias formas clínicas de epilepsias, porém os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo início e término da crise epilética, ainda permanecem obscuros (LEES et al., 2000). As diretrizes para explicar o surgimento das crises epiléticas giram especialmente em torno de mecanismos sinápticos e não sinápticos (McNAMARA, 1994). Entre os fatores sinápticos enfoca-se a diminuição da inibição GABAérgica, a ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) para glutamato e o potencial excitatório pós-sináptico (PEPS).

Na última década, estudos envolvendo a epilepsia do lobo temporal postularam diversos mecanismos que conduzem à hiperexcitabilidade neuronal tais como, a inibição das células em cesto dormentes (SLOVITER citado por McNAMARA, 1994), plasticidade e reorganização sináptica (TAUCK ; NADLER citados por McNAMARA, 1994).

De acordo com SLOVITER (1991) uma crise prolongada levaria à morte de neurônios no hilo (células musgosas), removendo aferências excitatórias desses neurônios para as células em cesto, que são GABAérgicas. Uma vez iniciada a perda parcial da inibição, combinada à aferência excitatória, descargas excessivas das células granulares seriam geradas, levando à morte celular no hilo e ao



aparecimento de uma condição epiléptica. Em síntese, tudo isso indica que a morte das células musgosas altera o circuito hipocampal por deixar de modular as células inibitórias. Consequentemente, isso aumentaria a excitabilidade neuronal.

Uma hipótese alternativa defende a ideia de que a hiperexcitabilidade das células granulares é uma consequência de um rearranjo patológico em um circuito neuronal no qual as células granulares emitiriam colaterais axônicos para o seu próprio campo dendrítico, resultando num circuito excitatório recorrente. Esse rearranjo é resultante da eliminação sináptica em decorrência da morte de neurônios que projetam axônios para o terço proximal da camada molecular do giro denteado. Dessa forma, as sinapses eliminadas seriam substituídas por axônios das células granulares, as fibras musgosas. Tauck; Nadler (1985) mostraram que a estimulação da via perfurante sobre as células granulares, em animais controles, produzia PEPS acompanhados de potenciais de ação. Um segundo estímulo evoca PEPS sem a geração de potenciais de ação, possivelmente devido à inibição recorrente.

Em contrapartida, nas fatias de encéfalo dos ratos tratados com ácido caínico, um segundo estímulo evocava múltiplos potenciais de ação. Essa resposta foi associada à presença de uma reorganização sináptica das fibras musgosas no giro denteado e foi interpretada pelos autores como sendo devida à presença de uma sinapse recorrente excitatória Tauck; Nadler (1985). Corroborando essa ideia, Penido et al. (2012) também mostram alterações excitatórias irreversíveis em ratos submetidos à restrição alimentar. Eles observaram que os animais submetidos à restrição alimentar crônica aumentaram a liberação de glutamato no córtex, hipocampo, mesencéfalo e no tronco encefálico e diminuíram o limiar potenciais excitatórios evocados na via auditiva do tronco encefálico.

Os mecanismos responsáveis pela gênese das crises são diferentes para as diversas áreas encefálicas. Isso indica que a expressão motora da crise está associada aos distintos substratos anatômicos que norteiam o percurso das crises parciais e generalizadas. Experimentos em animais de laboratório indicam que as crises que envolvem o prosencéfalo recrutam estruturas como a amígdala, o hipocampo, o subiculum, o septum, o córtex e o bulbo olfatório (BROWNING, 1994; LOTHAMAN et al., 1995; AVOLI et al., 2002). Expressam-se por meio de

imobilidade, abalo mioclônico, mioclonia facial ou de membro anterior, sendo denominadas crises parciais (BROWNING, 1994). Já as crises mediadas pelo tronco encefálico, expressas pelo comportamento tônico-clônico generalizado, compromete estruturas como a formação reticular, o cerebelo, a substância negra, os colículos superior e inferior (ROSSETTI et al., 2011; DORETTO et al., 2009; GARCIA-CAIRASCO, 2002; ROSS; COLEMAN, 2000; BROWNING 1994). Tanto o prosencéfalo quanto o tronco encefálico possuem condições de originar crises convulsivas sendo que, cada um deles pode iniciá-las e sustenta-las na ausência do outro (BROWNING, 1994).

#### 1.1.1.4 Fármacos anticonvulsivantes

Dentre os métodos não invasivos que visam o tratamento sintomático para a disfunção encefálica que causa a epilepsia, a farmacoterapia é principal via de controle que age no sentido de diminuir a excitabilidade do tecido neural, aumentando o tônus inibitório ou diminuindo o excitatório. Atualmente, os diversos fármacos são agrupados de acordo com o seu mecanismo de ação. Os principais grupos incluem os bloqueadores de canal para sódio, inibidores de corrente de cálcio, gabamiméticos, antagonistas dos receptores glutamatérgicos, inibidores da anidrase carbônica, hormônios, entre outros.

Existem diferenças quanto à fisiopatologia da epileptogênese parcial e generalizada, o que provavelmente explica a grande variabilidade das manifestações clínicas e as respostas aos diferentes tipos de medicamentos. Logo, a seleção do fármaco anticonvulsivante é baseada primariamente na sua eficácia para os diferentes tipos de epilepsias.

No final do século XVIII, a farmacoterapia da epilepsia era limitada ao uso dos brometos. Em 1912, o fenobarbital foi introduzido e em 1932 a fenitoína foi descoberta. Estas drogas foram por vários anos as únicas opções terapêuticas para a epilepsia até o aparecimento da carbamazepina e do ácido valpróico (YACUBIAN, 2004). A carbamazepina é uma droga de primeira escolha para o tratamento das

crises parciais e generalizadas. Age prevenindo disparos repetitivos de potenciais de ação em neurônios despolarizados por meio do bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes e do bloqueio pós-sináptico das correntes nos receptores NMDA (REMY et al., 2003).

No início dos anos 70, o ácido gama aminobutírico (GABA) foi reconhecido como importante neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC), o que suscitou a possibilidade de que o aumento da ação gabaérgica pudesse levar a supressão das crises epiléticas. A ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> abre os canais iônicos de cloro do complexo GABA/benzodiazepínico, permitindo o influxo do cloro e a hiperpolarização do neurônio pós-sináptico, inibindo o potencial de ação (MELDRUM, 2002). A partir desse conhecimento, os análogos GABAérgicos começaram ser desenvolvidos pela indústria farmacêutica.

No início dos anos 80, a vigabatrina foi o primeiro composto com este mecanismo de ação introduzido no mercado. A vigabatrina promove a inibição irreversível da GABA-transaminase, a enzima que degrada o GABA na fenda sináptica, aumentando a disponibilidade do neurotransmissor (VIVEGANO; CILIO, 1997). A partir daí surgiram novos compostos como a tiagabina que inibe a receptação do GABA nos neurônios e na glia, aumentando a concentração encefálica do neurotransmissor (SCHIMIDT et al., 2000). Drogas com múltiplos mecanismos de ação também potencializam a função gabaérgica destacando-se o topiramato que promove o aumento do influxo de cloro mediado pelo GABA (WHITE, 1997).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Dentre os seus receptores, o NMDA parece ter o maior envolvimento na epileptogênese. A estimulação deste receptor produz influxo celular principalmente de cálcio, com rápida despolarização e disparos repetitivos sustentados (MELDRUM, 2002). A remacemida é um antagonista não competitivo do receptor NMDA. Apresenta metabólito ativo, a desglicina, que tem maior afinidade pelo receptor do que a própria droga (LUSZCZKI, 2009). Ambos interagem com os canais de sódio voltagem-dependentes reduzindo os disparos repetitivos sustentados (WAMIL et al., 1996).

A lamotrigina atua na inibição do glutamato pré-sináptico. Ela inativa os canais de sódio voltagem-dependentes promovendo maior estabilidade da membrana neuronal (MELDRUM, 1996). Existem evidências que a lamotrigina possa influenciar seletivamente os neurônios que sintetizam o glutamato e o aspartato, uma vez que esse fármaco diminui a liberação destes neurotransmissores excitatórios (LEACH et al., 1986).

Além da lamotrigina, outras drogas antiepilépticas como a fenitoína, carbamazepina, valproato, oxcarbazepina, topiramato atuam através da modulação dos canais de sódio voltagem-dependentes (LEACH et al., 1986; MELDRUM, 1996; WHITE, 1997). A fenitoína, por exemplo, atua em canais de sódio, inibindo os disparos neuronais de alta frequência. Uma vez que o canal de sódio é ativado, a fenitoína é capaz de mantê-lo no modo inativado, evitando disparos subsequentes, bloqueando assim, o início da crise convulsiva (TUNNICLIFF, 1996).

### 1.1.2 Modelos experimentais

Os modelos de epilepsia em animais ainda são pré-requisitos importantes na busca pré-clínica por novos fármacos anticonvulsivantes (LÖSCHER et al., 1991; LÖSCHER; LEPPIK, 2002; WHITE, 1997 e 2003). O efeito anticonvulsivante de todos os fármacos de primeira linha, exceto os brometos e o fenobarbital foi primariamente determinado em modelos animais de eletrochoque máximo ou por meio do teste de pentilenotetrazol – PTZ (LÖSCHER; FIEDLER, 1996).

Diversos modelos experimentais são de grande utilidade no estudo dos mecanismos e de estratégias de tratamento das crises convulsivas. Entre eles, os modelos químicos, caracterizados pela administração periférica ou intracerebral de agentes farmacológicos ou toxinas, com o propósito de desencadear crise convulsiva, incluindo o do PTZ (VELISEK et al., 1992) e os modelos genéticos (ROSS; COLEMAN, 2000), com destaque para as crises audiogênicas em ratos (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1983).

### 1.1.2.1 Modelo de pentilenotetrazol

O modelo de crise convulsiva induzida por PTZ é um modelo químico de efeito agudo (MELDRUM, 2002), validado em ratos por Velisek et al. (1992). O PTZ é um derivado tetrazol com atividade convulsivante consistente em diversas espécies animais (FISHER, 1989), como ratos (BOUGH et al., 2000; COTA et al., 2009; SCARLATELLI-LIMA et al., 2003) e camundongos (LÖSCHER et al., 1991; LÖSCHER; FIEDLER 1996; TCHEKALAROVA et al., 2001 2003 e 2005; TCHEKALAROVA; GEORGIEV, 2005). É um modelo comumente utilizado em estudos de epilepsia e na descoberta de novos agentes anticonvulsivantes. Alguns fármacos como etosuximida e valproato de sódio foram descobertos nesse modelo (LÖSCHER; FIEDLER, 1996 e LÖSCHER; LEPIK, 2002). A etosuximida elimina as crises de ausência em 80% dos pacientes sendo também utilizada no tratamento de crises mioclônicas (WALLACE, 1998).

Os eventos comportamentais após a infusão sistêmica de PTZ são sequenciais. Iniciam-se com os abalos mioclônicos, que se tornam contínuos, podendo levar a crises tônico-clônicas generalizadas. Em roedores, a infusão de dose baixa gera comportamento que acomete estruturas do sistema límbico e em alta dose gera comportamento que envolve o tronco encefálico (BROWNING 1994; EELLS et al., 2004). Nesse modelo, a crise motora clônica é classificada como crise mínima e a generalizada do tipo tônico-clônica como crise máxima. Os eventos comportamentais da crise convulsiva induzida por PTZ, expressos pela sua gravidade estão descritos na TABELA 2 (VELISEK et al., 1992). Diversos experimentos utilizam como critério de avaliação comportamental, o limiar de crise mínima onde o animal exhibe somente a mioclonia de membro anterior (BOUGH et al., 1999 e 2000; PI et al., 2004). Outros, além do referencial mínimo também utilizam como ponto de corte o limiar de crise máxima, caracterizada pelo aparecimento de crise tônico-clônica generalizada (COTA et al., 2009; SCARLATELLI-LIMA et al., 2003; TCHEKALAROVA et al., 2001 2003 e 2005; TCHEKALAROVA; GEORGIEV, 1999 e 2005).

Variação nesse protocolo pode ser realizada com a administração repetida de PTZ, em doses subconvulsivantes (40mg/kg), em intervalos de 48 horas. Esse tipo de procedimento é caracterizado como abrasamento químico (TCHEKALAROVA et al., 2001 e 2003).

TABELA 2

Índice de gravidade de crises convulsivas induzidas por PTZ

Índice	Comportamentos
0	Nenhuma alteração no comportamento
1	Contrações mioclônicas isoladas
2	Crise mínima atípica
3	Crise mínima (mioclonia de membro anterior e/ou cabeça)
4	Crise máxima sem a fase tônica
5	Crise máxima (crise generalizada tônico-clônica)

Fonte: VELISEK et al., 1992.

O PTZ é antagonista do receptor GABA<sub>A</sub> (JUNG et al., 2002). Embora, a estrutura desse receptor permita várias combinações, apenas doze isoformas totalizam os 90% dos receptores encontrados no encéfalo (MELDRUM, 2002, TABELA 3).

TABELA 3

Composição dos receptores GABA<sub>A</sub>

Isoforma	Distribuição	Localização
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	40%	Córtex, hipocampo, células Purkinge
$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	15%	Hipocampo, células Purkinge
$\alpha 2\beta \gamma 1$	10%	Tálamo
$\alpha 3\beta \gamma 2/3$	10%	Colinérgico e monoaminérgico
$\alpha 4\beta \gamma$	2%	Córtex, células piramidais
$\alpha 4\beta 2\delta$	4%	Tálamo e giro denteado
$\alpha 5\beta 3\gamma 2/3$	3%	Células piramidais
$\alpha 6\beta \gamma 2$	2%	Células granulares encefálicas
$\alpha 6\beta \gamma \delta$	3%	Células granulares encefálicas

Fonte: MELDRUM, 2002.

Os mecanismos de ação do PTZ são parcialmente conhecidos. A visão de que uma deficiência GABAérgica como fator determinante da atividade epiléptica (JUNG et al., 2002) se apóia em parte na observação do mecanismo de ação de drogas anticonvulsivantes (LÖSCHER; FIEDLER, 1996 e LÖSCHER; LEPPIK, 2002). As bases neurais associadas à geração de padrões motores nesse modelo indicam que as crises mínimas acometem estruturas prosencefálicas, envolvendo o córtex pré-piriforme profundo (GALE, 1988). A farmacodinâmica do PTZ parece interagir com o complexo receptor GABA-benzodiazepínico-ionóforo cloreto (FISHER, 1989). O GABA agindo em receptores GABA<sub>A</sub> aumenta a condutância ao íon cloro acentuando a hiperpolarização da célula. Estudo eletrofisiológico sugeriu que o PTZ inibe a corrente de íons cloreto ativado por GABA de maneira concentração-dependente e voltagem-dependente (HUANG et al., 2001). Também, foi sugerida a contribuição de aminoácidos excitatórios aos efeitos convulsivantes do PTZ, sendo que essa atividade nos receptores NMDA pode estar relacionada à redução da neurotransmissão gabaérgica (SECHI et al., 1997).

#### 1.1.2.2 Crise audiogênica

Um dos modelos genéticos de grande importância para a compreensão dos mecanismos das epilepsias é o modelo da crise audiogênica em ratos onde a crise é induzida por estímulo sonoro de alta intensidade (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1983; ROSS; COLEMAN, 2000). Poucas linhagens de ratos são capazes de exibir a crise audiogênica, entre elas destaca-se a colônia de ratos com susceptibilidade audiogênica denominada Wistar Audiogenic Rat (WAR). Esse modelo é utilizado para compreensão dos mecanismos envolvidos na crise convulsiva (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992 e 2002; DORETTO et al., 2003a; FONSECA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2004; SCARLATELLI-LIMA et al., 2003), no abasamento (MORAES et al., 2000) e na seleção genética (DORETTO et al., 2003b).

A primeira observação de crise audiogênica foi realizada em 1924 por pesquisadores soviéticos que desenvolveram a partir de ratos Wistar a linhagem Krushinsky-Molodkina (KRUSHINSKY et al., 1970). Nos anos 50, outra linhagem derivada de ratos

Sprague-Dawley foi desenvolvida na Universidade do Arizona e denominada como GEPR (DAILEY et al., 1989). Além das linhagens soviética e americana, duas outras derivadas de ratos Wistar foram desenvolvidas. Uma delas foi estabelecida em Estrasburgo na França (KIESMANN, 1988) e a outra, denominada WAR foi desenvolvida no Brasil, no laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (GARCIA-CAIRASCO et al., 1983; DORETTO et al., 2003a). Um ramo da linhagem WAR é mantido no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

A progressão da crise audiogênica caracteriza-se por eventos procursivos (corrida, pulos e quedas atônicas) e eventos convulsivos (crise tônico-clônica). Independentemente do nível de gravidade obtido pela crise, a corrida é um componente sempre presente que pode ocorrer em um ou dois episódios distintos. O componente tônico, considerado a manifestação mais grave da crise ocorre logo após a fase de corrida e caracteriza-se pela flexão do dorso, pescoço, membros anteriores, membros posteriores, acompanhado de espasmos por todo o corpo e movimento de balanço (ROSS et al., 2000).

No final da crise, o animal apresenta quadro denominado depressão pós-ictal, caracterizado por ausência de reflexo de endireitamento e de respostas a estímulos nociceptivos, refratariedade a nova crise (DORETTO, 2003a; GARCIA-CAIRASCO et al., 1992), vocalização (TERRA et al., 1992), alterações neuroendócrinas como o aumento da prolactina (DORETTO et al., 2003a) e de vasopressina (FONSECA et al., 2005).

Os ratos Wistar com susceptibilidade audiogênica exibem crise tônica ou tônico-clônica em resposta à intensidade de estímulo sonoro de 125 dB (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1983 ). Foi demonstrado que a crise audiogênica inicia-se com a ativação da via auditiva do tronco encefálico envolvendo o colículo inferior, camadas profundas do colículo superior, formação reticular, substância negra e a substância cinzenta periaquedutal (ROSSETTI et al., 2011; DORETTO et al., 2009; GARCIA-CAIRASCO, 2002; ROSS et al., 2000). A interação de fatores anatômicos, neuroquímicos e fisiológicos sugere que hiperexcitabilidade nos modelos



audiogênicos está associada a uma transiente regulação para cima dos diversos tipos de receptores para o glutamato e com a redução da resposta inibitória mediada pelo GABA (FAINGOLD, 2004).

Embora, a crise audiogênica seja primariamente expressa por crise do tipo tônico-clônica também é possível obter crise com predominância parcial, nesse modelo. Para isso é necessário que a predisposição genética à crise seja associada ao abrasamento audiogênico (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; MORAES et al., 2000). O abrasamento é um fenômeno onde a administração repetida de um estímulo inicialmente subconvulsivante resulta em intensificação progressiva da atividade epiléptica, culminando em uma crise convulsiva (GODDARD, 1967; McINTYRE et al., 2002). O recrutamento de estruturas límbicas derivado das estimulações sonoras repetitivas é denominado abrasamento audiogênico.

Nos ratos WAR o abrasamento audiogênico representa um modelo experimental de hiperexcitabilidade capaz de recrutar novos substratos neurais e modificar a expressão motora da crise para um padrão semelhante a crises límbicas, também chamadas de crises do lobo temporal (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; MORAES et al., 2000). Acredita-se que alterações na expressão motora observada nesse modelo seja resultado da transferência de atividade epileptiforme de um circuito mesencefálico para um circuito prosencefálico. Por meio de registros eletrofisiológicos e comportamentais foi mostrado que a crise límbica em ratos WAR é acompanhada por um aumento da atividade epileptiforme no lobo temporal e por uma redução de manifestações comportamentais do tipo tônico-clônica (MORAES et al., 2000).

### 1.3.1 Balanço hidroeletrólítico e excitabilidade neuronal

O controle homeostático dos fluidos e o equilíbrio eletrólítico visam à manutenção de parâmetros como volume, osmolalidade e a concentração de íon. Esses parâmetros, também, fazem parte do arcabouço dos prováveis mecanismos não sinápticos responsáveis pela gênese das crises convulsivas.

Existem evidências que a hiposmolalidade prejudica a função celular, aumenta a excitabilidade neuronal e favorece o surgimento de crise convulsiva (VERBALIS, 2010). Para mostrar a interação entre a redução da osmolalidade e hiperexcitabilidade foram propostos três mecanismos que provavelmente poderiam justificar essa associação (ANDREW, 1991):

#### 1 - Potencial de campo:

A sincronização neuronal gera um fluxo de corrente que pode ser registrada como uma voltagem transiente no espaço extracelular adjacente. Registros eletrofisiológicos mostraram que a redução aguda da osmolalidade aumenta o efeito de campo na região CA1 do hipocampo. Conseqüentemente, há um aumento no registro da amplitude confirmando o mecanismo de hiperexcitabilidade (ANDREW et al., 1989).

#### 2 - Sinapse:

Andrew et al. (1989) mostraram *in vitro* que mudança aguda na osmolalidade favorece a excitabilidade neuronal independentemente do dano vascular e de outros fatores secundários decorridos do aumento de volume do encéfalo. Eles sugeriram que a hiposmolalidade intensifica a atividade simpática excitatória na comunicação neocortical e mostraram que a amplitude dos PEPS variava inversamente com a osmolalidade (ANDREW et al., 1989).

#### 3 - Alterações catiônicas:

O potássio é o principal cátion do interior da célula enquanto o sódio e cloreto dominam o espaço extracelular. Alterações nas concentrações do fluido extracelular de potássio e cálcio são comprometedores para uma atividade elétrica no SNC. As alterações nas concentrações catiônicas podem influenciar na susceptibilidade à crise por promover redução do espaço extracelular ou aumentar a concentração do potássio extracelular alterando a excitabilidade neuronal (ANDREW et al., 1989).

A crise epiléptica é frequentemente associada com comorbidades psiquiátricas (HERMANN, et al., 2000). Relatos mostram que a ingestão compulsiva de água pode conduzir ao quadro de intoxicação hídrica em pacientes com distúrbios psiquiátricos, especialmente, em portadores de esquizofrenia (OZTAS et al., 2003).

Doenças como a polidipsia psicogênica (ingestão compulsiva de água) e a síndrome inadequada da secreção do hormônio anti-diurético podem provocar hiponatremia aguda ( $< 120$  mEq/L) ou crônica ( $< 110$  mEq/L), aumentando a susceptibilidade a crises (O'BRIEN, 1998). A polidipsia psicogênica, usualmente associada com esquizofrenia, provoca hiponatremia e sugere-se que aproximadamente um quinto das mortes de esquizofrênicos abaixo de 50 anos seja atribuído às complicações da auto-indução de intoxicação hídrica (FERRIER, 1985).

Gameleira et al. (2002) mostraram que um portador de polidipsia psicogênica, ingeriu 6 litros de água por dia, apresentou hiponatremia severa (106 mEq/L) seguida de crise generalizada não convulsiva e coma. Esses achados sugeriram que o estado de intoxicação hídrica associada à hiponatremia conduz a uma progressiva excitabilidade do SNC, caracterizada por tremor, câimbras musculares (FERRIER, 1985; GAMELEIRA et al., 2002).

Informações sobre os hormônios do balanço hidroeletrólítico e epilepsia já foram registrados em animais resistentes (PERRONE et al., 1995), ratos susceptíveis à crise audiogênica (GARCIA-CAIRASCO et al., 1994; SANTOS, 2003; FONSECA et al., 2005) e em humanos (OBI et al., 2002). Porém, as divergentes metodologias e a obtenção de dados, principalmente, durante o período pós-ictal dificultam estabelecer as relações entre hormônios, balanço hidroeletrólítico e excitabilidade neuronal.

#### 1.4.1 Peptídeo natriurético atrial

##### 1.4.1.1 Características moleculares e funcionais

Antunes-Rodrigues et al. (2004), em sua revisão, fizeram citações sobre os primeiros estudos envolvendo a participação do hormônio natriurético e o sistema cardiovascular. Historicamente, as pesquisas originaram na década de 50. O primeiro estudo sobre a participação do átrio no controle da diurese surgiu em 1956. Sequencialmente, utilizando técnica de microscopia eletrônica observou-se a presença de grânulos secretórios em células cardíacas de porco. Esse achado, então, indicou que o coração poderia funcionar como órgão endócrino (HENRY et al., 1956; KISCH, 1956).

O primeiro peptídeo natriurético foi identificado em 1981. Foi demonstrado em ratos, que a infusão intravenosa de extrato atrial provocava um potente efeito hipotensor e diurético (De Bold et al citados por KUHN, 2004; VANDERHEYDEN et al., 2004). Em 1983, pela primeira vez, a substância responsável por esses efeitos, presente no interior dos miócitos atriais foi purificada (FLYNN citado por SAMSON; LEVIN, 1997) e denominada peptídeo natriurético atrial (ANP). A seguir, a partir de extrato de encéfalo de porco, foram isolados dois outros peptídeos contendo estruturas semelhantes ao ANP, identificados por ordem alfabética como peptídeo natriurético cerebral (BNP) e peptídeo natriurético do tipo C ou CNP (SUDOH et al., 1988 e 1990 citados por BAXTER, 2004; KUHN, 2004).

Os três subtipos apresentam em comum a formação de um anel composto por 17 aminoácidos ligados por pontes de dissulfeto entre dois resíduos de cisteína, nas posições 7 e 23, sendo essa formação essencial para o reconhecimento do peptídeo pelo receptor de membrana (BRENNER, 1990; VANDERHEYDEN et al., 2004). Como o peptídeo natriurético possui forte propriedade natriurética todas as três moléculas foram referenciadas como peptídeos natriuréticos, embora possam exercer outras funções ou talvez nunca expressar característica natriurética, como CNP que exerce funções autócrinas e parácrinas dentro e fora do sistema cardiovascular e particularmente não exerce a função que regula a excreção de sódio (KUHN, 2004).

O gene precursor do ANP codifica 151 aminoácidos (pré-pro-hormônio) que proteoliticamente é processado à forma de pro-hormônio contendo 126 aminoácidos (proANP<sub>1-126</sub>) estocados no interior dos miócitos atriais. O proANP é clivado durante

o processo de secreção pelo átrio por protease, para formar o proANP<sub>1-98</sub> (fragmento amino-terminal) e o protótipo biologicamente ativo contendo 28 aminoácidos (ANP<sub>99-126</sub>) denominado fragmento carboxi-terminal. As sequências do ANP encontradas em rato e humano são idênticas, exceto na posição 12. Em humano ocorre a substituição do aminoácido metionina por isoleucina. A determinação da sequência gênica completa do proANP revelou um gene contendo 3 exons separados por 2 introns. O primeiro exon contém sequências 5' não-traduzidas, o peptídeo sinal e os 16 aminoácidos. O segundo exon contém a sequência do proANP e o terceiro exon codifica os últimos três aminoácidos e a região não traduzida (BRENNER, 1990; SAMSON et al., 1997; VANDERHEYDEN et al., 2004).

Além do átrio cardíaco, o ANP e sua molécula precursora estão presentes em outros tecidos como o hipotálamo (JIRIKOWSKI et al., 1986), arco aórtico (GARDNER et al., 1987), pulmões (GUTKOWSKA et al., 1989), pituitária (GARDNER et al., 1986), adrenais (ONG et al., 1987), rins (SAKAMOTO et al., 1985), ventrículo, estômago, pâncreas e testículos (VESELY et al., 1992). Entretanto, apesar de presente em vários tecidos, a produção atrial é dezenas de vezes superior à de outras regiões (GARDNER et al., 1986).

O ANP promove efeitos que são importantes para homeostase do fluido corporal e para a regulação de pressão arterial. No sistema cardiovascular o ANP promove resposta hipotensora devido à redução do débito cardíaco, do volume intravascular (ALLEN et al., 1987; BREUHAUS et al., 1985) e da resistência vascular periférica (PARKES et al., 1988). Nos rins o ANP aumenta o ritmo de filtração glomerular (COGAN, 1986), inibe o transporte de sódio pelo segmento medular do ducto coletor (SONNENBERG et al., 1986), inibe secreção de renina (BURNETT-JR et al., 1984;) de aldosterona (MAACK, et al., 1984), aumenta a diurese e natriurese (KUHN, 2004).

#### 1.1.4.2 Receptores para os peptídeos natriuréticos

Existem três tipos de receptores para os peptídeos natriuréticos: o receptor do tipo A, o receptor tipo B e o receptor tipo C ou receptor de clearance. O ANP e o BNP ligam-se ao receptor do tipo A, porém o ANP apresenta maior afinidade de ligação a esse receptor quando comparado ao BNP. O CNP liga-se com maior afinidade ao receptor do tipo B. Os três peptídeos interagem com receptor do tipo C sendo a ordem de afinidade ANP > CNP > BNP (BAXTER, 2004; KUHN, 2004; SAGNELLA, 2001; VANDERHEYDEN et al., 2004).

Os receptores do tipo A e B são receptores protéicos com domínio transmembrana único, domínio extracelular com 44% de homologia entre eles e domínio catalítico intracelular acoplado à enzima guanilato ciclase. A ligação dos peptídeos aos receptores do tipo A e B leva à geração do segundo mensageiro GMPc, que é responsável pela maioria dos efeitos biológicos (BAXTER, 2004; KUHN, 2004; SAGNELLA, 2001; VANDERHEYDEN et al., 2004). Terada et al (1991) mostraram a presença do receptor do tipo A em todos segmentos do néfron de rato. No rim, o papel fisiológico do receptor do tipo A está associado à indução de natriurese e diurese (SAMSON et al., 1997).

O receptor do tipo C apresenta homologia estrutural com os receptores do tipo A e B, porém difere bastante no domínio intracelular catalítico apresentando curta cauda citoplasmática e não se encontra acoplado à guanilato ciclase. Os mecanismos celulares envolvidos em sua atividade biológica incluem internalização do receptor, hidrólise lisossomal do peptídeo ligante e reciclagem do receptor à superfície celular (BAXTER, 2004; KUHN, 2004; SAGNELLA, 2001; VANDERHEYDEN et al., 2004). O receptor do tipo C é encontrado no endotélio vascular, na musculatura lisa, coração, adrenal e rim (KONE, 2001) cuja função é promover a regulação da concentração plasmática de ANP (SAMSON et al., 1997). A depuração do ANP da circulação envolve duas vias: a degradação enzimática promovida pela endopeptidase neutra e a mediada pelo receptor do tipo C por meio da degradação lisossomal (VANDERHEYDEN et al., 2004). Embora os mecanismos que envolvam a regulação da expressão do receptor tipo C não sejam claramente conhecidos foi demonstrado que há maior expressão gênica desse receptor em ratos desidratados (KOLLENDEN et al., 1990). Outro fator que parece regular a expressão desse receptor é o próprio

ANP. Paradoxalmente, a essa ideia parece que o ANP não regula a expressão do receptor tipo A (SAMSON et al., 1997).

#### 1.1.4.3 Peptídeo natriurético atrial e o sistema renal

Nos rins, o ANP aumenta a taxa de filtração glomerular (GOGAN et al., 1996). O ANP aumenta a dilatação da arteríola aferente e promove constrição da arteríola eferente acarretando aumento da pressão hidrostática dentro do glomérulo, um possível mecanismo para o aumento da filtração glomerular (DUNN et al., 1986).

Nos rins, a natriurese induzida pelo ANP envolve a participação de três mecanismos: 1) alteração no transporte passivo do sódio na membrana apical; 2) alteração no transporte ativo de sódio realizado pela enzima  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  e  $\text{Na}^+\text{-ATPase}$  presente na membrana basolateral e 3) alterações no gradiente eletroquímico que direciona o transporte de sódio (BELTOWSKI et al., 2002; CARUSO-NEVES, 2004).

A inibição da reabsorção do sódio induzida pelo ANP ocorre em diversos segmentos do rim e em condições fisiológicas o ducto coletor medular interno é o principal alvo. Esse segmento representa a parte terminal do néfron responsável pela absorção de sódio ( $\approx 5\%$ ) e pela composição final da urina. Em ratos, esse segmento é composto por 90% de células principais (envolvidas no transporte do sódio e reabsorção de água) e 10% de células intercaladas responsáveis pelo equilíbrio ácido-básico. A reabsorção do sódio no ducto coletor medular interno consiste na entrada passiva do sódio através da membrana apical e da entrada ativa do sódio através da membrana basolateral por meio da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (BELTOWSKI et al., 2002).

Rocha et al. (1990) mostraram que o ANP reduz a entrada do sódio no ducto coletor medular interno. Um provável mecanismo estaria associado à inibição dos canais de sódio, presentes na membrana apical (VANDORPE et al., 1997). Na membrana apical existem dois tipos de canais para sódio. Os canais para sódio epiteliais caracterizados pela alta especificidade para o sódio sobre o potássio ( $>10:1$ ), inibidos pela amilorida e não sensíveis ao GMPc e os canais para sódio operados

por nucleotídeos que transportam o sódio, potássio e amônia com similar afinidade porém são inibidos por amilorida e GMPc. Outro argumento seria a inibição da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (SYREN et al., 1996) induzida pelo GMPc e proteína kinase G (LIGHT et al., 1990).

No que tange ao túbulo proximal, os efeitos do ANP sobre a inibição do sódio são contraditórios. Baum et al. (1986) não observaram efeito do ANP sobre o túbulo proximal. Porém, diversos estudos mostraram que o ANP foi capaz de inibir a reabsorção de sódio quando o transporte foi previamente estimulado por angiotensina II (GARVIN, 1989; EITLE et al., 1998) e noradrenalina (GARVIN, 1992). Então, Garcia et al. (1995) sugeriram que o ANP e angiotensina II interagem no túbulo proximal por meio de seus nucleotídeos e suas respectivas proteínas. A angiotensina II diminuiria a concentração de AMPc enquanto o ANP reverteria os seus efeitos pelo aumento do nível intracelular de GMPc.

Outro mecanismo observado nesse segmento foi a inibição da enzima Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. O ANP inibiu a reabsorção do sódio somente quando a enzima foi previamente tratada com noradrenalina ou angiotensina II (APERIA et al., 1994). Nesse segmento, também houve inibição da reabsorção do sódio quando a enzima Na<sup>+</sup>-ATPase foi previamente tratada com angiotensina II (LOPES et al., 1999; LARA et al., 2002).

Recentemente, foi demonstrado que a inibição da reabsorção do sódio no túbulo proximal, estimulada pelo ANP está associado à inibição da enzima Na<sup>+</sup>-ATPase localizada na membrana basolateral.. Recentemente, foi demonstrado que ANP modula a atividade de enzima Na<sup>+</sup>-ATPase, por meio da ativação receptor do tipo A envolvendo as vias cGMP e PKG (VIVES et al., 2010).

Portanto, é provável que este segmento se torne um local importante em condições patológicas quando o transporte de sódio é previamente estimulado por mediadores anti-natriuréticos (BELTOWSKI et al., 2002).



#### 1.1.4.4 Peptídeo natriurético atrial e o sistema nervoso central

Além da forte propriedade natriurética o ANP age como neuromodulador e ou neurotransmissor no SNC principalmente nas áreas do hipotálamo (rostral, lateral e na parede do terceiro ventrículo), ponte e tronco encefálico. Altas densidades do receptor do tipo A foram encontrados no bulbo olfatório, plexo coróide, órgão subfornicial, núcleo pré-óptico medial, núcleos do trato solitário, área postrema, (DUMONT et al., 2004; FERGUSON, 1997; SAMSON, 1987), amígdala e hipocampo (SAMSON, 1987). Estruturas do sistema límbico como hipocampo e amígdala, que apresentam altas densidades do receptor do tipo A para ANP, estão intimamente envolvidos no circuito neural de crises epiléticas (LOTHAMAN et al., 1995; AVOLI et al., 2002).

Densidades moderadas estão presentes na eminência mediana, hipotálamo rostral e no núcleo hipotalâmico paraventricular (DUMONT et al., 2004; SAMSON et al., 1997). Baixas densidades aparecem na pituitária e no corpo estriado (SAMSON, 1987). O receptor do tipo B é encontrado no plexo coróide com baixas densidades no órgão subfornicial, glândula pineal e área postrema. O receptor do tipo C está presente no bulbo olfatório e no plexo coróide (SAMSON et al.; 1997; DUMONT et al., 2004).

O hipotálamo é a principal estrutura encefálica que controla o balanço hidroeletrólítico. As estruturas encefálicas envolvidas no controle da natriurese contém neurônios ANPérgicos e tem sido sugerido que a liberação de ANP derivada de neurônios hipotalâmicos é essencial para aumentar da secreção de ANP pelos cardiomiócitos atriais e promover natriurese. O circuito neural envolvendo neurônios ANPérgicos e o aumento do ANP plasmático em resposta a expansão de volume já foi estabelecido. O aumento de volume extracelular promove a distensão dos barorreceptores no átrio direito, seios carotídeo e aórtico e conjuntamente com os rins, aferências são projetadas para o núcleos do trato solitário. Os impulsos então são direcionados para ativar o locus ceruleus e o núcleo da rafe. Os axônios de neurônios noradrenérgicos localizados no locus ceruleus projetam para a região do terceiro ventrículo onde ativam os seus interneurônios colinérgicos que por sua vez

estimulam neurônios ANPérgicos. Esses neurônios podem ativar as vias eferentes neurohumoral ou neuronal para concomitante liberação do ANP do encéfalo e átrio (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004).

O hipotálamo regula o balanço hídrico e o comportamento de ingestão de água. Dentro de amplos limites, a ingestão excessiva de água é eliminada pelos rins. Entretanto, um ponto de ajuste parece existir, já que uma variação na ingestão de água pode acarretar distúrbios fisiológicos. Uma das funções do sistema nervoso é manter a estabilidade do ambiente interno e muitos neurônios controladores da homeostasia se encontram no hipotálamo. Essa região tem papel relevante na integração da resposta autonômica com função endócrina e comportamental. O processo do equilíbrio hidrossalino é complexo envolvendo a participação do sistema nervoso, cardiovascular adicionado às respostas renais e comportamentais. Estruturas envolvidas no circuito das crises convulsivas também modulam a atividade hipotalâmica. Embora já existam trabalhos na literatura que investigam a relação entre os hormônios do balanço hidroeletrólítico e crises convulsivas (TCHEKALAROVA et al., 1999, 2001, 2003 e 2005a e b; OBI et al., 2002; FONSECA et al., 2005) pouco se sabe sobre a interação dos mecanismos envolvidos durante o período inter-ictal.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi investigar os efeitos do ANP sobre a susceptibilidade de crises audiogênica e induzida por PTZ.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação entre a susceptibilidade à crise audiogênica e hormônio do balanço hidroeletrólítico, especificamente associado ao ANP.
- Verificar se o ANP diretamente favorece a excitabilidade neuronal no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ.
- Estabelecer as possíveis relações entre os parâmetros que controlam o balanço hidroeletrólítico e a excitabilidade neuronal no modelo experimental de crise audiogênica.
- Avaliar os efeitos da atividade do eixo hipotálamo-hipofisário sobre a homeostase em modelo genético de epilepsia.

“O conhecimento é o tesouro, mas a prática é a chave para obtê-lo”.

Thomas Fuller

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Núcleo de Neurociências do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 2.1 Delineamentos experimentais

Os delineamentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (141/10). Foram utilizados os seguintes delineamentos: 1) comparação para pares independentes, 2) planejamento inteiramente ao acaso para amostras independentes, 3) delineamento em subparcela 4) fatorial e 5) delineamento em blocos ao acaso (MONTGOMERY, 1997; SIEGEL CASTELLAN-JR., 2006).

### 2.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, não susceptíveis aos estímulos sonoros indutores de crises, denominados resistentes, procedentes da população geral do Centro de Bioterismo (CEBIO) e ratos da colônia WAR, com susceptibilidade epiléptica audiogênica, criados e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica. Os animais tiveram livre acesso à água, ração e ciclo claro-escuro de 14 horas de luz por 10 horas de escuro, iniciando o período de luz às 6 horas da manhã. Todos os cuidados foram tomados em relação ao manuseio dos animais durante os experimentos.

### 2.3 Avaliação comportamental da crise audiogênica

Aos setenta, setenta e quatro e setenta e oito, dias todos os ratos Wistar e WAR receberam três estímulos sonoros de alta intensidade (120 dB, SPL - nível de pressão sonora) com finalidade de selecionar animais com predisposição às crises epiléticas. Essa técnica de seleção é denominada *screening*. Os animais foram submetidos ao estímulo sonoro dentro de um cilindro de acrílico transparente de 32 cm de altura, com base de 30 cm de diâmetro feito de modo a não interferir na expressão motora da crise audiogênica e ao mesmo tempo facilitar sua visualização. Este cilindro de acrílico fica posicionado dentro de uma câmara de 45 x 45 x 40 cm, sendo esta revestida nas paredes internas por material isolante acústico. O acesso visual é possível em toda parte frontal da câmara. O sistema de estimulação sonora da caixa consiste de um amplificador de 15 watts, um alto falante (tweeter - 4Ω, TLX1e, 5KHz-20KHz) e uma fonte de alimentação (12V, 3A). Neste sistema se aplica o sinal de uma campainha elétrica, gravado em CD e executado por um CD player. A intensidade do estímulo é ajustada por meio do controle de volume áudio, sendo que se colocado no máximo da escala, a intensidade sonora equivale a 120 dB SPL. O alto-falante, instalado no teto do cilindro de acrílico está conectado ao amplificador por meio de uma chave que possui a finalidade de iniciar e interromper o som abruptamente quando necessário (MORAES, 1998).

Os animais foram colocados, individualmente, dentro da caixa de estimulação e observados durante o período de 1 minuto antes da aplicação do estímulo sonoro. Em seguida, um som de intensidade máxima foi aplicado até o aparecimento do componente tônico da crise. Na ausência do componente tônico o som foi aplicado durante um período máximo de um minuto. O comportamento foi avaliado por meio de observações e quantificado pelo índice de gravidade das crises (IS) proposto por Garcia-Cairasco et al. (1996). O IS representa uma escala de gravidade gradual, onde a sequência de eventos característicos das crises são expressos em valores ordinais de 0 a 1 (TAB. 4). Foram selecionados os ratos Wistar com IS = 0 e os ratos WAR com  $IS \geq 0,85$  (DORETTO et al., 2003b), pareados pela idade (80 dias), tendo, à data dos experimentos 80 dias.

TABELA 4

## Índice de gravidade de crises audiogênicas

Índice	Comportamentos
0,00	Ausência de qualquer comportamento relacionado à crise
0,11	Um episódio de corrida
0,23	Um episódio de corrida + pulos e quedas atônicas
0,38	Dois episódios de corrida + pulos e quedas atônicas
0,61	Todos os comportamentos anteriores + convulsão tônica com arqueamento dorsal da cabeça
0,73	Todos os comportamentos anteriores + convulsões clônicas parciais e generalizadas
0,85	Todos comportamentos anteriores + espasmos clônicos
0,90	Todos os comportamentos anteriores + flexão ventral da cabeça
0,95	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão dos membros anteriores
1,00	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão de membros posteriores

Fonte: GARCIA-CAIRASCO et al., 1996.

## 2.4 Coleta de materiais

A eutanásia dos animais foi por decapitação. O sangue foi coletado através de funis heparinizados em tubos pré-refriados contendo aproximadamente 10 µL de cada inibidor de protease por mL de sangue (Pepstatina  $0,5 \times 10^{-5}$  M, PMSF  $10^{-5}$  M, EDTA  $10^{-5}$  M). Após a centrifugação do sangue (3000 rpm, 20 min, 4°C), o plasma foi separado e conservado em freezer -80°C até a realização das dosagens hormonais por radioimunoensaio. Átrios e rins foram retirados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80°C até a realização das dosagens.

## 2.5 Dosagens de peptídeo natriurético atrial

Após a eutanásia foram retirados os apêndices atriais e separado o plasma para a quantificação do ANP. No plasma, o ANP foi extraído em coluna Sep-Pak C18. As colunas foram ativadas com 8 mL de acetonitrila e lavadas com 8 mL de acetato de amônio (0,2%), pH 4. A seguir, 1 mL de plasma foi aplicado à coluna. Após lavagem com 5 mL de acetato de amônio, o ANP adsorvido foi eluído com 3 mL de acetonitrila (60%) em acetato de amônio (0,2%). Após a extração, as amostras foram secas em centrífuga evaporadora (Speed-Vac) e reconstituídas com 0,5 mL de tampão fosfato (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,14 M, albumina bovina 0,1 %, azida sódica 0,01 %, triton X-100 0,1%- pH 7,4).

Os apêndices atriais foram homogeneizados em 2 mL de solução de ácido acético (0,1 M), contendo inibidores de proteases (EDTA  $10^{-5}$  M, Pepstatina  $10^{-5}$  M e PMSF  $10^{-5}$  M). Após centrifugação, alíquotas do sobrenadante (20  $\mu$ L) foram diluídas em tampão fosfato para determinação do ANP por radioimunoensaio.

O ANP imunorreativo foi determinado de acordo com o protocolo determinado por Gutkowska et al (1987). As amostras de 100  $\mu$ L, em duplicata, foram incubadas "overnight" com 100  $\mu$ L de anticorpo anti-ANP (4 °C). Amostras diluídas do tecido cardíaco também foram incubadas com o anticorpo. Foram adicionados 100  $\mu$ L (8000 cpm) de  $^{125}$ I-ANP e incubados por mais 24 h a 4 °C. A separação do imunocomplexo foi feita por precipitação com segundo anticorpo (soro de cabra antigama-globulina de coelho). Após duas horas à temperatura ambiente, foi adicionado 0,5 mL de polietilenoglicol (6,25%) em água. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos (3000 rpm, 4 °C) e o sobrenadante foi retirado por aspiração. A radioatividade do imunocomplexo foi determinada por contador gama.

## 2.6 Dosagem de proteína

A determinação do conteúdo de proteína dos átrios foi feita pelo método de Bradford modificado (BRADFORD, 1976).



O Coomassie Brilliant Blue G-250 (100 mg) foi dissolvido em 50 mL de etanol 95% e a essa solução acrescentou-se 100 mL de ácido orto-fosfórico 85-88%. O volume foi completado com quantidade suficiente para um litro com água mili-Q.

A solução padrão foi obtida por meio da diluição de albumina sérica bovina (BSA) em água destilada com concentração final de 1 mg/mL. A partir de diluições dessa solução foi obtida a curva-padrão. As amostras foram diluídas 10 vezes e 50 µL dessa diluição foram utilizados para o ensaio. A seguir, o reagente de cor, previamente filtrado, foi adicionado (2,5 mL). A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

## 2.7 Quantificação da expressão gênica para o receptor de ANP

A vidraria utilizada no preparo de soluções seguiu as exigências da pesquisa em biologia molecular (MANIATIS et al., 1982). Todo material de vidraria não descartável foi lavado adequadamente e submetido à fornagem em estufa de esterilização (225 °C), por um período de 4 horas. O material de plástico foi autoclavado quando necessário. Foram utilizados os seguintes reagentes: isopropanol (99%), etanol (70-75%), trizol, clorofórmio, água (tridestilada e autoclavada) e dietilpirocarbonato (DEPC).

Após a eutanásia do animal, o tecido alvo (rim) foi rapidamente removido e congelado em nitrogênio líquido. O isolamento de RNAm total foi realizado pelo método de Chomczynski et al (1987) modificado. O rim (50-100 mg de tecido) foi colocado em tubo falcon contendo 1 mL de trizol, homogeneizado em velocidade máxima até que ocorresse a dissociação mecânica completa do tecido. O material foi transferido para eppendorf e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Para separação das fases (RNA, DNA e proteína) foi adicionado ao homogenato 200 µL de clorofórmio, misturado totalmente por inversão e a suspensão agitada vigorosamente por 15-30 segundos, resfriada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após 3 minutos de repouso, o homogenato foi centrifugado (12.000 rpm, 4 °C, 15

minutos), o sobrenadante transferido cuidadosamente para outro eppendorf acrescido de 500 µL de isopropanol, homogeneizado com movimentos bem leves. A mistura foi armazenada a temperatura ambiente por 10 minutos. Nova sedimentação foi realizada (12.000 rpm, 4 °C, 10 minutos). O sobrenadante foi vertido e o pellet resultante diluído em 1 mL de etanol (70%) passado levemente pelo vortex (rotação 2,2 vezes). Após 5 minutos de centrifugação (4 °C e 9.500 rpm), o sobrenadante foi vertido e o eppendorf colocado na bancada sobre papel higiênico para retirar o excesso de etanol. O pellet seco foi ressuspendido em 50 µL de água DEPC e dissociado por processo mecânico (vortex). Após verificação da integridade do RNA da amostra por eletroforese em gel de agarose, a concentração foi determinada por leitura da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm em espectrofotômetro (*GeneQuant*). Para isso, alíquotas de 2 µl da solução contendo o RNA total foram diluídas em 98 µL (1:50) de água DEPC, levemente homogeneizadas e quantificada em cubeta de quartzo específica.

As análises das sequências de nucleotídeos e a pesquisa em banco de dados foram executadas pelos programas de computador para análise de DNA, RNA e proteínas, contidos no pacote PC/GENE da *IntelliGenetics* e disponíveis na Internet, *blastn* (*NCBI*). A região-alvo para confecção do par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para os receptores de ANP continha 23 nucleotídeos. A sequência do senso para o receptor do tipo A foi 5'-ATCACAGTCAATCACCAGGAGTTC-3' e do antisenso 5'-AGATGTAGATAACTCTGCCCTTTC-3, um amplicom com 97 pb. A sequência do senso para o receptor do tipo C foi 5'-CCTACAATTTGACGAGACCAAA-3' e para o antisenso 5'-ACTCGCTCACTGCCCTGGATGTA-3', um amplicon com 73 pb.

Para normalização das concentrações de RNAm expresso nos tecidos analisados por PCR em tempo real foi utilizado o par de *primers* para o gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH). A sequência do senso foi 5'-ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3' e para o antisenso 5'-GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA-3', um amplicon com 102 pb.

A reação de transcrição reversa foi realizada pela técnica descrita por Martins et al. (1995). Primeiramente, foi aliqotado 0,4 µg de RNA total acrescido com água DEPC

para 8  $\mu\text{L}$ . Foi adicionado 1,6  $\mu\text{L}$  do antisense (50 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de oligo dT18 (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) e a mistura foi incubada a 70 °C durante o período de 10 min. Após a incubação, as amostras foram colocadas em gelo e acrescentados sequencialmente 4  $\mu\text{L}$  de tampão reação 5 vezes; 2  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (1,25 mM/ $\mu\text{L}$ ); 2  $\mu\text{L}$  de água mili-Q SF; 2  $\mu\text{L}$  de DTT; e as amostras foram incubadas a 37° C por 2 min. A seguir, foram adicionada 2  $\mu\text{L}$ (20 U/ $\mu\text{L}$ ) de transcriptase reversa (RT) às amostras, que ficaram incubadas a 40 °C por 60 min e, em seguida, foram colocadas em gelo. Após a adição de 80  $\mu\text{L}$  de água mili-Q e 200  $\mu\text{L}$  de fenol–clorofórmio–álcool isoamílico (24: 24: 1), as amostras foram centrifugadas (13.000 rpm, 15 seg) e o sobrenadante (100  $\mu\text{L}$ ) foi pipetado em um novo tubo. Ao sobrenadante foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  (10% do volume obtido) de tampão acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 220  $\mu\text{L}$  de etanol (100%).

As amostras foram levadas ao freezer (–20°C) por 24 horas. Após esse período, foi procedida centrifugação (14.000 rpm, 4 °C, 15 min) e o conteúdo do tubo foi vertido preservando-se o *pellet*. Este foi ressuscitado em 300  $\mu\text{L}$  de etanol (75%) e centrifugado novamente por 5 min. O *pellet* resultante foi seco em centrífuga a vácuo e ressuscitado em 20  $\mu\text{L}$  de água mili-Q SF.

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada por meio de um *pool* unindo a transcrição reversa de cada três amostras. Foi utilizado o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK), com um protocolo básico mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de reação de 15  $\mu\text{L}$ . A reação foi constituída por meio de: 6,65  $\mu\text{L}$  de água para PCR (SF); 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão (*10x SYBR Green PCR buffer*); 1,2  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (200  $\mu\text{M}$  cada); 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM); 3  $\mu\text{L}$  de GAPDH *primer* mix (senso e antisense - 1,5 pmol cada); 0,15  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ) de enzima AmpliTaq Gold™ e 1  $\mu\text{L}$  de cDNA da reação de transcrição reversa.

O controle negativo para GAPDH foi realizado substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação em tempo real foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 SDS* no seguinte ciclo termal: um ciclo de 52 °C durante 2 minutos (estágio 1); um ciclo a 95 °C durante 10 min (estágio 2) e 40 ciclos de 95 °C

durante 0,15 min. e 50 °C durante 1 min (estágio 3). Como controle positivo e para posterior quantificação dos resultados, uma curva-padrão do amplicon de ANP purificado foi construída a partir de diluições seriais de: 4,15; 2,08; 1,04; 0,52; 0,26; 0,13 e 0,065 ng. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real foi realizada uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* e os fragmentos amplificados também foram posteriormente visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

## 2.8 Balanço hidroeletrólítico

### 2.8.1 Osmolalidade

A osmolalidade da urina (25  $\mu\text{L}$  da amostra e 25  $\mu\text{L}$  de água destilada) e plasmática (50  $\mu\text{L}$  da amostra) foi realizada por osmometria por congelamento. Para a leitura das amostras, o osmômetro (Fisk Associates Inc-Mass, USA) foi calibrado com soluções padrão contendo 100, 290 e 500 mOsmol/kg de água.

### 2.8.2 Dosagens de sódio e potássio

As dosagens de sódio e potássio da urina e do plasma foram realizadas por fotometria de chama. Para a calibração do aparelho (FC-180, Celm) foram utilizados os padrões com as seguintes concentrações: cloreto de sódio (140 mmol de sódio), cloreto de potássio (5 mmol de potássio) e água deionizada (branco). O padrão sódio foi diluído 1:200 e o potássio 1:50. Para a leitura do sódio e do potássio as amostras foram diluídas 1:200 em água deionizada. Os dados foram expressos como concentração ( $\text{mEq.L}^{-1}$ ) e como carga excretada (produto da concentração pelo volume urinário  $\text{mEq.24 h}^{-1}$  por 100 g de peso corporal durante o período de 24 horas).

### 2.8.3 Depuração da creatinina

As dosagens de creatinina plasmática e urinária foram realizadas pelo método colorimétrico de ponto final (Bioclin®) que consiste na reação da creatinina com solução de ácido pícrico em meio alcalino. Foram utilizados padrões contendo creatinina (3 mg/dL), ácido pícrico (60 mmol/L), reagente alcalino (hidróxido de sódio 110 mmol/L, carbonato de sódio 75 mmol/L e surfactante) e reagente ácido (ácido acético 12,25 mmol/L). O sangue coletado na cauda (0,5 mL contendo heparina) e a urina (24 horas, conservada em geladeira) foram centrifugados a 3000 rpm, 37°C por 5 minutos. A curva padrão de creatinina (TABELA 5) foi obtida por três diferentes concentrações de creatinina.

TABELA 5  
Curva Padrão de Creatinina

	Branco	Padrão 3 mg/dL	Padrão 1 mg/dL	Padrão 0,5 mg/dL	Amostra
Reagente alcalino	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Água destilada	125 µL	-	-	-	-
Amostra	-	-	-	-	125 µL
Padrão	-	125 µL	125 µL	125 µL	-
Ácido Pícrico	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL

Para a dosagem de creatina no plasma, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria 37°C por 10 minutos. Foram realizadas leituras das absorvâncias da amostra ( $A_1$ ) e do padrão (P) em 510 nm, acertando o zero com branco. Em seguida foi adicionado reagente ácido (TABELA 6, acidificação). Novamente, as amostras foram homogeneizadas e permaneceram em descanso por 5 minutos entre 15 e 30 °C. Foi realizada a leitura da absorvância da amostra ( $A_2$ ) em 510 nm, acertando o zero com branco. A reação de cor ficou estável por 30 minutos.

TABELA 6

Curva Padrão de Creatinina – acidificação

	Branco	Padrão 3 mg/dL	Padrão 1 mg/dL	Padrão 0,5 mg/dL	Amostra
Reagente ácido	50 µL	-	-	-	50 µL

Para dosagem da creatinina na urina, o volume coletado foi anotado (mL). A urina foi diluída 1:25 (50 µL urina +1200 µL água destilada). Em seguida foi utilizado o procedimento descrito acima, corrigido pelo valor da diluição. Para esse ensaio, a etapa de acidificação foi omitida.

Equações utilizadas:

Equação (1) – Fator de calibração = média (concentração do padrão/absorbância do padrão)

Equação (2) – Creatinina no plasma (mg.dL<sup>-1</sup>) = (A<sub>1</sub> – A<sub>2</sub>)\*Fator de calibração

Equação (3) – Creatinina na urina (mg.dL<sup>-1</sup>) = [(Absorbância da amostra)\*25]\*Fator de calibração

Equação (4) – Creatinina na urina (mg/24 horas) = mg.dL<sup>-1</sup> x Volume de 24 h (mL)/100

Equação (5) – Volume por minuto = Volume urinário de 24 horas (mL)/1440 (min)

Equação (6) – Depuração da creatinina (mL.min<sup>-1</sup>) = (taxa de excreção da creatinina na urina (mg/min)/concentração plasmática de creatinina (mg/mL plasma)

Equação (7) – Taxa de filtração glomerular = depuração de creatinina

Equação (7) – Depuração de água livre = volume urinário de 24 horas (mL)\*[1 – (osmolalidade da urina/osmolalidade do plasma)

“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

### 3.1 SUSCEPTIBILIDADE À CRISE AUDIOGÊNICA E O PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL

#### 3.1.1 Considerações iniciais

O rato WAR é um modelo importante para o estudo da epilepsia. É um modelo genético que apresenta susceptibilidade à crise epiléptica (ROSS et al., 2000). Nesse modelo, para a obtenção da crise é necessária a predisposição inata à crise somada aos fatores iniciadores, entre eles, o estímulo sonoro (DORETTO et al., 2003b). A progressão da crise audiogênica é caracterizada por uma ou duas corridas seguidas de pulos e quedas atônicas, terminando com o comportamento convulsivo agudo do tipo tônico-clônico.

Garcia-Cairasco et al. (1994) mostraram que os ratos susceptíveis à crise audiogênica submetidos ao abrasamento audiogênico apresentavam aumento gradual na diurese e natriurese à medida que a frequência de crise aumentava e sugeriram a participação dos hormônios do balanço hidroeletrólítico na modulação da crise, entre eles o ANP. Em seguida, Perrone et al (1995) também mostraram que há aumento na diurese, natriurese e na concentração plasmática de ANP em ratos Wistar, submetidos ao abrasamento químico, induzido por PTZ. Posteriormente, Santos (2003) observou que independentemente do abrasamento audiogênico os animais com predisposição à crise audiogênica apresentavam maior diurese. Por fim, registro em humanos mostrou que há aumento na diurese, natriurese e na concentração de ANP plasmático durante o curso da crise generalizada (OBI et al., 2002).

Considerando esse conjunto de informações e principalmente a proposição sugerida por Garcia-Cairasco et al (1994), o primeiro passo dessa pesquisa foi elaborar um planejamento experimental capaz de avaliar as relações entre a susceptibilidade à crise audiogênica e o ANP, uma vez que não existe publicação referente ao assunto.



Nesse contexto, a primeira hipótese proposta foi verificar se as concentrações plasmática e tecidual de ANP estavam alteradas nos ratos WAR. Em segunda instância, para melhor compreensão dos efeitos biológicos gerados por esse hormônio, tornou-se crucial verificar se a expressão gênica dos receptores do tipo A e do tipo C no rim também estava modificada.

Para testar as hipóteses foram selecionadas técnicas já definidas na literatura. Portanto, o *screening* foi utilizado para selecionar ratos WAR susceptíveis à crise audiogênica, o radioimunoensaio para quantificar as concentrações de ANP no plasma e nos tecidos e o protocolo da reação em cadeia da polimerase em tempo real para avaliar a expressão gênica dos receptores do tipo A e C no rim, ensaio cuja padronização para o ANP foi determinada pelo Laboratório de Endocrinologia da UFMG.

### 3.1.2 Procedimentos experimentais

O delineamento experimental proposto para testar a relação entre a susceptibilidade à crise audiogênica e o ANP foi a comparação para pares independentes. Para isso foram utilizados 14 ratos Wistar machos, não susceptíveis aos estímulos sonoros indutores de crises, denominados resistentes e 14 ratos da colônia WAR, com susceptibilidade epiléptica audiogênica, pareados pela idade.

Para padronizar o experimento, todo o processo de seleção foi realizado pelo próprio pesquisador. A seleção dos animais envolveu etapas que iniciavam com o acasalamento e finalizavam com o screening. Os ratos WAR foram obtidos a partir do acasalamento consanguíneo cujos progenitores exibiam  $IS \geq 0,90$ . A sequência dos eventos está descrita na TABELA 7.

TABELA 7

Sequência das etapas para seleção dos ratos WAR

Eventos	Duração (dias)
Acasalamento	5 dias
Período gestacional	≈ 21 dias
Desmame	30 dias após o nascimento
Crescimento	40 dias após o desmame
Avaliação comportamental da crise	Aos 70, 74 e 78 dias de nascimento

Após o screening foi dado um período de repouso de antes do início dos experimentos. Os dois grupos Wistar e WAR foram sacrificados por decapitação para a quantificação do ANP no plasma e no tecido atrial e para a avaliação da expressão gênica dos receptores A e C no rim.

As latências e o comportamento da crise audiogênica foram expressos em valores medianos seguidos dos primeiro e terceiro quartis. As medianas foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* Dunn quando necessário (SIEGEL; CASTELLAN-JR, 2006).

As concentrações de ANP no plasma e nos tecidos e a expressão relativa do RNAm dos receptores do tipo A e C no rim foram expressas em valores médios seguidos do erro padrão da média. As médias foram comparadas pelo teste t de Student (MONTGOMERY, 1997).

A hipótese nula foi rejeitada para  $p < 0,05$ .

### 3.1.3 Resultados

Nos três testes do screening, nenhuma diferença foi encontrada para as latências referentes à primeira corrida (70 dias:  $2,5 \pm 2$  e 5 segundos; 74 dias:  $3 \pm 2$  e 6,5 segundos; 78 dias:  $2 \pm 2$  e 4 segundos;  $p > 0,05$ ; FIG. 1A), à segunda corrida (70 dias:  $30,5 \pm 28$  e 32 segundos; 74 dias:  $31,5 \pm 31$  e 35 segundos; 78 dias:  $29 \pm 22$  e 33 segundos;  $p > 0,05$ ; FIG. 1B) e à crise audiogênica (70 dias:  $8,5 \pm 6,5$  e 35,5 segundos; 74 dias:  $11 \pm 8$  e 37,5 segundos; 78 dias:  $10 \pm 7$  e 36 segundos;  $p > 0,05$ ; FIG. 1C).

Nas três situações distintas, os ratos WAR não apresentam IS diferentes (70 dias:  $90 \pm 90$  e 90; 74 dias:  $90 \pm 90$  e 95; 78 dias:  $95 \pm 90$  e 95;  $p > 0,05$ ; FIG. 1D). Todos os ratos Wistar não exibiram comportamento de corrida ou crise tônico-clônica generalizada e apresentaram IS = 0.

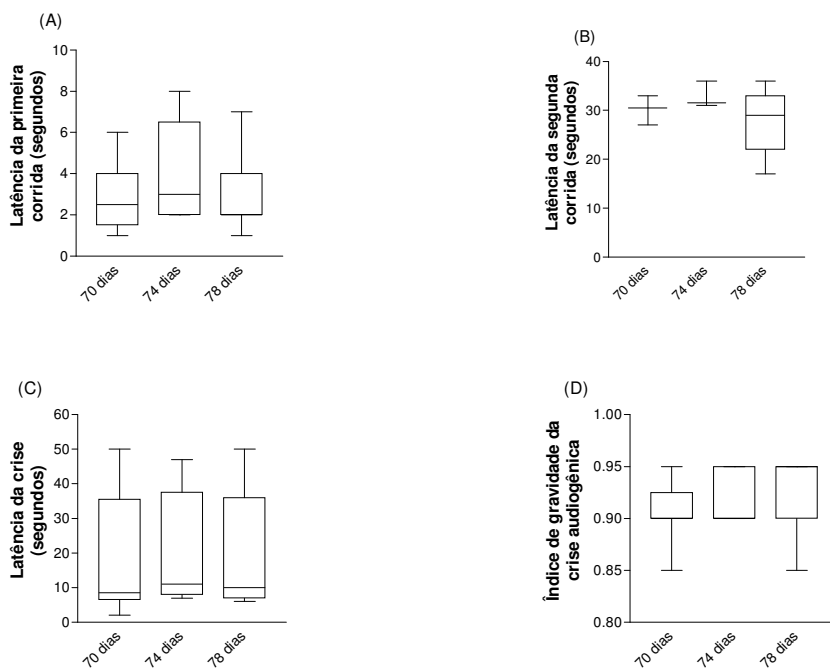


FIGURA 1 Análise comportamental da crise audiogênica. A: Latência da primeira corrida. B: Latência da segunda corrida. C: Latência da crise audiogênica. D: Índice de gravidade da crise audiogênica. Delineamento para blocos ao acaso, ANOVA – Kruskal-Wallis, ( $n = 14$ ). Resultados expressos em mediana  $\pm$  primeiro e terceiro quartis.

O grupo WAR apresentou maior concentração de ANP no plasma (Wistar:  $357,5 \pm 19,2$ ; WAR:  $513,9 \pm 28,0$  pmol/mL;  $p < 0,0001$ ; FIG. 2A) no átrio direito (Wistar:  $5,3 \pm 0,3$ ; WAR:  $10,1 \pm 0,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína;  $p < 0,0001$ ; FIG. 2B) e no átrio esquerdo (Wistar:  $6,2 \pm 0,8$ ; WAR:  $9,7 \pm 0,7$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína;  $p < 0,0001$ ; FIG. 2C).

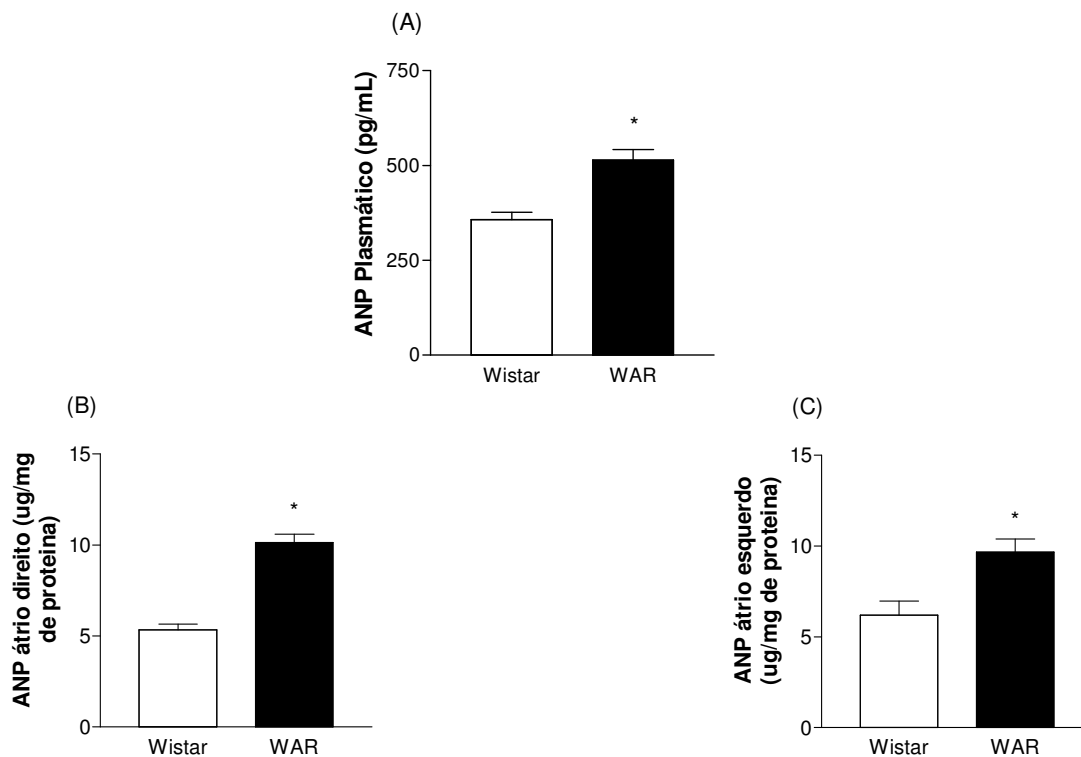


FIGURA 2 – Concentrações de ANP no plasma e nos tecidos atriais. **A:** Concentração plasmática. **B:** Concentração de ANP no átrio direito ajustado pela concentração de proteína total. **C:** Concentração de ANP no átrio esquerdo ajustado pela concentração de proteína total. Delineamento para grupos independentes, teste t Student (n = 14) \*Comparar as concentrações de ANP entre os grupos Wistar e WAR. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

Nos rins, os ratos Wistar e WAR não apresentaram diferenças para a expressão relativa do RNAm do receptor do tipo A (Wistar:  $2,6 \pm 0,8$ ; WAR:  $2,0 \pm 0,8$ ;  $p > 0,05$ ; FIG. 3A). Em contrapartida, o grupo WAR apresentou maior expressão relativa do RNAm para o receptor do tipo C (Wistar:  $1,1 \pm 0,1$ ; WAR:  $1,5 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ; FIG. 3B).

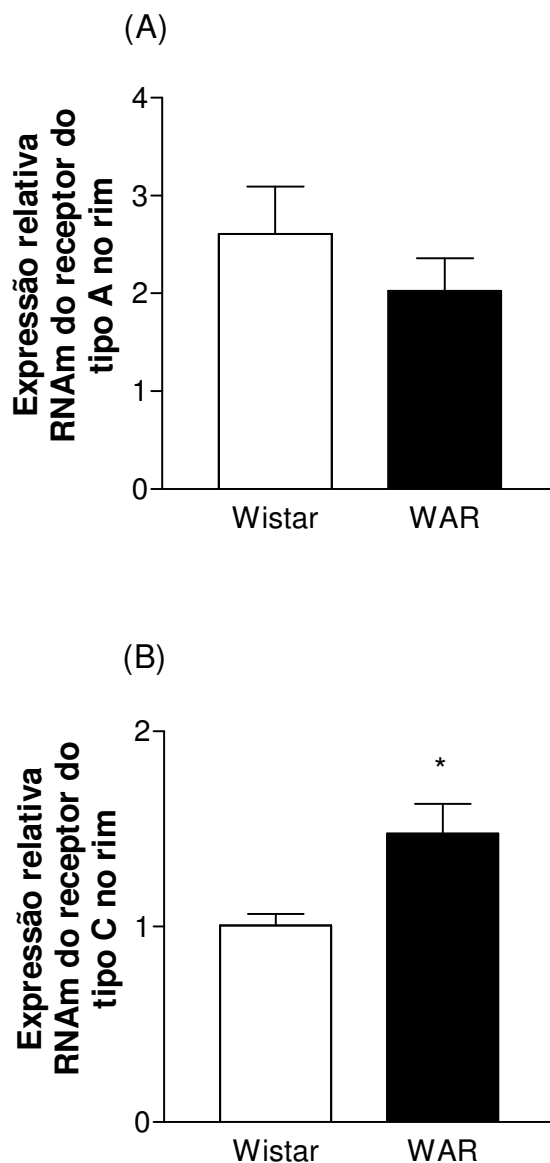


FIGURA 3 – Expressão relativa dos receptores de ANP no rim. **A:** Expressão relativa de RNAm do receptor do tipo A. **B:** Expressão relativa de RNAm do receptor do tipo C. Delineamento para grupos independentes, teste t Student ( $n = 14$ ) \*Comparar a expressão relativa entre os grupos Wistar e WAR. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

### 3.1.4 Discussão

O resultado do teste de screening confirmou que todos os animais da colônia WAR selecionados para o estudo eram susceptíveis à crise audiogênica, capazes de alcançar a classificação mais grave observada em seres humanos de acordo com a Liga Internacional Contra a Epilepsia. Todos os ratos WAR exibiram pelo menos uma corrida acrescida de pulo e queda atônica seguida da crise convulsiva generalizada do tipo tônico-clônica ( $IS \geq 0,85$ ). Durante o período pós-ictal, todos os ratos WAR exibiram comportamento de imobilidade e às vezes vocalização. Esses comportamentos são consistentes com os relatos descritos pela literatura (DORETTO et al., 2003a; GARCIA-CAIRASCO et al., 1992 e 1996; TERRA et al., 1992) sugerindo que todos os animais possuíam tecido encefálico com anormalidade crônica, provavelmente derivado de uma resposta GABAérgica alterada (GARCIA-CAIRASCO, 2002; ROSS et al., 2000).

Para a grande maioria dos animais a crise audiogênica apareceu após um único episódio de corrida. Somente quatro animais apresentaram dois episódios de corridas. Independentemente da presença da segunda corrida todos obtiveram altos valores de IS. Isso mostra que a presença da segunda não alterou o escore da crise. A maioria dos animais estudados exibiram valores de latências muito curtos para o surgimento da corrida e da crise tônico-clônica generalizada (FIG.1). Essa resposta é vista como fator positivo na seleção dos animais. Doretto et al (2003a) mostraram que há redução na latência ao longo das gerações e sugeriram que essa característica torna o modelo mais apropriado para os estudos que enfocam a epilepsia. As latências obtidas pelos ratos WAR na primeira corrida foram similares aos GEPR-9 (MISHRA et al., 1998).

O grupo de ratos Wistar, caracterizado como grupo resistente, não apresentou nenhum tipo de comportamento relacionado com a crise audiogênica ( $IS = 0$ ). Tipicamente, animais resistentes não apresentam comportamento de crise epilética, mas sua inclusão no screening foi para certificar que, realmente, os ratos utilizados como controle não respondiam aos estímulos sonoros, uma vez que há

probabilidade de encontrar animais com susceptibilidade epiléptica audiogênica na população geral de ratos Wistar.

Nesse contexto, o surgimento da crise audiogênica no grupo WAR indica que a rede neural envolvida requereu a participação da via central do sistema auditivo que contém grande número de núcleos de retransmissão dentro do tronco encefálico. Estudos sugerem que o estímulo auditivo, após atingir o colículo inferior, núcleo responsável pelo início da crise audiogênica, alcança núcleos específicos que regulam o comportamento, sendo as camadas profundas do colículo superior responsáveis pelo comportamento de corridas e a substância cinzenta periaquedutal e a formação reticular responsáveis pelo componente tônico da crise (ROSSETTI et al., 2011; DORETTO et al., 2010; FAINGOLD, 2004; GARCIA-CAIRASCO, 2002; ROSS et al., 2000).

As análises das concentrações plasmática e tecidual de ANP, obtidas durante o período inter-ictal asseveraram que os ratos WAR possuíam maiores concentrações de ANP no plasma e nos átrios direito e esquerdo comparados aos ratos Wistar. Portanto, esses resultados confirmaram a hipótese proposta por Garcia-Cairasco et al (1994) que os ratos WAR, um modelo genético de epilepsia, capaz de exibir crise tônico-clônica, realmente possuem alteração em um dos hormônios envolvidos no balanço hidroeletrolítico.

Para confirmar possíveis relações entre a susceptibilidade à crise audiogênica e a quantidade de ANP circulante no plasma foi feita a análise dos receptores do tipo A e C para ANP, no rim. Nenhuma diferença foi encontrada para expressão do RNAm do receptor A entre os grupos Wistar e WAR. Por outro lado, houve aumento da expressão do RNAm do receptor do tipo C, para o grupo de ratos WAR.

Esses resultados indicaram que o aumento na expressão do receptor do tipo C poderia ser um mecanismo para compensar o aumento do ANP no plasma. Se os ratos WAR exibirem maior concentração plasmática de ANP fisiologicamente era de se esperar uma maior depuração desse peptídeo. Então, uma opção para a depuração do ANP da circulação seria a via mediada pelo receptor do tipo C (VANDERHEYDEN et al., 2004).



Apesar do aumento na expressão gênica do receptor do tipo C nos ratos WAR parece que esse mecanismo não foi suficiente para manter o equilíbrio entre a quantidade circulante de ANP e a quantidade depurada.

Esse conjunto de informações confirmou ratos WAR possuíam maiores concentrações de ANP nos átrios e tecidos. Em vista disso, tornou-se necessário elaborar novos planejamentos experimentais que fossem capazes de avaliar a ação direta e indireta do ANP sobre a excitabilidade neuronal.

“Morre lentamente quem não muda de marca, não se arrisca a vestir uma cor ou não  
conversa com quem não conhece”.

Pablo Neruda

## 3.2 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL: CAUSA OU CONSEQUÊNCIA DA CRISE CONVULSIVA

### 3.2.1 Considerações iniciais

Mediante a confirmação que a susceptibilidade audiogênica estava associada com uma maior concentração de ANP no plasma, tornou-se crucial avaliar a ação direta desse peptídeo sobre o sistema nervoso central para averiguar a sua associação com a crise convulsiva. Dentro desse contexto foi levantada a hipótese que o ANP poderia ser um fator proeminente na excitabilidade neuronal. Para responder essa hipótese foi proposto um planejamento experimental capaz de avaliar a resposta aguda do ANP em encéfalo não susceptível à crise convulsiva e cujo mecanismo da crise estivesse associado à redução da resposta inibitória.

Um modelo experimental com essa característica é o modelo de crise convulsiva induzida por PTZ. Crises convulsivas induzidas por PTZ constitui um modelo experimental bem descrito na literatura (VELISEK et al., 1992), de fácil procedimento, capaz de acometer substratos límbicos e de tronco encefálico (BROWNING 1994; EELLS et al., 2004), produzir um conjunto de comportamentos estereotipados expressos por meio de crises convulsivas com limiares mínimo (BOUGH et al., 1999 e 2000; PI et al., 2004) e máximo distintos (COTA et al., 2009; SCARLATELLI-LIMA et al., 2003; TCHEKALAROVA et al., 1999, 2001, 2003 e 2005a e b), frequentemente utilizados na seleção de fármacos anticonvulsivantes (LÖSCHER et al., 1991, 1996 e 2002; WALLACE, 1998) e com mecanismo de ação associado à deficiência GABAérgica (FISHER, 1989; JUNG et al., 2002; LÖSCHER et al., 1996 e 2002; SECHI et al., 1997).

Por esse motivo, o modelo de PTZ foi selecionado para ser comparado ao modelo audiogênico. Os ratos WAR constituem um modelo robusto onde o sistema GABAérgico já se encontra comprometido (FAINGOLD, 2004). Portanto é uma ferramenta de extrema importância para estudos que desejam avaliar respostas crônicas relacionadas à epilepsia.

A metodologia proposta para avaliar o efeito direto do ANP sobre a excitabilidade neuronal foi por meio da análise do limiar de crise mínima e máxima induzido por PTZ. Essa metodologia já foi utilizada, em camundongos, para avaliar o efeito central da angiotensina sobre a excitabilidade neuronal (TCHEKALAROVA et al., 1999, 2001, 2003 e 2005a e b).

### 3.2.2 Material e métodos

#### 3.2.2.1 Animais

O delineamento experimental proposto para avaliação das crises mínima e máxima induzida por PTZ foi o planejamento inteiramente ao acaso para amostras independentes. Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, não susceptíveis aos estímulos sonoros, com peso corporal de 250-300g.

#### 3.2.2.2 Anestesia

Foi utilizado o anestésico Cetamina (60 mg/kg) associada a xilazina (10 mg/kg), pela via intramuscular. Também foi administrado enrofloxacin (5 mg.kg<sup>-1</sup>, sc), para cobertura antibiótica profilática e flumixina meglumina (2 mg/kg, sc) para analgesia pós-operatória.

#### 3.2.2.3 Cirurgia para implantação da cânula

Após tricotomia do escalpo, o animal foi colocado no aparelho estereotáxico (modelo Stoelting) e fixado por barras auriculares. A antisepsia no campo cirúrgico foi realizada com iodo degermante e álcool iodado. Foi realizada incisão cutânea elíptica na região dorsal do escalpo na linha interauricular, após anestesia local com lidocaína 2%. O tecido subcutâneo e periósteo foram removidos, o bregma e o lambda foram nivelados. A cânula foi inserida no ventrículo lateral direito e fixada à superfície óssea com cimento de zinco e acrílico odontológico. Foram utilizadas as seguintes coordenadas: ântero posterior (AP = 0,9), látero lateral (LL = 1,5) e dorso ventral (DV = 2,5) tendo o bregma como referência. Após um período de sete dias para recuperação da cirurgia de implantação das cânulas foram realizadas as micro-

injeções, utilizando-se base de micromanipulação adaptada à seringa do tipo Hamilton de 05 µl, por tubo de polietileno (PE20), preenchido com água destilada (GUIDINE et al., 2008).

#### 3.2.2.4 Doses de peptídeo natriurético atrial e isatina

Foram avaliadas três doses de ANP (9,8; 98 e 326,5 pmol/animal) dissolvidas em salina estéril infundidos no ventrículo lateral em um volume total de 2 µL (PATAKI et al., 1999)

Como antagonista do receptor do tipo A foi utilizada a isatina (Sigma<sup>®</sup>) na dose de 50 mg/kg (ip), diluída em salina estéril no volume de 2,5 mL/kg, administrado 30 minutos antes do tratamento com ANP (PATAKI et al., 2000).

Todos os animais controle receberam o mesmo volume de salina em todos os experimentos (PATAKI et al., 1999 e 2000).

#### 3.2.2.5 Limiar de PTZ

Após a infusão do ANP (icv) ou do antagonista para receptor do tipo A (ip), os animais receberam PTZ dissolvido em solução salina, na concentração final de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, infundido na veia da cauda por bomba de infusão, na vazão constante de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

O limiar de crise mínima foi caracterizado pelo aparecimento de mioclonia de membro anterior (BOUGH et al., 1999 e 2000; PI et al., 2004) e o limiar máximo caracterizado pelo aparecimento da crise tônico clônica generalizada (TCHEKALAROVA et al., 2001).

A quantidade total de PTZ administrada foi obtida a partir do tempo cronometrado de infusão da solução de PTZ expressa em dose limiar ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

### 3.2.2.6 Procedimentos experimentais

Os animais foram distribuídos em oito grupos compostos por seis animais e receberam o seguinte tratamento (TABELA 8):

TABELA 8

Tratamento para ANP e para a isatina

Grupos	Tratamento
Grupo 1: Controle	salina (0,9%)
Grupo 2: Tratamento	Somente ANP na dose de 9,8 pmol/animal
Grupo 3: Tratamento	Somente ANP na dose de 98 pmol/animal
Grupo 4: Tratamento	Somente ANP na dose de 326,5 pmol/animal
Grupo 5: Controle	Isatina e salina (0,9%)
Grupo 6: Tratamento	Isatina e ANP na dose de 9,8 pmol/animal
Grupo 7: Tratamento	Isatina e ANP na dose de 98 pmol/animal
Grupo 8: Tratamento	Isatina e ANP na dose de 326,5 pmol/animal

Uma semana após a cirurgia os animais foram submetidos ao tratamento. Nos grupos 1, 2, 3 e 4 o PTZ foi infundido 15 minutos após a administração de salina ou de ANP (icv). Os animais dos grupos 5, 6, 7 e 8, primeiramente, receberam a isatina (ip). Após o intervalo de 30 minutos foi administrado salina ou ANP (icv). A infusão do PTZ, na veia da cauda, ocorreu 15 minutos após a infusão da salina ou do ANP. Todos os experimentos foram realizados no período de 10:00 às 15:00 horas para minimizar os possíveis efeitos do ritmo circadiano (BOUGH et al., 1999).

Após o experimento, os animais foram injetados (icv) com *Azul de Evans* para marcação dos ventrículos e confirmação da posição da agulha injetora (PATAKI et al., 1999 e 2000)

### 3.2.2.7 Análise estatística

Em todos os tratamentos, o limiar para a crise mínima e máxima foi expresso em valores medianos seguidos dos primeiro e terceiro quartis. As medianas foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* Dunn quando necessário (SIEGEL; CASTELLAN-JR, 2006).

A hipótese nula foi rejeitada para  $p < 0,05$ .



### 3.2.3 Resultados

Nenhuma diferença no limiar de crise induzido por PTZ foi observada entre os grupos para o aparecimento da crise mínima com: salina ( $23,4 \pm 21,4$  e  $25,0$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 4A),  $9,8$  pmol/animal de ANP ( $22,5 \pm 20,6$  e  $25,1$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 4A),  $98$  pmol/animal de ANP ( $21,0 \pm 20,6$  e  $21,8$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 4A) e  $326,5$  pmol/animal de ANP ( $24,1 \pm 22,3$  e  $25,6$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 4A).

Nenhuma diferença no limiar de crise induzido por PTZ foi observada entre os grupos para o surgimento de crise mínima, na presença do antagonista do receptor do tipo A para ANP com: salina e isatina ( $21,4 \pm 21,0$  e  $25,3$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 4B),  $9,8$  pmol/animal de ANP e isatina ( $23,9 \pm 22,8$  e  $26,3$  mg/kg; FIG. 4B),  $98$  pmol/animal de ANP e isatina ( $23,7 \pm 20,5$  e  $28,7$  mg/kg; FIG. 4B) e  $326,5$  pmol/animal ANP e isatina ( $23,9 \pm 21,4$  e  $28,9$  mg/kg; FIG. 4B).

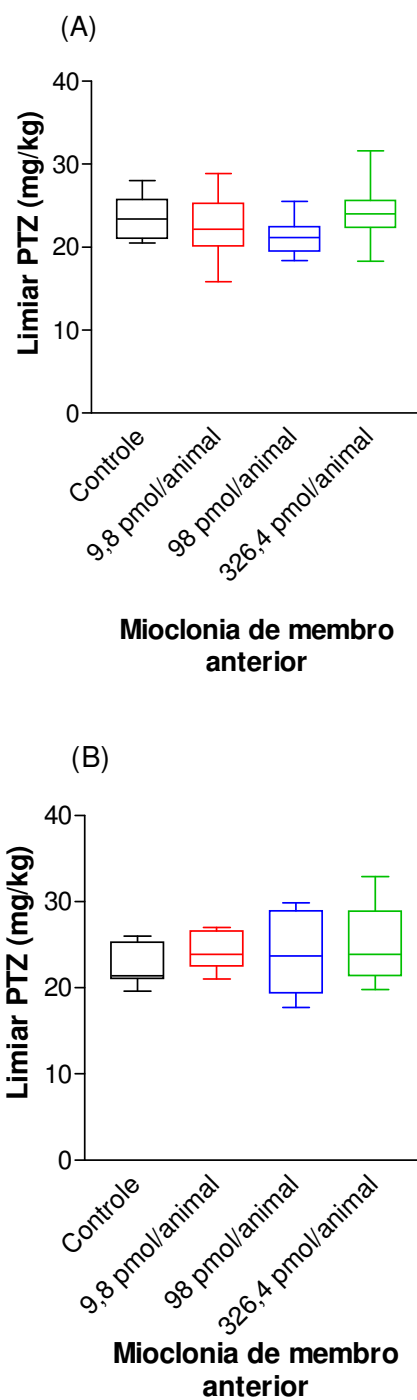


FIGURA 4 – Limiar de PTZ para crise mínima. **A:** Tratamento somente com ANP em diferentes doses. **B:** Tratamento na presença do antagonista para receptor do tipo A. Delineamento para bloco ao acaso, teste Kruskal-Wallis ( $n = 48$ ; 6 animais por grupo). Resultados expressos como mediana  $\pm$  1 e 3 quartis.

Nenhuma diferença foi observada para o comportamento de crise máxima após a infusão central de ANP: salina ( $50,3 \pm 38,8$  e  $54,0$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5A);  $9,8$  pmol/animal de ANP ( $34,2 \pm 32,0$  e  $52,8$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5A);  $98$  pmol/animal de ANP ( $35,9 \pm 31,1$  e  $49,2$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5A) e  $326,5$  pmol/animal de ANP ( $43,4 \pm 35,4$  e  $48,0$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5A).

Nenhuma diferença entre os grupos foi observada para o comportamento de crise máxima, na presença do antagonista do receptor do tipo A para ANP com: salina e isatina ( $52,3 \pm 42,3$  e  $55,9$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5B),  $9,8$  pmol/animal isatina e ANP ( $55,7 \pm 48,5$  e  $59,0$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5B),  $98$  pmol/animal de ANP e isatina ( $54,4 \pm 50,2$  e  $61,5$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5B) e  $236,5$  pmol/animal ANP e isatina ( $56,8 \pm 54,6$  e  $59,5$  mg/kg;  $p > 0,05$ ; FIG. 5B).

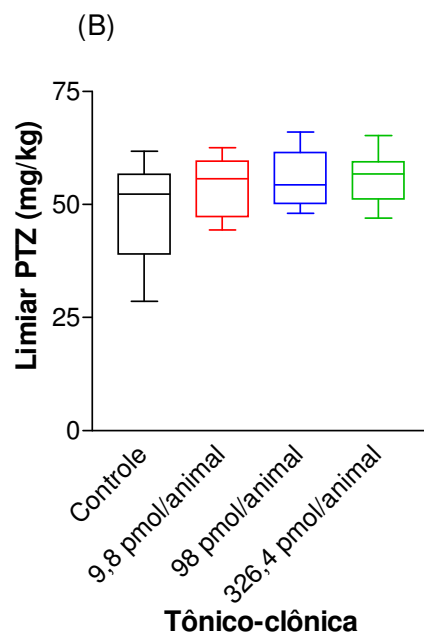
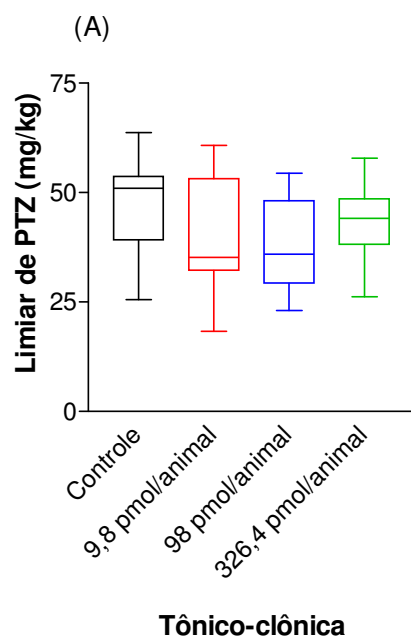


FIGURA 5 – Limiar de PTZ para crise máxima. **A**: Tratamento somente com ANP em diferentes doses. **B**: Tratamento na presença do antagonista para receptor do tipo A. Delineamento para bloco ao acaso, teste Kruskal-Wallis ( $n = 48$ ; 6 animais por grupo). Resultados expressos como mediana  $\pm$  1 e 3 quartis.

### 3.2.4 Discussão

Conforme esperado, as crises induzidas por PTZ apresentaram nitidamente duas fases motoras distintas, as crises máximas sempre precedidas de crises mínimas, cada qual com o seu conjunto de comportamentos estereotipados (VELISEKV et al., 1992). De fato, essa informação foi corroborada pela análise dos resultados comportamentais durante o experimento, cujas crises iniciaram com comportamentos parciais e finalizaram com a crise generalizada à medida que a droga foi atingindo sítios de ação amplamente localizados no encéfalo.

Estudos mostraram que a atividade epileptiforme gerada pelo PTZ envolve gradualmente substratos neurais no encéfalo, iniciando-se em pequenos circuitos altamente conectados, tais como o sistema límbico, para então propagar e abranger todo o encéfalo (BROWNING 1994; EELLS et al., 2004). As doses menores de PTZ recrutaram apenas os circuitos locais, mais susceptíveis ao estado de hiperexcitabilidade, originando os comportamentos típicos de crises parciais como a mioclonia de membro anterior (BOUGH et al., 1999 e 2000; PI et al., 2004). As doses maiores de PTZ recrutaram redes mais extensas e resultaram em comportamentos generalizados, com a expressão da crise tônico-clônica (COTA et al., 2009; SCARLATELLI-LIMA et al., 2003; TCHEKALAROVA et al., 1999, 2001, 2003 e 2005a e b).

Nenhuma diferença foi encontrada para o limiar de crise mínima caracterizada pelo aparecimento da mioclonia de membro anterior e para o limiar de crise máxima expressa pelo comportamento da crise tônico-clônica generalizada, na ausência ou presença de antagonista para receptor do tipo A para ANP. O peptídeo foi administrado em estruturas hipotalâmicas nos quais já foram quantificadas densidades do receptor do tipo A (SAMSON et al., 1997). Se o ANP modificasse a excitabilidade neuronal haveria reduções ou talvez aumento nos limiares para as crises convulsivas que envolvem o sistema límbico e de tronco encefálico. Entretanto, os resultados obtidos mostraram que nesse modelo o ANP não alterou o limiar e conseqüentemente não promoveu efeito anticonvulsivante.

Os primeiros questionamentos poderiam ser direcionados para as doses ou talvez pelo tipo de antagonista utilizado. As doses de ANP (icv) e de isatina (ip) administradas nos protocolos experimentais foram baseadas nos estudos de Pataki et al. (1999 e 2000) que avaliaram os efeitos do ANP e da isatina sobre a termorregulação.

Pataki et al. (1999 e 2000) observaram que a infusão de 50 mg/kg (ip) de isatina foi capaz de abolir os efeitos hipertérmicos induzidos pelo ANP(icv). Porém, a infusão de isatina nessa dose não reduziu o limiar de PTZ. A isatina (2,3-dioxindole) está distribuída em diversas estruturas encefálicas, principalmente no hipocampo e no cerebelo de ratos. Tem sido descrito na literatura como um inibidor de receptor do tipo A para ANP e inibidor endógeno do monoamino-oxidase B (MEDVEDEV et al., 1996). O mecanismo de ação da isatina sobre o receptor do tipo A para ANP está associada a um complexo mecanismo inibitório capaz de reduzir a formação GMPc (GLOVER et al., 1995).

Além do seu efeito sobre receptor do tipo A para ANP, também, tem sido postulado que a isatina exerce efeito ansiogênico na dose de 20 mg/kg, sedativo na dose de 50 mg/kg e anticonvulsivante nas doses de 80-200 mg/kg em vários modelos de crise convulsiva (MEDVEDEV et al., 1996). Embora, a isatina apresente limitações, ela é um antagonista de fácil acesso no mercado.

Como o ANP diretamente não favorece a excitabilidade neuronal no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ foi rejeitada a hipótese alternativa e o passo seguinte do trabalho foi avaliar a ação indireta desse peptídeo sobre a excitabilidade neuronal.

“Se eu fosse esperar que as pessoas fizessem minhas ferramentas e tudo o mais para mim, eu nunca teria feito nada”.

Issac Newton

### 3.3 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL: CIRCUITO HIPEREXCITÁVEL

#### 3.3.1 Considerações iniciais

A propriedade única dos neurônios que os caracteriza como tecido excitável é a capacidade de gerar e propagar sinais elétricos. Os íons potássio e sódio são proeminentes para regular o potencial de membrana da célula e gerar excitabilidade. Portanto, distúrbios no equilíbrio desses íons podem causar sérios problemas para o sistema nervoso central.

À medida que a concentração plasmática de potássio afasta do seu referencial de normalidade (3,5 – 5,0 mmol/L) os tecidos excitáveis promovem modificações funcionais. O aumento na concentração extracelular de potássio promove uma diminuição no gradiente de concentração permitindo que maior quantidade de potássio permaneça no meio intracelular favorecendo a excitabilidade neuronal.

O sódio também tem um papel chave na geração de sinais elétricos em tecidos excitáveis. Em repouso, a membrana celular de um neurônio é quase impermeável ao sódio. Entretanto, se a membrana aumenta a permeabilidade para este íon, maior quantidade de sódio irá se mover em favor do gradiente de concentração, favorecendo a despolarização e a geração de um sinal elétrico. Dessa forma, é importante para o organismo manter a concentração plasmática de sódio em uma faixa limitada de 135-140 mmol/L.

Os parâmetros do balanço hidroeletrólítico já foram associados à crise convulsiva. Entre os parâmetros estão a osmolalidade (ANDREW, 1991; ANDREW et al., 1987), o volume (GAMELEIRA et al., 2002; VERBALIS, 2010) e os íons (GARCIA-CAIRASCO et al., 1994; PERRONE et al., 1995; OBI et al., 2002). Também há evidência que a crise convulsiva é capaz de gerar prejuízo para o sistema renal (PERRONE et al., 1995).



Informações preliminares desse estudo mostraram que ratos WAR possuíam maiores concentrações ANP no plasma e tecido bem como alterações no receptor do tipo C. Portanto, esse conjunto de informações sugeriu que indiretamente, os parâmetros do balanço hidroeletrolítico como volume, osmolalidade e as concentrações iônicas poderiam ser fatores determinantes na excitabilidade neuronal.

Para testar a hipótese que os parâmetros envolvidos no balanço hidroeletrolítico poderiam indiretamente favorecer o surgimento de crise, foi necessário confinar os animais em gaiola metabólica. Esse é um procedimento clássico utilizado para padronizar e quantificar variáveis de fluxo continuado como a ingestão de água, a diurese, a natriurese e caliurese (GARCIA-CAIRASCO et al., 1994; SANTOS, 2003).

Para isso, foi imprescindível elaborar um delineamento experimental capaz de avaliar todas as variáveis do balanço hidroeletrolítico na ausência de crise, na mesma idade e condições experimentais, sem intervenção cirúrgica e que permitisse a reutilização dos animais em protocolos subsequentes.

### 3.3.2 Procedimentos experimentais

Para preservar os princípios que norteiam a experimentação animal, como a repetição, casualização, uniformidade dos animais, do tratamento e do meio foi utilizado o delineamento hierárquico em subparcela.

A amostra foi composta por 14 Wistar e 14 ratos WAR, pareados pela idade. Aos 70, 74 e 78 dias de nascimento, todos os animais dos grupos Wistar e WAR foram submetidos ao teste de *screening* para a avaliação comportamental da crise. Foram selecionados os ratos resistentes com índice de gravidade (IS = 0) e ratos WAR (IS  $\geq$  0,85), capazes de exibir crise convulsiva do tipo tônico-clônica.

Aos 80 dias de nascimento, os animais foram colocados individualmente, em gaiolas metabólicas. Durante 16 dias os animais receberam ração e água *ad libitum*. As coletas foram realizadas diariamente e somente nos 8<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias foram analisadas as variáveis de fluxo continuado como: peso corporal (g), a ingestão de água (mL) e ração (mg), a excreção de urina (mL), as concentrações plasmáticas de sódio e potássio (mEq/L; Fotometria de chama), as cargas excretadas de sódio e potássio (mEq/L; Fotometria de chama), a osmolalidade da urina e do plasma (mOsmol/kg H<sub>2</sub>O; osmometria por congelamento) e a depuração de água livre (Método colorimétrico de ponto final). Para garantir a homogeneidade dos procedimentos, todas as coletas foram realizadas na estação de verão.

As médias das variáveis de fluxo continuado foram avaliadas pela ANOVA no modelo linear geral, seguida de *post-hoc* Tukey (MONTGOMERY, 1997).

A decisão para aceitação ou rejeição da hipótese nula foi para  $p < 0,05$ .

### 3.3.3 Resultados

A FIG. 6 mostra os valores médios do peso corporal e da ingestão de ração dos grupos Wistar e WAR referente aos 8<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias de permanência na gaiola metabólica. O grupo WAR apresentou menor peso corporal (Wistar:  $341,3 \pm 3,1$ ; WAR:  $292,9 \pm 2,4$  g;  $p < 0,0001$ ; FIG. 6A) e maior ingestão de ração (Wistar:  $7,1 \pm 0,2$ ; WAR:  $8,3 \pm 0,1$  g;  $p < 0,0001$ ; FIG 6B).

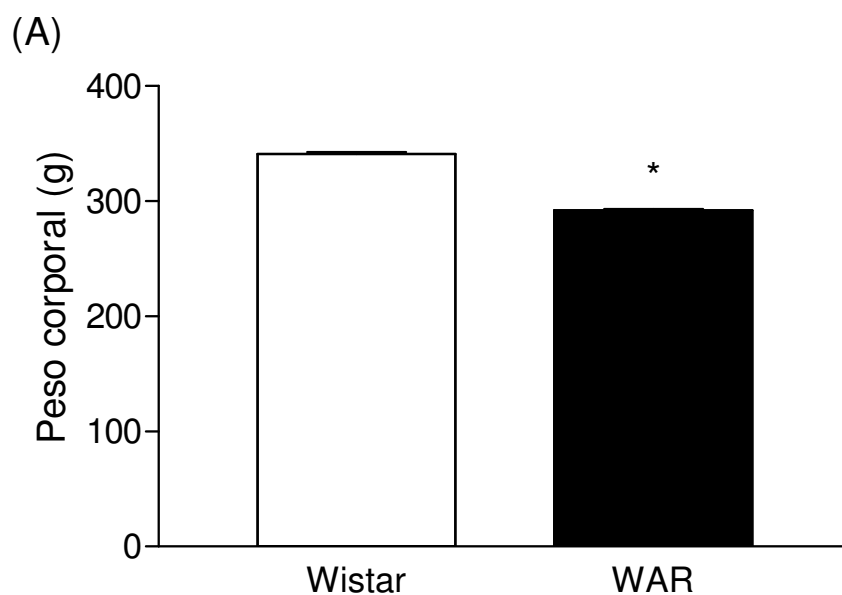


FIGURA 6 – Peso corporal (A). Delineamento em subparcela, ANOVA – modelo linear geral (n = 14 animais por grupo). \*Comparar o peso corporal entre os grupos Wistar e WAR. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

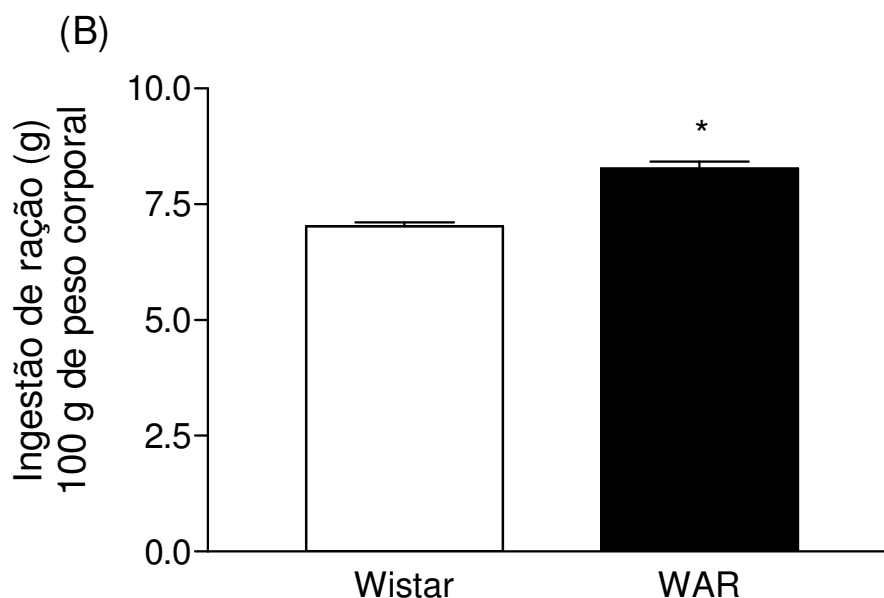


FIGURA 6 – Ingestão de ração (B). Delineamento em subparcela, ANOVA – modelo linear geral (n = 14 animais por grupo). \*Comparar a ingestão de ração entre os grupos Wistar e WAR. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

A TABELA 9 mostra os valores médios da carga excretada de potássio, das concentrações de sódio, potássio e osmolalidade plasmáticas e da depuração de água livre de ratos Wistar e WAR, aos 8°, 10° e 12° dias de permanência na gaiola metabólica. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

TABELA 9

Parâmetros do balanço hidroeletrólítico em ratos

	Wistar	WAR	p
N	14	14	
Potássio urina (mEq/24 horas)	0,74 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,02	0,934
Sódio plasma (mmol/L)	140,9 $\pm$ 1,5	141,4 $\pm$ 1,4	0,852
Potássio plasma (mmol/L)	3,4 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,1	0,124
Osmolalidade plasma (mosmol/kg H <sub>2</sub> O)	285,3 $\pm$ 2,4	287,5 $\pm$ 2,4	0,532
Depuração de água livre (mL/24 horas)	-48,6 $\pm$ 1,9	-50,7 $\pm$ 1,7	0,575

A FIG.7 mostra os valores médios da ingestão de água, excreção de urina, osmolalidade urinária, carga excretada de sódio e potássio, taxa de filtração glomerular referente aos 8<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias de permanência na gaiola metabólica.

O grupo WAR ingeriu maior volume de água (Wistar:  $8,1 \pm 0,2$ ; WAR:  $12,5 \pm 0,2$  mL;  $p < 0,0001$ ; FIG 7A), excretou maior volume de urina (Wistar:  $2,9 \pm 0,1$ ; WAR:  $4,1 \pm 0,2$  mL;  $p < 0,0001$ ; FIG. 7B) com menor osmolalidade (Wistar:  $1730,0 \pm 68,0$ ; WAR:  $1477,8 \pm 50,3$  mOsmol/kg H<sub>2</sub>O;  $p < 0,01$ ; FIG. 7C), excretou maior quantidade de sódio (Wistar:  $0,24 \pm 0,01$ ; WAR:  $0,28 \pm 0,01$  mEq/24hr;  $p < 0,05$ ; FIG 7D) e apresentou maior taxa de filtração glomerular (Wistar:  $0,51 \pm 0,05$ ; WAR:  $0,73 \pm 0,08$  mL/min; \* $p < 0,05$ ; FIG. 7E).

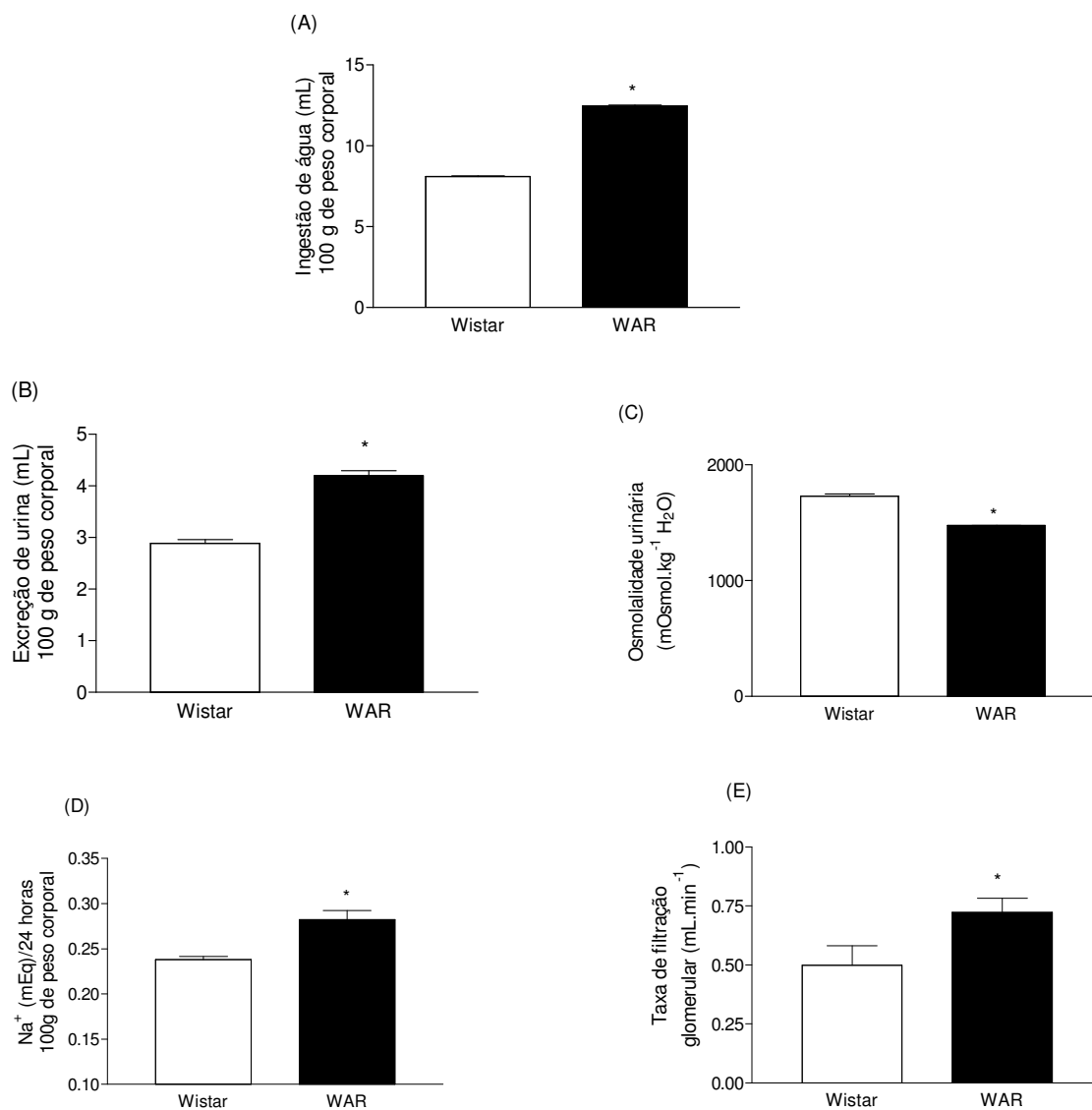


FIGURA 7 - Balanço hidroeletrólítico. **A:** Ingestão de água. **B:** Excreção de urina. **C:** Osmolalidade urinária. **D:** Carga excretada de sódio na urina. **E:** Taxa de filtração glomerular. Delineamento em subparcela, ANOVA – modelo linear geral (n = 14 animais por grupo). \*Comparar os grupos Wistar e WAR. Resultados expressos em média ± EPM.

### 3.4.3 Discussão

Todos os animais do grupo WAR exibiram crise do tipo tônico-clônica. Esse comportamento confirmou que os dados referentes ao balanço hidroeletrólítico foram obtidos em animais com susceptibilidade à crise audiogênica. O pareamento dos grupos pela idade garantiu a homogeneidade da amostra mostrando que para a mesma faixa etária os ratos WAR apresentaram menor peso corporal apesar da maior ingestão de ração. Esses resultados indicaram que essa é uma característica inerente ao modelo e que o pareamento por meio do peso corporal provavelmente compromete as respostas que são afetadas pelo envelhecimento.

Nenhuma diferença foi observada para as concentrações de sódio, potássio e osmolalidade plasmáticos, bem como, para a carga excretada de potássio na urina e a depuração de água livre entre os grupos, durante a permanência na gaiola metabólica. Esses resultados mostraram que a osmolalidade e concentração de íons, parâmetros do balanço hidroeletrólítico, indiretamente não são fatores proeminentes que favorecem a excitabilidade neuronal, no modelo WAR.

Nesse contexto, se o estado osmótico fosse capaz de favorecer a excitabilidade neuronal em ratos susceptíveis à crise audiogênica era de se esperar uma osmolalidade plasmática com valores próximos ou inferiores 250 mOsmol/kg H<sub>2</sub>O. Andrew et al (1989) mostraram que esse valor de referência altera o potencial de campo e o potencial excitatório pós-sináptico aumentando a excitabilidade neuronal. Paradoxal a esse resultados, os ratos Wistar e WAR utilizados no estudo exibiram osmolalidade plasmática em torno de 286 mOsmol/kg H<sub>2</sub>O, valores coerente com o padrão de normalidade (280 a 290 mOsmol/kg.H<sub>2</sub>O) encontrado em ratos (PORZIO et al., 2000).

Se o ambiente iônico estivesse alterado favorecendo a excitabilidade neuronal, os ratos WAR deveriam apresentar indício de hipercalemia. Porém, nenhuma dessas condições foi diagnosticada no modelo. Essa hipótese foi descartada porque os animais apresentaram concentrações plasmáticas de potássio e sódio condizente aos valores de referência de normalidade sugeridos pela literatura de 140 mmol/L

para o sódio e 5mmol/L para o potássio (MAKINO et al., 1996; SHYI-JANG et al., 1998).

Os ratos WAR ingeriram maior quantidade de água em relação ao seu controle. Em contrapartida, eles excretaram maior volume de urina e quantidade de sódio, apresentaram maior taxa de filtração glomerular e menor osmolalidade urinária quando comparados aos ratos Wistar.

A maior ingestão de água exibida pelos ratos WAR na ausência de crise convulsiva confirmou que parâmetro volume estava alterado. Isso sugeriu que indiretamente a maior concentração de ANP no plasma não estava associada com a excitabilidade neuronal, mas poderia ser um mecanismo para justificar o aumento da diurese e da natriurese.

A maior ingestão hídrica encontrada nos ratos WAR corroborou os resultados de Santos (2003). Porém, os resultados referentes à diurese e natriurese foram divergentes. Essas divergências podem estar associadas aos procedimentos metodológicos empregados. Além disso, o número de resposta gerada não foi suficiente para garantir dez graus de liberdade para o resíduo, requisito obrigatório nas comparações que envolvem as análises de variância.



“De erro em erro vai se descobrindo toda a verdade”

Sigmund Freud

### 3.4 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL – EFEITO HOMEOSTÁTICO

#### 3.4.1 Considerações iniciais

Obi et al. (2002), por meio de um estudo clínico, mostraram que lesão encefálica envolvendo o lobo temporal provocava poliúria, aumentava a excreção de sódio e a concentração plasmática de ANP durante o desenvolvimento da crise. Esses autores sugeriram que a crise poderia estimular estruturas hipotalâmicas, especialmente o terceiro ventrículo e como resposta haveria uma maior secreção de ANP pelos cardiomiócitos. As crises foram acompanhadas por automatismo e confusão mental indicando que se tratava de uma crise parcial simples com manifestações autonômicas que evolui para crise parcial complexa com automatismo. Além disso, os sintomas indicavam que o foco epiléptico estava localizado no hipotálamo e a atividade epiléptica poderia ter sido originada por uma hipertermia estimulada pelo hipotálamo posterior. Logo após essa publicação, Fonseca et al. (2005), mostraram que a região magnocelular constituída pelos núcleos, paraventricular e supra-óptico que participam na regulação do balanço hidroeletrolítico também é recrutada durante a crise audiogênica, em ratos WAR.

O organismo possui diferentes vias para a excreção de íons e água sendo os rins a via primária para esse mecanismo. Logo, a manutenção do volume sanguíneo e da osmolalidade no meio extracelular forma uma rede complexa de controle homeostático, onde a urina é a principal via para perda da água. O controle osmótico para diurese é realizado por células neurosecretórias magnocelulares que controlam a secreção de vasopressina da neurohipófise. O núcleo hipotalâmico que contém as células magnocelulares também é inervado por fibras que contém ANP (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004).

O SNC está envolvido na regulação do ANP plasmático. A regulação envolve respostas hemodinâmica e humoral. A primeira é afetada por volume e carga osmótica, enquanto a segunda é afetada pela distensão atrial (RAUCH et al., 1990). Portanto, o próximo passo do estudo foi avaliar como a ativação do eixo hipotálamo-

hipofisário se associava com a homeostase em animais susceptíveis à crise audiogênica.

A privação de água é um potente estímulo para modificar o balanço de água e eletrólitos. Em ratos adultos, a privação de água diminui o volume extracelular e intracelular conduzindo aumento na osmolalidade plasmática e na concentração de sódio acompanhada de mudanças na secreção dos hormônios que controlam o balanço hidroeletrólítico. Certamente, a privação de água aumenta a atividade da renina, as concentrações de angiotensina e vasopressina no plasma (EL FAZAA et al., 2000). Por outro lado, espera-se que haja redução na concentração plasmática de ANP (SHYI-JANG et al., 1998).

Portanto, a privação de água é um protocolo clássico, capaz de ativar o eixo hipotálamo-hipofisário e gerar estresse homeostático em ratos (EL FAZAA et al., 2000). O terço médio do hipotálamo, circundando a haste hipofisária contém os principais núcleos hipotalâmicos, intercalados entre dois sistemas de fibras: o fascículo prosencefálico medial que conecta o hipotálamo com o tronco encefálico, amígdala e córtex encefálico e o segundo, constituído por um pequeno sistema de fibras localizado medialmente aos principais núcleos hipotalâmicos na parede do terceiro ventrículo. Esse sistema de fibras liga o hipotálamo com a substância cinzenta periaquedutal no mesencéfalo, importante via para regular as funções integrativas complexas além de ser um dos substratos envolvidos na crise audiogênica.

Para avaliar os efeitos da atividade do eixo hipotálamo-hipofisário sobre a homeostase em modelo genético de epilepsia foi elaborado um protocolo com a finalidade de retirar em grande parte os efeitos endógenos produzidos pelo ANP. Uma das maneiras de avaliar a retirada dos efeitos biológicos induzidos pelo ANP foi quantificando a expressão dos seus receptores renais, principalmente, o receptor responsável pela sua depuração durante a privação de água.

### 3.4.2 Procedimentos experimentais

O delineamento proposto para a avaliação dos parâmetros do balanço hidroeletrolítico após a privação de água foi o modelo fatorial 2x2x2 com sete repetições. Para isso foram utilizados os mesmos animais do protocolo anterior.

Após 16 dias de gaiola metabólica, os grupos dos animais Wistar e WAR foram subdivididos e aleatoriamente alocados em 04 grupos:

Grupo controle: animais Wistar sem privação de água (n =7)

Grupo controle: animais WAR sem privação de água (n =7)

Grupo tratamento: animais Wistar com privação de água (n =7)

Grupo tratamento: animais WAR com privação de água (n =7)

Ao completarem 16 dias de confinamento, os animais foram privados de água durante 72 horas (MAKINO et al., 1996; KIM et al., 2002). Nas últimas 48 horas foram quantificados as variáveis de fluxo continuado como o peso corporal, a ingestão de água e ração, a excreção de urina e a osmolalidade da urina.

Em seguida, os grupos Wistar e WAR foram sacrificados por decapitação para a quantificação do ANP no plasma e no tecido atrial e para a avaliação da expressão gênica dos receptores A e C no rim. Além disso, foram quantificadas as concentrações de sódio e a osmolalidade no plasma. A metodologia utilizada foi previamente descrita. A FIG. 8 mostra a sequência dos eventos ocorridos durante o período em que os animais permaneceram na gaiola metabólica.

As variáveis de fluxo continuado, as concentrações de ANP no plasma e nos tecidos, a expressão relativa do RNAm dos receptores do tipo A e C no rim e as concentrações de sódio e a osmolalidade no plasma foram expressas em valores médios seguidos do erro padrão da média.

As médias das variáveis de fluxo continuado foram avaliadas pela ANOVA no modelo fatorial, seguida de *post-hoc* Tukey (MONTGOMERY, 1997).



### 3.4.3 Resultados

A comparação para grupos independentes mostrou que após a privação de água o grupo WAR exibiu maior concentração de ANP no plasma (Wistar:  $30,7 \pm 0,2$ ; WAR:  $60,1 \pm 6,0$  pmol/mL;  $p < 0,0001$ ; FIG. 9A) e no átrio direito (Wistar:  $3,5 \pm 0,2$ ; WAR:  $6,2 \pm 0,8$  µg/mg de proteína;  $p < 0,001$ ; FIG. 9B). Nenhuma diferença foi observada na concentração do átrio esquerdo entre os grupos (Wistar:  $5,3 \pm 0,9$ ; WAR:  $5,9 \pm 0,3$  µg/mg de proteína;  $p > 0,05$ ; FIG. 9C).

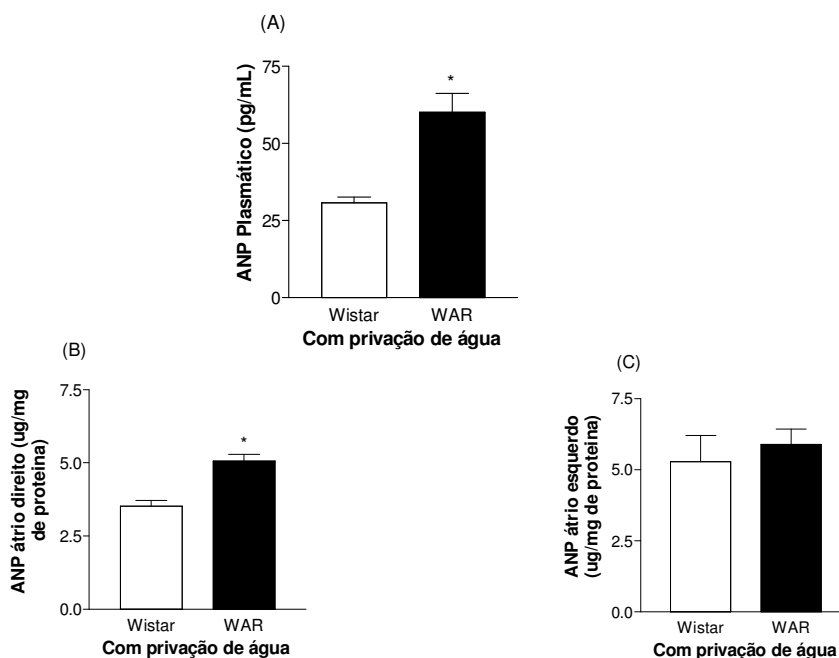


FIG 9 - Concentrações de ANP no plasma e átrios após a privação de água. **A:** Concentração plasmática de ANP **B:** Concentração de ANP no átrio direito corrigido pela proteína total **C:** Concentração de ANP no átrio esquerdo corrigido pelo valor da proteína total. Delineamento para grupos independentes. Teste t de Student ( $n = 14$ ). \*comparar Wistar vs WAR. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM.

A análise no modelo fatorial permitiu que fossem realizadas as comparações entre as concentrações de ANP em animais que receberam água *ad libitum* (FIG. 1) com os animais submetidos à privação de água. Houve redução significativa da concentração de ANP no plasma e no átrio direito para ambos os grupos.

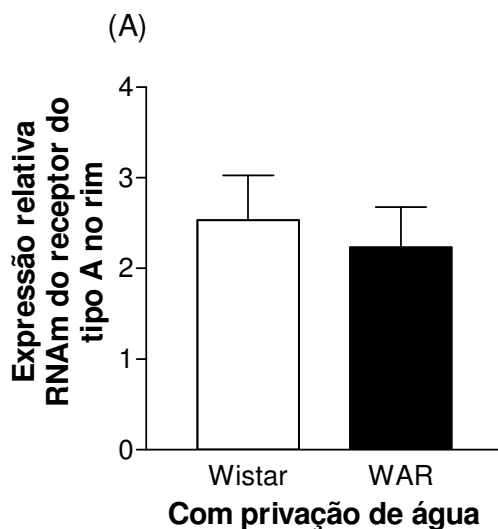
No grupo dos ratos Wistar houve uma redução plasmática na ordem de 91,4% (animais sem privação de água:  $357,5 \pm 19,2$ ; animais com privação de água:  $30,7 \pm 0,2$  pmol/mL;  $p < 0,0001$ ) e de 88,3% no grupo WAR (animais sem privação de água:  $513,9 \pm 28,0$ ; animais com privação de água:  $60,1 \pm 6,0$  pmol/mL;  $p < 0,0001$ ).

No átrio direito, a quantidade de ANP corrigida pelo valor da proteína total, também ficou reduzida. Houve uma redução de 34,0% para o grupo Wistar (animais sem privação de água:  $5,3 \pm 0,3$ ; animais com privação de água:  $3,5 \pm 0,2$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína,  $p < 0,0001$ ) e de 38,6% para o grupo WAR. (animais sem privação de água:  $10,1 \pm 0,5$ ; animais com privação de água:  $6,2 \pm 0,8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína,  $p < 0,0001$ ).

Embora, nenhuma diferença tenha sido observada na quantidade de ANP no átrio esquerdo entre os grupos submetidos à privação de água, houve redução de 39,1% no grupo WAR (animais sem privação de água:  $9,7 \pm 0,5$ ; animais com privação de água:  $5,9 \pm 0,3$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína,  $p < 0,0001$ ) e de 14,5% no grupo Wistar (animais sem privação de água:  $6,2 \pm 0,8$ ; animais com privação de água:  $5,3 \pm 0,9$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína,  $p > 0,05$ ).

A comparação para grupos independentes mostrou que após a privação de água não houve diferença na expressão gênica do receptor do tipo A (Wistar:  $2,5 \pm 0,9$ ; WAR:  $2,2 \pm 0,8$ ;  $p > 0,05$ ; FIG.10A) no rim. A análise no modelo fatorial mostrou que a privação de água não alterou a expressão gênica do receptor do tipo A para o grupo Wistar (antes da privação de água:  $2,6 \pm 0,8$ ; após a privação de água:  $2,5 \pm 0,9$ ;  $p > 0,05$ ) e para o grupo WAR (antes da privação de água:  $2,0 \pm 0,8$ ; após a privação de água:  $2,2 \pm 0,8$ ;  $p > 0,05$ ).

Em função do coeficiente de variação apresentado pelo grupo WAR após a privação de água não foi possível realizar análise inferencial dos dados. Portanto, os resultados obtidos para o receptor do tipo C após a privação de água foram avaliados por análise descritiva. Os dados sugerem que não há diferenças na expressão gênica para o receptor C entre os grupos Wistar e WAR privados de água (Wistar:  $2,1 \pm 1,0$ ; WAR:  $2,4 \pm 1,6$ ; FIG.10B). A magnitude da expressão gênica do receptor do tipo C, embora não significativa, dobrou nos animais Wistar (antes da privação:  $1,1 \pm 0,1$ ; após a privação de água:  $2,1 \pm 1,0$ ) e WAR (antes da privação:  $1,5 \pm 0,3$ ; após a privação:  $2,4 \pm 1,6$ ) comparados aos seus congêneres que receberam água *ad libitum*.





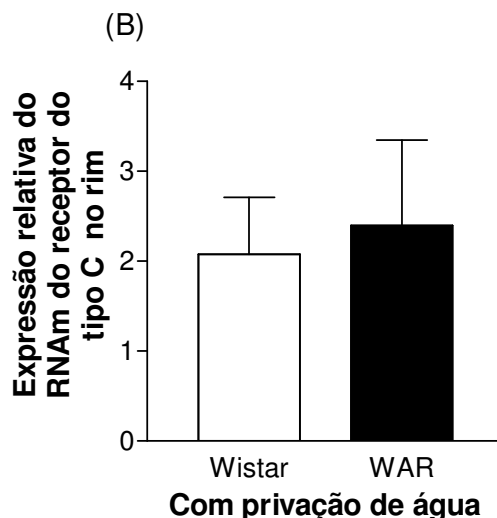


FIGURA 10 – Expressão relativa dos receptores de ANP no rim após a privação de água. **A:** Expressão relativa de RNAm do receptor do tipo A. **B:** Expressão relativa de RNAm do receptor do tipo C. Delineamento para grupos independentes, teste t Student (n = 14) Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

O grupo WAR com ingestão de água *ad libitum* apresentou menor peso corporal quando comparado aos seus controles (Wistar:  $381,1 \pm 5,8$ ; WAR:  $302,9 \pm 4,9$  g;  $p < 0,0001$ ; FIG.11A). Os ratos WAR submetidos à privação de água também exibiram menor peso corporal quando comparados aos controles (Wistar:  $313,6 \pm 7,0$ ; WAR:  $253,5 \pm 3,8$  g;  $p < 0,0001$ ; FIG. 11A). A privação de água promoveu redução significativa no peso corporal. Houve redução significativa de 17,7% no grupo Wistar e de 16,3% para o grupo WAR. A redução do peso corporal foi proporcional em ambos os grupos, submetidos à privação hídrica.

Os ratos WAR com ingestão de água *ad libitum* apresentaram maior ingestão de ração (Wistar:  $7,3 \pm 0,2$ ; WAR:  $8,2 \pm 0,1$  g/100 g de peso corporal;  $p < 0,001$ ; FIG.11B). Nenhuma diferença para a ingestão de ração foi observada entre os grupos Wistar e WAR após a privação de água (Wistar:  $2,8 \pm 0,2$ ; WAR:  $2,6 \pm 0,3$  g/100g de peso corporal;  $p > 0,05$ ; FIG.11B). A privação de água promoveu redução significativa na ingestão de ração. Houve redução significativa de 61,6% para o grupo Wistar e 68,3% para o grupo WAR (68,3%). A magnitude da redução foi proporcional em ambos os grupos, submetidos à privação hídrica.

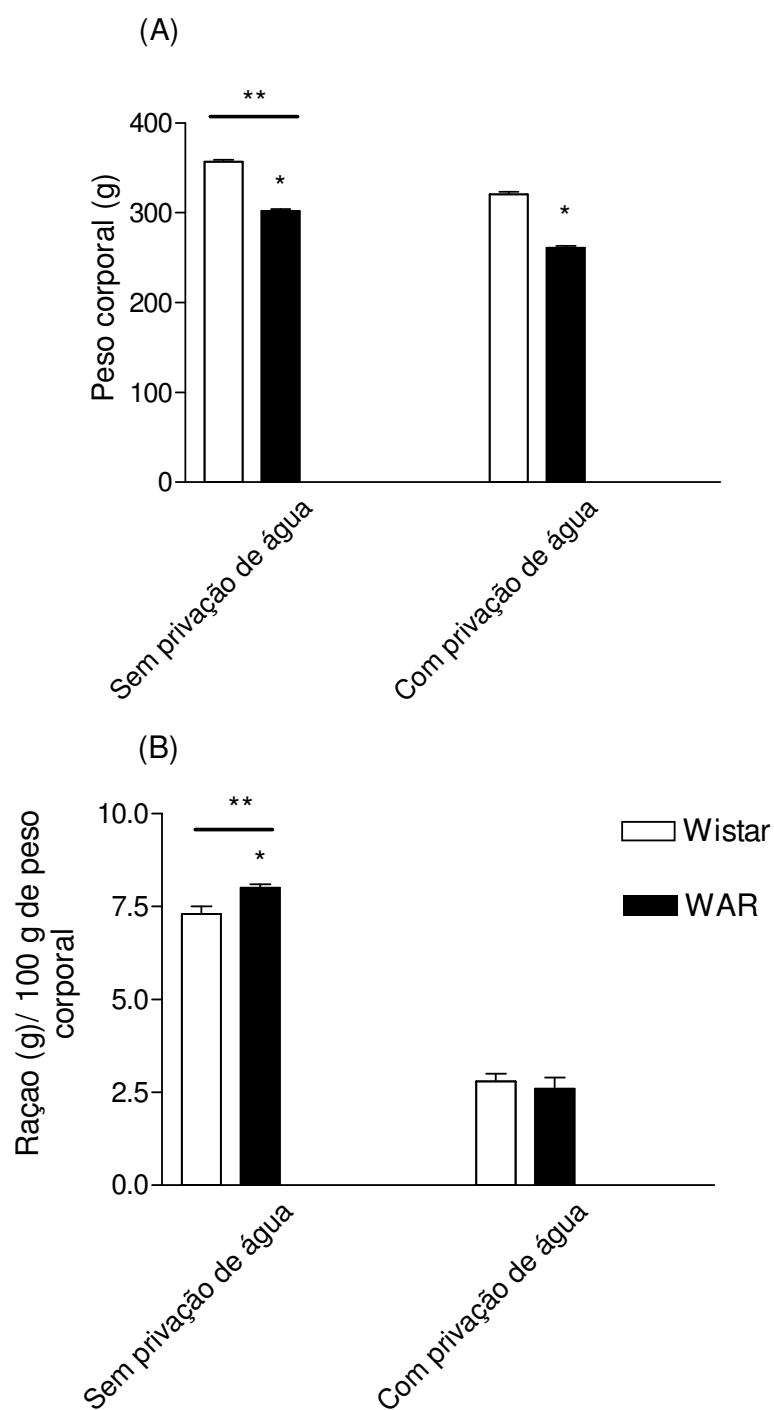


FIGURA 11 - Balanço hidroeletrólítico após a privação de água **A**: Peso corporal. **B**: Ingestão de ração do grupo sem privação de água. Delineamento fatorial 2x2x2 com sete repetições (n = 14 animais por grupo). \*Comparar os grupos Wistar e WAR. \*\* comparar grupos sem e com privação de água. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

O grupo WAR ingeriu maior volume de água comparado ao seu controle (Wistar:  $8,5 \pm 0,3$ ; WAR:  $12,3 \pm 0,4$  mL/100 g de peso corporal;  $p < 0,0001$ , FIG.12).

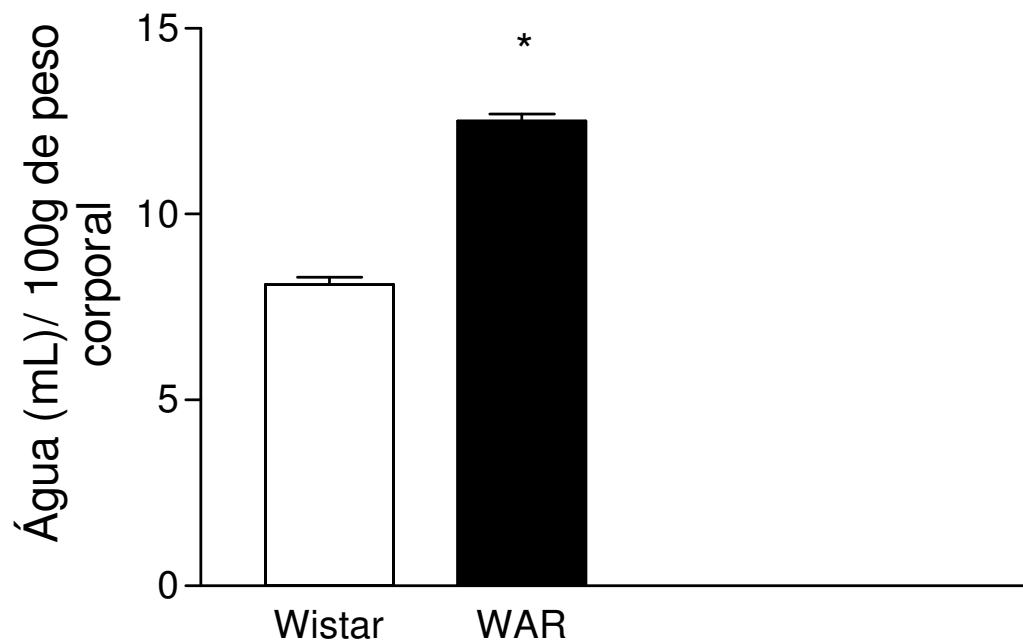


FIGURA 12 – Balanço hidroeletrolítico. Ingestão de água do grupo sem privação de água. Delineamento para grupos independentes, teste t Student ( $n = 14$ ). \*Comparar os grupos Wistar e WAR. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

O grupo WAR com ingestão de água *ad libitum* apresentou maior excreção de urina quando comparados ao seu controle (Wistar:  $2,7 \pm 0,1$ ; WAR:  $4,1 \pm 0,3$  mL/100 g de peso corporal;  $p < 0,0001$ ; FIG.13A). Nenhuma diferença na excreção de urina foi observada entre os grupos Wistar e WAR após a privação de água (Wistar:  $0,6 \pm 0,1$ ; WAR:  $1,0 \pm 0,2$  mL/100 g de peso corporal;  $p > 0,05$ ; FIG.13A). A privação de água promoveu redução na excreção de urina. Houve redução significativa de 77,8% para o grupo Wistar e de 75,6% para o grupo WAR. A magnitude da redução foi proporcional entre os grupos, submetidos à privação de água.

O grupo WAR com ingestão de água *ad libitum* apresentou menor osmolalidade urinária comparado ao seu controle (Wistar:  $1879,6 \pm 52,1$ ; WAR:  $1352,6 \pm 63,4$  mOsmol/kg H<sub>2</sub>O;  $p < 0,01$ ; FIG.13B). Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos Wistar e WAR após a privação de água (Wistar:  $2188,6 \pm 85,0$ ; WAR:  $2435,4 \pm 81,1$  mOsmol/kg H<sub>2</sub>O;  $p > 0,05$ ; FIG.13B). A privação de água promoveu aumento significativo na osmolalidade urinária. Houve aumento significativo de 16,4% para o grupo Wistar e de 80,1% para o Grupo WAR.

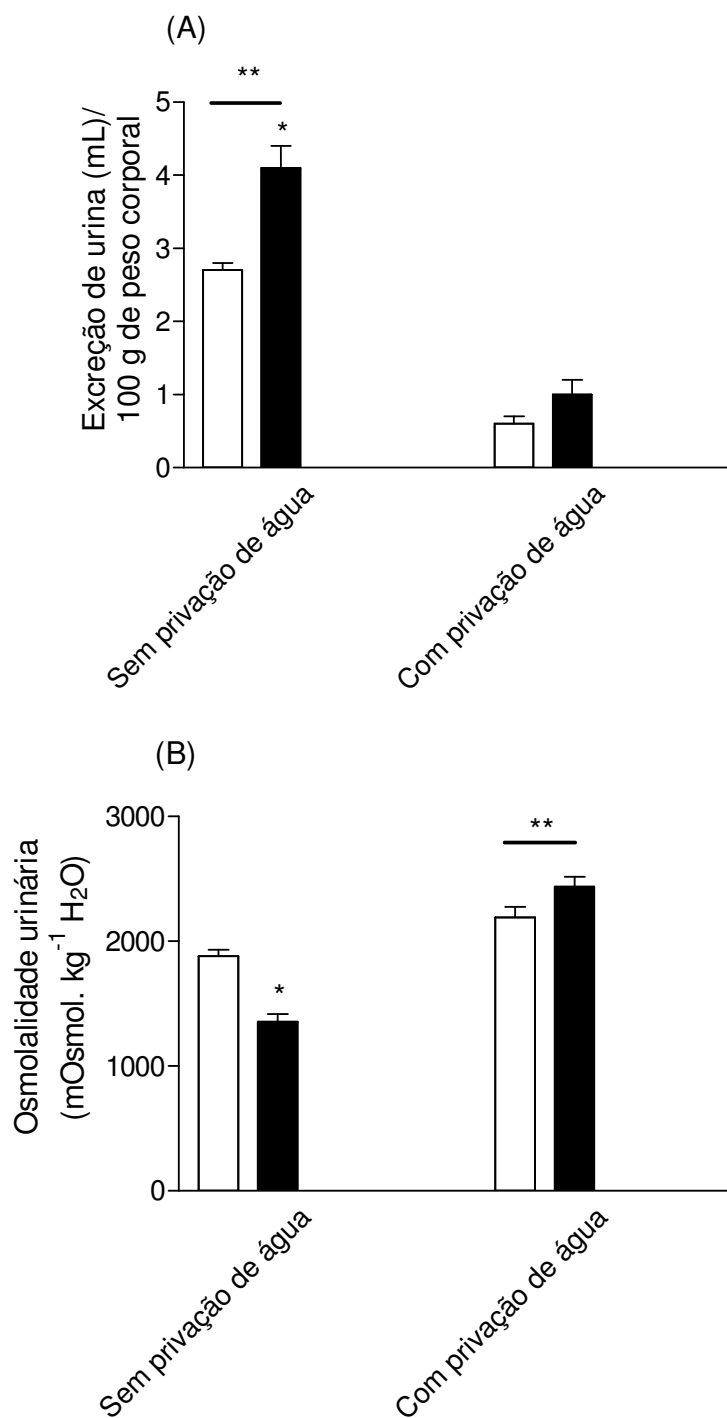
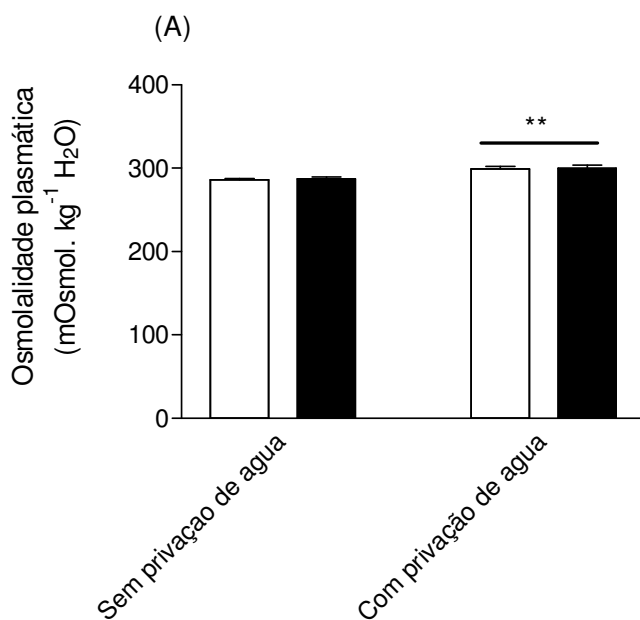


FIG 13– Balanço hidroeletrólítico após privação de água. **A**: Excreção de urina **B**: Osmolalidade da urina. Delineamento fatorial 2x2x2 com sete repetições (n = 14 animais por grupo). \*Comparar os grupos Wistar e WAR. \*\* comparar grupos sem e com privação de água. Resultados expressos em média ± SEM.

Não houve diferença na osmolalidade plasmática entre os grupos Wistar ou WAR com ingestão de água *ad libitum* (Wistar:  $286,1 \pm 1,4$ ; WAR:  $287,3 \pm 2,2$  mOsmol/kg H<sub>2</sub>O;  $p > 0,05$ ; FIG.14A). Também não houve diferença na osmolalidade para os grupos Wistar e WAR submetidos à privação de água (Wistar:  $299,3 \pm 3,0$ ; WAR:  $299,9 \pm 3,9$  mOsmol/kg H<sub>2</sub>O;  $p > 0,05$ ; FIG.14A). A privação promoveu aumento significativo na osmolalidade plasmática. Houve aumento de 4,6% para o grupo Wistar e de 4,4% para o grupo WAR. O aumento na osmolalidade plasmática foi proporcional em ambos os grupos submetidos à privação hídrica.

Também, não houve diferença na concentração plasmática de sódio para os grupos que ingeriram água *ad libitum* (Wistar:  $139,6 \pm 0,5$ ; WAR:  $140,0 \pm 0,7$  mmol/L;  $p > 0,05$ ; FIG.14B). Nenhuma diferença foi observada na concentração de sódio para os grupos Wistar e WAR após a privação de água (Wistar:  $147,4 \pm 1,2$ ; WAR:  $147,3 \pm 1,5$  mmol/L;  $p > 0,05$ ; 14B). A privação de água promoveu aumento na concentração plasmática de sódio. Houve aumento de 5,6% para o grupo Wistar e 5,6% para o grupo WAR submetidos a privação hídrica



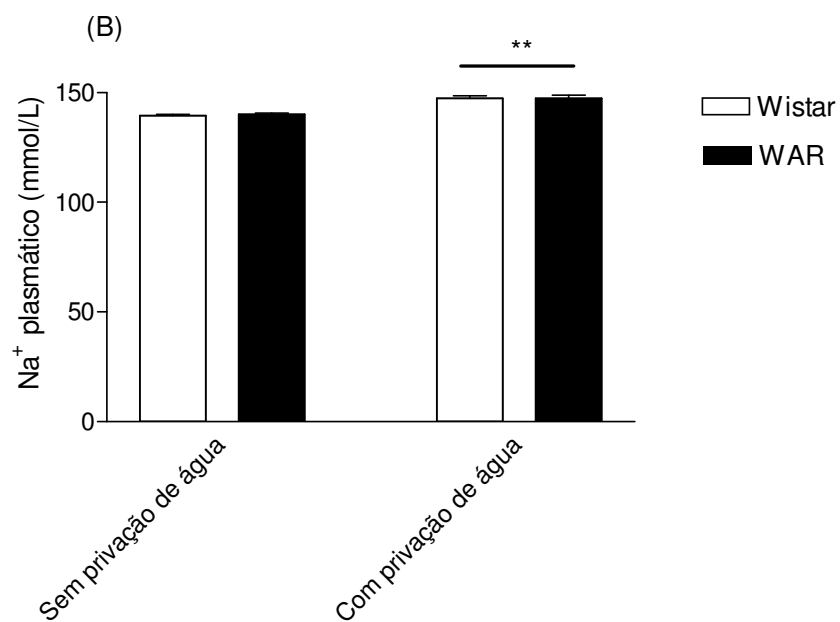


FIG 14 - Balanço hidroeletrólítico após privação de água. **A**: Osmolalidade plasmática. **B**: Concentração de sódio no plasma. Delineamento fatorial 2x2x2 com sete repetições (n = 14 animais por grupo). \*\* comparar grupos com e sem privação de água. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM.

### 3.4.3. Discussão

Os resultados mostraram que três dias de privação de água promoveram alterações significativas nas concentrações plasmáticas e teciduais de ANP. Nos animais submetidos à privação de água a concentração plasmática de ANP foi reduzida em 91,4% para o grupo Wistar e 88,3% para o grupo WAR. Resposta semelhante foi encontrada no tecido atrial, principal local para síntese e secreção de ANP. No átrio direito, o grupo Wistar reduziu sua concentração na ordem de 34% e o grupo WAR de 38,6%. No átrio esquerdo houve redução de 14,5% para o grupo Wistar e de 39,1% para o grupo WAR.

A concentração plasmática de ANP reduziu drasticamente, devido à diminuição da secreção de ANP pelas células cardíacas em ambos os grupos de animais submetidos à privação de água. MAKINO et al. (1996) mostraram em ratos Sprague-Dawley que 72 horas de privação de água foi capaz de reduzir a concentração tecidual de ANP e suprimir a expressão gênica para o ANP no átrio e ventrículo.

Após a privação de água nenhuma diferença foi observada na expressão gênica para o receptor do tipo A para ANP, no rim, entre os grupos. O resultado obtido para o receptor do tipo A após privação de água foi similar ao observado em seus congêneres que receberam água *ad libitum*. Também, nenhuma diferença foi encontrada para o receptor do tipo C, entre os grupos, após a privação de água. Isso demonstrou que a maior expressão de RNAm para o receptor do tipo C no rim encontrado no grupo WAR não submetido à privação hídrica poderia ser um meio de degradação do peptídeo circulante.

Existem dois tipos de receptores para o ANP, o receptor biológico acoplado a guanilato ciclase e o receptor de depuração responsável pela remoção do ANP da circulação. A privação de água não alterou a expressão gênica do receptor biológico, mas aboliu a diferença existente para o receptor de depuração. Esses resultados sustentam por dados da literatura que mostraram que a privação de água aumenta a população do receptor do tipo C sem alterar a densidade do receptor do tipo A em rim de ratos adultos (KOLLENDÁ et al., 1986) e de ratas prenhes (DELOOF et al.,



1999). Então, em ratos desidratados o aumento do receptor do tipo C é um meio para explicar a diminuição do ANP circulante.

A redução do ANP foi necessária para manter a integração do balanço hidroeletrólítico. Após a privação de água nenhuma diferença para a concentração de ANP no átrio esquerdo foi observada entre os grupos. Porém, mesmo desidratados os ratos WAR continuaram exibindo maiores concentrações de ANP no plasma e no átrio direito comparado aos ratos Wistar. Talvez, essa resposta seja uma característica intrínseca ao modelo que possivelmente pode estar associada ao processo de seleção genética.

Os dados da privação de água foram confirmados com a redução do peso corporal, menor ingestão de ração e excreção de urina, maior concentração de sódio plasmático, maior osmolalidade no plasma e urinária nos ratos Wistar e WAR. A privação de água é um potente estímulo que modifica os parâmetros do balanço hidroeletrólítico. Portanto, houve ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário em ambos os grupos e essa afirmação pode ser comprovada com dados da literatura. Shyi-Jang et al (1998) mostraram em ratos Wistar adultos que a privação de água reduz o peso corporal, aumenta a concentração de sódio e a osmolalidade no plasma

As análises obtidas antes da privação de água foram necessárias para garantir a homogeneidade dos grupos no processo de adaptação às gaiolas. Todos os ratos WAR pertencentes à situação controle ingeriram mais água, excretaram maior volume de urina e não apresentaram alterações nas concentrações de sódio e osmolalidade plasmáticas quando comparados aos ratos Wistar. Após a restrição hídrica de 72 horas, os parâmetros hidroeletrólíticos de ratos Wistar e WAR se igualaram, reforçando a idéia que a maior diurese e natriurese encontrada em ratos WAR não privados de água é devido ao mecanismo para compensar a maior ingestão de água e ração.

Além disso, foi sugerido que a infusão de ANP na área pré-óptica do hipotálamo reduz a liberação local de GABA (RODRIGUES-LOPEZ et al., 1993).

Foi citado, previamente que alteração no estado osmótico pode induzir hiposmolalidade ( $< 250$  mosmol/kg.H<sub>2</sub>O) e favorecer a excitabilidade neuronal (ANDREW et al., 1989). Santos (2003) relatou que ratos com susceptibilidade audiogênica apresentaram maior ingestão de água. Diversos quadros clínicos estão associados com a alteração do balanço hidroeletrólítico, entre elas a terapia rápida de reidratação, a síndrome de desequilíbrio de diálise, polidipsia compulsiva, a síndrome de secreção inapropriada do hormônio antidiurético e a síndrome pós-reseção transuretral de próstata (ANDREW 1991). Partindo dessa asserção avaliamos se a susceptibilidade à crise é capaz de alterar parâmetros do balanço hidroeletrólítico que estão associados com a excitabilidade neuronal.

Os dados do balanço hidroeletrólítico mostraram que ratos WAR apresentaram menor peso corporal e maior ingestão de ração. Ingeriram mais água, excretaram maior volume de urina e quantidade de sódio, apresentaram maior taxa de filtração glomerular e menor osmolalidade urinária quando comparados aos ratos Wistar.

A maior ingestão hídrica encontrada nos ratos WAR corroborou os resultados de Santos (2003), porém o resultado referente à natriurese foi divergente. Também, foi observada contradição em relação aos achados de Garcia-Cairasco (1994). Esses autores não encontraram diferença na diurese e natriurese de ratos WAR não submetidos ao abrasamento audiogênico, utilizados como grupo controle. Essas divergências podem estar associadas aos procedimentos metodológicos.

Os resultados obtidos indicam que maior taxa de filtração glomerular, diurese e natriurese observadas nos animais audiogênicos podem estar associadas à maior concentração de ANP circulante.

Os resultados obtidos no estudo sugerem que a maior diurese e natriurese encontrada em ratos WAR, possivelmente, podem ser um mecanismo compensatório para maior ingestão de água e ração. O dado expressivo do balanço hidroeletrólítico foi o comportamento dos ratos WAR em relação à ingestão hídrica.

Esse comportamento sugeriu o envolvimento do sistema nervoso central, provavelmente do hipotálamo, uma vez que a área septal, o bulbo olfatório e a amígdala são estruturas envolvidas no circuito das crises límbicas (BROWNING, 1994) e que também modulam a atividade hipotalâmica (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004)

Como existe evidência que o hipotálamo participa na regulação de ANP plasmático, principalmente em animais com alteração na função renal (RAUCH et al., 1990), a próxima inferência foi mostrar que a maior ingestão hídrica no modelo WAR estava associada às alterações no SNC. Para isso, foi empregado o procedimento privação de água.

“Escrevo sem pensar, tudo o que meu inconsciente grita. Penso depois: não só para corrigir, mas para justificar o que escrevi”.

Mario de Andrade

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

Esse estudo surgiu a partir da sugestão que o sistema endócrino poderia ser uma das pontes entre crise e epilepsia. Desse modo, o primeiro passo da pesquisa foi avaliar a relação entre a susceptibilidade à crise audiogênica e um dos hormônios que participam na regulação do balanço hidroeletrolítico, o ANP. Para esse enlace, foi selecionado um modelo de roedor, susceptível à crise audiogênica, capaz de exibir crise generalizada do tipo tônico-clônica, denominado rato WAR. A presença de crise demonstrou que os animais possuíam um tecido encefálico anormal, decorrente de uma resposta GABAérgica reduzida.

De fato, os animais com susceptibilidade audiogênica apresentaram maiores concentrações de ANP no plasma e nos tecidos atriais, no período inter-ictal. Aumento na secreção de ANP plasmático está associado a estímulos mecânicos, hormonais, fisiológicos e fisiopatológicos. Mudanças no estiramento atrial, induzida por expansão aguda de volume sanguíneo ou como resultado direto ou indireto da ação hormonal, exercício, isquemia, hipóxia e osmolalidade plasmática estimulam a liberação de ANP (BAXTER 2004; RAUCH et al., 1990). Contudo, a eutanásia foi realizada em delineamento cruzado e todos os cuidados foram tomados para evitar estresse. Além disso, nenhum dos fatores mencionados acima estava presente indicando que o aumento do ANP observado nos ratos WAR poderia ser uma característica intrínseca do modelo audiogênico.

A associação entre o aumento do ANP plasmático com a diurese e a natriurese constitui um mecanismo para o balanço hidroeletrolítico. Porém a maior concentração de ANP plasmático encontrada nos animais WAR, analisada isoladamente não foi uma prova suficiente para mostrar a interação com a susceptibilidade audiogênica.

Como a função renal é multifatorial a outros hormônios que participam do balanço hidroeletrolítico foi essencial realizar análise dos receptores para ANP no rim. Os efeitos biológicos do ANP no rim, mediados pelos seus receptores, em ratos, já foram estabelecidos (KUHN, 2004; TERADA et al., 1991). Porém, por se tratar de

uma colônia rara, existente somente em dois laboratórios brasileiros, até o presente momento não há quantificação direcionada para ratos WAR. Os resultados mostraram que não há diferença na expressão do RNAm para o receptor do tipo A, no rim, entre os animais controles e os susceptíveis à crise. Porém, os ratos WAR apresentaram respostas dicotômicas em relação à expressão de RNAm do receptor do tipo C, no rim. Positiva em relação à quantificação e negativa para depuração.

Paralelamente a esse estudo, foram quantificados a concentração de ANP e a expressão do RNAm para os receptores do tipo A e C no encéfalo de fêmeas WAR prenhas. Os resultados obtidos foram similares aos obtidos para os machos WAR. Gouvêa (2010) mostrou que ratas com susceptibilidade audiogênica comparadas com ratas Wistar exibiram maior concentração de ANP no hipotálamo ( $278,1 \pm 45$  pg/mg de proteína total) sem nenhuma diferença na expressão do RNAm para o receptor do tipo A.

Altas densidades do receptor do tipo A já foram encontradas em núcleos hipotalâmicos (DUMONT et al., 2004; FERGUSON, 1997; SAMSON, 1987) e em estruturas límbicas (SAMSON, 1987). Estruturas encefálicas que apresentam altas densidades do receptor tipo A para o ANP, como o bulbo olfatório, a amígdala e o hipocampo estão envolvidas na susceptibilidade de crise límbica (AVOLI et al., 2002; LOTHAMAN et al., 1995; BROWNING, 1994). Portanto, esse conjunto de informações associado com as respostas exibidas pelos ratos WAR fortaleceu a idéia que poderia haver associação entre a susceptibilidade audiogênica e o ANP.

Em relação à literatura existente, há uma grande dificuldade em discernir se o ANP é a causa ou consequência da crise convulsiva. Enquanto alguns autores sugerem que a crise é modulada pelo ANP (GARCIA-CAIRASCO et al., 1994), outros sugerem que a secreção do ANP pelo coração é modulada pela estimulação epiléptica sobre estruturas do terceiro ventrículo (OBI et al., 2002). Então, para a melhor compreensão desses mecanismos a próxima etapa foi avaliar o efeito direto do ANP sobre a excitabilidade neuronal em estruturas que modulam a crise e o balanço hidroeletrólítico.

Para avaliar a excitabilidade neuronal é necessário que o aumento da suscetibilidade do tecido nervoso às crises epiléticas tenha sido ligado a uma

anormalidade no sistema de neurotransmissão excitatória ou por uma diminuição na transmissão inibitória, ou por ambos. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório enquanto o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. A sincronização dos disparos neuronais e propagação das descargas epilépticas requerem tanto sinapses excitatórias intactas como as inibitórias alteradas (AVOLI et al., 2002; FAINGOLD, 2004).

O PTZ é um antagonista de GABA<sub>A</sub> capaz de promover hiperexcitabilidade neuronal devido ao desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória. Há evidência de que a perda da inibição pós-sináptica mediada pelo GABA é crucial para a gênese de crises. O circuito inibitório promovido pelos neurônios GABAérgicos é onipresente em áreas específicas do sistema nervoso central como um mecanismo que controla as alterações excitatórias que conduzem à epileptogênese. A diminuição da atividade GABAérgica no sistema nervoso central usualmente conduz à convulsão, enquanto a intensificação protege o organismo contra alguns tipos de crise convulsiva (TCHEKALAROVA et al., 2005a).

Os resultados do limiar de crise obtidos tanto para crise mínima quanto para crise máxima não foram diferentes. Essas informações mostraram que a infusão de ANP (icv) no hipotálamo de ratos, no modelo farmacológico de PTZ não alterou o limiar de crise induzido por PTZ e conseqüentemente não favoreceu a excitabilidade neuronal. Portanto, a infusão central de ANP em estrutura hipotalâmica não gerou respostas pró-convulsivante.

Diferentemente desse resultado, efeitos anticonvulsivantes foram encontrados após a infusão de angiotensinas III, IV (TCHEKALOROVA et al., 2001) e sarmina, um análogo da angiotensina II, no ventrículo lateral de camundongos (TCHEKALOROVA et al., 2003 e 2005b). Eles mostraram que esses peptídeos aumentavam o limiar de PTZ e também reduziam a gravidade da crise durante o abrasamento químico. Os efeitos das angiotensinas sobre a redução da atividade neuronal estariam associados à interação dos sistemas angiotensinérgico e glutamatérgico, em diversas estruturas encefálicas (TCHEKALAROVA et al., 2005a). O efeito anticonvulsivante promovido pelas angiotensinas poderia ser devido a sua ação direta sobre o complexo receptor GABA-benzodiazepínico-ionóforo cloreto ou pela

interação entre os receptores para angiotensina II com o GABA e o complexo GABA-benzodiazepínico-ionóforo cloreto.

A rejeição da hipótese que o ANP seria um foco indutor de crise no modelo de PTZ indicou que as ideias postuladas por Garcia-Cairasco et al. (1994) poderiam constituir mecanismos que indiretamente favoreciam a excitabilidade neuronal. Partindo da proposta que: 1) o abasamento audiogênico ativou núcleos hipotalâmicos e estruturas límbicas como amígdala e hipotálamo; 2) indiretamente esse circuito foi modulado por hormônios do balanço hidroeletrólítico e 3) as respostas do balanço hidroeletrólítico estariam associadas à maior diurese e natriurese. O próximo passo do estudo foi estabelecer as possíveis relações entre os parâmetros que controlam o balanço hidroeletrólítico e a excitabilidade neuronal no modelo experimental de crise audiogênica.

As possibilidades para essa relação seriam a redução da osmolalidade ou um aumento na concentração extracelular de potássio. A hiposmolalidade aumenta o potencial de campo que favorece a excitabilidade neuronal e sabe-se que concentração do potássio no sangue e no fluido intersticial é um fator determinante do potencial de repouso da célula. Alterações nas concentrações do fluido extracelular de potássio estão associadas com atividade elétrica anormal no sistema nervoso (ANDREW et al., 1989 e ANDREW, 1991). Os ratos WAR ingeriram maior volume de água, apresentaram maior diurese e natriurese. Porém, não alteraram os parâmetros osmótico e iônico, no plasma, que poderiam fortalecer a idéia da associação entre o balanço hidroeletrólítico e a excitabilidade neuronal no modelo experimental de crise audiogênica.

Como há relato na literatura que o hipotálamo também é um mediador de crise (FONSECA et al., 2005; OBI et al., 2002), a última etapa do estudo foi avaliar a relação entre o hipotálamo e a homeostase em modelo cujo encéfalo encontrava-se geneticamente com anormalidade.

De fato, a desidratação resultante da privação de água durante três dias foi um estímulo potente para o recrutamento do sistema magnocelular no hipotálamo dos ratos Wistar e WAR. A privação de água promoveu alterações na osmolalidade e sódio plasmático em ambas as linhagens. Possivelmente, essas informações foram



encaminhadas para áreas encefálicas específicas que regulam o balanço hidroeletrólítico. Essas estruturas uma vez estimuladas modulariam a fome, a atividade simpática, o sistema renina-angiotensina-aldotestorona, a liberação de hormônios envolvidos no balanço hidroeletrólítico. Esses ajustes promovem antinatriurese e antidiurese (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; CHATELAIN et al., 2003).

A diminuição do volume sanguíneo decorrente de desidratação estimula a liberação de renina, aumenta as concentrações plasmáticas de angiotensina II (DI NICOLANTONIO; MENDELSON, 1986) e de vasopressina (DAI; YOO., 1995) e reduz as concentrações de ANP (SHYI-JANG, 1998). O rim regula o balanço hidroeletrólítico mediante a excreção de sódio, excreção de água e secreção de renina. Essas funções renais são controladas principalmente por fatores humorais e pela inervação simpática que modulam o fluxo sanguíneo renal, a filtração glomerular, transporte de soluto e água, a produção de hormônio, a secreção e excreção de sódio na urina (DiBONA, 2000).

A redução do ANP após privação de água promoveu menor diurese necessária para o balanço hidroeletrólítico. Além disso, possivelmente, os sistemas renina-angiotensina-aldotestorona e hipotálamo neurohipofisário desempenharam papel fundamental na manutenção da homeostase e sobrevivência desses animais. A similaridade dos resultados obtida em ambos os grupos, durante a privação de água, para todas as respostas envolvidas na homeostase foi um forte indício de que os rins dos ratos WAR não estavam funcionando em condições fisiopatológicas.

Este foi o primeiro estudo que mostrou as possíveis relações entre ANP, balanço hidroeletrólítico durante o período inter-ictal, em ratos com susceptibilidade à crise audiogênica. A maior ingestão de água no modelo genético de epilepsia mostra que esse animal apresenta alteração neuroendócrina e comportamental. Essa informação sugere que a maior ingestão hídrica pode estar associada à alteração hipotalâmica envolvendo o centro da sede ou relacionada à ansiedade.

“É impossível atingir a perfeição, mas é possível aproxima-se dela.”

Telê Santana

## 5 CONCLUSÃO

Esse trabalho mostrou que durante o período inter-ictal, os animais susceptíveis à crise audiogênica apresentaram maiores concentrações de ANP no plasma e tecido atriais. Embora, não exista diferença na expressão de RNAm para o receptor do tipo A, nos rins, os ratos WAR apresentaram maior expressão de RNAm do receptor do tipo C.

O ANP não favoreceu a excitabilidade neuronal no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ. A ação central desse peptídeo em estrutura hipotalâmica não alterou os limiares de crise mínima ou máxima demonstrando que ANP não tem efeitos pro ou anticonvulsivante.

O trabalho também mostrou que não há relações entre os parâmetros osmótico e iônico que controlam o balanço hidroeletrolítico e a excitabilidade neuronal no modelo experimental de crise audiogênica. O único parâmetro do balanço hidroeletrolítico que apresentou alteração estava associado ao volume, ou seja, maior ingestão de água. Essas informações associadas às respostas da privação de água mostraram que os ratos WAR apresentaram alteração comportamental.

Portanto, as alterações nas concentrações de ANP e na expressão de RNAm do receptor do tipo C, a maior diurese, natriurese e taxa de filtração glomerular, observadas no modelo de crise audiogênica, são mecanismos fisiológicos para compensar a maior ingestão de água.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.; SCORZA, F. A. Qualidade de vida em pacientes com epilepsia generalizada. In: CUKIERT, A. *Epilepsias generalizadas*. São Paulo: Segmento Farma., cap. 18. p. 211-218, 2006.

ALLEN, D. E.; GELLAI, M. Cardioinhibitory effect of atrial peptide in conscious rats. *Am. J. Physiol*, v. 252, n. 21 p. R610-616, 1987.

ANDREW, D, R.; FAGAN, M.; BALLYK, B. A.; ROSEN, A. S. Seizure susceptibility and osmotic state. *Brain Research*, v. 1, p. 175-180, 1989.

ANDREW, D, R. Seizure and acute osmotic change: clinical and neurophysiological aspects. *Journal of the neurological Sciences*, v. 101, p. 7-18, 1991.

ANNEGERS, J. F.; HAUSER, W. A.; ELVEBACK, L. R. Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. *Epilepsia*, v. 20, p.729-737, 1979.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; CASTRO, M.; ELIAS, L. L. L.; VALENÇA, M. M.; McCANN, S. M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol. Rev*, v. 84, p. 169-208, 2004.

APERIA, A., HOLTBACK, U.; SYRÉN, M. L.; SVENSSON, L. B. Activation/deactivation of renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J.*, V. 8, p. 436-439, 1994.

AUSTIN, J. K.; HUSTER, G. A; DUNN, D. W.; RISINGER, M. W. Adolescents with active or inactive epilepsy or asthma: a comparison of quality of life. *Epilepsia*, v. 37, n.12, p.1228-1238, 1996.

AVOLI, M.; D'ANTUONO, M.; LOUVEL, J.; KÖHLING, R.; BIAGINI, G.; PUMAIN, R.; D'ARCANGELO, G.; TRANCREDI, V. Network and pharmacological mechanisms

leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in Neurobiology*, v. 68, p.167-207, 2002.

BAKER, G. A. Assessment of quality of life in people with epilepsy: some practical implications *Epilepsia*, v. 42, p.66-69, 2001.

BAUM, M.; TOTO, R. D. Lack of effect of atrial natriuretic factor in the rabbit proximal tubule. *Am J. Physiol*, v. 250, F.66-69, 1989.

BAXTER, G. F. The natriuretic peptides: an introduction. *Brain Res Cardiol*, v. 99, p. 71-75, 2004.

BERG, A. T.; LEVY, S. R.; NOVOTNY, E.; SHINNAR, S. Predictors of intractable epilepsy in childhood: a case-control study. *Epilepsia*, v. 37, n.1, p.24-30, 1996.

BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptide: two decades of research. *Med Sci Monit.*, v. 8, n. 2, p. RA 39-52, 2002.

BLUME-CHAIR, W.; LUDERS, H. O.; MIZRAHI, E.; TASSINARI, C.; BOAS, W. E.; ENGEL-JR, J. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, v. 42, n 9, p. 1212-1218, 2001.

BOUGH, J. B.; VALIYIL, R.; HAN, F. T.; EAGLES, D. A. Seizure resistance is dependent upon age and caloric restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy Research*, v. 35, p. 21-28, 1999.

BOUGH, J. B.; MATTHEWS, P. J.; EAGLES, D. A. A ketogenic diet has different effects upon seizures induced by maximal electroshock and by pentylenetetrazole infusion. *Epilepsy Research*, v. 38, p. 105-114, 2000.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREUHAUS, B. A.; SNAEII, H. H.; BRANDT, M. A.; CHIMOSKEY, J. E. Atriopeptin II lowers cardiac output in conscious sheeps. *Am J. Physiol.*, v. 249, n. 18, p. 776-780, 1985.

BRENNER, B. M.; BALLERMANN, B. J.; GUNNING, M. E.; ZEIDEL, M. L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological Reviews*, v. 70, n.3, p.665-699, 1990.

BROWNING, R. A. Anatomy of generalized convulsive seizure. In: MALAFOSSE, A.; GENTON, P.; HIRSCH, E; MARESCAUX, C.; BROGLIN, D. BERNASCONI, R. *Idiopathic generalized epilepsies: clinical, experimental and genetic aspects*. UK: Jonh Libbey & company Ltd., cap. 33. p. 399-414, 1994.

BRUCK, I.; ANTONIUK, S. A.; SPESSATTO, A.; MEISTER, E. L.; GONDRO, R.; HALICK, S. M.; BRUYN, L. R. Qualidade de vida em epilepsia relato preliminar de 26 adolescentes. *Brazillian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 6, n.4, p.193-196, 2000.

BURNETT-JR. J. C.; GRANCER, J. P.; OPGENORTH, T, J. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and rennin release. *Am J. Physiol.*, v. 247, n. 16, p. 863-866, 1984.

CHATELAIN, D.; MONTEL, V. DICKES-COOPMAN, A.; CHATELAIN, A.; DELOOF, S. Trophic and steroidogenic effects of water deprivation on the adrenal gland of the adult female rat. *Regulatory peptides*, n.110, p.249-255, 2003.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, n.162, p.156-159, 1987.

COGAN, M. C. A; Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *Am J. Physiology*, n. 250, p.710 – 714, 1986.

COTA, V. R.; MEDEIROS, D. C.; VILELA, M. R. S. P.; DORETTO, M. C.; MORAES, M. F. D. Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylentetrazole seizure outcome. *Epilepsy Behavior*, n. 14, p.26 – 31, 2009.

DAI, W. J.; YOO, T. Effects of dehydration and salt-loading on hypothalamic vasopressin mRNA level in male and female rat. *Brain Res.*, v. 676, p. 178-182, 1995.

DAILEY, J. W.; REIGEL, C. E.; MISHRA, P. K. Neurobiology of seizures predisposition in genetically epilepsy-prone rat. *Fed. Proc.*, v. 44, p. 2640-2644, 1989.

De BOLD, A. J.; BORENSTEIN, H. B.; VERESS, A. T.; SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rat. *Life Sci*, v. 28, p. 89-94, 1981.

DELOOF, S.; DE SEZE, C. MONTEL, V.; CHATELAIN, A. Effects of water deprivation on atrial natriuretic peptide secretion and density of binding sites in adrenal glands and kidney of maternal and fetal rats in late gestation. *European Journal of Endocrinology*, v. 141, p. 160-168, 1999.

DiBONA, G, F. Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the rennin-angiotensin system in the control of renal function, *Hypertension*, v.36, p.1083-1088, 2000.

DI NICOLANTONIO, R.; MENDELSON, F. A. O. Plasma renin and angiotensin in dehydrated and rehydrated rats. *Am. J. Physiol.*, p. 898-901, 1986.

DORETTO, M. C.; OLIVEIRA E SILVA, M., FERREIRA-ALVES, D. L., GARCIA-CAIRASCO, N., REIS, A. M. Effect of lactation on the expression of audiogenic

seizure: association with plasma prolactin profiles. *Epilepsy Research*, v. 54, n 2-3, p. 109 -121, 2003 a.

DORETTO, M. C.; FONSECA, C. G.; LOBO, R. B.; TERRA, V. C.; OLIVEIRA, J. A. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav. Genet.* v. 33, n. 1, p. 33-42, 2003 b.

DORETTO, M. C.; CORTE-DE-OLIVEIRA, J. A.; ROSSETTI, F.; GARCIA-CAIRASCO, N. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. *Epilepsia*. v. 50, n. 12, p. 2563-2574, 2009.

DUMONT, Y.; CHABOT, J-G., QUIRION, R. Receptor autoradiography as mean to explore the possible functional relevance of neuropeptides: focus on new agonists and antagonists to study natriurético peptides, neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptides. *Peptides*, v. 25, p. 365-391, 2004.

DUNN, B. R.; ICHIKAWA, I.; PFLEFFER, J. M.; TROY, J. L.; BRENNER, B. M. Renal and systemic hemodynamic effects of synthetic atrial natriuretic peptide in the anaesthetized rat. *Circ Res.*, v. 59, n. 3 p. 634-639, 1986.

EELLS, J. B.; CLOUGH, R. W.; BROWNING, R. A.; JOBE, P. C. Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylentetrazol, focally induced and audiogenic seizure in rats . *Neuroscience* v. 123, p.279-292, 2004.

EITLE, E.; HIRANYACHATTADA, S., WANG, H. HARRIS, P. J. Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney. *Am J. Physiol*, v. 274, p.1075-1080, 1998.

EL FAZAA, S. GHARBI, N.; KAMOUN, A.; SOMODY, L. Vasopressin and A1 noradrenaline turnover during food and or water deprivation in the rat. *Comp Biochem Physiol*, v. 126, p.129-37, 2000.



ENGEL, J. Concepts of epilepsy. *Epilepsia*, v. 36, n.1, p.23-29, 1995.

FAINGOLD, C. L. Emergent properties of CNS neuronal network as target for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Progress in Neurobiology*, v. 72, p.55-85, 2004.

FERGUSON, A. V. Natriuretic peptide actions in the brain. In: Natriuretic peptide in health and disease. New Jersey: Humana Press, cap. 12, p. 211-220, 1997.

FERRIER, I. N. Water intoxication in patients with psychiatric illness. *British Medical Journal*, v. 297, p. 1594-1595, 1989.

FISHER, R. S. Animal model of epilepsies. *Brain Research Review*, v.14, p.247-248, 1989.

FISHER, R. S.; BOAS, W. E; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL-JR, J. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, v. 46, n 4, p. 470-472, 2005.

FLYNN, T. G.; de BOLD, M.L.; de BOLD, A. J. The amino acid sequence of na atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, n. 117, p. 859-865, 1983.

FONSECA, A. G. A. R., SANTOS, R. A. S.; MORAES, M. F. D; LEITE, M. F.; DORETTO, M. C. Vasopressinergic hypothalamic neurons are recruited during the audiogenic seizure of WARs. *Brain Research*, v. 1038, v. 1, n 15, p. 32-40, 2005.

GALE, K. Progression and generalization of seizure discharge: anatomical and neurochemical substrates. *Epilepsia*, v. 29, n. 2, p. s15-s34, 1998.

GAMELEIRA, F. T.; ARAUJO-PINTO, J.; SILVA, M. E. B.; MENDES, A. J. O. Polidipsia psicogênica e hidroclorotiazida com causas de hiponatremia e estado de

mal epiléptico não convulsivo: associação com mielinólise pontina central. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 8, n. 4, p. 239-243, 2002.

GARCIA, N. H.; GARVIN, J. L. ANF and angiotensin II Interact via kinases in the proximal straight tubule. *Am J. Physiolog*, v. 268, p. 730-735, 1995.

GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. Role of the substantia nigra in audiogenic seizure: a neuroethological analysis in the rat. *Braz J. Med Biol. Res*, v. 16, p. 171-183; 1983.

GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; PRADO, R. P.; JORGE, B. P. D.; TERRA, V. C.; OLIVEIRA, J. A. C. New insights behavioral evaluation of audiogenic seizure. A comparison of two ethological methods. *Behav. Brain Res*, v. 48, p. 49 – 56, 1992.

GARCIA-CAIRASCO, REIS, L. C.; TERRA, V. C.; OLIVEIRA, J. A. C.; ANTUNES-RODRIGUES. Diuresis and natriuresis in non-siezing and in kindled rats from a genetically audiogenic susceptible. *Neuro Report*, v. 5, n. 1, p. 1873 - 1876; 1994.

GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; OLIVEIRA, J. A. C.; GOMES, E. L. T.; DEL BEL, E. A.; MELLO, L. E. A. M. Neuro-ethological and morphological (neo-timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Research*, v. 26, n. 1, p. 391-392; 1996.

GARCIA-CAIRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-mort and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hearing Research*, v. 168, p. 208-222; 2002.

GARDNER, D. G.; HANES, R.; TRACHEWSKY, D.; SCHEND, D.; BAXTER, J. D. Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoides in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, v.139, p.1047-1054, 1986.

GARDNER, D. G.; DESCHEPPER, C. F.; BAXTER, J. D. The gene for atrial natriuretic factor is expressed in the aortic arch. *Hypertension*, v.9, p.103-106, 1987.

GARVIN, J. L. Inhibition of Jv by ANF in rat proximal straight tubule requires angiotensin. *Am J. Physiolog*, v. 257, p. 907-911, 1989.

GARVIN, J. L. ANF inhibits norepinephrine-stimulated fluid absorption in rat proximal straight tubules. *Am J. Physiol*, v. 263, p. 581-585, 1992.

GLOVER, V.; MEDVEDEV, A. SANDLER, M. Isatin is a potent endogenous antagonist of guanylate cyclase-coupled atrial natriuretic peptide receptors. *Life Sciences*, v.57, n. 22, p.2073-2079, 1995.

GODDARD, G. V. The development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*, v.214, 1020-1021, 2002.

GOUVÊA, Michele Pacheco. *Participação hormonal na redução das crises convulsivas induzida pela gestação em um modelo genético de epilepsia*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

GRANIERI, E.; ROSATI, G.; TOLA, R A. A descriptive study of epilepsy in the district of Copparo, Italy, 1964-1978. *Epilepsia*, v. 24, p.502-514, 1983.

GUIDINE, P. A. M.; MORAES-SANTOS, T.; MASSENSINI, A. R.; MORAES, M. F. D. Carbamazepine protects the CNS of Wistar rats against the central effects of scorpion envenomation . *Neuro toxicology*. v. 29 , p.136-142, 2008.

GUTKOWSKA, J.; GENEST, J.; THIBAUT, G.; GARCIA, R.; LAROCHELLE, P.; CUSSON, J.R.; KUCHEL, O.; HAMET, P.; DE LEAN, A.; CANTIN, M. Circulating forms and radioimmunoassay of natriuretic factor. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v.16, n. 1, p.183-198,1987.

GUTKOWSKA, J.; NEMER, M.; SOLE, M. J.; DROUIN, J.; SIROIS, P. Lung is an important source of atrial natriuretic factor in experimental cardiomyopathy. *J Clin Invest*, v.83, p.1500-1504, 1989.

HAUSER, W. A.; KURLAND, L. D. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia*, v. 16, p.1-166, 1975.

HENRY, J. P.; GAUER, O.H.; REEVES, J. L. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res*, v. 4, p.85-90, 1956.

HERMANN, B. P.; SEIDENBERG, M.; BELL, B. Psychiatric comorbidity in chronic epilepsy: identification, consequences, and treatment of major depression. *Epilepsia*, v. 41 (suppl), p.31-41, 2000.

HUANG, R.; BELL-HORNER, C. ILON,.; DIBAS, M. I.; COVERY, D. F.; DREWE, J. A.; DILLON, G. H. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant aminobutyric acid type A (GABA A) receptors: mechanism and site of action. *Pharmacology and Experimental Therapeutic*, v. 293, n.3, p-986-995, 2001.

JIRIKOWSKI, G.; BACK, H.; FORSSMANN, W. G.; SUMPFF, W. E. Coexistence of atrial natriuretic factor (ANF) and oxytocin in neurons of rat hypothalamus. *Neuropeptides*, v.8, p.243-249, 1986.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 26, p. 429-439, 2002.

KISCH, B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg*, v. 14, p. 99-112, 1956.

KIESMANN, M.; MARESCAUX, C.; VERGNES, M.; MICHELETTI, G.; DEPAULIS, A.; WARTER, J. M. Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological and electroencephalographic. *J. Neural Transm.*, v. 72, p. 235-244, 2002.

KIM, S. H.; KWON, J. W., KIM, W. B.; LEE, I. LEE, M. G. Effects of water deprivation for 72 on pharmacokinetics of a new carbapenem, DA-1131 in rats. *Life Sciences.*, v. 71, p. 2291-2298, 2002.

KONE, B. C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovascular research.*, v. 51, p. 429-441, 2001.

KOLLLEND, M. C.; VOLLMAR, A. M.; McENROE, G. A.; GERBERS, A. L. Dehydration increases the density of C receptor for ANF on rat glomerular membranes. *Am. J. Physiol.*, v. 258, p. 649-657, 1989.

KRUSHINSKY, L. V.; MOLODKINA, L. N.; FLESS, D. A.; DOBROKHOTOVA, L. P.; STESHENKO, A. P.; SEMIOKHINA, A. F.; ZORINA, Z. A.; ROMANOVA, L. G. The functional state of the brain during sonic stimulation. In: WELCH, B.; WELCH, A. *Physiological effects of noise*. New York: Plenum Press, p. 151-148, 1970.

KUHN, M. Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. *Basic Res. Cardiol.*, v. 99, p. 76-82, 2004.

LEACH, M. J.; MARDEN, C. M.; MILLER, A. A. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neurochemical studies on mechanisms of action. *Epilepsia* v. 27, p. 490-497, 1986.

LEES, G. V.; JONES, E. G.; McNAMARA, J. Epilepsy. *Neurobiology of Disease*, v. 7, p. 549-551, 2000.

LIGHT, D. B.; GORBIN, J. D.; STANTON, B. A. Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature*, v. 252, p.551-559, 1990.

LOSCHER, W.; HÖNACK, D.; FASSBENDER, C. P.; NOLTING, B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs: III pentylenetetrazole seizure models. *Epilepsy Research*, v. 8, p. 171-189, 1991.

LOSCHER, W.; FIEDLER, M. O. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs: VI seasonal influences on maximal electroshock and pentylenetetrazol seizure thresholds. *Epilepsy Research*, v. 25, p. 3-10, 1996.

LOSCHER, W.; LEPPIK, I. Critical re-evaluation of preclinical strategies for the discovery and the development of new antiepileptic drugs. *Epilepsy Research*, v. 50, p. 17-20, 2002.

LOTHAMAN, E. W.; REMPE, D. A.; MANGAN, P. Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neurophysiology*, v. 74, n. 2, p. 841-847, 1995.

LUSZCZKI, J. J. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep*, v. 61, n. 2, p. 197-216, 2009.

MAACK, T. D. N.; MARION, M. J.; CAMARGO, M. J.; KLEINERT, H. D.; LARAGH, J. H.; VAUGHAN-JR., E. D.; ATLAS, S. A. Effects of auriculin on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am. J. Med.*, v. 77, p. 1069-1075, 1984.

MAGALHÃES, L. H. M.; GARCIA-CAIRASCO, N.; MASSENSINI, A. R.; DORETTO, M. C.; MORAES, M. F. D. Evidence for augmented brainstem activated forebrain seizure in Wistar Audiogenic Rats subjected to transauricular electroshock *Neuroscience Letters*, v. 369, p. 19-23, 2004.

MAKINO, Y.; MINAMINO, N.; KAKISHITA, E.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. Natriuretic peptide in water-deprived and in salt-loaded rats. *Peptides*, v. 17, n. 6, p. 1031-1039, 1996.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1982.

MARTINS, A. S.; GREENE, L. J.; YOHO, L. L.; MILSTED, A. The cDNA encoding canine dihydrolipoamide dehydrogenase contains multiple termination signals. *Gene*, v.161, p.253-257, 1995.

McNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. *The Journal of Neuroscience.*, v. 14, n. 6, p. 3413-3425, 1994.

McKEOWN, M. J.; McNAMARA, J. O. When do epileptic seizure really begin?. *Neuron*, v. 30, p.1-9, 2001.

McINTYRE, D. C.; POULTER, M. O.; GILBY, P. K. Kindling: some old and some new. *Epilepsy Research*, v.50, 79-92, 2002.

MEDVEDEV, A. E.; CLOW, A.; SANDLER, M.; GLOVERS, V. Isatin: a link between natriuretic peptides and monoamines. *Biochemical Pharmacology*, v. 52, p. 385-381, 1996.

MELDRUM, B. S. Update on mechanism of action antiepileptic drugs. *Epilepsy*, v. 37 (suppl 6), p.4-11, 1996.

MELDRUM, B. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Research*, v. 50, p. 33-40, 2002.

MELO, A. N.; YACUBIAN, E. M.; NUNES, M. L. Crises epilépticas e epilepsias ao longo da vida: 100 questões práticas. São Paulo: *Segmento farma*, 2006, 92p.

MISHRA, P. K.; DAILEY, J. W.; REIGEL, C. E.; TOMISC, M. L.; JOBE, P. C. Sex-specific distinctions in audiogenic convulsions exhibited by severe seizure genetically epilepsy-prone rats (GEPR-9s). *Epilepsy Research*, v. 2, p. 309-316, 1998.

MONTGOMERY, D. C. *Design and analysis of experiments*. 4<sup>a</sup> <sup>th</sup>, USA: John Wiley & Sons, 1997, 704p.

MORAES, Márcio Flávio Dutra. *Epilepsia experimental: estudos eletrofisiológicos e comportamentais em modelos animais de crises convulsivas audiogênicas*. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1998.

MORAES, M. F. D.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Research*. V.39, p. 251-259, 2000.

MUSZKAT, M.; RIZZUTTI, S. PEREIRA, M. M. In: CUKIERT, A. Tratamento clinico e cirúrgico das epilepsias de difícil controle. São Paulo: Lemos editorial ., cap. 9. p. 91-106, 2002.

OBI, T.; TAKATSU, M.; KONISHI, T.; MIZOGUCHI, K.; NISHIMURA, Y. Secretion of natriuretic peptides caused by an epileptic attack. *Acta Neurol Scand.*, v. 106, p. 225-228, 2002.

O'BRIEN, D. Toxic and metabolic causes of seizures. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 13, p. 159-166, 1998.

ONG, H.; LAZURE, C.; NGUYEN, T. M. D.; MCNICOLL, N.; SEIDAH, N.; CHRETIEN, M.; DELEAN, A. Bovine adrenal chromaffin granules are a site of synthesis of atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun*, v.147, p.957-963, 1987.

OZTAS, B.; KUCUK, M.; KAYA, M. Sex-dependent changes in blood-brain barrier permeability in epileptic rats following acute hyperosmotic exposure. *Pharmacological Research*, v. 5, p. 469-472, 1998.

PATAKI, I.; JÁSZBERÉNYI M., TELEGDY, G. Hyperthermic effect of centrally administered natriuretic peptides in the rat. *Peptides*, v. 20, p. 193-197, 1999.

PATAKI, I.; ADAMIL, A., TELEGDY, G. Isatin (indole-2, 3-dione) inhibits natriuretic peptide-induced hyperthermia in rats. *Peptides*, v. 21, p. 373-377, 2000.

PENIDO, A. B.; REZENDE, G. H.; ABREU, R. V.; deOLIVEIRA, A. C.; GUIDINE, P. A.; CHIANCA, D. A.; MASSENSINI, A. R.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES, M.F. Malnutrition during central nervous system growth and development impairs permanently the subcortical auditory pathway. *Nutr Neurosci*, v. 15, n. 1, p. 31-6, 2012.



PERRONE, B.; VARI, R. C.; KREISMAN, N. R. Recurrent seizure alter renal function and plasma atrial natriuretic peptide levels in rats. *Epilepsia*, v. 36, n. 7, p. 649-657, 1995.

PI, X.; LEE, J., HOWARD, F. L.; ROSENBERG, H. C. Decreased expression of brain cAMP response element-binding protein gene following pentylentetrazol seizure. *Molecular Brain Research*, v. 127, p. 60-67, 2004.

PORZIO, D. V. M. P.; HALBERTHAL, M. D. M.; BOHN, D. M. B.; MITCHELL, M. B. HALPERIN, M. D. Treatment of acute hyponatremia: ensuring the excretion of predictable amount of electrolyte-free water. *Crit Care Med*, p.1905-1910, 2000.

RAUCH, A. L.; CALLAHAN, M. F.; BUCKALEW-JR M., MORRIS, M. Regulation of plasma atrial natriuretic peptide by the central nervous system. *The American Physiological society*, p.531-534, 1990.

REMY, S.; GABRIEL, S.; URBAN, B. W.; DIETRICH, D.; LEHMANN, T. N.; ELGER, C. E. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol*, v. 53, p.469-479, 2003.

RODRIGUES-LOPEZ, P.; EHLERDING, A. LEONHART, S.; JARRY, H.; UTTKE, W. Effects of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on LH release are exerted in the preoptic area: possible involvement of gamma-aminobutyric acid (GABA). *Exp Clin endocrinol*, v. 101, p.350-355, 1993. Abstract.

ROCHA, A. S.; KUDO, L. H. Atrial peptide and cGMP effects on NaCl transport in intermedullary collecting duct. *Am. J. Physiol.*, v. 259, p. 258 -268, 1990.

ROSS, K. C.; COLEMAN, J. R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 24, p. 639-653, 2000.

ROSSETTI, F.; RODRIGUES, M. C. A.; OLIVEIRA, J. A. C.; GARCIA-CAIRASCO. Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of nigrotectal pathway in the Wistar audiogenic rat strain. *Epilepsy and Behavior*, v. 242, p. 191-199, 2011.

SAGNELLA, G. A. Atrial natriuretic peptide mimetics and vasopeptidase inhibitors. *Cardiovascular Research*, v. 51, p. 416-428, 2001.

SAKAMOTO, M.; NAKAO, K.; KUIARA, M.; MORII, N.; SUGAWARA, A.; SUDA, M. Existence of atrial natriuretic polypeptide in kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, v.128, p.1281-1287, 1985.

SAMSON, W. K. Atrial natriuretic factor and the central nervous system. In: ROSENBLATT, M.; JACOBS, J. W. *Endocrinology and metabolism clinics of north America USA*: Saunders Company, v.16, n. 1 p. 145-161, 1987.

SAMSON, W. K.; LEVIN, E. R. *Natriuretic peptides in health and disease*. Humana Press, New Jersey, 1997, 336p.

SANTOS, Jerusa de Almeida. *Balanço hidroeletrólítico, vasopressina e angiotensinas em ratos com susceptibilidade epilética audiogênica*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

SCARLATELLI-LIMA, A. V.; MAGALHÃES, L. H. M.; DORETTO, M. C.; MORAES, M. F. D. Assessment of seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylenetetrazole and pilocarpine. *Brain Research*, v. 960, p. 184-189, 2003.

SCHIMIDT, D.; GRAM, L.; BRODIE, M.; KRAMER, G.; PERUCCA, E.; ELGAR, C. E. Tiagabine in the treatment of epilepsy - A clinical review with a guide for the prescribing physician.. *Epilepsy Res* v. 41, n.3, p. 245-251, 2000.

SECHI, G.; ROSATI, G.; PETRUZZI, V.; DERIU, F.; CORREDDU, P.; RIU, P. L. D. Covariation of free amino acids in brain interstitial fluid during pentylenetetrazole convulsive status epilepticus. *Brain Research*, v. 764, p.230-236, 1997.

SHYI-JANG, S.; JIN-DER, W.; I-HSUAN, C. FENG-JIE, L.; MING-CHIA, H.; TUSTY-JIUAN, H.; MIAN-SHIN, T.; JUEI-HSIUNG, T. Increases renal ANP synthesis, but decreased or unchanged cardiac ANP synthesis in water-deprived and salt-restricted rats. *Kidney International*, v. 54, p. 1617-1625, 1998.

SIEGEL, S.; CASTELLAN-JR, N. J. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2006, 448p.

SLOVITER, R. S. Permanently altered hippocampal structure excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: "the dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, v. 1; p. 41-46, 1991.

SONNENBERG, H.; HONRATH, U.; CHONG, C. K.; WILSON, D. R. Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol*, v. 250, p. F963 – 966, 1986.

SUDOH, T.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; MATSUO, H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, v. 332, p. 78-81, 1988.

SUDOH, T.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; MATSUO, H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide Family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 168, p. 863-870, 1990.

SYREN, M. L.; TIRELLI, A. S.; ASSAEL, B. M.; SERENI, F. Regulation of sodium-potassium-adenosine triphosphatase activity by extracellular guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in rat kidney. *Acta Physiolo Scand.*, v.158, p. 295-296, 1996.

TAUCK, D. L.; NADLER, J. V. Evidence of function mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J. Neurosci*, v. 5, p. 1016 – 1022, 1985 .

TCHEKALAROVA, J.; KAMBOUROVA, T.; GEORGIEV, V. Effects of angiotensin III and angiotensin IV on pentylentetrazol seizure susceptibility (threshold and kindling): interaction with adenosine A<sub>1</sub> receptors. *Brain Research Bulletin*, v. 56, n.2, p. 87 – 91, 2001 .

TCHEKALAROVA, J.; PECHIVANOVA, D.; KAMBOUROVA, T.; MATSOUBAS, J.; GEORGIEV, V. The effects of sarmisin, an angiotensin II analogue on seizure susceptibility, memory and nociception. *Regulatory Peptides* v.111, p. 191-197, 2003.

TCHEKALAROVA, J.; SOTIRIOU, E.; GEORGIEV, V.; KOSTOPOULOS G.; ANGELATOU, F. Up-regulation of adenosine A1 receptor binding in pentylentetrazol kindling in mice: effects of angiotensin IV. *Brain Research*, v. 1032, p. 94 – 103, 2005.

TCHEKALAROVA, J.; GEORGIEV, V. Adenosine-angiotensin II interactions in pentylentetrazol seizure threshold in mice. *J. Physiol*, v. 93, p. 191 – 197, 1999 .

TCHEKALAROVA, J.; GEORGIEV, V. Angiotensin peptides modulatory system: how is it implicated in the control of seizure susceptibility? *Life Science*, v. 76, p. 995 – 970, 2005.

TERADA, Y.; MORIYAMA, T.; MARTIN, B. M.; ET AL. RT-PCR microlocalization mRNA for guanylyl cyclase-coupled ANF receptor in rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v. 261, p. 1080-1087, 1991.

TERRA, V. C. GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures audiogenic-like seizure induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. II. Effects of nigral clobazam microinjections. *Behav Brain Res*, v. 52, p. 19 – 26, 1992.

TUNNICLIFF, G. Basis of the antiseizure action of phenytoin. *Gen. Pharmac*, v. 27, n.7, p. 1091-1097, 1996.

VANDERHEYDEN, M.; BARTUNEK, J.; GOETHALS, M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *The European Journal of Heart Failure*, v. 6, p. 261-268, 2004.

VANDORPE, D.; CIAMPOLLILO, F.; GREEN, R. B.; STANTON, B. A. Cyclic nucleotide-gated cation channels mediated sodium absorption by IMCD (mIMCD-K2) cells. *Am J. Physiol.*, v. 272, p. 901-910, 1997.

VELISEK, L.; KUBOVA, H.; POHL, M.; STANKOVA, L.; MARES, P.; SCHICKEROVA, R. Pentylenetetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Archives of pharmacology*, v. 346, p. 346-588, 1992.

VESELY, D. L.; PALMER, P. A.; GIORDANO, A. T. Atrial natriuretic factor prohormone peptides are present in a variety of tissues. *Peptides*, v.13, p.165-170, 1992.

VIGEVANO, F.; CILIO, M. R. Vigabatrin versus ACTH as first-line treatment for infantile spasms: a randomized, prospective study. *Epilepsia*, v. 38, p. 1271-1274, 1997.

VERBALIS, J. G. Brain volume regulation in response to changes in osmolality. *Neuroscience*, v. 168, n. 4, p. 862-870, 2010.

VIVES, D.; FARAGE, S.; MOTTA, R.; LOPES, A. G.; CARUSO-NEVES, C. Atrial natriuretic peptides and urodilatin modulate proximal tubule  $Na^+$ -ATPase activity through activation of the NPR-A/cGMP/PKG pathway. *Peptides*, v. 32, p. 903-908, 2010.

WALLACE, S. Myoclonus and epilepsy in childhood: a review of treatment with valproate, ethosuximide, lamotrigine and zonisamide. *Epilepsv Res*, v. 29, n.2, p. 147-154, 1998.

WAMIL, A. W.; CHEUNG, H.; HARRIS, E. W.; McLEAN, M. J. Remacemide HCL and its metabolite, FPL 12495AA, limit action potential firing frequency and block NMDA responses of mouse spinal cord neurons in cell culture. *Epilepsy Res.* v. 23, p. 1-14, 1996.

WHITE, H. S. Clinical significance of animal seizures model and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia* v. 38 (suppl 1), p. 9-17, 1997.

WHITE, H. S. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. *Epilepsia* v. 38 (suppl 5), p. 2-10, 2003.

YACUBIAN, E. M. T. *Epilepsia da antiguidade ao Segundo milênio*. São Paulo: Lemos editorial LTDA, 2000, 142p.

YACUBIAN, E. M. T. *Tratamento medicamentoso das epilepsias*. 2 ed. São Paulo: Lemos, 2004.