



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**PARTICIPAÇÃO HORMONAL NA REDUÇÃO DAS CRISES  
CONVULSIVAS INDUZIDA PELA GESTAÇÃO EM UM  
MODELO GENÉTICO DE EPILEPSIA**

**MICHELE PACHECO GOUVÊA**

**BELO HORIZONTE**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Michele Pacheco Gouvêa**

**PARTICIPAÇÃO HORMONAL NA REDUÇÃO DAS CRISES  
CONVULSIVAS INDUZIDA PELA GESTAÇÃO EM UM  
MODELO GENÉTICO DE EPILEPSIA**

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: Adelina Martha dos Reis  
Co-orientação: Maria Carolina Doretto

**Belo Horizonte**  
**Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**

**2010**

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais e a Deus,  
por sempre caminharem a meu lado.*

## MEUS AGRADECIMENTOS

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do ICB – UFMG, pelo companheirismo e amizade.

À Adelina, pelo acolhimento, orientação, confiança e enriquecedora troca de experiências.

À Carol, pela co-orientação e enriquecedora troca de experiências.

Ao professor Almir, pelos valiosos ensinamentos e auxílio nas técnicas de biologia molecular.

À minha mãe, Núbia, e ao meu pai, Marco Antônio, que participaram ativamente dessa conquista.

À Luciana Firmes e ao Mauro Sérgio, pela ajuda durante a realização dos últimos experimentos.

Aos docentes do Departamento de Fisiologia e Biofísica, por seus valiosos ensinamentos.

À banca examinadora, pela atenção e sugestões na organização da tese.

Ao CNPq e FAPEMIG, que subsidiaram esta pesquisa.

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

*"Aqueles que tem um grande autocontrole, ou que estão totalmente absorvidos no trabalho, falam pouco. Palavra e ação juntas não andam bem. Repare na natureza: trabalha continuamente, mas em silêncio."*

*"Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa."*

*Gandhi*

**RESUMO**

O objetivo do presente trabalho foi identificar alterações hormonais que pudessem explicar a redução da gravidade das crises epiléticas, induzida pela gestação, em uma parcela da população de animais susceptíveis à epilepsia audiogênica, *Wistar Audiogenic Rats* (WAR). Ratas Wistar e WAR foram sacrificadas por decapitação aos 7, 14 e 20 dias de gestação e as concentrações de peptídeo natriurético atrial (ANP) no plasma, átrios, hipotálamo e hipocampo foram determinadas por radioimunoensaio. A expressão do gene para ANP foi avaliada por PCR em tempo real em átrios e a de seus receptores (NPR-A e NPR-C) em rins, hipotálamo e hipocampo. A capacidade de ligação dos receptores renais de ANP foi avaliada por autorradiografia. As concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona foram determinadas por radioimunoensaio. A gravidade das crises foi determinada ao longo da gestação por estimulação sonora de alta intensidade. No 20º dia de gestação, houve redução das crises em 50% das WAR, sendo que 33% delas apresentaram ausência total de crises (Índice de Severidade ou IG=0,0), sendo assim, dois subgrupos de WAR foram comparados: os que apresentaram redução do IG (RIG) e os que não apresentaram redução do IG (NRIG). O subgrupo RIG apresentou redução de ANP plasmático em relação ao NRIG e aos animais Wistar controle. Além disso, esse grupo apresentou aumento de mRNA NPR-A e aumento da capacidade de ligação do ANP aos receptores renais em relação aos outros grupos. O grupo RIG apresentou, também, redução da concentração de ANP no hipocampo e hipotálamo, além de menor concentração de mRNA NPR-A no hipocampo em relação ao grupo NRIG. Em relação aos hormônios esteróides, as ratas RIG apresentaram concentrações tanto de progesterona quanto de estradiol maiores do que NRIG. Além disso, o subgrupo RIG apresentou relação P/E similar

ao grupo controle enquanto o grupo NRIG apresentou redução da relação P/E em relação ao controle. Para confirmar a participação dos esteróides gonadais na redução das crises convulsivas, foi delineado outro experimento no qual ratas Wistar e WAR foram ovariectomizadas (ovx) e receberam diariamente progesterona (500 µg; *im*) e/ou estrógeno (1µg/100g, *sc*) nos seguintes esquemas de tratamento: a) veículo (3 semanas); b) estrógeno (3 semanas) e progesterona (3 semanas); c) estrógeno (1 semana) seguido por progesterona (2 semanas); d) somente progesterona (3 semanas) ou e) somente estradiol (3 semanas). O tratamento com progesterona sem associação com estrógenos ocasionou redução da gravidade das crises em 33% das ratas WAR, enquanto a associação dos dois hormônios em ambos os regimes apresentou efeito mais pronunciado, reduzindo as crises em 67% dos animais. Em resumo, os dados deste trabalho indicam que alterações do sistema de peptídeos natriuréticos no sistema nervoso central podem estar associadas à redução das crises observada no subgrupo RIG e sugerem uma possível ação pró-convulsivante do ANP nesses animais. Demonstram, também, um importante papel para os esteróides gonadais, progesterona e estradiol, na redução das crises convulsivas em WAR e que o estradiol intensifica a ação anticonvulsivante da progesterona. Em conclusão, alterações do Sistema de Peptídeos Natriuréticos e dos esteróides gonadais parecem estar envolvidos com a redução da gravidade das crises epiléticas induzida pela gestação em WAR.

**Palavras-chaves:** epilepsia, crise audiogênica, gestação, peptídeo natriurético atrial, progesterona, estradiol.

**ABSTRACT**

The aim of the present work was investigate hormonal changes that could explain the seizure reduction induced by pregnancy in part of a population of a genetically susceptible strain, Wistar Audiogenic Rats (WAR). Wistar (R) and WAR rats were sacrificed by decapitation at 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 20<sup>th</sup> days of pregnancy and levels of atrial natriuretic peptide (ANP) were determined by radioimmunoassay in plasma, atria, hypothalamus and hippocampus. The gene expression of ANP was evaluated in atria and of its receptors (NPR-A and NPR-C) in kidneys, hypothalamus and hippocampus using Real Time PCR. The binding of ANP to kidney receptors was determined by autoradiography. Plasma concentrations of estradiol (E) and progesterone (P) were determined by radioimmunoassay. The severity index (SI) of seizure was determined during pregnancy by high intensity sound stimulation. On the 20<sup>th</sup> day of pregnancy, the seizures remitted in 50% of WAR, with 33% showing SI=0 (Severity Index) and two subgroups were formed: WAR displaying *reduced gravity index* of seizure (*RIG*) with the subgroup that did not show any alteration of the severity index (*non-reduced gravity index*, *NRIG*). The RIG group presented reduction of plasma ANP as well as increase of mRNA NPR-A and increase of ANP binding to kidney slices compared to NRIG group and R. Moreover, RIG group presented reduction of ANP in hypothalamus and hippocampus and lower mRNA NPR-A in hippocampus compared to NRIG group. The RIG group showed also higher concentration of estradiol and progesterone compared to NRIG. Furthermore, RIG group presented P/E ratio similar to the R group, which was higher than the NRIG. In order to confirm the participation of gonadal steroids in the seizure reduction, Wistar and WAR rats were ovariectomized (ovx) and separated in groups that received different treatment

schedules with daily injections of progesterone (500 µg; *im*) and/or estrogen (1µg/100g, *sc*): a) vehicle (3 weeks); b) estrogen (3 weeks) plus progesterone (3 weeks); c) estrogen (1 week) followed by progesterone (2 weeks); d) progesterone alone (3 weeks) or e) estrogen alone (3 weeks). When progesterone was administered alone, seizure reduction occurred in 33% of WAR. Progesterone with estrogen in both regimens reduced the audiogenic seizures in 67% of WAR. In summary, data of this study suggest a possible pro-convulsant role for ANP in WAR and indicates that alterations of natriuretic peptide system in the central nervous system could be associated with the seizure reduction observed in the RIG group. We have also shown an important role for gonadal steroids, estradiol and progesterone, in the seizure reduction in WAR. Furthermore, estradiol seems to potentiates the anticonvulsant effect of progesterone. In conclusion, alterations of Natriuretic Peptide System and gonadal steroids seem to be involved in the epileptic seizure severity reduction induced by pregnancy in WAR.

**Key words:** epilepsy, audiogenic seizures, pregnancy, atrial natriuretic peptide, progesterone, estrogen.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gravidade das crises epiléticas nas ratas WAR (W) antes (S) e nos diferentes tempos de gestação (T) ..... 42
- Figura 2.** Concentração plasmática de peptídeo natriurético atrial (ANP) em ratas R e WAR durante a gestação ..... 43
- Figura 3.** Concentração plasmática de ANP em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 43
- Figura 4.** Quantidade relativa de ANP nos átrios direitos, ajustada pela concentração de proteína total, em ratas R e WAR durante a gestação ..... 44
- Figura 5.** Quantidade relativa de ANP nos átrio direitos, ajustada pela concentração de proteína total, em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 44
- Figura 6.** Quantidade relativa de ANP nos átrios esquerdos, ajustada pela concentração de proteína total, em ratas R e WAR durante a gestação ..... 45

**Figura 7.** Quantidade relativa de ANP no átrio esquerdo, ajustada pela concentração de proteína total, em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 45

**Figura 8.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio direito, ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação ..... 46

**Figura 9.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio direito, ajustada pela concentração de S26, em ratas R e ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 46

**Figura 10.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio esquerdo, ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação ..... 47

**Figura 11.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio esquerdo, ajustada pela concentração de S26, em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 47

**Figura 12.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação ..... 48

**Figura 13.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 48

**Figura 14.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação ..... 49

**Figura 15.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 49

**Figura 16.** Autorradiografia para determinação da capacidade de ligação do ANP aos seus receptores nos rins em ratas R e WAR aos 7 dias de gestação ..... 50

**Figura 17.** Autorradiografia para determinação da capacidade de ligação do ANP aos seus receptores nos rins em ratas R e WAR aos 14 dias de gestação ..... 51

**Figura 18.** Autorradiografia para determinação da capacidade de ligação do ANP aos seus receptores nos rins em ratas R e WAR que não apresentaram e que

apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 52

**Figura 19.** Quantidade relativa de ANP no hipotálamo ajustada pela concentração de proteína total, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 54

**Figura 20.** Quantidade relativa no hipotálamo de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 55

**Figura 21.** Quantidade relativa no hipotálamo de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 55

**Figura 22.** Quantidade relativa de ANP no hipocampo ajustada pela concentração de proteína total, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 56

**Figura 23.** Quantidade relativa no hipocampo de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR

que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 57

**Figura 24.** Quantidade relativa no hipocampo de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 57

**Figura 25.** Concentração plasmática de estradiol em ratas R e WAR durante a gestação ..... 60

**Figura 26.** Concentração plasmática de estradiol em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 60

**Figura 27.** Concentração plasmática de progesterona em ratas R e WAR durante a gestação ..... 61

**Figura 28.** Concentração plasmática de progesterona em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 61

**Figura 29.** Relação entre progesterona e estradiol plasmáticos em ratas R e WAR durante a gestação ..... 62

**Figura 30.** Relação entre progesterona e estradiol plasmáticos em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação ..... 62

**Figura 31.** Porcentagem de animais apresentando crises convulsivas tônico-clônicas durante o experimento ..... 65

**Figura 32.** Índice de gravidade das crises nas ratas WAR na terceira semana de terapia hormonal ..... 66

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Número de animais por grupo no experimento de gestação ..... 24

**Tabela 2** - Índice de gravidade das crises epiléticas ..... 26

**Tabela 3** - Tratamento hormonal e número de animais do experimento de castração ..... 36

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANP** – peptídeo natriurético atrial

**E** – estrógeno

**EPM** – erro padrão da média

**Est** – hexaidrobenzoato de estradiol

**GABA<sub>A</sub>** – receptor A para o ácido gama-aminobutírico

**IM** – intramuscular

**IP** – intraperitoneal

**IG** – índice de gravidade

**NPR-A** – Receptor do tipo A para o ANP

**NPR-C** – Receptor do tipo C para o ANP

**NRIG** – não-redução do índice de gravidade

**Ovx** – ovariectomia

**P** – progesterona

**P/E** – relação entre progesterona e estrógeno

**Prog** – acetato de medroxiprogesterona

**PRL** - prolactina

**PR** – receptor de progesterona

**PTZ** – pentilenotetrazol

**R** – Wistar não-susceptível às crises audiogênicas

**RIG** – redução do índice de gravidade

**SC** – subcutânea

**WAR** – *Wistar Audiogenic Rats*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XVI
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XVII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>2.1. Peptídeos Natriuréticos</b> .....	6
2.1.1. <i>Peptídeo Natriurético Atrial (ANP)</i> .....	7
2.1.2. <i>ANP e os hormônios sexuais femininos</i> .....	10
2.1.3. <i>ANP materno durante a gestação</i> .....	10
2.1.4. <i>Receptores para os Peptídeos Natriuréticos</i> .....	11
2.1.5. <i>Alterações de Osmolaridade: Efeitos sobre o Sistema Nervoso</i> <i>Central</i> .....	13
2.1.6. <i>Peptídeos Natriuréticos e Sistema Nervoso Central</i> .....	14
<b>2.2. Estrogênios e Progestinas</b> .....	16
2.2.1. <i>Estrogênios e Progestinas: Efeitos sobre Crises Epilépticas</i> ....	17
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	21
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
<b>4.1. Animais</b> .....	23
<b>4.2. Delineamento experimental</b> .....	23

4.2.1. <i>Experimento Gestação</i> .....	23
4.2.2. <i>Experimento Castração</i> .....	25
<b>4.3. Testes audiogênicos</b> .....	25
<b>4.4. Esfregaço vaginal</b> .....	26
<b>4.5. Coleta de materiais</b> .....	27
<b>4.6. Dosagem de ANP</b> .....	27
4.6.1. <i>Radioimunoensaio para ANP</i> .....	28
<b>4.7. Dosagem de proteína total (Bradford, 1976) nos átrios, hipocampo e hipotálamo</b> .....	29
4.7.1. <i>Reagente de cor</i> .....	29
4.7.2. <i>Ensaio</i> .....	29
<b>4.8. Radioimunoensaio para estradiol</b> .....	29
<b>4.9. Radioimunoensaio para progesterona</b> .....	30
<b>4.10. Quantificação de mRNA</b> .....	30
4.10.1. <i>Extração de mRNA total e quantificação</i> .....	30
4.10.2. <i>Tratamento com DNase e transcrição reversa</i> .....	32
4.10.3. <i>Purificação de amplicons para construção da curva-padrão</i> .....	33
4.10.4. <i>PCR em Tempo Real</i> .....	34
4.10.4.1. <i>Sequências dos primers utilizados</i> .....	34
<b>4.11. Autorradiografia</b> .....	35
<b>4.12. Anestesia e ovariectomia</b> .....	36
<b>4.13. Terapia hormonal</b> .....	36
<b>4.14. Análise estatística</b> .....	37
<b>5. RESULTADOS</b> .....	38
<b>5.1. Gestação</b> .....	39
5.1.1. <i>Peptídeo Natriurético Atrial e seus receptores</i> .....	39
5.1.2. <i>Peptídeo Natriurético Atrial e seus receptores no SNC:</i>	

<i>hipotálamo e hipocampo</i> .....	53
5.1.3. <i>Estrogênios e Progestinas</i> .....	58
<b>5.2. Castração</b> .....	63
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	75
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77
<b>9. ANEXOS</b> .....	93



## 1. INTRODUÇÃO

As epilepsias são distúrbios cerebrais comuns caracterizados por descargas elétricas súbitas e excessivas dos neurônios locais. A incidência das epilepsias varia de acordo com a localização geográfica. Em países desenvolvidos, a incidência é de aproximadamente 1%, subindo para 2% em nações menos desenvolvidas, segundo dados da Liga Brasileira de Epilepsia.

De acordo com a *International League Against Epilepsy*, cerca de 70% dos casos de epilepsia são controlados por via medicamentosa. Entretanto, em aproximadamente 30% dos pacientes, as crises não são totalmente controladas ou necessitam de tratamentos alternativos para o controle ou, ao menos, melhoria da qualidade de vida desses pacientes. Esses dados demonstram a necessidade de um maior entendimento dessa síndrome, em busca de novas estratégias de tratamento.

As crises epilépticas expressam-se de forma recorrente e, em geral, espontânea, com características convulsivas ou não-convulsivas. Os atuais conceitos sobre as epilepsias baseiam-se nas propostas formuladas por John Hughlings Jackson em 1873. Segundo Jackson, “as crises constituem o resultado de breves descargas eletroclínicas cerebrais e as características clínicas das crises dependerão da localização e da função do local envolvido pela descarga” (*apud* Yacubian, 2000). Essas descargas elétricas são traduzidas em fenômenos eminentemente motores, sensitivos, autonômicos ou psíquicos, podendo ocorrer diminuição de consciência associada.

As crises epilépticas podem ser classificadas em parciais e generalizadas. As crises parciais podem ser simples ou complexas e estão restritas a uma região do cérebro. Nas crises parciais simples não ocorre perda de consciência do indivíduo afetado e estas podem evoluir para crises parciais complexas ou para crises generalizadas. As crises parciais complexas iniciam-se em uma área determinada do cérebro, mas espalham-se para outras áreas, provocando perturbação da consciência. As crises generalizadas envolvem todo o cérebro e associam-se à perda de consciência (Guerreiro e cols., 2000).

Existem vários modelos para o estudo das epilepsias e entre eles está o modelo de epilepsia audiogênica, no qual crises convulsivas são induzidas por estímulos sonoros de alta intensidade. Uma linhagem de ratos com essa característica foi geneticamente selecionada através de cruzamentos endogâmicos entre ratos Wistar que apresentavam susceptibilidade natural à epilepsia audiogênica, pela Profa. Maria Carolina Doretto, no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Doretto e cols., 2003a). Esses animais foram denominados *Wistar Audiogenic Rats* (WAR). Desta colônia inicial partiu o ramo que vem sendo mantido no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais. A grande vantagem deste modelo é apresentar naturalmente os determinantes neuroquímicos da susceptibilidade à epilepsia.

A gravidade das crises epilépticas nesses animais é determinada pelo índice de gravidade (IG), que expressa uma escala linear de gravidade gradual variando de 0 a 1 e é determinado de acordo com o comportamento do animal durante uma estimulação acústica (Garcia-Cairasco e cols., 1996).

Animais WAR apresentam desequilíbrio hidroeletrolítico, com aumento da diurese e da natriurese, sugerindo alterações nas ações dos sistemas hormonais que controlam o volume dos fluidos corporais (Garcia-Cairasco e cols., 1994). Entre esses sistemas destaca-se o do peptídeo natriurético atrial (ANP), um hormônio secretado primariamente pelos átrios cardíacos e que apresenta propriedades diuréticas, natriuréticas e vasodilatadoras (De Bold e cols., 1981). Além disso, ratos WAR apresentam recrutamento de neurônios hipotalâmicos vasopressinérgicos durante as crises audiogênicas (Fonseca e cols., 2005) e trabalho em desenvolvimento sugere que animais WAR podem apresentar aumento da gravidade das crises quando submetidos a infusões intracerebroventriculares de ANP, sugerindo um papel pró-convulsivante desse hormônio.

Além de alterações no controle do equilíbrio hidroeletrolítico, constatou-se que ratas WAR podem apresentar redução das crises epiléticas durante a lactação (Doretto e cols., 2003b). Entretanto, algumas ratas cujos filhotes foram retirados no período pós-parto também apresentaram redução das crises, indicando a permanência de alterações, com influências anticonvulsivantes, induzidas pela gestação, visto que esses animais não passaram pelo período de lactação. O mecanismo envolvido nesta redução, entretanto, não foi esclarecido.

O presente estudo buscou identificar alterações hormonais que pudessem explicar a redução da gravidade das crises epiléticas, induzida pela gestação, em uma parcela da população de animais geneticamente predispostos à epilepsia audiogênica.



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Peptídeos Natriuréticos**

O sistema de peptídeos natriuréticos contém, pelo menos, três peptídeos endógenos com semelhanças estruturais: peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético tipo-B (BNP) e peptídeo natriurético tipo-C (CNP) (Imura e cols., 1991). Cada um desses peptídeos tem seu precursor codificado por um gene específico (revisão por Levin e cols., 1998).

As ações primárias dos peptídeos natriuréticos ocorrem nos rins, vasos e glândulas adrenais, produzindo diurese, natriurese e vasodilatação, contribuindo, de forma aguda ou crônica, para a redução da pressão sanguínea sistêmica e do volume intravascular (Ballerman & Brenner, 1986). Devido à descoberta dos peptídeos natriuréticos terem coincidido com o desenvolvimento de novas técnicas de sequenciamento de proteínas e rápido avanço na tecnologia de DNA recombinante, a estrutura desses hormônios bem como de seus precursores e genes foi rapidamente elucidada.

A atividade biológica dos peptídeos natriuréticos é totalmente dependente de sua estrutura. Os três tipos apresentam em comum a formação de um anel composto por 17 aminoácidos ligados por pontes dissulfeto entre dois resíduos de cisteína, sendo essa formação essencial para o reconhecimento do peptídeo pelo receptor de membrana (Flynn, 1997).

### 2.1.1. *Peptídeo Natriurético Atrial (ANP)*

Henry e colaboradores, em 1955, foram os primeiros a sugerir que o coração poderia ser capaz de detectar a amplitude do leito vascular e regulá-la por modulação do fluxo de urina. Entretanto, as primeiras evidências de que o coração poderia funcionar como um órgão endócrino foram fornecidas por Kisch em 1956, que descreveu, através de microscopia eletrônica de transmissão, a presença de grânulos densos localizados nos átrios de mamíferos.

A confirmação da existência do ANP ocorreu em 1981, quando DeBold e colaboradores demonstraram a presença de uma substância produzida nos átrios, a qual seria capaz de aumentar a excreção urinária de sódio e regular o volume do líquido extracelular. Quando um extrato de átrios de rato era injetado em ratos anestesiados, observava-se um grande aumento no fluxo urinário e na excreção de sódio, além de uma potente ação de relaxamento sobre o músculo liso vascular.

Em 1983, esse peptídeo foi purificado a partir de extrato de átrios de rato por Flynn e colaboradores e descrito como um peptídeo ativo de 28 aminoácidos, que predomina na circulação, sendo sua precursora, uma molécula composta por 126 aminoácidos, encontrada estocada nos miócitos atriais. Seidah e colaboradores (1984) identificaram uma sequência comum para todos os peptídeos ativos que, quando sintetizados, apresentavam uma atividade similar à do ANP endógeno (Zivin e cols., 1984). Ainda em 1984, cópias de cDNA do ANP foram clonadas em *Escherichia coli* e sua sequência foi determinada. A análise da sequência obtida mostrou que o ANP estava contido na extremidade carboxi-terminal de um

polipeptídeo precursor: pronatriodilatina atrial, proANP ou procardionatrina (Zivin e cols., 1984; Argentin e cols., 1985).

A partir dos estudos anteriores, concluiu-se que o ANP é sintetizado como um grande precursor, proANP. A conversão de proANP para ANP ativo ocorre no momento ou logo após sua secreção do átrio através de clivagem enzimática específica entre os resíduos de Arg-Ser (Imada e cols., 1987) pelas enzimas carboxipeptidase-e ou encefalina-convertase (Ruskoaho e cols., 1986). O cDNA do proANP apresenta uma ORF (*Open Reading Frame*) que potencialmente codificaria uma proteína de 152 aminoácidos, dos quais os primeiros 24 se assemelham fortemente a uma sequência sinal. Observou-se também um alto grau de homologia entre as sequências do ANP em ratos e humanos. O ANP humano é idêntico ao de ratos, exceto pela substituição de metionina por isoleucina na posição 12 (Zivin e cols., 1984; Brenner e cols., 1990).

O gene que codifica o proANP está ligado ao cromossomo 1 no homem (Yang-Feng e cols., 1985), 4 no camundongo (Mullins e cols., 1987) e 5 no rato (Szipirer e cols., 1990). A determinação da sequência gênica completa do proANP revelou um gene com 1,3 kb, contendo dois introns com respectivamente 104 e 391 pb, flanqueados por típicas sequências exon-intron. O primeiro exon contém sequências 5' não-traduzidas, o peptídeo sinal e os primeiros 16 aminoácidos do proANP. O exon central contém sequência do proANP e o terceiro exon codifica os últimos três aminoácidos e a região 3' não-traduzida (Argentin e cols., 1985).

Além do átrio cardíaco, ANP e proANP podem estar presentes em outros tecidos como o hipotálamo (Jirikowski e cols., 1986), arco aórtico (Gardner e cols., 1987), pulmões (Gutkowska e cols., 1989), pituitária (Gardner e cols., 1986), adrenais (Ong e cols., 1987), rins (Sakamoto e cols., 1985), ventrículo, estômago, pâncreas, cérebro e testículos (Vesely e cols., 1992). Entretanto, apesar de presente em vários tecidos, a produção atrial é dezenas de vezes superior à de outras regiões (Gardner e cols., 1986).

O ANP participa, de forma importante, da manutenção do volume extracelular e da pressão arterial. Mudanças no estiramento atrial, como aquela induzida por expansão aguda de volume sanguíneo ou como resultado direto ou indireto de influências hormonais, estimulam a secreção de ANP (Lang e cols., 1985), mas outros fatores fisiológicos e fisiopatológicos podem influenciar a liberação de ANP, tais como o exercício, a hipóxia, a taquicardia e a isquemia do miocárdio (Espiner, 1994). Vários hormônios e neurotransmissores, tais como endotelina, vasopressina e catecolaminas, estimulam a secreção de ANP (revisado por Levin e cols., 1998).

O ANP atua nos rins, aumentando o ritmo de filtração glomerular, inibindo a secreção de renina e o transporte de sódio pelo segmento medular do ducto coletor, e nas adrenais, suprimindo a secreção basal e estimulada de aldosterona. O resultado final dessas diversas ações é a diminuição do volume sanguíneo percebido pelos átrios e o auxílio ao controle do equilíbrio hidroeletrolítico no organismo (Baldissera e cols., 1989, revisado por Brenner e cols., 1990). Recentemente, foi demonstrado que o ANP suprime o crescimento celular no

músculo liso vascular, induz apoptose no músculo cardíaco e células endoteliais vasculares (Misono, 2002).

### 2.1.2. ANP e os hormônios sexuais femininos

A expressão e a secreção dos peptídeos natriuréticos podem sofrer influências dos hormônios esteróides e, dessa forma, podem variar de acordo com as alterações desses hormônios (Haanwinckel e cols., 1995; Reis e cols., 1997; Lee e cols., 1999; Jankowski e cols., 2001; Mukaddam-Daher e cols., 2002). Durante o ciclo estral em ratas, ocorrem alterações do sistema dos peptídeos natriuréticos no útero. A concentração de ANP, assim como de seu mRNA, segue um padrão cíclico sincronizado, sendo elevada no metaestro e baixa no proestro. Além disso, as alterações físicas dos receptores dos peptídeos natriuréticos estão associadas com os níveis elevados de estrogênio durante o ciclo estral e estão inversamente relacionadas aos níveis de progesterona (Reis e cols., 1997).

### 2.1.3. ANP materno durante a gestação

A gestação normal é caracterizada por mudanças hemodinâmicas que incluem uma grande expansão do volume plasmático. O ANP, além de ser um potente diurético e natriurético, apresenta efeitos de supressão da secreção de aldosterona e renina (Brenner e cols., 1990), sendo um dos principais responsáveis pela manutenção da volemia dentro dos limites fisiológicos. No período final da gestação, ratas apresentam refratariedade às ações desse peptídeo, não apresentando aumento da diurese e da natriurese após a infusão do mesmo (Masilamani e cols., 1994). Essa

resistência às ações do ANP, no período final da gestação, poderia contribuir para a retenção de sódio e para a expansão de volume durante a gestação através da diminuição da expressão de receptores renais (dados não publicados dos nossos estudos) e adrenais (Vaillancourt e cols., 1997) para esse peptídeo.

Em ovelhas, a concentração de ANP plasmático aumenta no início da gestação e depois permanece elevado ao longo da gestação (Mukaddam-Daher e cols., 1994). Esse aumento dos níveis de ANP circulante seria provocado pela maior distensão do átrio esquerdo durante a gestação (Javeshghani e cols., 1995). Em ratas, as concentrações de ANP estão elevadas no início da gestação, mas reduzem ou tendem a reduzir ao final da gestação. Uma semana após o parto, os níveis de ANP plasmático estão novamente elevados (Mukaddam-Daher e cols., 2002; Nadel e cols., 1988). O estradiol foi sugerido como fator determinante dessas alterações (Zhang e cols., 1995).

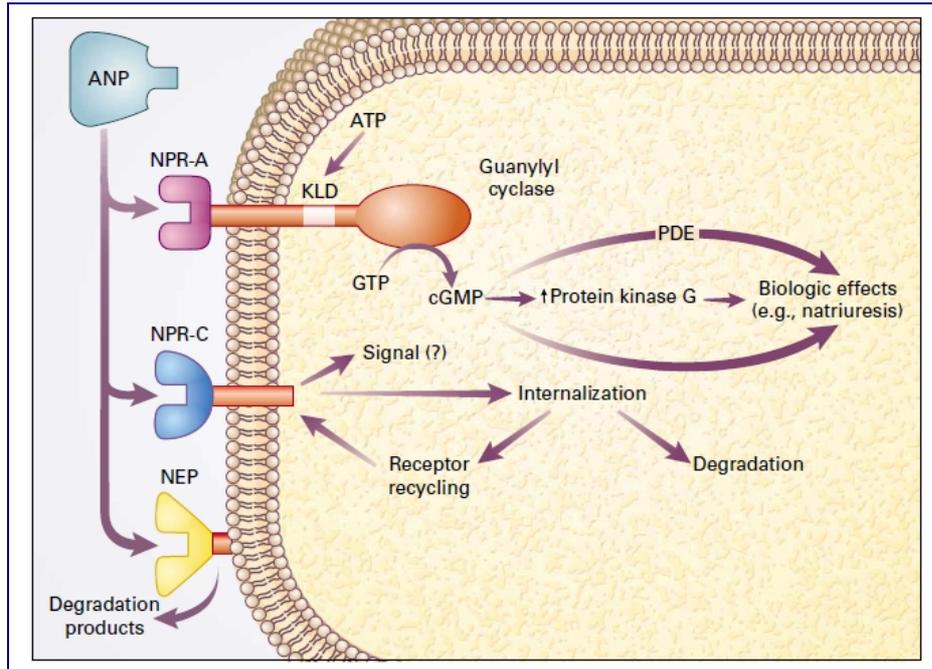
#### 2.1.4. *Receptores para os Peptídeos Natriuréticos*

Existem três tipos de receptores para os peptídeos natriuréticos, dois deles acoplados à guanilato ciclase, receptor A (NPR-A), receptor B (NPR-B) e receptor C (NPR-C).

O ANP e o BNP ligam-se ao receptor NPR-A, sendo que o BNP apresenta menor afinidade por esse receptor. CNP liga-se ao receptor NPR-B. Os três peptídeos ligam-se com alta afinidade ao receptor do tipo C (NPR-C) ou de *clearance* (revisado por Levin e cols., 1998). NPR-A e NPR-B apresentam domínio transmembrana

único, domínio extracelular com cerca de 30% de homologia ao receptor C (Nakao e cols., 1992) e 44% de homologia entre eles e domínio catalítico intracelular acoplado à enzima guanilato ciclase (Koller & Goeddel, 1992). A ligação dos peptídeos aos receptores A e B leva à geração do segundo mensageiro GMP cíclico, que é o responsável pela maioria das ações biológicas do ANP.

O receptor C apresenta homologia estrutural com NPR-A e NPR-B, porém difere bastante no domínio intracelular catalítico, apresentando curta cauda citoplasmática sem acoplamento à guanilato ciclase. Este receptor mostra ter sua estrutura molecular bem preservada através da evolução, com sequência de aminoácidos apresentando aproximadamente 95% de identidade entre humanos e ratos (*apud* Lewick & Protter, 1997). O receptor C apresenta um papel essencial na depuração metabólica dos peptídeos natriuréticos, regulando a concentração plasmática dos mesmos. Os mecanismos celulares envolvidos em sua atividade biológica incluem internalização do receptor, hidrólise lisossômica do peptídeo ligante e reciclagem do receptor à superfície celular (Nussenzveig e cols., 1990).



**Receptores para o ANP e sinalização nas células alvo.**

Fonte: Levin e cols., 1998

### 2.1.5. Alterações de Osmolaridade: Efeitos sobre o Sistema Nervoso Central

Pacientes com polidipsia psicogênica podem ingerir até seis litros de água por dia, resultando em hiponatremia e hipocalemia severa e outros efeitos colaterais como cefaléias, vômitos, tremores, convulsões e coma (Ferrier, 1985). Por outro lado, a hiperosmolaridade do espaço extracelular, provocada por aumento da concentração de glicose, apresenta efeito de proteção contra crises (Andrew, 1989).

Hiperexcitabilidade nos registros eletrográficos, obtida em fatias das regiões CA1 e CA3 do hipocampo, promovida pela elevação da concentração de potássio no meio extracelular, é abolida pela adição de substâncias que não penetram nas células, como manitol, sacarose e L-glicose, que são eficazes em aumentar a pressão osmótica do meio extracelular. No entanto, o aumento da osmolaridade por agentes

que ultrapassam a membrana plasmática, como D-glicose e glicerol, não influenciam o aparecimento de convulsões (Traynelis e Dingledine, 1989).

#### 2.1.6. *Peptídeos Natriuréticos e Sistema Nervoso Central*

Quirion e colaboradores (1986) encontraram alta densidade de ANP ligado a várias regiões cerebrais. A grande distribuição da ligação desses peptídeos sugere que o ANP pode desempenhar papéis diferentes no cérebro além da regulação central das funções cardiovasculares. A partir dessa descoberta, sugeriu-se a existência de uma família de peptídeos cardio-cerebrais em analogia aos bem conhecidos peptídeos cérebro-intestinais.

Embora o ANP e o BNP plasmáticos não sejam capazes de ultrapassar a barreira hemato-encefálica, eles alcançam o sistema nervoso central através de locais externos a essa barreira, chegando a várias regiões cerebrais. Além disso, todos os três peptídeos natriuréticos são produzidos no cérebro. O ANP apresenta efeitos centrais coordenados aos efeitos periféricos, levando a ações de controle da homeostase dos fluidos e eletrólitos (Levin e cols., 1998; Antunes-Rodrigues e cols., 2004).

Os mecanismos de ação dos peptídeos natriuréticos no cérebro podem ser associados à distribuição de seus receptores. O receptor C é encontrado por todo o sistema nervoso central, enquanto o receptor do tipo A predomina em áreas adjacentes ao terceiro ventrículo, que não estão separadas do sangue pela barreira hemato-encefálica. Este receptor parece mediar os efeitos do ANP sobre a ingestão

de sal e água. Os receptores do tipo B predominam no hipotálamo e em outras regiões rostrais do cérebro (Levin e cols., 1998).

Poucos trabalhos e relatos sobre o sistema de peptídeos natriuréticos em indivíduos epiléticos são conhecidos. Este é um campo ainda pouco explorado, mas sabe-se que existem relações entre esse sistema e a epilepsia. *Status epilepticus* induzido em ratos anestesiados mostrou que a crise produz aumento do fluxo urinário, da excreção de sódio e do ANP plasmático (Perrone e cols., 1995). Animais susceptíveis à epilepsia audiogênica apresentam naturalmente excreção de sódio aumentada, sendo que a estimulação audiogênica aguda e a crônica (modelo de abrasamento audiogênico, onde repetidos estímulos audiogênicos recrutam áreas límbicas) elevam mais ainda essa excreção (Garcia-Cairasco e cols., 1994).

A estimulação do nervo vago tem emergido como uma terapia adjuvante em epilepsias refratárias a medicamentos, nas quais a cirurgia não é aconselhável. Entretanto, essa terapia pode elevar as concentrações séricas de fragmentos aminoterminais de BNP (NT-proBNP), que, juntamente ao próprio BNP, são utilizados largamente como marcadores de disfunção cardíaca (Rauchenzauner e cols., 2007b), mostrando, portanto, a necessidade de cautela nesse tipo de terapia.

Crianças epiléticas apresentam níveis séricos de BNP superiores às crianças sem crises, doze horas após a ocorrência das crises, sugerindo a possibilidade da presença de disfunções cardíacas (Alehan e cols., 2009) e/ou potenciais papéis desse hormônio e seu pró-hormônio em desordens cerebrais agudas

(Rauchenzauner e cols., 2007a; Rauchenzauner e cols., 2007b), além da função já reconhecida como marcadores em desordens cardiovasculares.

## **2.2. Estrogênios e Progestinas**

A secreção de esteróides ovarianos obedece ao eixo hipotálamo-hipofisário. As principais ações dos estrogênios são o crescimento e desenvolvimento do sistema genital; aumento da motilidade uterina e sensibilidade uterina à ocitocina; comportamento de estro em animais e aumento da libido em humanos; estímulo do crescimento ósseo e fechamento das epífises. Além disso, os estrogênios têm efeitos sobre o metabolismo como diminuição da tolerância à glicose, diminuição da taxa de colesterol plasmático, aumento do HDL, aumento dos receptores para progesterona, aumento dos fatores de coagulação sanguínea.

As ações dos estrogênios são mediadas por receptores específicos ou via mecanismos independentes de seus receptores específicos. Os receptores intracelulares estão presentes no citoplasma e no núcleo. No citoplasma, ocorre principalmente a forma inativa e, no núcleo, a forma ativa. Os receptores de estrogênios também podem existir como receptores de membrana, que estão geralmente associados a ações não genômicas do hormônio (Velísková, 2007).

A progesterona age aumentando a secreção endometrial, estimulando o crescimento lobular-alveolar mamário, possui efeito antagônico à aldosterona, aumenta a temperatura corporal, reduz a motilidade uterina e diminui a retenção de sódio (Porterfield, 1997).

### 2.2.1. *Estrogênios e Progestinas: Efeitos sobre Crises Epilépticas*

Vários fatores ambientais e/ou metabólicos podem influenciar a ocorrência de crises epilépticas. Dentre esses fatores, destacamos os esteróides gonadais, que influenciam funções cerebrais e podem afetar o início de crises epilépticas por alterações do metabolismo celular e da transmissão neural, pois vários desses hormônios têm o hipotálamo e o córtex límbico como locais de ação (Morrel e cols., 2002; Edwards e cols., 2000; Pimentel, 2000; Valente e cols., 2002)

A gravidade e a frequência das crises epilépticas em mulheres podem ser alteradas de acordo com os vários estágios de vida que estão associados a mudanças hormonais, como na puberdade, durante o ciclo menstrual e na menopausa (Morrell, 2002). Indivíduos epilépticos podem apresentar diferenças na susceptibilidade às crises dependendo da fase do ciclo menstrual ou do ciclo estral em que se encontram (Herzog e cols., 1997; Reddy, 2004; Rhodes e cols., 2004). Além disso, disfunções reprodutivas e alterações endócrinas são comuns em mulheres e homens com epilepsia (Edwards e cols., 2000; Morris III & Vanderkolk, 2005).

De um modo geral, acredita-se que a administração de estrogênios aumenta a gravidade das crises, devido à diminuição do limiar convulsivante, enquanto a progesterona e alguns de seus metabólitos têm efeitos inibitórios sobre as crises epilépticas em vários modelos animais (Morrel, 2002; Pimentel, 2000; Reddy, 2004; Reddy e cols, 2004; Rhodes e cols., 2004).

Em muitas mulheres com epilepsia, as crises aumentam em frequência e intensidade em algumas fases do ciclo menstrual. Essa condição é conhecida como epilepsia catamenial. Variações cíclicas naturais das concentrações de progesterona durante o ciclo menstrual podem influenciar a ocorrência de crises catameniais. A frequência e/ou intensidade das crises diminui quando a progesterona plasmática está elevada, aumentando no período perimenstrual, quando a progesterona plasmática diminui. Pode aumentar, também, quando ocorre elevação do estradiol na fase pré-ovulatória e em fases luteínicas inadequadas, nestas a progesterona encontra-se em concentrações reduzidas (Herzog e cols., 1997). É interessante observar que na fase luteínica normal, quando ocorre elevação da concentração de progesterona, a concentração de estradiol também se encontra elevada, indicando que a relação entre progesterona e estradiol talvez seja mais importante para a determinação das crises do que as suas concentrações individuais (Reddy, 2004). Vários estudos que associam diretamente as crises com mudanças nas concentrações hormonais sugerem que a relação entre progesterona e estrogênios influencia a atividade epileptiforme (Backstrom, 1976; Herzog, 1991). Os altos níveis de estrogênios poderiam predispor à hiperexcitabilidade e a progesterona apresentaria efeitos opostos.

No modelo de crise epiléptica induzida por ácido cáínico, ocorrem reduções das crises epilépticas durante a gestação e isso seria devido a um aumento estável das concentrações de progestinas (Rhodes e cols., 2004). Nesse modelo observam-se também elevadas concentrações de estradiol e 3-alfa dióis resultantes do metabolismo de andrógenos, que apresentam reconhecida ação anticonvulsivante. Mais uma vez observa-se uma elevada concentração de estradiol associada à

elevada concentração de progesterona, reforçando a idéia de que a relação entre progesterona e estradiol apresenta papel importante na modulação das crises epiléticas (Rhodes e cols., 2004). Esses dados são reforçados pela observação de que as crises podem diminuir durante a gestação em algumas mulheres (Morrell, 1992) e durante a gestação e lactação em modelos animais de epilepsia (Amado & Cavalheiro, 1998; Doretto e cols., 2003b), quando a relação entre progesterona e estrogênios está elevada.

Por outro lado, os efeitos dos estrogênios sobre as crises epiléticas são contraditórios. É comumente aceito que os estrogênios apresentam efeitos pró-convulsivantes; entretanto, dados clínicos mostram que os estrogênios podem apresentar efeitos pró-convulsivantes, nenhum efeito ou efeitos anticonvulsivantes em indivíduos epiléticos (Harden, 2003; Jacono & Robertson, 1987; Peebles e cols., 2000). Da mesma forma, em modelos animais, a administração de estrogênios pode aumentar, não apresentar efeitos ou diminuir as crises (Budziszewska e cols., 2001; Hoffman e cols., 2003; Perez e cols., 1988; Reibel e cols., 2000). Existem também fortes evidências de que os estrogênios podem aumentar os efeitos anticonvulsivantes da progesterona em modelos de crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (Frye & Rhodes, 2005). Esses efeitos aparentemente contraditórios dos estrogênios sobre as crises dependem da duração do tratamento, do modo de administração, da dose e tipo de estrogênio, do estado hormonal, do tipo de crise epilética, dentre outros fatores (Velísková, 2007).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi investigar alterações hormonais do sistema de peptídeos natriuréticos e dos esteróides gonadais relacionados com a redução na susceptibilidade às crises epiléticas em fêmeas WAR durante a gestação.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar alterações no perfil do peptídeo natriurético atrial e de seus receptores, NPR-A (receptor biologicamente ativo) e NPR-C (receptor de “*clearance*”), durante a gestação.
- Estabelecer relações entre a gravidade das crises epiléticas e as concentrações de peptídeo natriurético atrial e seus receptores.
- Estabelecer possíveis relações entre as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona com a gravidade das crises.
- Investigar a participação do estradiol e da progesterona na redução da gravidade das crises epiléticas em fêmeas WAR castradas utilizando diferentes esquemas de tratamento.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar não susceptíveis à epilepsia audiogênica provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG) e ratas WAR susceptíveis à crise audiogênica provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com idades em torno de 3 meses e pesos variando entre 230 e 270 g. Todos os animais foram submetidos a ciclo claro-escuro de 14/10 horas e receberam ração comercial e água *ad libitum*.

### 4.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA).

#### 4.2.1. *Experimento Gestação*

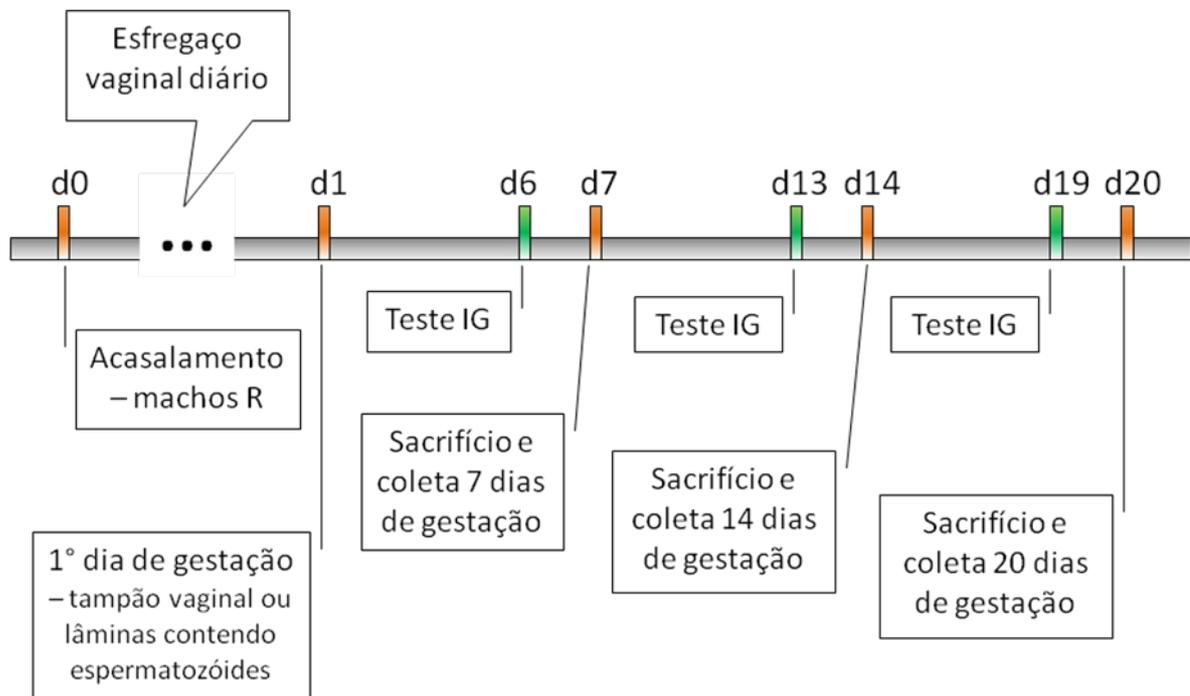
No experimento de gestação, o seguinte delineamento experimental foi seguido:

- Ratas Wistar e WAR, selecionadas após 3 testes de estimulação sonora, foram acasaladas com ratos Wistar resistentes (R) à epilepsia audiogênica.
- O dia de acasalamento foi determinado por esfregaço vaginal diário.
- Os animais foram divididos em grupos como na tabela abaixo:

**Tabela 1** - Número de animais por grupo no experimento de gestação.

Tempo de Gestação	Wistar (n)	WAR (n)
7 dias	9	10
14 dias	8	11
20 dias	6	12

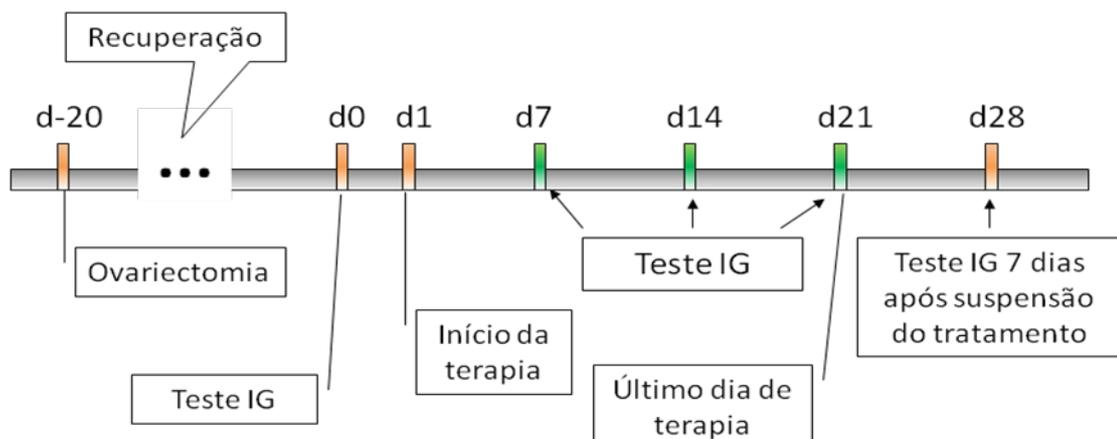
- Todos os animais foram submetidos à estimulação sonora, no dia anterior ao sacrifício, para determinação da gravidade das crises nos diferentes períodos de gestação. Dessa forma, foi possível comparar a gravidade das crises antes e durante a gestação.
- Os animais foram sacrificados por decapitação aos 7, 14 e 20 dias de gestação conforme a **Tabela 1**.

**Delineamento experimental do experimento de gestação.**

#### 4.2.2. Experimento Castração

No experimento de castração, o seguinte delineamento experimental foi seguido:

- Ratas Wistar e WAR, selecionadas após 3 testes de estimulação sonora, foram ovariectomizadas.
- No 21º dia após a ovariectomia, os animais foram submetidos à estimulação sonora e no 22º dia iniciou-se a terapia hormonal.
- Novas estimulações sonoras foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias de terapia hormonal e 7 dias após a suspensão do tratamento.
- Ao final da quarta semana os animais foram sacrificados.



**Delineamento experimental do experimento de castração.**

#### 4.3. Testes audiogênicos

Aos 70, 74 e 78 dias de idade, todos os animais foram submetidos à estimulação sonora de alta intensidade para avaliação da susceptibilidade epiléptica (“*screening*”). Neste teste, o animal é colocado na caixa de estimulação e submetido

a estímulo sonoro até que apresente uma crise generalizada tônico-clônica ou por um tempo máximo de um minuto. O índice de gravidade das crises (IG) foi determinado de acordo com o comportamento do animal durante a estimulação. O IG expressa uma escala linear de gravidade gradual variando de 0 a 1 (**Tabela 2**). Foram considerados animais resistentes os Wistar que apresentaram IG igual a 0,0 e susceptíveis os WAR com IG maior ou igual a 0,85 nos três testes do *screening*.

**Tabela 2** - Índice de gravidade das crises epiléticas.

0,00	Nenhum comportamento relacionado a crises.
0,11	Um episódio de corridas.
0,23	Um episódio de corridas seguido de pulos e quedas atônicas.
0,38	Dois episódios de corridas seguidos de pulos e quedas atônicas.
0,61	Tudo que foi citado acima, mais convulsão tônica, com arqueamento tônico dorsal da cabeça (opistótomo).
0,73	Tudo acima mais convulsões clônicas parciais (somente membros anteriores ou posteriores) e generalizadas (membros anteriores e posteriores).
0,85	Tudo acima mais espasmos clônicos.
0,90	Tudo acima mais flexão ventral da cabeça.
0,95	Tudo acima mais hiperextensão de membros anteriores.
1,00	Tudo acima mais hiperextensão de membros posteriores.

Durante os experimentos foram realizados novos testes audiogênicos para determinação da gravidade das crises dos animais nas diferentes condições analisadas, conforme citado no delineamento experimental. O bloqueio do componente tônico da crise, ou  $IG \leq 0,38$ , foi considerado ação anticonvulsivante.

#### 4.4. Esfregaço vaginal

No Experimento de Gestação, todas as ratas foram acasaladas com machos Wistar não susceptíveis à epilepsia audiogênica. O dia de acasalamento foi determinado por esfregaço vaginal diário, realizado entre 7:00 e 9:00 h, considerando-se como

primeiro dia de gestação aquele em que foi encontrado tampão vaginal e/ou espermatozóides nas lâminas de esfregaço.

#### **4.5. Coleta de materiais**

As ratas R e WAR foram sacrificadas aos 7, 14 e 20 dias de gestação, por decapitação, no Experimento de Gestação. O sangue foi coletado através de funis heparinizados em tubos pré-gelados 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 centrifugação do sangue (960 x g, 20 min, 4°C), o plasma foi separado e conservado em freezer a -80°C até a realização das dosagens hormonais por radioimunoensaio. Átrios, rins, hipófise, hipotálamo e hipocampo foram retirados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80°C até a realização das dosagens.

#### **4.6. Dosagem de ANP**

O plasma teve os peptídeos extraídos em colunas *Sep-Pak* C18. As colunas foram ativadas com 8 ml de acetato de amônio a 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 em 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 átrios, hipocampo e hipotálamo foram homogeneizados em 1 ml de solução de ácido acético 0,1 M contendo inibidores de proteases (Pepstatina 5  $\mu$ M, PMSF  $10^{-3}$  M, EDTA  $10^{-3}$  M) e centrifugados (19.400 x g, 30 min, 4°C). O sobrenadante dos átrios foi diluído em tampão. Foram realizadas duas diluições em série: 20  $\mu$ l do sobrenadante foram diluídos em 980  $\mu$ l de tampão fosfato; 5  $\mu$ l desta diluição foram novamente diluídos em 975  $\mu$ l de solução tampão. Os sobrenadantes do hipocampo e hipotálamo tiveram os peptídeos extraídos em colunas *Sep-Pak* C18, conforme descrito para o plasma anteriormente, mas antes foram reservadas alíquotas para posterior dosagem das proteínas totais. A concentração de ANP, nos átrios, plasma, hipocampo e hipotálamo foi determinada por radioimunoensaio.

#### 4.6.1. Radioimunoensaio para ANP

Amostras de plasma extraído reconstituídas em 0,5 ml de tampão fosfato e amostras de hipocampo e hipotálamo extraídos reconstituídas em 0,25 ml de tampão fosfato (100  $\mu$ l), em duplicata, foram incubadas “*overnight*” a 4°C com 100  $\mu$ l de anticorpo anti-ANP (1:60.000), fornecido por J. Gutkowska do *Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Research Centre, Centre Hospitalier de L'Université de Montréal-Hôtel-Dieu*. 20  $\mu$ l das amostras diluídas do tecido cardíaco também foram incubadas com o anticorpo. Foram adicionados 100  $\mu$ l (10000 cpm) de  $^{125}$ I-ANP incubando por mais 24 horas a 4°C. A separação do imunocomplexo foi feita por precipitação com segundo anticorpo (soro de cabra antigama-globulina de coelho) na concentração de 1:20 por duas horas. Após duas horas em temperatura ambiente foi adicionado 0,5 ml de polietilenoglicol 6,25% em água. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos

a 960 x g, 4°C, e o sobrenadante foi retirado por aspiração. A radioatividade do imunocomplexo foi determinada por contador gama.

#### **4.7. Dosagem de proteína total (Bradford, 1976) nos átrios, hipocampo e hipotálamo**

##### *4.7.1. Reagente de cor*

*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 1 litro com água mili-Q.

##### *4.7.2. Ensaio*

A solução padrão foi obtida através 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.

#### **4.8. Radioimunoensaio para estradiol**

Para a determinação do estradiol plasmático utilizou-se o kit Maia (Adaltis). Amostras de plasma diluídas 10 vezes (50 µl), em duplicata, foram incubadas com

20 µl de anticorpo anti-estradiol e 20 µl de <sup>125</sup>I-estradiol por uma hora a 37°C. A separação do imunocomplexo foi feita por precipitação em placa magnética com segundo anticorpo marcado com íon metálico. Após 10 minutos de incubação com o segundo anticorpo, em temperatura ambiente, os tubos foram colocados em placa magnética por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade do imunocomplexo determinada por contador gama.

#### **4.9. Radioimunoensaio para progesterona**

Para a determinação das concentrações de progesterona plasmática utilizou-se o kit Maia (Adaltis). Amostras de plasma (5 µl), em duplicata, foram incubadas com 40 µl de anticorpo anti-progesterona e 40 µl de <sup>125</sup>I-progesterona por uma hora a 37°C. A separação do imunocomplexo foi feita por precipitação em placa magnética com segundo anticorpo marcado com íon metálico. Após 10 minutos de incubação com o segundo anticorpo, em temperatura ambiente, os tubos foram colocados em placa magnética por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e a radioatividade do imunocomplexo foi determinada por contador gama.

#### **4.10. Quantificação de mRNA**

##### *4.10.1. Extração de RNA total e quantificação*

O RNA total foi extraído dos átrios, hipotálamo, hipocampo e rins. Para isso, adicionou-se 500 µL de Trizol® (Invitrogen) em tubos eppendorf autoclavados

contendo o tecido (aproximadamente 50 mg para os rins e 10 mg dos demais tecidos) levando-o ao homogeneizador.

Após a homogeneização, as amostras ficaram à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200  $\mu$ L de clorofórmio em cada tubo e os mesmos foram vigorosamente agitados por um período de 15 a 30 segundos. Em seguida, as amostras ficaram em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente e foram centrifugadas por 15 minutos a  $15.300 \times g/4^\circ \text{C}$ .

O sobrenadante foi transferido, cuidadosamente, para outro eppendorf, evitando contaminação com o DNA. Isopropanol (500  $\mu$ L) foi adicionado aos tubos e homogeneizou-se levemente por inversão. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas ( $15.300 \times g/4^\circ \text{C}/10 \text{ min}$ ) e o sobrenadante foi descartado.

Adicionou-se 1 ml de Etanol (EtOH) 70% ao precipitado, que foi homogeneizado levemente e centrifugado por 5 minutos a  $9.600 \times g/4^\circ \text{C}$ . O sobrenadante foi novamente descartado e, após secagem do excesso de EtOH, as amostras foram ressuspensas em água DEPC (água mili-Q submetida a tratamento prévio, 24 horas, com dietilpirocarbonato e autoclavada).

Alíquotas de 6  $\mu$ l do RNA total foram diluídas em 594  $\mu$ l (1:100) de água DEPC para quantificação em cubeta de quartzo específica. As concentrações do mRNA total foram determinadas pela leitura da densidade óptica (OD) em comprimento de onda de 260 nm em espectrofotômetro *GeneQuant*.

#### 4.10.2. Tratamento com DNase e transcrição reversa

Alíquotas contendo concentrações iguais de RNA total foram previamente submetidas a tratamento com DNase (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade – Invitrogen), a fim de evitar contaminação com DNA durante a reação de PCR posteriormente realizada.

Resumidamente, foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente: 0,5 µg de RNA total, 0,5 µL de DNase (*10x DNase I Reaction Buffer*), 1 µl *DNase I, Amp Grade*, 1 U/µl e quantidade suficiente para 5 µl de água DEPC. A DNase foi, em seguida, inativada pela adição de 0,5 µl de solução EDTA 25 mM e as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 65°C. Para a realização do PCR em Tempo Real para o ANP não foi necessário tratamento prévio com DNase, pois um dos primers utilizados foi padronizado de forma a não ligar-se ao DNA genômico. A reação de transcrição reversa foi realizada logo após o tratamento com DNase para os mRNAs dos receptores (NPR-A e NPR-C).

A reação de transcrição reversa para o mRNA ANP nos átrios foi realizada utilizando-se, para cada amostra, 1 µg de RNA total em quantidade suficiente para 18,6 µl de água DEPC. Em cada tubo foram acrescentados 4 µl primer reverso para o mRNA alvo (ANP 3 – 1 pmol/µl), 4 µl primer reverso para o gene normalizador (S26 – 1 pmol/µl), 0,2 µl oligo dT 18 (0,5 µg/µl), 2 µl dNTP mix (2,5 mM), 4 µl tampão 10x, 2 µl DTT e 0,2 µl de enzima transcriptase reversa (MLV), totalizando um volume de 35 µl, que foi incubado por uma hora a 40°C e armazenado em freezer a -20°C.

A reação de transcrição reversa para o mRNA do NPR-A e NPR-C nos rins, hipotálamo e hipocampo, foi realizada utilizando-se, para cada amostra, 0,5 µg de RNA total tratado com DNase (5,5 µl volume final). Em cada tubo foram acrescentados 11,1 µl água DEPC, 4 µl primer reverso Receptor A (NPR-AREV – 1 pmol/µl), 4 µl primer reverso Receptor C (NPR-C – 1 pmol/µl), 4 µl primer reverso gene normalizador (S26REV – 1 pmol/µl), 0,2 µl oligo dT 18 (0,5 µg/µl), 0,5 µl dNTP mix (2,5 mM), 4 µl tampão 10x, 2 µl DTT, 0,2 µl enzima transcriptase reversa (MLV), totalizando um volume de 35 µl, que foi incubado por uma hora a 40°C e armazenado em freezer a -20°C.

#### 4.10.3. *Purificação de amplicons para construção da curva-padrão*

Com o objetivo de se obter fragmentos de PCR (amplicons) puros e específicos para quantificação e utilização como padrão no PCR em Tempo Real utilizou-se *PureLink™ PCR Purification Kit* da Invitrogen.

Resumidamente, quatro volumes de *PureLink Binding Buffer* com isopropanol foram adicionados a um volume de produtos de PCR em Tempo Real, ANP, NPR-A e NPR-C, previamente realizados em outros experimentos. Essa mistura foi adicionada à coluna de separação (*PureLink Spin Column*) e a coluna foi centrifugada a 10.600 x g por 1 minuto. O DNA ficou ligado à coluna e o líquido restante foi descartado. A coluna foi lavada com 650 µL de *Wash Buffer* com etanol e novamente centrifugada a 10.600 x g por 1 minuto e o líquido restante foi descartado. A coluna foi eluída com 50 µl de *Elution Buffer* adicionado ao centro da

coluna e incubado à temperatura ambiente por 1 minuto. Após a incubação, a coluna foi novamente centrifugada (17.900 x g) por 2 minutos e os amplicons foram quantificados em espectrofotômetro *GeneQuant*.

#### 4.10.4. PCR em Tempo Real

Para a reação de PCR em Tempo Real, utilizou-se em cada poço 1 µl de cDNA da transcrição reversa, 3 µl primer senso (1 pmol/µl), 3 µl primer reverso (1 pmol/µl) e 17 µl de Sybr Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) para cada peptídeo analisado.

O mRNA para a proteína ribossômica S26 foi utilizado como normalizador da reação de PCR em Tempo Real, devido à expressão constitutiva de seu gene, ou seja, expressão contínua, sem influências externas, em todas as células do organismo de maneira semelhante.

##### 4.10.4.1. Sequências dos primers utilizados

<b>ANP1</b>	GGA TTT CAA GAA CCT GCT AGA
<b>ANP3</b>	CTT CAT CGG TCT GCT CGC TCA

<b>NPR-AREV</b>	AGA TGT AGA TAA CTC TGC CCT TTC G
<b>NPR-AFOR</b>	ATC ACA GTG AAT CAC CAG GAG TTC

<b>NPR-CREV</b>	ACT CGC TCAC TGC CCT GGA TGT A
<b>NPR-CFOR</b>	CCT ACA ATT TCG ACG AGA CCA AA

<b>S26REV</b>	CGA TTC CTG ACA ACC TTG CTA TG
---------------	--------------------------------

<b>S26FOR</b>	CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT
---------------	-----------------------------

#### 4.11. Autorradiografia

Foram feitos cortes dos rins congelados, em criostato a  $-30^{\circ}\text{C}$ , com espessura de 16  $\mu\text{m}$ . Os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas. As lâminas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia do ensaio.

No ensaio, as lâminas foram pré-incubadas em solução Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 0,1% PEI, a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esta pré-incubação, as lâminas foram dispostas em superfície plana e os cortes receberam concentrações crescentes de ANP, de  $10^{-12}$  a  $10^{-6}$  M, diluídos em Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  bacitracina (Sigma), 0,5% albumina sérica bovina (BSA) e 50 pM  $^{125}\text{I}$ -ANP (20.000 cpm/100  $\mu\text{l}$ ), sendo cada concentração pipetada em seu respectivo corte. O primeiro corte recebeu apenas a solução contendo  $^{125}\text{I}$ -ANP, para verificação da ligação total do peptídeo marcado.

Após uma hora de incubação, as lâminas foram lavadas em tampão Tris-HCl em cubas geladas (3 lavagens de 1 min cada) e depois lavadas com água destilada para remoção dos sais (10 segundos). As lâminas foram dispostas em cassetes para sensibilização das telas por 48 horas. Após este período, as telas sensibilizadas foram escaneadas pelo aparelho *PhosphorImager* (Fuji, BAS-1000) e as imagens digitalizadas foram analisadas utilizando-se o programa *Image Gauge*.

#### 4.12. Anestesia e ovariectomia

No Experimento de Castração, os animais foram previamente anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1ml/100g de peso corporal, *ip*) e submetidos à ovariectomia bilateral, 21 dias antes do início da terapia hormonal. Após incisão bilateral nos flancos, os ovários foram removidos e a pele suturada.

#### 4.13. Terapia hormonal

As ratas Wistar e WAR, 21 dias após a ovariectomia, foram submetidas à terapia hormonal, de acordo com o esquema apresentado na **Tabela 3**:

**Tabela 3** - Tratamento hormonal e número de animais do experimento de castração.

		1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	n
<b>Wistar</b>	<b>Grupo 1</b>	Veículo	Veículo	Veículo	s/ tratamento	5
	<b>Grupo 2</b>	E+P	E+P	E+P	s/ tratamento	5
	<b>Grupo 3</b>	E	P	P	s/ tratamento	5
	<b>Grupo 4</b>	P	P	P	s/ tratamento	5
	<b>Grupo 5</b>	E	E	E	s/ tratamento	5
<b>WAR</b>	<b>Grupo 1</b>	Veículo	Veículo	Veículo	s/ tratamento	5
	<b>Grupo 2</b>	E+P	E+P	E+P	s/ tratamento	6
	<b>Grupo 3</b>	E	P	P	s/ tratamento	6
	<b>Grupo 4</b>	P	P	P	s/ tratamento	6
	<b>Grupo 5</b>	E	E	E	s/ tratamento	5

Veículo: óleo de milho na dose de 0,1ml/100g de peso corporal; E: estrogênio (Hexaidrobenzoato de Estradiol - Benzoginoestril), 1µg/100g de peso corporal; P: progesterona, (Acetato de Medroxiprogesterona - Depo®-Provera®) 500µg.

#### **4.14. Análise estatística**

Os resultados dos experimentos são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o teste *One-way ANOVA* (análise de variâncias) seguido por *Newman-Keuls*. O teste t de *Student* e o teste Q de *Cochran* foram realizados quando apropriados. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Gestação

#### 5.1.1. *Peptídeo Natriurético Atrial e seus receptores*

Nenhuma alteração na gravidade das crises epiléticas foi observada aos 7 e aos 14 dias de gestação nas WAR. Entretanto, na terceira semana de gestação (20 dias), houve redução das crises em 50% das WAR, sendo que 33% dos animais desse grupo apresentaram IG=0,0, conforme ilustrado na **Figura 1**. Devido a esses resultados, análises foram feitas separando-se as duas sub-populações de WAR: os animais que apresentaram redução da gravidade das crises aos 20 dias de gestação (RIG) e aqueles que não apresentaram redução (NRIG).

A **Figura 2** mostra que a concentração plasmática de ANP diminuiu com o decorrer da gestação em WAR. Os valores máximos foram observados aos 7 dias ( $593,20 \pm 76,50$  pg/ml;  $p < 0,01$  em relação a R 7 dias,  $344,10 \pm 60,72$  pg/ml). As ratas R não apresentaram alteração das concentrações de ANP plasmático nestas fases. Entretanto, a análise dos subgrupos de 20 dias de gestação revela que o grupo RIG apresentou ANP plasmático reduzido em relação aos grupos R e NRIG ( $p < 0,05$ ; RIG:  $36,49 \pm 7,52$ ; R:  $159,0 \pm 23,70$ ; NRIG:  $137,2 \pm 37,59$  pg/ml).

As concentrações de ANP nos átrios direitos de WAR foram iguais às das R aos 7 e 14 dias de gestação e permaneceram constantes nesses períodos, enquanto, aos 20 dias, ocorreu uma queda da concentração atrial de ANP das WARs (**Figura 4**,

$p < 0,01$ ; R 20 dias:  $31,23 \pm 2,79$  vs. WAR 20 dias:  $8,93 \pm 0,94$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína total). O conteúdo de ANP no átrio direito do grupo RIG não foi diferente do grupo NRIG (**Figura 5**).

Nos átrios esquerdos, conforme apresentado na **Figura 6**, animais R apresentaram aumento progressivo das concentrações de ANP (R 7 dias:  $15,56 \pm 2,25$ ; R14 dias:  $28,35 \pm 4,03$ ; R20 dias:  $46,26 \pm 2,46$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína). O mesmo não foi observado em WAR, que apresentou elevação de ANP aos 7 dias ( $p < 0,01$ ; R 7 dias:  $15,56 \pm 2,25$  vs. WAR 7 dias:  $25,52 \pm 1,53$ ) e redução aos 20 dias de gestação ( $p < 0,001$ ; R20 dias:  $46,26 \pm 2,46$  vs. WAR 20 dias:  $5,92 \pm 0,41$ ). Os grupos RIG e NRIG não apresentaram diferenças no conteúdo de ANP nos átrios esquerdos (**Figura 7**).

O mRNA do ANP nos átrios direitos apresentou-se elevado apenas aos 14 dias de gestação ( $p < 0,001$ ; R 14 dias:  $19,76 \pm 3,36$  vs. WAR 14 dias:  $59,28 \pm 10,68$  ng/ng S26; **Figura 8**), não ocorrendo diferenças entre os grupos RIG e NRIG (**Figura 9**). Entretanto, o grupo NRIG apresentou aumento do mRNA do ANP em relação a R 20 dias ( $p < 0,05$ ; R 20 dias:  $6,16 \pm 1,670$  vs. NRIG:  $13,49 \pm 3,510$  ng/ng S26).

Nos átrios esquerdos, houve aumento do mRNA do ANP aos 14 dias ( $p < 0,001$ ; R 14 dias:  $60,12 \pm 11,60$  vs. WAR 14 dias:  $138,00 \pm 15,66$  ng/ng S26) e redução aos 20 dias em WAR em relação aos animais controle ( $p < 0,001$ ; R 20 dias:  $213,60 \pm 31,65$  vs. WAR 20 dias:  $70,01 \pm 18,31$  ng/ng S26), conforme observa-se na **Figura 10**. A análise aos 20 dias de gestação (**Figura 11**) mostrou redução deste mRNA nos grupos NRIG e RIG em relação ao controle, além de redução do grupo RIG em

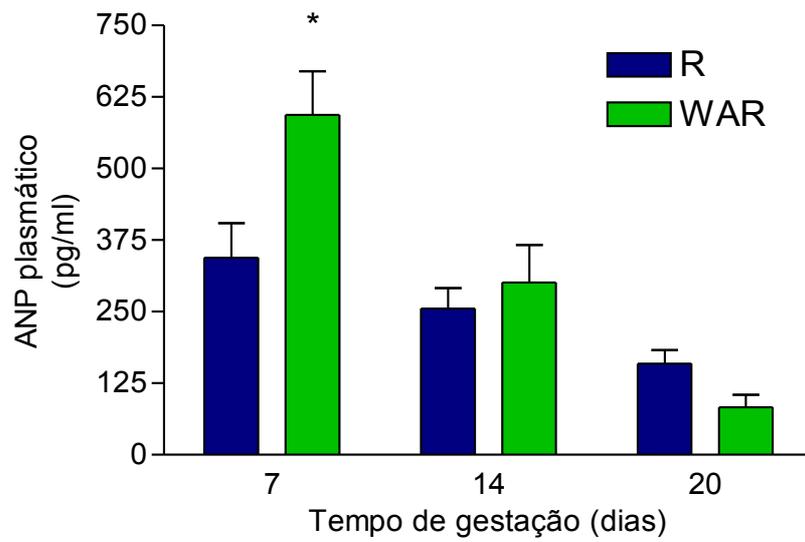
relação a NRIG (R 20 dias:  $213,60 \pm 31,65$ ; NRIG:  $108,1 \pm 24,27$ ; RIG:  $31,93 \pm 13,93$  ng/ng S26).

A concentração de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A) nos rins diminuiu acentuadamente a partir dos 14 dias de gestação em R e WAR e permaneceu reduzida até os 20 dias de gestação (**Figura 12**). A **Figura 13** mostra que o grupo RIG apresentou concentração maior do mRNA NPR-A quando comparado ao grupo R 20 dias ( $p < 0,05$ ; R 20 dias:  $0,011 \pm 0,005$  vs. RIG:  $0,042 \pm 0,009$  pg/ $\mu$ g S26).

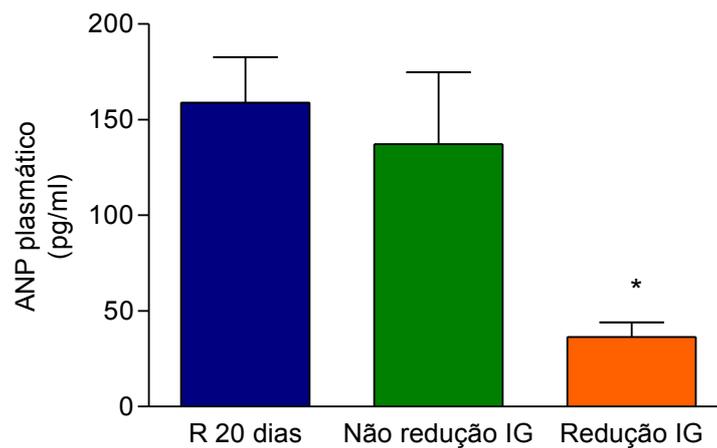
Em relação ao mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C) renal, **Figura 14**, aos 7 e 14 dias de gestação, ele apresentou-se significativamente maior em WAR (R 7 dias:  $99,40 \pm 65,96$  vs. WAR 7 dias:  $1.012,00 \pm 200,7$  pg/ $\mu$ g S26; R 14 dias:  $63,95 \pm 14,12$  vs. WAR 14 dias:  $396,1 \pm 128,2$  pg/ $\mu$ g S26) e, a análise aos 20 dias, **Figura 15**, mostrou que esse aumento permaneceu apenas no subgrupo RIG, mas não no NRIG (R 20 dias:  $29,28 \pm 20,42$  vs. RIG:  $208,9 \pm 45,68$  pg/ $\mu$ g S26).

O ensaio de competição pela ligação aos receptores de ANP, mostrou um perfil semelhante para os animais controle e WAR aos 7 e aos 14 dias de gestação. A ligação total do  $^{125}\text{I}$ -ANP e a capacidade do ANP em deslocar o  $^{125}\text{I}$ -ANP foi semelhante entre os animais R e WAR (**Figuras 16 e 17**). Entretanto, aos 20 dias de gestação, a capacidade de ligação total apresentou-se maior nos animais do grupo RIG e menor nos animais NRIG (**Figura 18**).

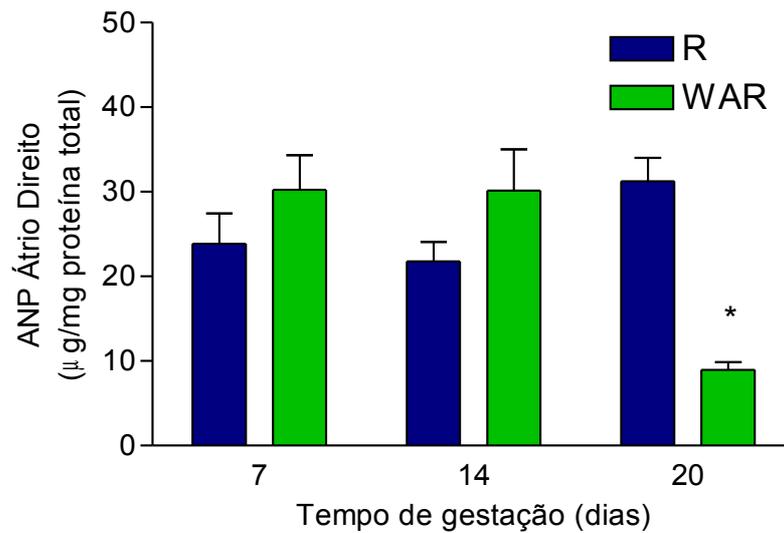




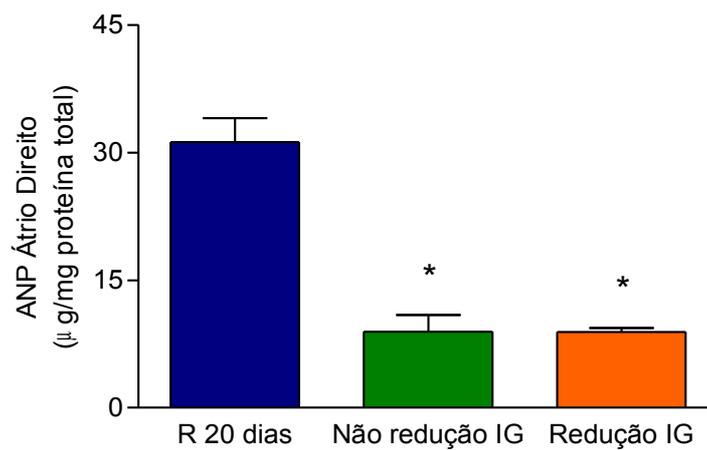
**Figura 2.** Concentração plasmática de ANP em ratas R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,01$  em relação a R 7 dias.



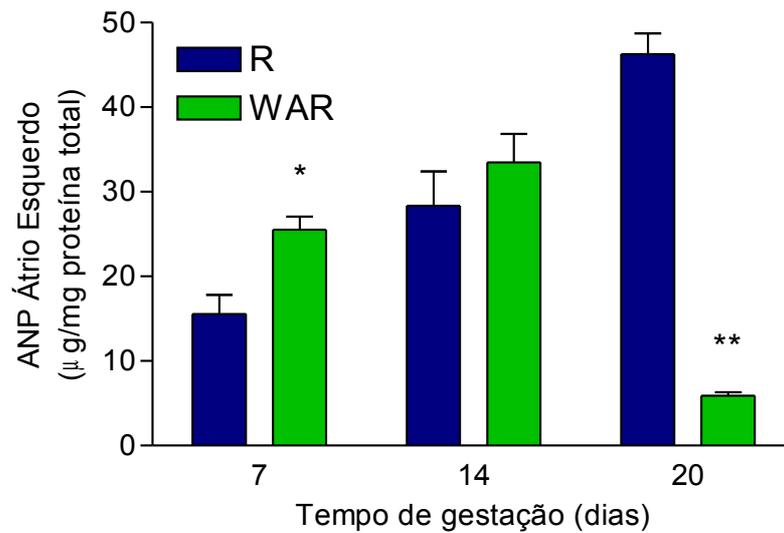
**Figura 3.** Concentração plasmática de ANP em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias e em relação a Não redução IG.



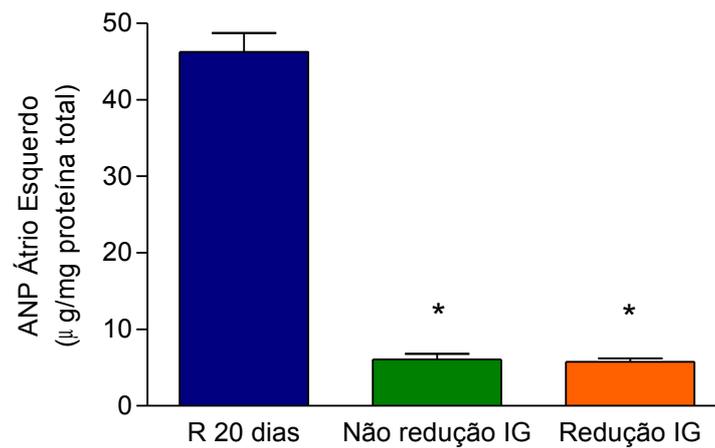
**Figura 4.** Quantidade relativa de ANP nos átrios direitos, ajustada pela concentração de proteína total, em ratos R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,01$  em relação a R 20 dias.



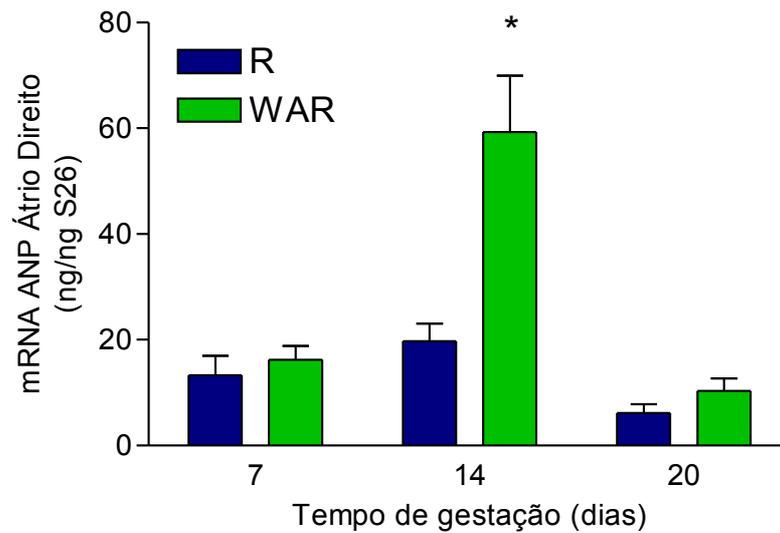
**Figura 5.** Quantidade relativa de ANP nos átrio direitos, ajustada pela concentração de proteína total, em ratos R e em ratos WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,001$  em relação a R 20 dias.



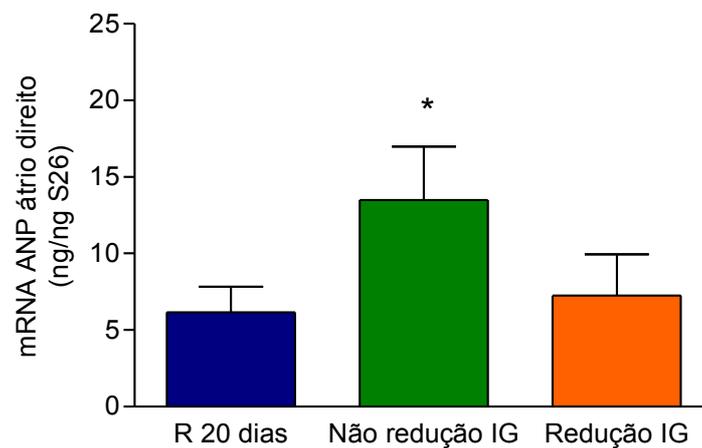
**Figura 6.** Quantidade relativa ANP nos átrios esquerdos, ajustada pela concentração de proteína total, em ratos R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,01$  em relação a R 7 dias; \*\*,  $p < 0,001$  em relação a R 20 dias.



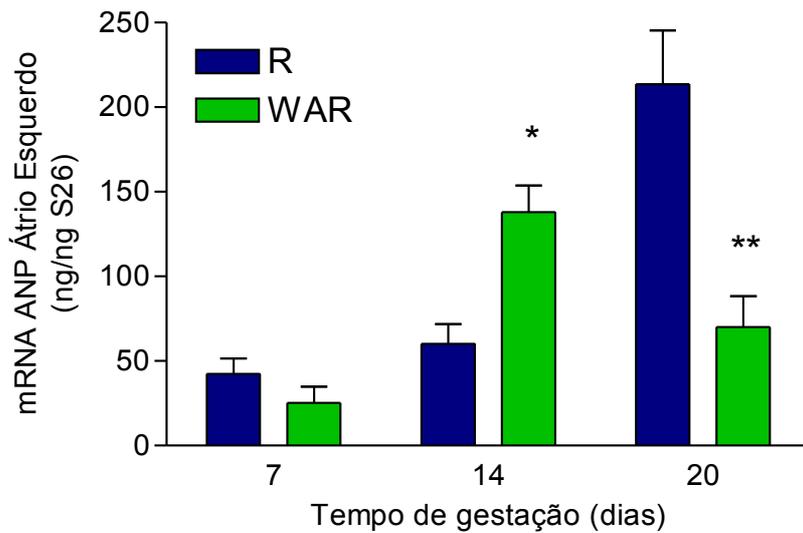
**Figura 7.** Quantidade relativa de ANP no átrio esquerdo, ajustada pela concentração de proteína total, em ratos R e em ratos WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,001$  em relação a R 20 dias.



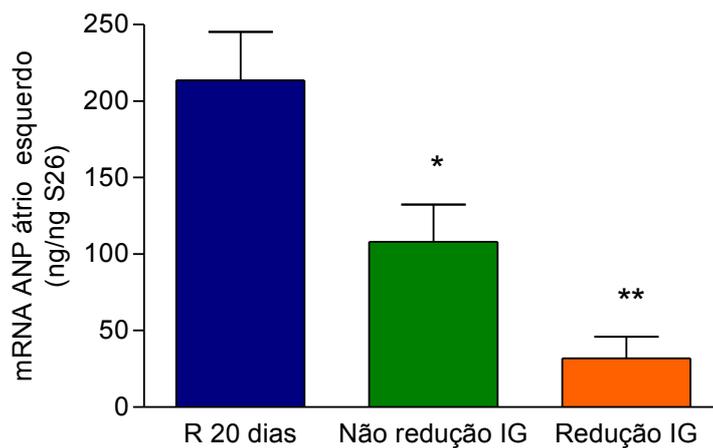
**Figura 8.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio direito, ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,001$  em relação a R 14 dias.



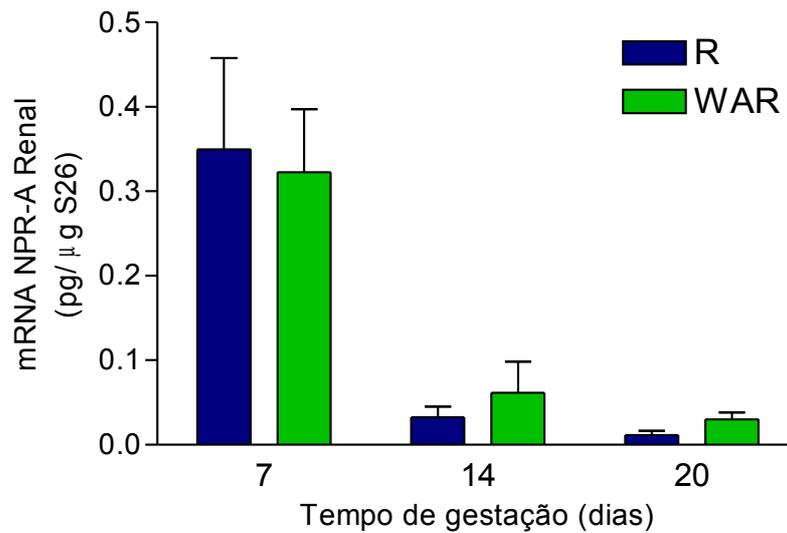
**Figura 9.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio direito, ajustada pela concentração de S26, em ratas R e ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias.



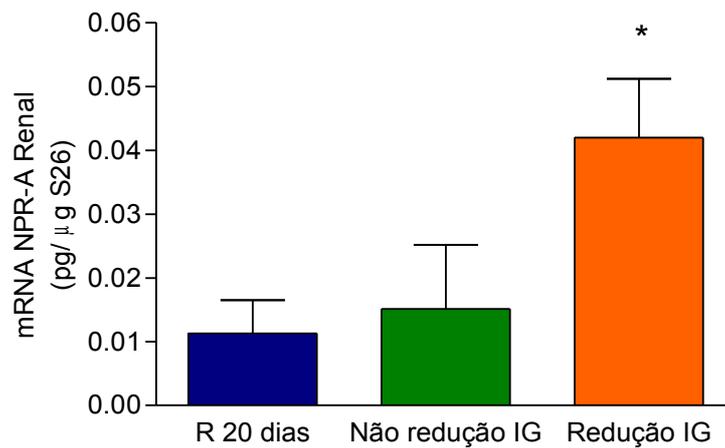
**Figura 10.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio esquerdo, ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,001$  em relação a R 14 dias; \*\*,  $p < 0,001$  em relação a R 20 dias.



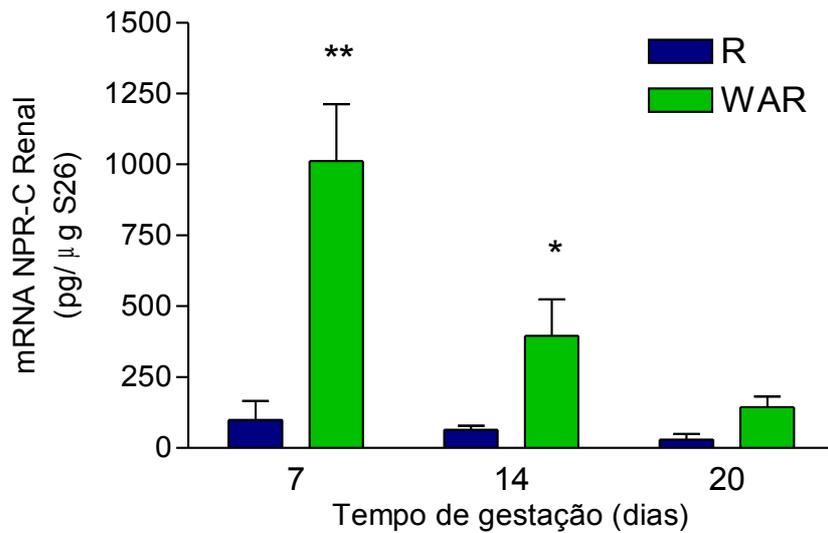
**Figura 11.** Quantidade relativa de mRNA para o ANP no átrio esquerdo, ajustada pela concentração de S26, em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias; \*\*,  $p < 0,01$  em relação a R 20 dias e  $p < 0,05$  em relação a Não redução de IG.



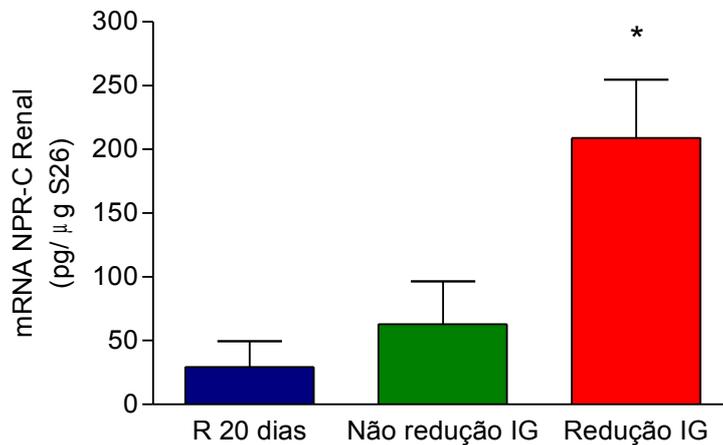
**Figura 12.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação.



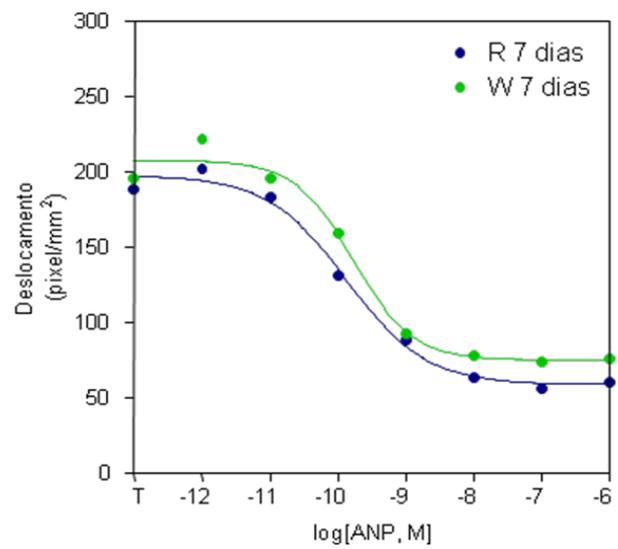
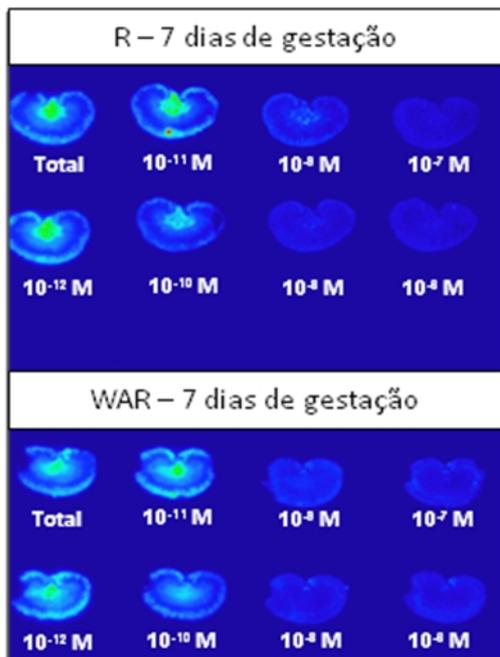
**Figura 13.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias



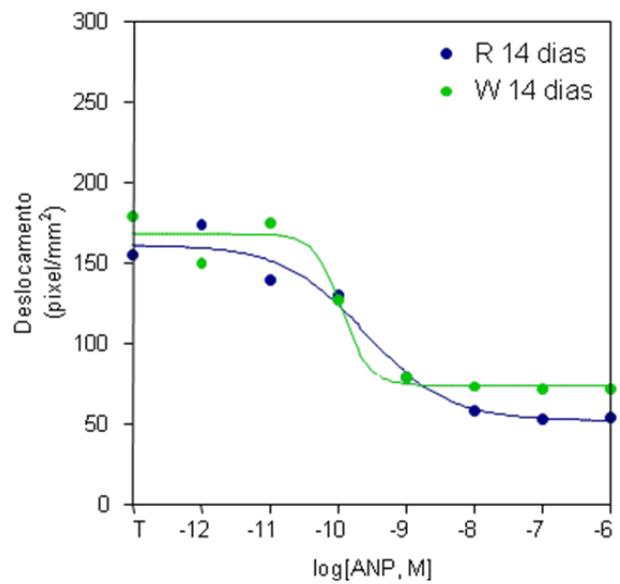
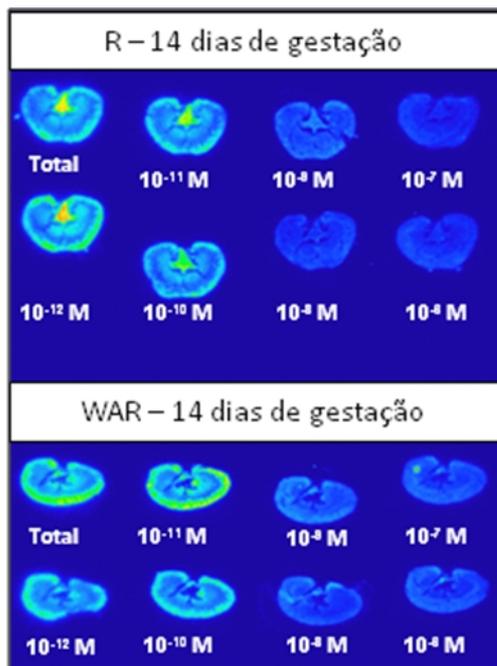
**Figura 14.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e WAR durante a gestação. \*\*,  $p < 0,001$  em relação a R 7 dias; \*,  $p < 0,05$  em relação a R 14 dias



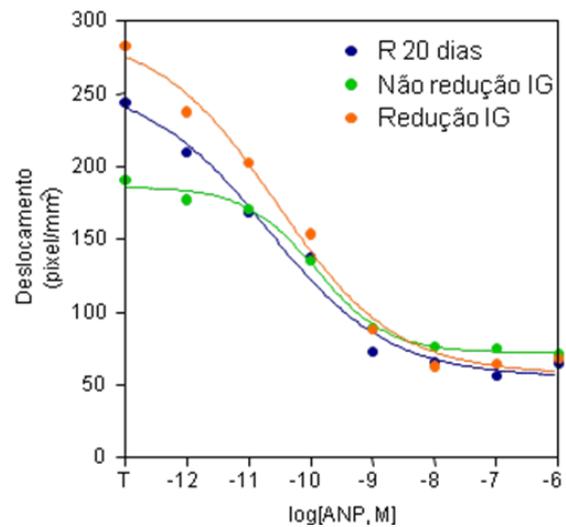
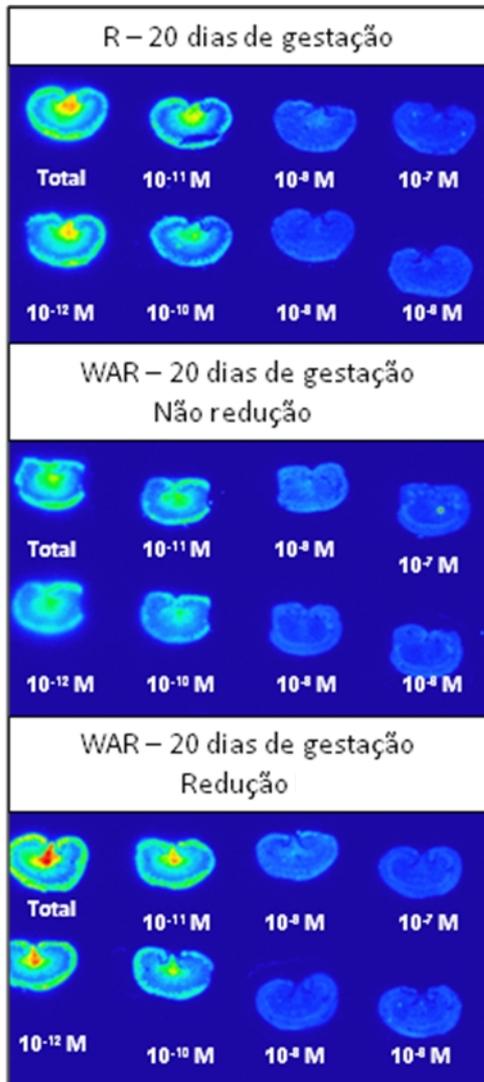
**Figura 15.** Quantidade relativa renal de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias.



**Figura 16.** Autorradiografia para determinação da capacidade de ligação do ANP aos seus receptores nos rins em ratas R e WAR aos 7 dias de gestação. O primeiro corte representa a ligação total do  $^{125}\text{I}$  – ANP ( $T = 50$  pM) e os cortes seguintes representam a competição entre o  $^{125}\text{I}$  – ANP e o ANP em concentrações crescentes ( $10^{-12}$  M a  $10^{-6}$  M). O gráfico apresenta a capacidade de ligação em cada corte nos dois grupos.



**Figura 17.** Autorradiografia para determinação da capacidade de ligação do ANP aos seus receptores nos rins em ratos R e WAR aos 14 dias de gestação. O primeiro corte representa a ligação total do  $^{125}\text{I}$  – ANP ( $T = 50$  pM) e os cortes seguintes representam a competição entre o  $^{125}\text{I}$  – ANP e o ANP em concentrações crescentes ( $10^{-12}$  M a  $10^{-6}$  M). O gráfico apresenta a capacidade de ligação em cada corte nos dois grupos.

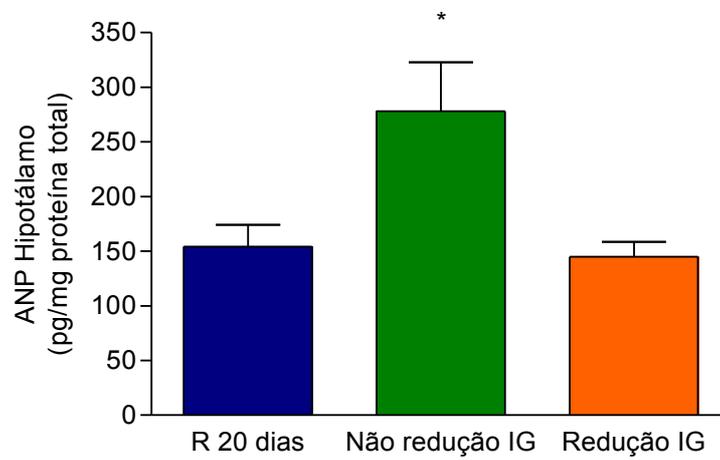


**Figura 18.** Autorradiografia para determinação da capacidade de ligação do ANP aos seus receptores nos rins em ratos R e WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. O primeiro corte representa a ligação total do  $^{125}\text{I}$  – ANP ( $T = 50 \text{ pM}$ ) e os cortes seguintes representam a competição entre o  $^{125}\text{I}$  – ANP e o ANP em concentrações crescentes ( $10^{-12}$  M a  $10^{-6}$  M). O gráfico apresenta a capacidade de ligação em cada corte nos três grupos.

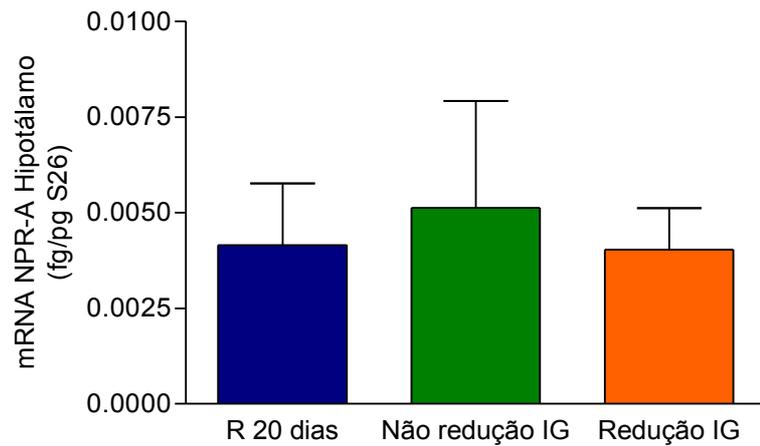
### 5.1.2. *Peptídeo Natriurético Atrial e seus receptores no SNC: hipotálamo e hipocampo*

A dosagem de ANP no hipotálamo dos animais aos 20 dias de gestação (**Figura 19**) revelou um aumento significativo da concentração desse peptídeo nos animais que não apresentaram redução das crises epiléticas quando comparado aos animais controle e aos animais que apresentaram redução das crises ( $p < 0,05$ ; R 20 dias:  $154,2 \pm 20,18$ ; NRIG:  $278,1 \pm 45,00$ ; RIG:  $145,1 \pm 13,51$  pg/mg proteína total). As concentrações hipotalâmicas de mRNA para os receptores NPR-A (**Figura 20**) e NPR-C de ANP (**Figura 21**) não foram diferentes entre os grupos analisados.

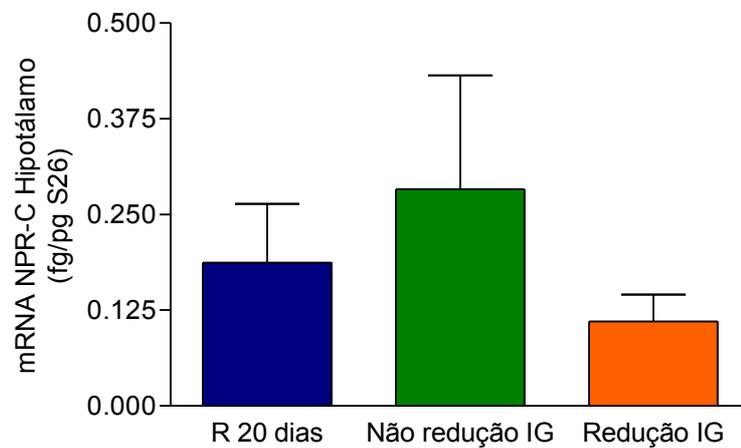
No hipocampo, também foi observada uma concentração de ANP significativamente maior no grupo NRIG em relação ao controle e ao grupo RIG ( $p < 0,01$ ; R 20 dias:  $89,91 \pm 13,34$ ; NRIG:  $156,7 \pm 12,31$ ; RIG:  $81,75 \pm 17,93$  pg/mg proteína total), conforme apresentado na **Figura 22**. O mRNA do receptor de ANP do tipo A, NPR-A, **Figura 23**, foi significativamente menor no grupo RIG em relação ao NRIG ( $p < 0,05$ ; NRIG:  $0,026 \pm 0,0074$  vs. RIG:  $0,0018 \pm 0,00058$  pg/ $\mu$ g S26), enquanto o mRNA do receptor de ANP do tipo C, NPR-C, **Figura 24**, foi significativamente menor no grupo RIG comparado a R 20 dias ( $p < 0,01$ ; R 20 dias:  $0,058 \pm 0,014$  vs. RIG:  $0,0092 \pm 0,0043$  pg/ $\mu$ g S26).



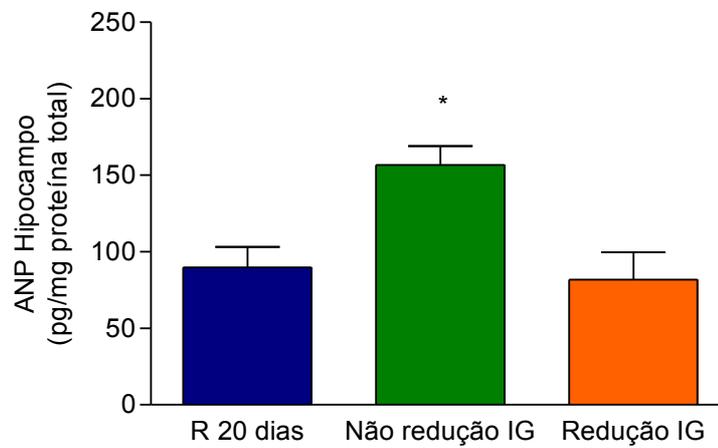
**Figura 19.** Quantidade relativa de ANP no hipotálamo, ajustada pela concentração de proteína total, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias e em relação a Redução IG.



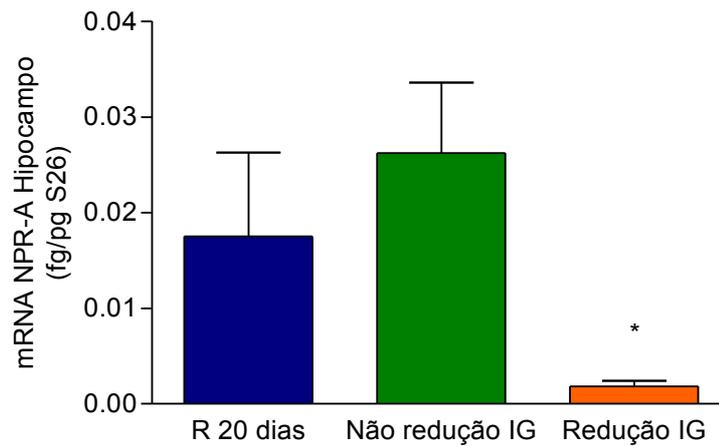
**Figura 20.** Quantidade relativa no hipotálamo de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação.



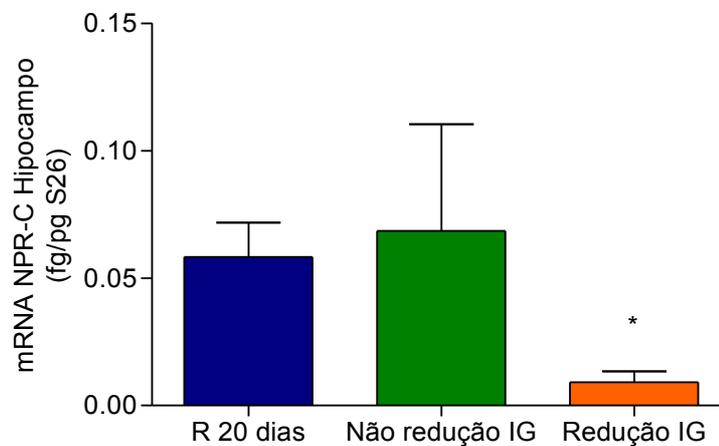
**Figura 21.** Quantidade relativa no hipotálamo de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação.



**Figura 22.** Quantidade relativa de ANP no hipocampo, ajustada pela concentração de proteína total, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,01$  em relação a R 20 dias e em relação a Redução IG.



**Figura 23.** Quantidade relativa no hipocampo de mRNA para o receptor de ANP do tipo A (NPR-A), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a Não redução IG.



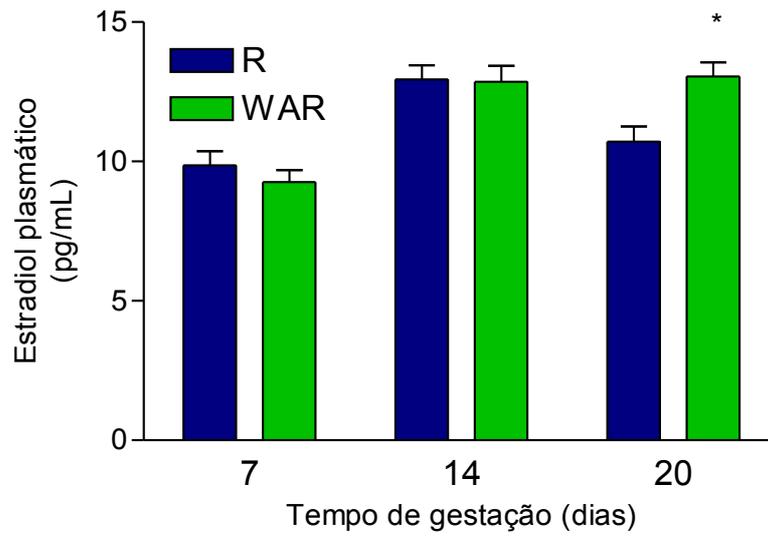
**Figura 24.** Quantidade relativa no hipocampo de mRNA para o receptor de ANP do tipo C (NPR-C), ajustada pela concentração de S26, em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epiléticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,01$  em relação a R 20 dias.

### 5.1.3. Estrogênios e Progestinas

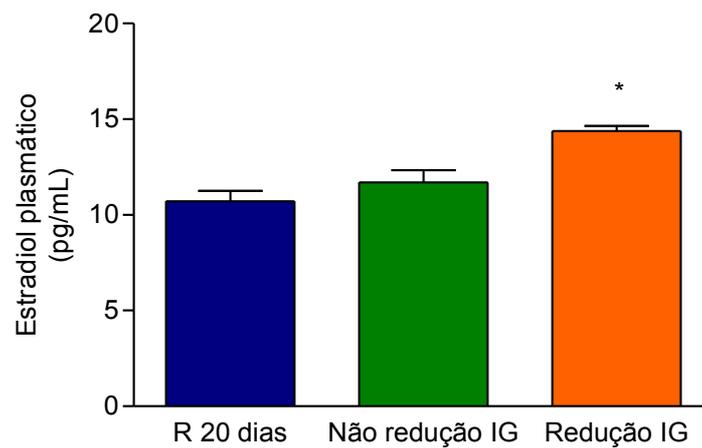
A **Figura 25** mostra que as WAR não apresentaram diferenças nas concentrações plasmáticas de estradiol aos 7 e aos 14 dias de gestação em relação às ratas Wistar, mas concentração significativamente maior foi observada aos 20 dias de gestação ( $p < 0,05$ ; R 20 dias:  $10,71 \pm 0,55$  vs. WAR 20 dias:  $13,04 \pm 0,52$  pg/ml). Como pode ser observado na Figura 26, a análise individual dos animais aos 20 dias de gestação revelou que as WAR com redução das crises (RIG) apresentaram concentrações de estradiol maiores do que aqueles com gravidade não reduzida (NRIG) ( $14,38 \pm 0,26$  e  $11,70 \pm 0,64$  pg/ml, respectivamente;  $p = 0,0032$ ).

Observa-se, na **Figura 27**, que as concentrações de progesterona das WAR foram mais elevadas que as das ratas Wistar na primeira semana de gestação ( $p < 0,05$ ; R 7 dias:  $38,97 \pm 4,41$  vs. WAR 7 dias:  $76,34 \pm 5,51$  ng/ml), mas permaneceram similares aos 14 e 20 dias. Também as concentrações de progesterona (**Figura 28**) foram significativamente maiores nas ratas que apresentaram redução das crises do que nas que não apresentaram ( $52,45 \pm 12,92$  e  $17,61 \pm 3,29$  ng/ml, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Além disso, a concentração plasmática de estradiol do grupo NRIG foi semelhante à do grupo Wistar aos 20 dias de gestação, enquanto a concentração de progesterona em NRIG foi menor que o controle. O grupo RIG apresentou concentração de estradiol superior à do grupo Wistar aos 20 dias de gestação. A concentração de progesterona em RIG permaneceu semelhante à do controle (**Figuras 26 e 28**).

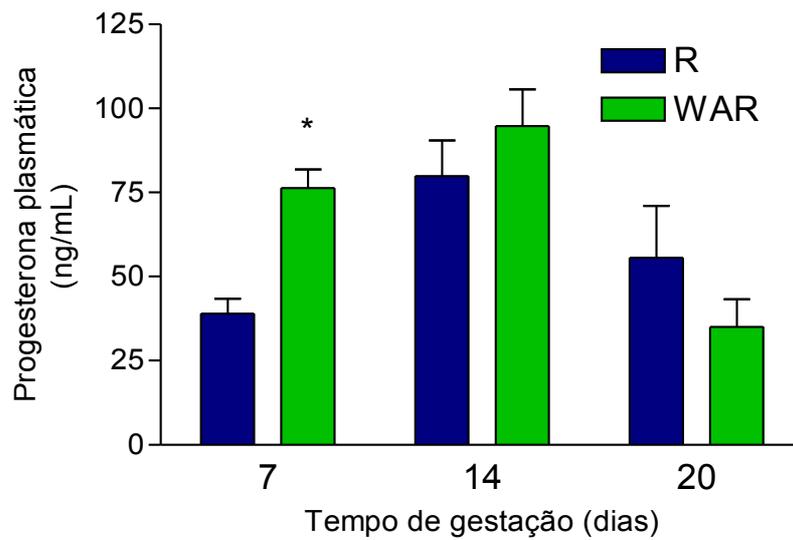
A relação entre progesterona e estradiol (P/E) diminui ao longo da gestação em WAR, o mesmo não ocorreu com as Wistar (**Figura 29**). A **Figura 30** mostra que não somente as concentrações de estradiol e progesterona são maiores nas ratas que apresentaram redução da gravidade das crises convulsivas aos 20 dias de gestação, mas também a relação P/E encontra-se aumentada (RIG:  $3,66 \pm 0,91$  vs. NRIG:  $1,50 \pm 0,29$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, as WAR com redução das crises aos 20 dias de gestação apresentaram relação P/E similar às ratas Wistar enquanto os animais que não tiveram redução das crises apresentaram relação P/E menor que a das ratas Wistar.



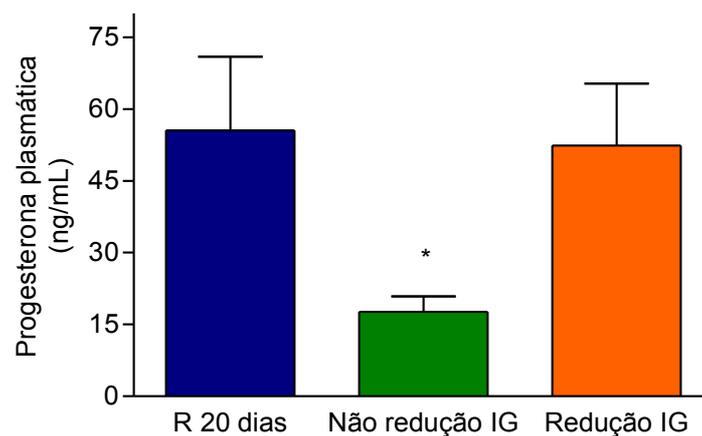
**Figura 25.** Concentração plasmática de estradiol em ratas R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias.



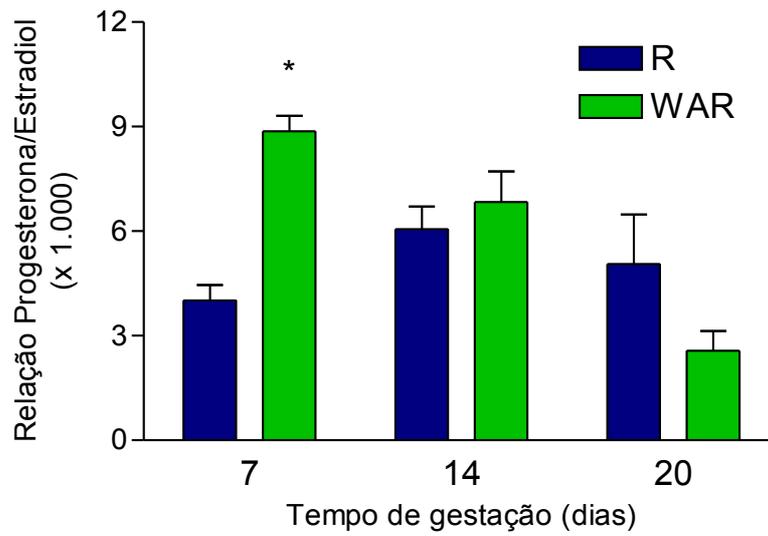
**Figura 26.** Concentração plasmática de estradiol em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,001$  em relação a R 20 dias;  $p < 0,01$  em relação a Não redução IG.



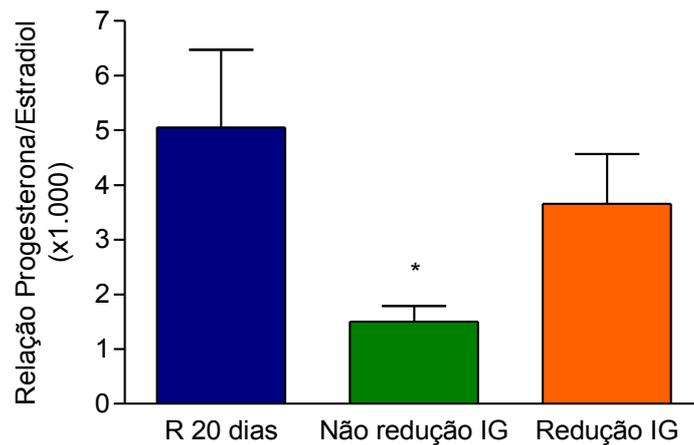
**Figura 27.** Concentração plasmática de progesterona em ratas R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 7 dias.



**Figura 28.** Concentração plasmática de progesterona em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias e em relação a Redução IG.



**Figura 29.** Relação entre progesterona e estradiol plasmáticos em ratas R e WAR durante a gestação. \*,  $p < 0,001$  em relação a R 7 dias.



**Figura 30.** Relação entre progesterona e estradiol plasmáticos em ratas R e em ratas WAR que não apresentaram e que apresentaram redução da gravidade das crises epilépticas aos 20 dias de gestação. \*,  $p < 0,05$  em relação a R 20 dias e em relação a Redução IG.

## 5.2. Castração

A **Figura 31** mostra o número de animais apresentando crises convulsivas tônico-clônicas durante o experimento. Pode-se observar que a gravidade das crises audiogênicas não sofreu alterações após a ovariectomia dos animais. Observa-se que a maior redução no número de animais com crises tônico-clônicas ocorreu na terceira semana, em todos os grupos submetidos à terapia hormonal, semelhante aos resultados do Experimento 1, no qual foi observada redução das crises somente aos 20 dias de gestação.

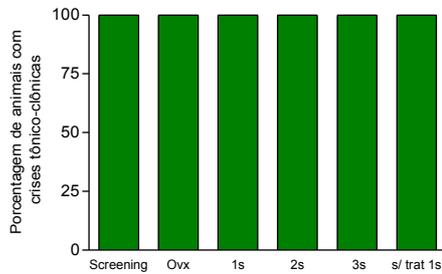
Os grupos de WAR que receberam veículo não apresentaram redução das crises durante todo o experimento, enquanto os animais que receberam progesterona com estrogênio por três semanas apresentaram redução da gravidade das crises na terceira semana de terapia,  $p < 0,05$  (**Figura 31**).

A **Figura 32** mostra que 67% dos animais susceptíveis à epilepsia audiogênica que receberam progesterona com estrogênio, em ambos os regimes testados, apresentaram redução das crises enquanto somente 33% dos animais que receberam apenas progesterona apresentaram redução do IG.

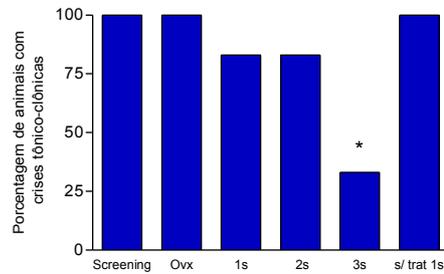
O grupo em que foi administrado estradiol por uma semana seguida por duas semanas de progesterona apresentou redução da média do IG de  $0,93 \pm 0,02$  para  $0,33 \pm 0,21$  na terceira semana. A média do IG dos animais que receberam apenas progesterona foi de  $0,98 \pm 0,02$ , antes da terapia, para  $0,72 \pm 0,18$ , após três semanas

de terapia. Nenhuma das ratas Wistar apresentou crise convulsiva em qualquer etapa do experimento.

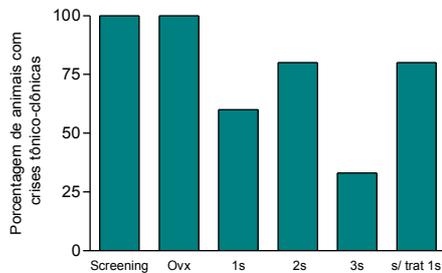
## A) Óleo



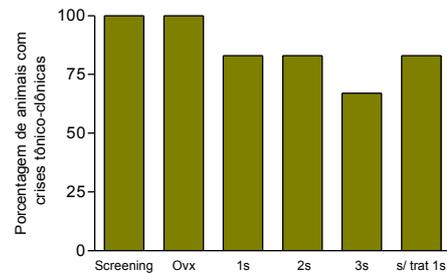
## B) Estradiol e Progesterona



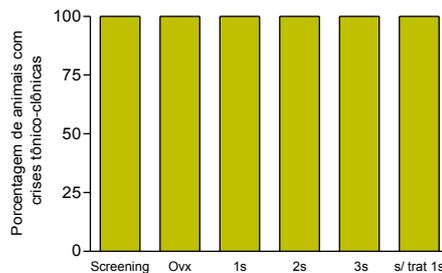
## C) Estradiol (1s) e Progesterona (2s)



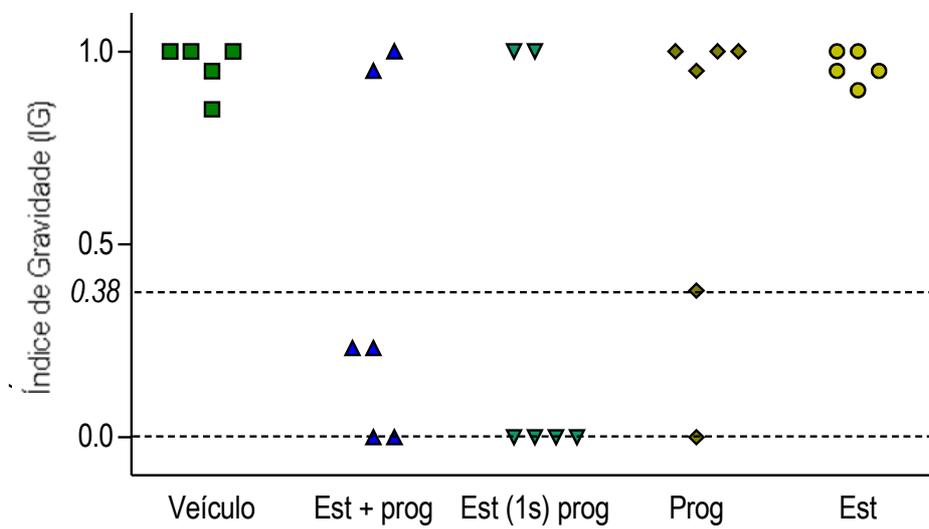
## D) Progesterona



## E) Estradiol



**Figura 31.** Porcentagem de animais apresentando crises convulsivas tônico-clônicas durante o experimento. **A)** óleo de milho (0,1ml/100g de peso corporal/dia) por três semanas (1s, 2s e 3s). **B)** hexaidrobenzoato de estradiol (1µg/100g de peso corporal/dia) e acetato de medroxiprogesterona (500µg/dia) combinados por três semanas (1s, 2s e 3s). **C)** hexaidrobenzoato de estradiol (1µg/100g de peso corporal/dia) por uma semana (1s) e acetato de medroxiprogesterona (500µg/dia) nas duas semanas seguintes (2s e 3s). **D)** acetato de medroxiprogesterona (500µg) por três semanas (1s, 2s e 3s). **E)** hexaidrobenzoato de estradiol (1µg/100g de peso corporal/dia) por três semanas (1s, 2s e 3s). *Screening*, todos os animais apresentaram crises tônico-clônicas nos três dias de *screening*; *Ovx*, após 21 dias da ovariectomia; *s*, semana; *s/trat 1s*, após uma semana sem tratamento; \*,  $p < 0,05$ , conforme detectado pelo teste Q de *Cochran*.



**Figura 32.** Índice de gravidade das crises nas ratas WAR na terceira semana de terapia hormonal.  $IG \leq 0,38$  indica bloqueio do componente tônico da crise. S, semana; Est, hexaidrobenzoato de estradiol ( $1\mu\text{g}/100\text{g}$  de peso corporal/dia); Prog, acetato de medroxiprogesterona ( $500\mu\text{g}/\text{dia}$ ).



## 6. DISCUSSÃO

A gestação reduziu a intensidade das crises epiléticas audiogênicas em uma parcela da população de WAR, como havia sido observado anteriormente (Doretto e cols., 2003b). Esta redução foi observada aos 20 dias de gestação em 50% das WAR, sendo que 33% dos animais apresentaram ausência total de crises nesse período. Nenhuma alteração na gravidade das crises epiléticas foi observada aos 7 ou 14 dias de gestação nas WAR.

As ratas WAR apresentaram várias alterações no sistema de Peptídeos Natriuréticos ao longo da gestação. Destaca-se, entretanto, conforme mostrado nos resultados, que os animais WAR com redução das crises epiléticas durante a gestação apresentaram concentração reduzida de peptídeo natriurético atrial plasmático. Esse fato levou-nos a suspeitar de seu possível envolvimento na modulação das crises epiléticas no nosso modelo animal. Tal envolvimento poderia ocorrer por ação direta do peptídeo sobre o sistema nervoso central ou por seus efeitos sobre o equilíbrio hidroeletrólítico.

A fim de confirmar possíveis relações entre a redução periférica do ANP e a intensidade das crises, passamos à análise dos seus receptores renais, que são o principal meio de atuação periférica desse hormônio. Observamos um aumento de expressão dos receptores de ANP nos animais que apresentaram redução das crises. Esses dados foram confirmados pelo ensaio de competição pela ligação aos receptores. O aumento foi observado tanto para o receptor biologicamente ativo (NPR-A), responsável pelas ações fisiológicas do ANP, quanto para o receptor de

*clearance* (NPR-C), principal responsável pela degradação do peptídeo no organismo. Esses dois dados agrupados permitiram a conclusão de que a redução de ANP plasmático pode ser explicada, ao menos em parte, pelo aumento de expressão do receptor do tipo C em animais WAR. Entretanto, o aumento da expressão do receptor do tipo A sugere um mecanismo compensatório, responsável por estabilizar e manter o equilíbrio hidroeletrólítico no organismo desses animais, apesar dos níveis plasmáticos reduzidos do hormônio.

Após a análise do ANP sistêmico, procedemos à análise desse peptídeo no sistema nervoso central nos animais Wistar e WAR no período de 20 dias de gestação. O hipotálamo foi escolhido por ser uma região de atuação do ANP na regulação central do equilíbrio hidroeletrólítico que atua em sinergismo com suas ações periféricas. No sistema nervoso central há um circuito neural que controla a ingestão e/ou excreção de sódio. Esse circuito envolve a área septal, AV3V, complexo amigdalóide, bulbo olfatório e o hipotálamo, sendo este a principal estrutura do circuito. O hipotálamo sofre modulação pelas outras regiões do circuito citadas (Antunes-Rodrigues e cols., 2004). Já o hipocampo foi escolhido por ser uma região bem delimitada e comumente envolvida na inicialização de crises epiléticas, pois possui limiar excitatório inferior à observada em outras regiões cerebrais. Além disso, vários trabalhos citam influências hormonais sobre o hipocampo, levando à redução de crises ou à proteção contra danos nessa região. A administração de estradiol, por exemplo, reduz os danos causados pelas crises epiléticas no hipocampo de ratas ovariectomizadas (Galanopoulou e cols., 2003) e o tratamento hormonal com estradiol e progesterona reduz as crises epiléticas em ratas, ao menos em parte,

por aumento de alopregnanolona no hipocampo, como será discutido posteriormente (Frye & Rodes, 2005).

As ratas WAR que não tiveram redução das crises apresentaram concentração elevada de ANP no hipotálamo e no hipocampo, ao passo que, as ratas com redução das crises, apresentaram redução na expressão dos receptores para esse peptídeo. Em conjunto, esses dados sugerem aumento das ações centrais do ANP nos animais sem redução de crises indicando sua possível participação em mecanismos pró-convulsivantes.

O esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas ações do ANP tem sido dificultado pela falta de um bom antagonista para ANP no mercado até o momento. A Isatina tem sido descrita como um potente inibidor dos receptores do ANP e da geração de cGMP induzida por ANP *in vitro*. *In vivo*, a administração de Isatina não apresentou efeito sobre o volume urinário e sobre a natriurese, mas normalizou o aumento urinário do cGMP induzido por sobrecarga hídrica (Medvedev e cols., 2001). Além de seus efeitos sobre os receptores de ANP, a Isatina apresenta outros efeitos sobre o sistema nervoso central, que podem ser tanto ansiogênicos quanto sedativos (Medvedev e cols., 1996) e até mesmo, pró-convulsivantes e anticonvulsivantes, dependendo da dose administrada. Além disso, a Isatina é um inibidor endógeno da monoamino-oxidase (Bhattacharya & Chakrabarti, 1998). Esses efeitos sobre o sistema nervoso central limitam seu uso em nosso modelo de epilepsia.

O envolvimento do ANP na modulação da excitabilidade neural foi descrito anteriormente. Injeções intracerebroventriculares de ANP inibem de maneira dose-dependente o efeito de convulsões induzidas por etanol (Kovács, 1993) e de crises induzidas por NMDA (N-metil-D-aspartato) em animais dependentes de etanol (Kovács, 2000) e o anticorpo contra o ANP potencia o efeito de convulsões induzidas por etanol (Kovács, 1993). Esses dados contrariam nossos resultados, mas podem ser questionados, pois a ingestão de álcool provoca profundas alterações hormonais e dos fluidos e eletrólitos, diferentemente do nosso modelo. O álcool, além de outras ações, promove a inibição da secreção de hormônio antidiurético, levando a um aumento da diurese e da concentração dos eletrólitos, o que explicaria a ação anticonvulsivante do ANP normalizando a concentração iônica alterada pelo etanol.

Além das alterações no sistema do peptídeo natriurético atrial, as ratas que tiveram redução das crises epiléticas apresentaram concentrações de progesterona e de estrogênio maiores do que as que não apresentaram redução das crises. A participação dos esteróides gonadais na redução das crises convulsivas foi confirmada pelo tratamento de ratas WAR, ovariectomizadas, com progesterona associada ou não ao estradiol. O estradiol potenciou o efeito da progesterona, em ambos os regimes testados, resultando em redução das crises em 67% das WAR. No tratamento com progesterona sem estradiol, esta redução ocorreu em somente 33% das WAR. De forma semelhante ao ocorrido durante a gestação, o efeito só foi observado na terceira semana de tratamento. Além disso, como pode ser observado, nossos resultados sugerem um efeito anticonvulsivante mais

pronunciado quando o estradiol é aplicado anteriormente à aplicação da progesterona, ou seja, em regime sequencial.

Na gestação, a relação entre progesterona e estrogênio parece ser mais importante para a redução das crises audiogênicas do que os níveis individuais desses hormônios. A presença de uma relação P/E alta e estável esteve associada aos efeitos anticonvulsivantes da gestação em WAR. A redução da gravidade das crises ocorreu na terceira semana em ambos os experimentos. Esses resultados mostram que níveis elevados de progesterona auxiliam na redução das crises em animais WAR e que os estrogênios apresentam um importante papel nos efeitos anticonvulsivantes.

Existem dois mecanismos pelos quais a progesterona pode afetar a susceptibilidade às crises. A progesterona ou a 5-alfa diidroprogesterona, produto de seu metabolismo, podem se ligar ao receptor de progesterona, que é um fator de transcrição, levando à ativação ou ao silenciamento de genes nas células-alvo ou, os produtos do metabolismo da progesterona, 5-alfa diidroprogesterona e alopregnanolona, podem atuar sobre o receptor GABA<sub>A</sub> levando à redução da susceptibilidade às crises (Reddy, 2004).

O estradiol poderia aumentar as ações anticonvulsivantes da progesterona por estimular a síntese de receptores para progesterona (Nussey & Whitehead, 2001), apesar de não termos avaliado este parâmetro no nosso modelo experimental. No entanto, em outros modelos de epilepsia, os efeitos inibitórios da progesterona sobre as crises não estão relacionados às interações clássicas com os receptores de

progesterona (PR), pois a atividade inibitória da progesterona não é bloqueada por antagonistas do seu receptor (Mohammad e cols., 1998) e não é diminuída em camundongos *knockout* para PR (Reddy e cols., 2004).

A progesterona poderia reduzir a gravidade das crises, em parte, devido às ações de seu metabólito alopregnanolona, que se liga a seu sítio no receptor GABA<sub>A</sub>, causando abertura dos canais de cloreto e diminuindo a excitabilidade neuronal (Herzog & Frye, 2003; Reddy, 2004; Reddy e cols., 2004). Os efeitos anticonvulsivantes ou pró-convulsivantes provenientes da progesterona, dependem das concentrações de alopregnanolona produzidas e da duração da exposição a esse metabólito (Frye & Bayon, 1998; Hoffman e cols., 2003; Moran & Smith, 1998).

As reduções nas crises catameniais se correlacionam melhor ao aumento da alopregnanolona do que ao aumento da progesterona durante o ciclo menstrual (Rhodes e cols., 2004). Além disso, a inibição da alopregnanolona aumenta a ocorrência de crises epiléticas em modelos animais (Herzog & Frye, 2003).

Entretanto, nos trabalhos que mostram ações dos metabólitos da progesterona sobre o receptor GABA<sub>A</sub>, os efeitos ocorrem rapidamente, o que é inconsistente com as ações genômicas do hormônio; enquanto nos animais WAR, os efeitos anticonvulsivantes só ocorreram após três semanas em ambos os experimentos. Portanto, as ações genômicas da progesterona, através da ligação ao PR, não podem ser descartadas nesse modelo.

Um estudo revela um efeito anticonvulsivante do estrogênio quando administrado antes da progesterona (regime de *priming*). O *priming* de estrogênio amplifica os efeitos anticonvulsivantes da progesterona, em parte, por aumentar a formação de outras progestinas no modelo de crises induzidas por PTZ. A alopregnanolona apresenta-se aumentada no hipocampo de animais que receberam aplicação de estrogênio anterior à de progesterona quando comparados a animais que receberam somente progesterona no modelo de PTZ (Frye & Rhodes, 2005). Estudos têm tentado esclarecer como os estrogênios podem acentuar a síntese de novo de progesterona no cérebro (Micevych e cols., 2003). Dessa forma, os estrogênios poderiam aumentar os efeitos anticonvulsivantes da progesterona em WAR por modificar a síntese de progestinas (Cheng & Karavolas, 1975; Micevych e cols., 2003; Vongher & Frye, 1999).

Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho demonstram a associação do ANP e o envolvimento dos esteróides gonadais, progesterona e estradiol, na redução das crises convulsivas em WAR. Mostram, também, que o estradiol pode aumentar os efeitos anticonvulsivantes da progesterona em animais susceptíveis à epilepsia audiogênica. Para que os efeitos anticonvulsivantes ocorram é necessária uma exposição contínua e estável à progesterona e ao estradiol, pois esses efeitos só foram alcançados após três semanas nos dois experimentos realizados.



## 7. CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou alterações no sistema de peptídeo natriurético atrial em animais WAR durante a gestação, sugerindo mecanismos periféricos de adaptações a essas alterações. Esses mecanismos periféricos, provavelmente, buscam a manutenção da homeostase dos fluidos e eletrólitos no organismo desses animais.

Mostrou, também, importantes alterações nas concentrações do ANP e seus receptores no sistema nervoso central em animais susceptíveis à epilepsia audiogênica. Animais com redução das crises convulsivas apresentaram redução desse peptídeo no sistema nervoso central. Esse fato, aliado aos estudos em andamento, sugere a participação central do ANP na modulação de crises convulsivas nesse modelo animal.

Além disso, demonstrou o importante papel dos esteróides gonadais, progesterona e estradiol, na redução das crises convulsivas em WAR. Mostrou também que o estradiol intensifica a ação anticonvulsivante da progesterona. Os efeitos anticonvulsivantes ocorreram após uma exposição contínua e estável à progesterona e ao estradiol.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEHAN F, EROL I, CEMIL T, BAYRAKTAR N, OGÜS E, TOKEL K. Elevated CK-MB mass and plasma brain-type natriuretic peptide concentrations following seizures in children and adolescents: possible evidence of subtle cardiac dysfunction. *Epilepsia*, v.50(4), pp.755-760, 2009.
- AMADO D, CAVALHEIRO EA. Hormonal and gestational parameters in female rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res*, v.32, p.266-274, 1998.
- ANDREW RD, ROSEN AS, QUACKENBUSH SJ. Increased glucose concentration reduces cortical excitability through an osmotic effect. *Can Journal Physiology Pharmacology*, v.67, 1989.
- ANDREWS ZB, KOKAY IC, GRATTAN DR. Dissociation of prolactin secretion from tuberoinfundibular dopamine activity in late pregnant rats. *Endocrinology*, v.142, n.6, pp.2719-2724, 2001.
- ANTUNES-RODRIGUES J, CASTRO M, ELIAS LLK, VALENÇA MM, McCANN SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev*, v.84, PP.169-208, 2004.
- ARGENTIN S, NEMER M, DROUIN J, SCOTT GK, KENNEDY BP, DAVIES PL. The gene for rat atrial natriuretic factor. *The Journal of Biological Chemistry*, v.260, n.8, pp.4568-4571, 1985.

- BACKSTROM T. Epileptic seizures in women related to plasma estrogen and progesterone during the menstrual cycle. *Acta Neurol Scand*, v.54, pp.321-47, 1976.
- BALDISSERA S, MENANI JW, SOTERO DOS SANTOS LF, FAVARETTO ALV, GUTKOWSKA J, TURRIN MQA, MCCANN SM, ANTUNES-RODRIGUES J. Role of the hypothalamus in the control of atrial natriuretic peptide release. *Proc Natl Acad Sci*, v.86, pp.9621-9625, 1989.
- BALLERMAN BJ, BRENNER BM. Role of atrial peptides in body fluid homeostasis. *Circ Res*, v.58, pp.619-630, 1986.
- BHATTACHARYA SK, CHAKRABARTI A. Dose-related proconvulsant and anticonvulsant activity of isatin, a putative biological factor, in rats. *Indian J Exp Biol*, v.36(1), pp.118-121, 1998.
- BELO NO, SILVA-BARRA J, CARNIO EC, ANTUNES-RODRIGUES J, GUTKOWSKA J, REIS AM. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. *Reg Peptides*, v.117, pp.53-60, 2004.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, v.72, pp.248-254, 1976.
- BRENNER BM, BALLERMANN BJ, GUNNING ME, ZEIDEL ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological Reviews*, v.70, n.8, pp.665-698, 1990.

- BUDZISZEWSKA B, LESKIEWICZ M, KUBERA M, JAWORSKA-FEIL L, KAJTA M, LASON W. Estrone, but not 17 $\beta$ -estradiol, attenuates kainate-induced seizures and toxicity in male mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v.109, p.168-73, 2001.
- CHENG YJ, KARAVOLAS HJ. Subcellular distribution and properties of progesterone ( $\Delta^4$ -steroid) 5 $\alpha$ -reductase in rat medial basal hypothalamus. *J Biol Chem*, v.250, p.7997-8003, 1975.
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, n.162, pp.156-159, 1987.
- CULEBRAS A, MILLER M, BERTRAM L, KOCH J. Differential response of growth hormone, cortisol and prolactin to seizures and to stress. *Epilepsia*, v.28, pp.564–570, 1987.
- DE BOLD AJ, BORENSTEIN HB, VERESS AT, SONNENBERG H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, v.28, pp.89-94, 1981.
- DORETTO MC, FONSECA CG, TERRA VC, OLIVEIRA JAC, GARCIA-CAIRASCO N. Quantitative study of the response to genetic selection of the wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav Gen*, v.33, p.33-42, 2003a.
- DORETTO MC, OLIVEIRA-E-SILVA M, FERREIRA-ALVES DL, PIRES SG, GARCIA-CAIRASCO N, REIS AM. Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: association with plasma prolactin profiles. *Epilepsy Res*, v.54, p.109-21, 2003b.

- EDWARDS HE, MACLUSKY NJ, BURNHAM WM. The effect of seizures and kindling on reproductive hormones in the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, n.24, p.753-762, 2000.
- ESPINER EA. Physiology of natriuretic peptides. *J Intern Med*, V.235, pp.527-541, 1994.
- FERRIER IN. Water intoxication in patients with psychiatric illness. *Br Med J*, v.291, pp.1594-1596, 1985.
- FLYNN TG. The biochemistry of atrial natriuretic peptides. In: *Natriuretic Peptides in Health and Disease*. Cap. 1, pp.1-19, 1997.
- FLYNN TG, DE BOLD ML, DE BOLD AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, v.117, pp.859-865, 1983.
- FONSECA AG, SANTOS RA, MORAES MF, LEITE MF, DORETTO MC. Vasopressinergic hypothalamic neurons are recruited during the audiogenic seizure of Wistar-Kyoto rats. *Brain Research*, v.1038, pp.32-40, 2005.
- FRYE CA, BAYON LE. Seizure activity is increased in endocrine states characterized by decline in endogenous levels of the neurosteroid 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. *Neuroendocrinology*, v.68, p.272-80, 1998.
- FRYE CA, RHODES ME. Estrogen-priming can enhance progesterone's anti-seizure effects in part by increasing hippocampal levels of allopregnanolone. *Pharmacol Biochem Behav*, v.81, p.907-916, 2005.

- GALANOPOULOU AS, ALM EM, VELÍSKOVÁ J. Estradiol reduces seizure-induced hippocampal injury in ovariectomized female but not in male rats. *Neuroscience Letters*, v.342, pp.201-205, 2003.
- GARCIA-CAIRASCO N, DORETTO MC, RAMALHO MJ, ANTUNES-RODRIGUES J, NONAKA KO. Audiogenic and audiogenic-like seizures: Locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.53(3), pp.503-510, 1996.
- GARCIA-CAIRASCO N, REIS LC, TERRA VC, OLIVEIRA JAC, ANTUNES-RODRIGUES J. Diuresis and natriuresis in non-seizing and kindled rats from a genetically audiogenic susceptible strain. *NeuroReport*, v.5, pp.1873-1876, 1994.
- GARCIA-CAIRASCO N, WAKAMATSU H, OLIVEIRA JAC, GOMES ELT, DEL BEL EA, MELLO LEAM. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res*, v.26, p.177-192, 1996.
- GARDNER DG, DESCHEPPER CF, BAXTER JD. The gene for atrial natriuretic factor is expressed in the aortic arch. *Hypertension*, v.9, pp.103-106, 1987.
- GARDNER DG, HANES R, TRACHEWSKY D, SCHEND D, BAXTER JD. Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoides *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, v.139, pp.1047-1054, 1986.
- GUERREIRO CAM, GUERREIRO MM, CENDES F, LOPES-CENDES I. *Epilepsia*. Lemos Editorial, São Paulo, 2000.

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

GRATTAN DR. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction*, v.123, pp.497-506, 2002.

HAANWINCKEL M, ELIAS L, FAVARETTO AL, GUTKOWSKA J, MCCANN SM, ANTUNES-RODRIGUES J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *PNAS*, v.92, pp.7902-7906, 1995.

HARDEN CL. Menopause and bone density issues for women with epilepsy. *Neurology*, v.61, p.S16-22, 2003.

HENRY JP, GAUER OH, REEVES DVM. Evidence of the atrial location receptors influencing urine flow. *Circ Res*, v.4, pp.85-90, 1955.

HERZOG AG, FRYE CA. Seizure exacerbation associated with inhibition of progesterone metabolism. *Ann Neurol*, v.53, p.390-391, 2003.

HERZOG AG, KLEIN P, RANSIL BJ. Three patterns of catamenial epilepsy. *Epilepsia*, v.38, p.1082-1088, 1997.

HERZOG AG. Reproductive endocrine considerations and hormonal therapy for women with epilepsy. *Epilepsia*, v.32, p.S27-33, 1991.

HOFFMAN GE, MOORE N, FISKUM G, MURPHY AZ. Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Exp Neurol*, v.182, p.124-34, 2003.

IMADA T, TAKAYANAGI R, INAGAMI T. Identification of a peptidase which processes atrial natriuretic factor precursor to its active form with 28 amino acid residues in particulate fractions of rat atrial homogenate. *Biochem Biophys Res Commun*, v.143, pp.587-592, 1987.

IMURA H, MATSUO H, MASAKI T. Peptide regulation of cardiovascular function. *Harcourt Brace Jovanovich Japan Inc.*, Tokyo, pp.3-101, 1991.

JABBOUR HN, KELLY PA. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Reviews of Reproduction*, v.2, pp.14-18, 1997.

JACONO JJ, ROBERTSON JM. The effects of estrogen, progesterone, and ionized calcium on seizures during the menstrual cycle of epileptic women. *Epilepsia*, v.28, p.571-7, 1987.

JANKOWSKI M, RACHELSKA G, DONGHAO W, MCCAN SM, GUTKOWSKA J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *PNAS*, v.98, n.20, pp.11765-11770, 2001.

JAVESHGHANI D, MUKADDAM-DAHER S, FAN L, GUTKOWSKA J, NUWAYHID B, QUILLEN EW. Control of atrial natriuretic factor by right and left atrial distension in pregnant sheep. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v.268, n.6, pp.R1411-R1417, 1995.

- JIRIKOWSKI G, BACK H, FORSSMANN WG, SUMPFF WE. Coexistence of atrial natriuretic factor (ANF) and oxytocin in neurons of rat hypothalamus. *Neuropeptides*, v.8, pp.243-249, 1986.
- KOVÁCS GL. Alpha-atrial natriuretic peptide attenuates ethanol withdrawal symptoms. *Eur J Pharmacol*, v.238(2-3), pp.417-419, 1993.
- KOVÁCS GL. Atrial natriuretic peptide modulates N-methyl-D-aspartate-induced hyperexcitability in ethanol-dependent mice. *Eur J Pharmacol*, v.401(3), pp.343-347, 2000.
- KISCH B. Electron microscopy of the atrium of the heart in guinea pig. *Exp Med Surg*, v.14, pp.99-112, 1956.
- KOLLER KJ, GOEDEL DV. Molecular biology of natriuretic peptides and their receptors. *Circulation*, v.86, pp.1081-1088, 1992.
- LANG RE, THÖLKEN H, GANTEN D, LUFT FC, RUSKOAHO H, UNGER T. Atrial natriuretic factor—a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature*, v.134, pp.314, 1985.
- LEE D, DONG P, COPOLOV D, LIM AT. D<sub>5</sub> dopamine receptors mediate estrogen-induced stimulation of hypothalamic atrial natriuretic factor neurons. *Molecular Endocrinology*, v.13, n.2, pp.344-352, 1999.
- LEVIN ER, GARDNER DG, SAMSON WK. Natriuretic peptides. *Mechanisms of Disease*, v.339, n.5, pp.321-328, 1998.

- LEWICK JA, PROTTER AA. Molecular determinants of natriuretic peptide clearance receptor function. In: *Natriuretic peptides in health and disease*. Edited by Samsom & Levin, pp51-69, 1997.
- MASILAMANI S, CASTRO L, BAYLIS C. Pregnant rats are refractory to the natriuretic actions of atrial natriuretic peptide. *Am j Physiol*, v.267, pp.1111-1116, 1994.
- MEDVEDEV A, ADAMIK A, GLOVER V, TELEGDY G. Cyclic GMP excretion blocked by isatin administration under conditions of fluid overload. *Biochemical Pharmacology*, v.62, pp.225-227, 2001.
- MEDVEDEV A, CLOW A, SANDLER M, GLOVERS V. Isatin: A link between natriuretic peptides and monoamines? *Biochemical Pharmacology*, v.52, pp.385-391, 1996.
- MICEVYCH P, SINCHAK K, MILLS RH, TAO L, LAPOLT P, LU JK. The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology*, v.78, p.29- 35, 2003.
- MISONO KS. Natriuretic peptide receptor: Structure and signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.230, pp.49-60, 2002.
- MOHAMMAD S, ABOLHASSAN A, POURGHOLAMI MH. Evaluation of the anticonvulsant profile of progesterone in male amygdala-kindled rats. *Epilepsy Res*, v.30, p.195-202, 1998.

- MORAN MH, SMITH SS. Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects. *Brain Res*, v.807, p.84-90, 1998.
- MORRELL MJ. Epilepsy in women. *Am Fam Physician*, v.66, p.1489-94, 2002.
- MORRELL MJ. Hormones and epilepsy through the lifetime. *Epilepsia*, v.33, n.4, p.49-59, 1992.
- MORRIS III GL, VANDERKOLK C. Human sexuality, sex hormones, and epilepsy. *Epilepsy Behav*, n.7, p.S22-S28, 2005.
- MULLINS JJ, ZENG Q, GROSS KW. Mapping of mouse atrial natriuretic factor gene. Evidence for tight linkage to the FV-1 locus. *Hypertension*, v.9, pp.518-521, 1987.
- MUKADDAM-DAHER S, JANKOWSKI M, WANG D, MENAOUAR A, GUTKOWSKA J. Regulation of cardiac oxytocin system and natriuretic peptide during rat gestation and postpartum. *Journal of Endocrinology*, v.175, pp.211-216, 2002.
- NADEL AS, BALLERMANN BJ, ANDERSON S, BRENNER BM. Interrelationships among atrial peptides, rennin, and blood volume in pregnant rats. *Am J Physiol*, v.254, pp.793-800, 1988.
- NAKAO K, OGAWA Y, SUGA S, IMURA H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptides receptors. *J Hypertension*, v.10, pp.1111-1114, 1992.

- NUSSENZVEIG DR, LEWICKI JA, MAACK T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem*, v.265, pp.20952-20958, 1990.
- NUSSEY SS, WHITEHEAD SA. *Endocrinology: an integrated approach*. Taylor & Francis Group, 2001.
- ONG H, LAZURE C, NGUYEN TMD, 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, pp.957-963, 1987.
- PEEBLES CT, MCAULEY JW, MOORE JL, MALONE HJ, REEVES AL. Hormone replacement therapy in a postmenopausal woman with epilepsy. *Ann Pharmacother*, v.34, p.1028-31, 2000.
- PENNELL PB. Hormonal aspects of epilepsy. *Neurol Clin*, v.27, pp.941-965, 2009.
- PEREZ J, ZUCCHI I, MAGGI A. Estrogen modulation of the gamma-aminobutyric acid receptor complex in the central nervous system of rat. *J Pharmacol Exp Ther*, v.244, pp.1005-10, 1988.
- PERRONE BL, VARI RC, KREISMAN NR. Recurrent seizures alter renal function and plasma atrial natriuretic peptide levels in rats. *Epilepsia*, v.36(7), pp.649-657, 1995.
- PIMENTEL J. Current issues on epileptic women. *Curr Pharm Des*, v.6 pp.865-872, 2000.
- PORTERFIELD SP. *Endocrine Physiology*. Cap.2, 8 e 9. 1997.

- QUIRION R, DALPE M, DAM T-V. Characterization and distribution of receptors for the atrial natriuretic peptides in mammalian brain. *Proc Nat Acad Sci*, v.83, pp.174-178, 1986.
- RAUCHENZAUNER M, HABERLANDT E, FOERSTER S, ULMER H, LAIMER M, EBENBICHLER CF, JOANNIDIS M, ZIMMERHACKL L, STEIN J, LUEF G. Brain-type natriuretic peptide secretion following febrile and afebrile seizures - a new marker in childhood epilepsy? *Epilepsia*, v.48(1), pp.101-106, 2007a.
- RAUCHENZAUNER M, HABERLANDT E, HÖGLER W, LUEF G. Brain-type natriuretic peptide release and seizure activity during vagal nerve stimulation. *Epilepsia*, v.48(2), pp.397-399, 2007b.
- REDDY DS, CASTANEDA DC, O'MALLEY BW, ROGAWSKI MA. Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*, v.310, n.1, p.230-239, 2004.
- REDDY DS. Role of neurosteroids in catamenial epilepsy. *Epilepsy Res*, v.62, p.99-118, 2004.
- REIBEL S, ANDRE V, CHASSAGNON S, ANDRE G, MARESCAUX C, NEHLIG A, DEPAULIS A. Neuroprotective effects of chronic estradiol benzoate treatment on hippocampal cell loss induced by status epilepticus in the female rat. *Neurosci Lett*, v.281, p.79-82, 2000.
- REIS AM, JANKOWSKI M, MUKADDAM-DAHER S, TREMBLAY J, DAM T-V, GUTKOWSKA J. Regulation of the natriuretic peptide system in rat uterus during the estrous cycle. *Journal of Endocrinology*, v.153, pp.345-355, 1997.

- RHODES ME, FRYE CA. Actions at GABA<sub>A</sub> receptors in the hippocampus may mediate some antiseizure effects of progestins. *Epilepsy Behav*, v.6, p.320-327, 2005.
- RHODES ME, HARNEY JP, FRYE CA. Gonadal, adrenal, and neuroactive steroids' role in ictal activity. *Brain Res*, v.1000, p.8-18, 2004.
- ROLLIN R, MEDIERO A, ROLDÁN-PALLARÉS M, FERNÁNDEZ-CRUZ A, FERNÁNDEZ-DURANGO R. Natriuretic peptide system in the human retina. *Molecular Vision*, v.10, pp.15-22, 2004.
- RÜCK A, GUSTAFSSON T, NORRBOM J, NOWAK J, KÄLLNER G, SÖDERBERG M, SYLVÉN C, DRVOTA V. ANP and BNP but not VEGF are regionally overexpressed in ischemic human myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*, v.322, pp.287-291, 2004.
- RUSKOAHO H, TOTH M, GANTEN D, UNGER T, LANG RE. The phorbol ester induced atrial natriuretic peptide secretion is stimulated by Forskolin and Bay K8644 and inhibited by 8-Bromo-Cyclic GMP. *Biochem Biophys Res Commun*, v.139, pp.266-274, 1986.
- 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, pp.1281-1287, 1985.
- SHUKLA G, BHATIA M, VIVEKANANDHAN S, GUPTA N, TRIPATHI M, SRIVASTAVA A, PANDEY RM, JAIN S. Serum prolactin levels for

differentiation of nonepileptic versus true seizures: limited utility. *Epilepsy & Behavior*, v.5, pp.517-521, 2004.

SZIPIRER C, RIVIERE M, SZIPIRER J, GENET M, DRREZE P, ISLAM MQ, LEVAN G. Assignment of 12 loci to rat chromosome 5: evidence that this chromosome is homologous to mouse chromosome 4 and to human chromosomes 9 and 1 (1p/arm). *Genomics*, v.6, pp.679-684, 1990.

TRAYNELIS SF, DINGLEDINE R. Role of hyperosmotic space in hyperosmotic suppression of potassium-induced electrographic seizure. *J Neurophysiology*, v.61, pp.927-940, 1989.

VAILLANCOURT P, OMER S, PALFREE R, VARMA DR, MULAY S. Downregulation of adrenal atrial natriuretic peptide receptor mRNAs and proteins by pregnancy in rats. *Journal of Endocrinology*, v.155, pp.523-530, 1997.

VALENTE SG, NAFFAH-MAZZACORATTI MG, PEREIRA M, SILVA I, SANTOS NF, BARACAT EC, CAVALHEIRO EA, AMADO D. Castration in female rats modifies the development of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res*, v.49, p.181-188, 2002.

VELÍSKOVÁ J. Estrogens and epilepsy: Why are so excited? *The Neuroscientist*, v.13(1), pp.77-88, 2007.

VESELY DL, PALMER PA, GIORDANO AT. Atrial natriuretic factor prohormone peptides are present in a variety of tissues. *Peptides*, v.13, pp.165-170, 1992.

- VONGHER JM, FRYE CA. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav*, v.64, p.777- 85, 1999.
- YACUBIAN EMT. *Epilepsia – Da Antigüidade ao Segundo Milênio: Saindo das Sombras*. Lemos Editorial, São Paulo, 2000.
- YAP EPH, O'D.MCGEE J. Short PCR product yields improved by lower denaturation temperatures. *Nucleic Acid Research*, v.19, p.1713, 1992.
- ZHANG Y, NOVAK K, KAUFMAN S. Atrial natriuretic factor release during pregnancy in rats. *Journal of Physiology*, v.488, pp.509-514, 1995.
- ZIVIN RA, CONDRA JH, DIXON RAF, SEIDAH NG, CHRÉTIEN M, NEMER M, CHAMBERLAND M, DROUIN J. Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors. *Biochemistry*, v.81, pp.6325-6329, 1984.



## ANEXO 1

Gravidade das crises epilépticas em fêmeas resistentes e WAR durante o *screening*, após 21 dias de ovariectomia e, durante e após o tratamento hormonal.

<b>Grupo 1 - Controle (óleo)</b>									
					antes trat	1s trat	2s trat	3s trat	1s s/ trat
<b>Rata</b>	<b>IG1</b>	<b>IG2</b>	<b>IG3</b>	<b>Média</b>	<b>teste1</b>	<b>teste2</b>	<b>teste3</b>	<b>teste4</b>	<b>teste5</b>
<b>R1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R4</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R5</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
Média				<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
EPM				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
<b>Rata</b>	<b>IG1</b>	<b>IG2</b>	<b>IG3</b>	<b>Média</b>	<b>teste1</b>	<b>teste2</b>	<b>teste3</b>	<b>teste4</b>	<b>teste5</b>
<b>W1</b>	0,85	0,95	0,85	0,88	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>W2</b>	0,95	0,95	0,85	0,92	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>W3</b>	0,85	0,95	0,90	0,90	1,00	0,95	1,00	1,00	1,00
<b>W4</b>	0,90	0,85	0,90	0,88	1,00	0,73	0,90	0,85	0,85
<b>W5</b>	0,85	0,85	0,85	0,85	0,90	0,95	0,95	0,95	0,95
Média				<b>0,89</b>	<b>0,96</b>	<b>0,93</b>	<b>0,97</b>	<b>0,96</b>	<b>0,96</b>
EPM				0,01	0,02	0,05	0,02	0,03	0,03

<b>Grupo 2 - Estradiol + Progesterona</b>									
					antes trat	1 est+prog	2 est+prog	3 est+prog	1s s/ trat
<b>Rata</b>	<b>IG1</b>	<b>IG2</b>	<b>IG3</b>	<b>Média</b>	<b>teste1</b>	<b>teste2</b>	<b>teste3</b>	<b>teste4</b>	<b>teste5</b>
<b>R6</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R7</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R8</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R9</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média				<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
EPM				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Rata</b>	<b>IG1</b>	<b>IG2</b>	<b>IG3</b>	<b>Média</b>	<b>teste1</b>	<b>teste2</b>	<b>teste3</b>	<b>teste4</b>	<b>teste5</b>
<b>W6</b>	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	1,00	1,00	0,23	1,00
<b>W7</b>	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	1,00	1,00	0,23	1,00
<b>W8</b>	0,85	0,85	0,85	0,85	0,95	0,95	1,00	0,00	0,95
<b>W9</b>	0,85	0,90	0,90	0,88	0,85	0,95	0,95	0,95	1,00
<b>W10</b>	0,95	0,95	0,95	0,95	0,90	0,95	0,00	1,00	1,00
<b>W11</b>	0,85	0,90	0,85	0,87	1,00	0,00	0,95	0,00	0,95
Média				<b>0,91</b>	<b>0,93</b>	<b>0,81</b>	<b>0,82</b>	<b>0,40</b>	<b>0,98</b>
EPM				0,02	0,02	0,16	0,16	0,19	0,01

Continuação da tabela 4.

**Grupo 3 - Progesterona com 1 semana estradiol**

				antes trat	1s est	1s prog	2s prog	1s s/ trat	
Rata	IG1	IG2	IG3	Média	teste1	teste2	teste3	teste4	teste5
R11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média				<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
EPM				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rata	IG1	IG2	IG3	Média	teste1	teste2	teste3	teste4	teste5
W12	0,95	0,85	0,95	0,92	0,95	0,00	0,00	0,00	0,11
W13	0,90	0,85	0,85	0,87	0,95	0,95	1,00	0,00	1,00
W14	0,85	0,95	0,95	0,92	0,90	1,00	0,85	0,00	0,85
W15	0,90	0,85	0,90	0,88	0,95	0,85	1,00	0,00	1,00
W16	0,95	0,95	0,95	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
W17	0,90	0,90	0,90	0,90	0,85	0,23	0,95	1,00	0,85
Média				<b>0,91</b>	<b>0,93</b>	<b>0,67</b>	<b>0,80</b>	<b>0,33</b>	<b>0,80</b>
EPM				0,01	0,02	0,18	0,16	0,21	0,14

**Grupo 4 - Progesterona**

				antes trat	1s prog	2s prog	3s prog	1s s/ trat	
Rata	IG1	IG2	IG3	Média	teste1	teste2	teste3	teste4	teste5
R16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média				<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
EPM				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rata	IG1	IG2	IG3	Média	teste1	teste2	teste3	teste4	teste5
W18	0,90	0,95	0,85	0,90	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
W19	0,85	0,90	0,85	0,87	1,00	0,95	1,00	1,00	1,00
W20	0,85	0,85	0,90	0,87	0,95	0,95	1,00	0,95	1,00
W21	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,95	0,95	1,00	1,00
W22	0,90	0,85	0,90	0,88	1,00	0,95	0,95	0,38	0,85
W23	0,90	0,85	0,90	0,88	1,00	0,95	0,95	1,00	0,95
Média				<b>0,88</b>	<b>0,98</b>	<b>0,79</b>	<b>0,81</b>	<b>0,72</b>	<b>0,80</b>
EPM				0,01	0,02	0,16	0,16	0,18	0,16

Continuação da tabela 4.

**Grupo 5 - Estradiol**

	antes trat			1s est	2s est	3s est	1s s/ trat		
<b>Rata</b>	<b>IG1</b>	<b>IG2</b>	<b>IG3</b>	<b>Média</b>	<b>teste1</b>	<b>teste2</b>	<b>teste3</b>	<b>teste4</b>	<b>teste5</b>
<b>R22</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R23</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R24</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R25</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>R26</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média				<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
EPM				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Rata</b>	<b>IG1</b>	<b>IG2</b>	<b>IG3</b>	<b>Média</b>	<b>teste1</b>	<b>teste2</b>	<b>teste3</b>	<b>teste4</b>	<b>teste5</b>
<b>W24</b>	0,90	0,95	1,00	0,95	1,00	0,85	0,90	1,00	0,85
<b>W25</b>	0,85	0,90	0,95	0,90	0,95	0,95	0,95	0,85	0,95
<b>W26</b>	0,85	0,85	1,00	0,90	0,95	0,95	0,85	0,85	0,95
<b>W27</b>	0,95	0,90	0,90	0,92	0,90	0,95	0,95	0,95	0,95
<b>W28</b>	0,90	0,85	0,90	0,88	1,00	0,95	0,90	1,00	0,95
Média				<b>0,91</b>	<b>0,96</b>	<b>0,93</b>	<b>0,91</b>	<b>0,93</b>	<b>0,93</b>
EPM				0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02

R, rata Wistar não-susceptível à epilepsia audiogênica; W, *Wistar Audiogenic Rats* (WAR); IG, índice de gravidade da crise durante o *screening*; Teste 1, teste audiogênico realizado 21 dias após a ovariectomia; Testes 2, 3 e 4, testes audiogênicos realizados nos dias 7, 14 e 21 de tratamento, respectivamente; Teste 5, realizado 7 dias após suspensão do tratamento; s, semana; trat, tratamento; est, hexaidrobenzoato de estradiol (1 µg/100g de peso corporal/dia); prog, acetato de medroxiprogesterona (500 µg/dia). O bloqueio do componente tônico da crise, ou  $IG \leq 0,38$ , foi considerado ação anticonvulsivante. As células em azul representam redução das crises; as células em laranja representam ausência de crises.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)