

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA AÇÃO DA  
GUANILINA E DE UROGUANILINA EM CÉREBRO DE  
RATOS**

**MARIA DANIELE AZEVEDO TEIXEIRA**

Fortaleza  
2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA AÇÃO DA  
GUANILINA E DE UROGUANILINA EM CÉREBRO DE  
RATOS**

**MARIA DANIELE AZEVEDO TEIXEIRA**

**Orientador:** Manassés Claudino Fonteles

Dissertação apresentada a Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Fortaleza

2003

T267a Teixeira, Maria Daniele Azevedo

Avaliação eletrofisiológica da ação da guanilina e de uroguanilina em cérebro de ratos / Maria Daniele Azevedo Teixeira, - Fortaleza, 2003.

103f. : il

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Ceará. Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

1.Eletroencefalografia.2. Guanilina. 3. Uroguanilina.  
4.Canais de cloreto. 5.Nerofarmacologia. I. Título

CDD: 616.80475

# AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA AÇÃO DA GUANILINA E DE UROGUANILINA EM CÉREBRO DE RATOS

Dissertação apresentada a Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Farmacologia., a qual encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida universidade.

---

Maria Daniele Azevedo Teixeira

Dissertação aprovada em 13 de outubro de 2003

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale

---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

“Não tens observado que sem a ciência as opiniões são todas vergonhosas ? ”

Platão, *República* IV (506c 5-6)

## **AGRADECIMENTOS**

A **Deus**, o maior.

A meus pais, **Eleazar Magalhães Teixeira & Maria de Lourdes Azevedo Teixeira**, meu muito obrigada, vocês são maravilhosos, eu os amo muito.

Ao professor **Dr. Manassés Claudino Fonteles**, orientador da presente tese, pela oportunidade que me foi dada de vivenciar e aprender muitos dos ensinamentos que levaram a esta dissertação e por possibilitar a realização de um trabalho tão interessante, cedendo seu laboratório e materiais necessários para os experimentos.

Ao professor **Dr. Otoni Cardoso do Vale**, pela co-orientação, pela paciência, pelos muitos aprendizados que lhe devo, pela oportunidade de trabalhar com um tema instigante e sobretudo pela grande experiência que vivenciei.

Aos amados e sempre presentes amigos que dividiram comigo as alegrias e angústias e me acompanharam até o desfecho desta tese: **Dr. Francisco Romero Cabral, Dra. Marta Regina Kerntopf, Dra. Rita Izabel Monteiro Galvão e Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento.**

Aos não menos queridos: **Lucília Lessa, Cláuber Sousa, Alexandre Havit, Regina Coeli, Cláudia Mendes.**

Aos **funcionários do IBIMED**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>XVII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>03</b>
<b>2.1 Objetivos gerais.....</b>	<b>03</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>04</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>05</b>
<b>3.1 Peptídeos Guanilina.....</b>	<b>05</b>
<b>3.1.1 Descoberta dos peptídeos Guanilina.....</b>	<b>05</b>
<b>3.1.2 Estrutura dos peptídeos guanilina.....</b>	<b>08</b>
<b>3.1.3 Precursores.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.4 Mecanismos Celulares e Moleculares.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.4.1 Receptores.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.4.2 Mecanismos Sinalizadores.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Líquido Céfalo-Raquidiano (LCR) e Sistema Nervoso Central (SNC).....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1 Barreiras Encefálicas.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2 Plexo Coróide (PC).....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.3 Compartimentos anatômicos do CSF.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Canais Iônicos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Canais de Cloreto.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4.1 Canais de Cloreto ativados por ligantes.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.2 Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística(CFRT).....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.3 A família CLC de canais de cloreto.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Conceitos básicos sobre o EEG.....</b>	<b>34</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Animais de laboratório utilizados.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Avaliação eletrofisiológica: eletroencefalograma e eletrocardiograma.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Cirurgia estereotáxica.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4 Coleta de Líquido Céfalo-Raquidiano(LCR) .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 Cisternografia.....</b>	<b>49</b>
<b>4.6 Infusão de Guanilina e Uroguanilina.....</b>	<b>51</b>

<b>4.7</b>	<b>Bloqueadores.....</b>	<b>51</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeito da guanilina sobre a amplitude absoluta média dos espectros alfa e teta e sobre o número de pontas por minuto encontradas no EEG.....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>6.1</b>	<b>Avaliação eletrofisiológica da infusão intracisternal de guanilina.....</b>	<b>78</b>
<b>6.2</b>	<b>Avaliação eletrofisiológica da infusão intracisternal de uroguanilina.....</b>	<b>80</b>
<b>6.3</b>	<b>Avaliação do bloqueador de canais de Cl<sup>-</sup>: ácido niflúmico..</b>	<b>81</b>
<b>6.4</b>	<b>Avaliação do inibidor de correntes de Cl<sup>-</sup>: nedocromil sódico.....</b>	<b>84</b>
<b>6.5</b>	<b>Avaliação do modelo experimental.....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>88</b>

## **LISTA DE ABREVIATURA, SÍMBOLOS E SIGLAS**

$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{V}$	Microvolts
$\theta$	Ângulo
A1	Região auricular esquerda
A2	Região auricular direita
27G	Tamanho referência para agulhas
ASICs	Canais iônicos sensíveis a ácido
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AP	Região antero-posterior
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase(s)	Adenosina trifosfatase(s)
BHE	Barreira hemato-encefálica
BHL	Barreira hemo-liquórica
BBM	Membrana em borda de escova
$\text{Br}^-$	Íon bário
C	Controle
$\text{Ca}^+$	Íon cálcio
$\text{Cl}^-$	Íon cloreto
ClC	Família de canais de cloreto

Cd <sup>2+</sup>	Íon Cádmio
CFRT	Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística
Cm	Unidade internacional de medida
DNS	Ácido desoxirribonucléico
E	Esquerdo
E.P.M.	Erro padrão da média
ECG	Eletrocardiograma
EEG	Eletroencefalograma
EMSA	Equipamentos médicos sociedade anônima
F3	Região frontal esquerda
F4	Região frontal direita
FC	Fibrose Cística
g	Gramma
Gaba	Ácido gama-amino-butírico
GC	Guanilato-ciclase
GC-C	Guanilato-ciclase C
Gly	Aminoácido glicina
GMPc	Monofosfato de guanosina
Hz	Hertz
HCO <sup>3</sup>	Bicarbonato
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
I <sup>-</sup>	Íon iodo
IP	Via de administração intraperitoneal
IM	Via de administração intramuscular

Kg	Kilograma
K+	Íon potássio
L	Região lateral
LCR	Líquido céfalo raquidiano
ms	Milissegundo
mg	Miligramma
ml	Mililitro
mM	Milimolar
n	Número de animais
Na+	Íon sódio
NH <sub>2</sub> +	Radical amina
OK	Rim de opossum
OK-GC	Guanilato ciclase encontrada no rim de opossum
pH	Grau de acidez
P	Significância Estatística
P3	Região parietal esquerda
P4	Região parietal direita
P64	Proteína do canal de cloreto
PKG- II	Proteína quinase dependente de GMPC
PKA- II	Proteína quinase dependente de AMPc
PDE	fosfodiesterase
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
Ser	Aminoácido serina
SNC	Sistema nervoso central

St	Toxina termo estável
seg	Segundos
t	estatístico
T3	Região correspondente á pata esquerda
T5	Região correspondente á pata direita
T84	Linhagem de células
UFC	Universidade Federal do Ceará
V	ventral
Va	aminoácido valina

## Lista de Figuras

<b>Figura. 1.</b> Subclasses da família de peptídeos biologicamente ativos guanilina. A classe 1 representa peptídeos com uma única ponte dissulfeto ( as linhas conectando o par de cisteínas). Os peptídeos da classe 2 apresentam duas pontes dissulfeto e na classe 3, três pontes dissulfeto intramoleculares. (Forte, 1999)....	09
<b>Figura 2.</b> modelo proposto para o mecanismo de transdução intracelular do GMPc para células alvo de guanilina no epitélio (Forte et al.,2000).....	13
<b>Figura 3</b> Anatomia das interfaces hematoencefálica e hematoliquórica. A: a BHE é formada por células endoteliais dos capilares cerebrais que estão justapostas pô “tight junctions”. B: Capilares do plexo coróide (PC) são fenestrados e cercados por uma membrana basal. Solutos que saem dos capilares coroides chegam ao espaço extracelular que contém fibroblastos e colágeno e devem atravessar o PC antes de entrar no LCR. C: As superfícies ventriculares são margeadas por células ciliadas ependimárias(E) ligadas por “tight junctions”. Uma membrana basal está presente entre as células ependimárias e os processos astrocísticos. Solutos do LCR podem atravessar ou passar entre as células ependimárias para entrar no fluido extracelular cerebral (ECP). D: Margem das superfícies cerebrais, o LCR filtra-se através espaço subaracnóide ( contendo colágeno e a pia-máter) e vem em contato com os limites da glia(que consiste de processos astrocísticos achataos) O LCR pode fazer trocas com o fluido extracelular cerebral atravessando ou por entre os processos gliais(Lee et al.,2001).....	17
<b>Figura 4</b> Figura esquemática representando o sistema plexo coróide(PC) – LCR (Chodobska et al., 2001).....	19

<b>Figura 5</b> Mecanismos de transporte intracelulares renal e coroidal.....	21
<b>Figura 6</b> Compartimentos de LCR e sua relação com o cérebro (Kazemi et al.,1986).....	23
<b>Figura 7</b> Classificação das diversas famílias ClC (Jentsch,2002).....	31
<b>Figura 8</b> Representação esquemática do sistema homeostático que regula os parâmetros definindo o estado basal da atividade elétrica cerebral.....	38
<b>Figura 9</b> Sistema de captação, análise e armazenamento dos sinais eletroencefalográficos e eletrocardiográficos. Este sistema originalmente é utilizado para realização de EEG digital em pacientes humanos. Foi adaptado para uso em animais, com utilização de um menor número de eletrodo(dez)(Cardoso do Vale, 2000).....	42
<b>Figura 10</b> Aparelho Estereotáxico.....	45
<b>Figura 11</b> Suturas ósseas; A, B e C pontos para implantação de parafusos; D – linha interaural.....	46
<b>Figura 12</b> – Exposição do tecido ósseo (a) e colocação dos parafusos com auxílio de uma broca odontológica (b).....	47
<b>Figura 13</b> Colocação da cânula-guia em direção à cisterna magna.....	47
<b>Figura 14</b> Rato Wistar não anestesiado com cânula-guia implantada na cisterna magna.....	48

<b>Figura 15</b> Cisternografia. Radiografia A: Contraste não se distribuiu pela medula espinhal do rato; Radiografia B: Contraste se distribuiu pela medula espinhal.....	50
<b>Figura 16</b> Amplitudes absolutas médias ( $\mu$ V) do espectro alfa do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu$ g/ $\mu$ g/min) em três momentos: antes, durante e após a infusão.....	57
<b>Figura 17</b> Amplitudes absolutas médias ( $\mu$ V) do espectro alfa do EEG nas regiões frontais esquerda (F3) e direita (F4), antes(f3a e f4a), durante (f3d e f4d) e após (f3ap e f4ap); em cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu$ g/ $\mu$ g/min).....	58
<b>Figura 18</b> Amplitudes absolutas médias ( $\mu$ V) do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu$ g/ $\mu$ g/min) em três momentos: antes, durante e após a infusão.....	59
<b>Figura 19</b> Número de pontas por minuto observadas no EEG da região frontal antes, durante e após a infusão de guanilina ( $2\mu$ g/ $\mu$ g/min) em cinco animais.....	60
<b>Figura 20</b> Número de pontas por minuto observadas na infusão intracisternal de uroguanilina nas duas doses.....	72
<b>Figura 21</b> Efeito da infusão de uroguanilina na cisterna magna sobre a amplitude das pontas registrado com eletrodos inseridos na região frontal (F3 e F4). P<0.05, ANOVA com Tukey.....	73

**Figura 22** Efeito da infusão de uroguanilina ( 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min ou 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min) na cisterna magna sobre o número de pontas por minuto registradas por eletrodos implantados na região frontal (F3-F4). Test t pareado bicaldal com nível de significância de 5%. As informações são expressas como media  $\pm$  de seis (2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min) e cinco (6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min) animais.....

74

**Figura 23** EEG representativa do registro dos efeitos em ratos anestesiados da infusão de salina: controle (**A**),durante 6 $\mu$ L/min infusão de salina(**B**) e vinte minutos após o término da infusão de salina infusão (**C**). Os outros traçados representam a mesma seqüência de eventos para a infusão de uroguanilina (2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min) (**E,F,G**) uroguanilina ( 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min) (**H,I,J**).....

75

**Figura 24** Representação do número de pontas por minuto observadas na infusão intracisternal nos grupos 1: controle 1 (antes da infusão de uroguanilina 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min); 2: infusão de uroguanilina 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min; 3: controle 2 (antes da infusão de uroguanilina 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min); 4: Infusão de uroguanilina 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min; 5. Infusão de nedocromil sódio; 6: Infusão de nedocromil sódio + uroguanilina.....

76

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Os valores são expressos em $\mu\text{V}$ (microvolts).....	54
<b>Tabela 2-</b> Amplitude absoluta média do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Os valores são expressos em $\mu\text{V}$ (microvolts).....	55
<b>Tabela 3-</b> Número de pontas por minuto observadas no EEG da região frontal antes, durante e após a infusão de guanilina ( $2\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) em cinco animais.....	56
<b>Tabela 4-</b> Número de pontas por minutos observadas no EEG de seis animais que receberam a dose de $2\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$ de uroguanilina intracisternal; antes, durante e após a infusão.....	62
<b>Tabela 5 -</b> Número de pontos por minuto observadas no EEG de cinco animais que receberam a dose de $6\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$ de uroguanilina intracisternal; antes, durante e após a infusão.....	63

<b>Tabela 6-</b> Amplitude absoluta média do espectro teta do EEG de seis animais submetidos a infusão intracisternal de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Valores expressos em $\mu\text{V}$ .....	65
<b>Tabela 7 -</b> Amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de seis animais submetidos a infusão intracisternal de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Valores expressos em $\mu\text{V}$ .....	66
<b>Tabela 8-</b> Amplitude da média de pontas observadas no EEG da região frontal antes, durante e após a infusão de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em seis animais.....	67
<b>Tabela 9-</b> Amplitude da média de pontas observadas no EEG da região frontal antes, durante e após a infusão de uroguanilina( $6\mu\text{g}/\text{min}$ ) em cinco animais.....	68
<b>Tabela 10-</b> Amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de salina( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão.Os valores são expressos em $\mu\text{V}$ .....	69

<b>Tabela 11-</b> Amplitudes absolutas médias do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de salina( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Os valores estão expressos em $\mu\text{V}$ .....	70
<b>Tabela 12 -</b> Amplitudes médias absolutas dos espectros alfa e teta do EEG sob efeito da uroguanilina nas doses de $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ e $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ , incluindo o erro da média. Valores expressos em $\mu\text{V}$ (microvolts).....	71

## **RESUMO**

**Avaliação eletrofisiológica da ação da guanilina e de uroguanilina em cérebro de ratos**

**Maria Daniele Azevedo Teixeira**

**Orientador: Dr. Manassés Claudino Fonteles**

**Dissertação de Mestrado em Farmacologia – UFC – 2003.**

Os peptídeos termo-estáveis guanilina e uroguanilina foram inicialmente isolados e identificados do intestino de rato e de urina de opossum: suas propriedades são atribuídas ao controle do transporte de sal e água no rim e intestino, mediado pelo GMPc.

O presente estudo propõe-se a avaliar a atividade neurofisiológica dos peptídeos do tipo guanilina, através da análise do registro eletroencefálico, bem como investigar os mecanismos de ação responsáveis pela possível ação sobre o sistema nervoso central. Para tanto, grupos de ratos Wistar machos anestesiados foram submetidos a uma cirurgia para a colocação de uma cânula na cisterna magna. Decorridas 48 horas da cirurgia, estes animais foram novamente anestesiados, sendo infundidas através de uma bomba de infusão: guanilina ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) e uroguanilina ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$  e  $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ), em três grupos distintos. Posteriormente, outros dois grupos de animais foram submetidos ao mesmo protocolo experimental, com a uroguanilina, porém adicionalmente, receberam um pré-tratamento (antes da infusão) de duas substâncias bloqueadoras de canais de  $\text{Cl}^-$ : o ácido niflúmico e o nedocromil sódico. Durante a infusão intracisternal dos peptídeos, houve o registro do EEG dos diversos espectros de ondas, sendo gravados três momentos: antes da infusão (controle), durante e após a infusão. O peptídeo guanilina quando infundido em cérebro de ratos levou a alterações na amplitude do traçado e o surgimento de pontas no EEG. A uroguanilina induziu as mesmas alterações, contudo houve uma maior intensidade ( $p<0.05$ ). O pré-tratamento com ácido niflúmico não influiu nos resultados da infusão de uroguanilina, porém o nedocromil inibiu o surgimento de pontas ( $p<0.05$ ).

Sugerimos através deste estudo, que os peptídeos guanilina e uroguanilina produzem alterações eletroencefalográficas, atuando sobre o cérebro por mecanismos de ação envolvendo canais de  $\text{Cl}^-$ .

## **ABSTRACT**

**Eletrophysiological evaluation of guanylin and uroguanylin in rat brain**

**Maria Daniele Azevedo Teixeira**

**Mentor: Ph D. Manassés Claudino Fonteles**

**Master degree thesis in Pharmacology – UFC – 2003.**

Guanylin and uroguanylin are heat-stable peptides isolated and identified from rat intestine and opossum urine, respectively. They control salt and water transport in the kidney and intestine mediated by cGMP.

In this study we tried to show the effects of the guanylin-like peptides on EEG-parameters, as well to investigate possible cerebral action mechanisms in the central nervous system. The experiments were performed using anaesthetized male Wistar rats that were placed on the stereotaxic frame for surgery to implant a guide cannula towards to cisterna magna. After 48 hours, the animals were divided in three groups: guanylin ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) and uroguanylin ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$  and  $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ), and received intracisternal infusion by a infusion pump. Another two groups were performed using uroguanylin ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) and a pretreatment of two  $\text{Cl}^-$  blockers: niflumic acid and nedocromil sodium. EEG recordings were made throughout the experimental procedure, using a software for spectral activity study and absolute amplitude, starting with the control recording segment, followed by drug infusion segment and finishing with after infusion segment. Guanylin peptide in the rat brain increased the frontal waves amplitude and induced spikes. Uroguanylin induced the same changes more intensively ( $p<0.05$ ). Niflumic acid didn't promoted changes, but nedocromil seemed to inhibit the spikes ( $p<0.05$ ).

We propose that guanylin and uroguanilyn EEG effects were caused by  $\text{Cl}^-$  channels envolvement.

## **1 Introdução**

O líquido céfalo-raquidiano (LCR) tem sido utilizado experimentalmente, e inclusive em procedimentos terapêuticos em humanos, ao longo dos anos, como veículo para liberação de substâncias. Sugere-se que substâncias com afinidade com o sistema nervoso sejam liberadas em locais específicos e sejam capazes de alcançar receptores de células-alvo distantes por difusão através do espaço extracelular (Proescholdt et al., 2000).

Os peptídeos guanilina e uroguanilina são hormônios que ativam receptores guanilato ciclase, pelo menos no intestino e no rim. A consequente elevação de GMPc no intestino acarreta um incremento na secreção de eletrólitos e água. A ativação dos receptores renais pela uroguanilina estimula o fluxo urinário e excreção de sódio, cloreto e potássio (Forte et al., 2000). O mecanismo de ação envolve canais de cloreto.

A presença de cópias de mRNA codificando guanilina e uroguanilina em tecidos distintos daqueles do trato gastrointestinal, como no sistema reprodutor, linfóide e no sistema nervoso central(Fan et al.,1997a) sugere que estes hormônios seriam responsáveis pela regulação

eletrolítica em tecidos diversos. Além disso, a semelhança dos sistemas de transporte de eletrolítico entre o rim e o cérebro levanta a hipótese dos peptídeos desempenharem funções no sistema nervoso central. Estudos cinéticos detalhados realizados em tecido de plexo coróide isolado têm confirmado e caracterizado o processo de transporte de ânions como similar àquele no fígado e rim (Angeletti et al., 1997).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivos gerais**

Propor o estudo eletrofisiológico da função cerebral sob o efeito da guanilina e da uroguanilina administradas por via intracisternal com base no conhecimento da ação destes peptídeos sobre receptores através do mecanismo sinalizador da guanilato ciclase atuando a partir de canais iônicos, como por exemplo, canais de cloreto, haja vista a presença de receptores da família guanilina no sistema nervoso central.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar quantitativa e qualitativamente o eletroencefalograma, enfatizando o surgimento de espículas, ondas agudas, complexos ponta-onda, e a ocorrência de atividade eletrofisiológica paroxística de ondas da faixa de freqüência teta ou delta;
- Interpretar os achados com base nos mecanismos de bioeletrogênese dos novos potenciais obtidos;
- Investigar possíveis mecanismos de ação da guanilina e uroguanilina sobre potenciais corticais através da utilização de antagonistas específicos de receptores;
- Mensurar as amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de freqüência, para avaliação dos possíveis efeitos dos peptídeos guanilina e uroguanilina em infusões prolongadas.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Peptídeos Guanilina**

##### **3.1.1 Descoberta dos peptídeos Guanilina**

O peptídeo guanilina, originalmente extraído e purificado do intestino delgado de rato, tem alta homologia estrutural e seqüencial com as enterotoxinas termoestáveis da *Escherichia coli* (D'Este et al. 2000) conhecida como a causadora da forma aquosa de diarréia similar à vista na cólera ( Forte et alli., 1999). Isolado da mucosa intestinal de ratos por Currie et al., o peptídeo de 15 aminoácidos foi purificado empregando-se um bioensaio de GMPc com células intestinais T84 para detectar os peptídeos ativos do jejuno ( Forte, 1999). Caracteriza-se pela presença de quatro resíduos de cisteína que requerem oxidação e formação de ponte dissulfeto para a completa expressão de sua atividade (Wiegand, RC et alli., 1992). O nome guanilina se deve ao mecanismo de sinalização celular, envolvendo a enzima guanilato ciclase e ao seu tecido de origem, o intestino ( Forte, 1999).

Estudos em opossum mostraram evidências preliminares de que um peptídeo semelhante à guanilina era abundante na urina. Em efeito, uma segunda versão de guanilina do opossum foi isolada, tanto a partir da mucosa intestinal, quanto da urina. O peptídeo predominante na urina foi denominado uroguanilina. Várias formas de uroguanilina foram isoladas da urina humana e de rato, do intestino de rato e plasma humano e de opossum (Forte et al., 2000).

A família guanilina guarda semelhanças tanto na estrutura primária, quanto nas atividades biológicas com as enterotoxinas termo estáveis (ST) agindo de forma a estimular a secreção de fluidos e eletrólitos para dentro do lúmen intestinal pela ativação de receptores de guanilina localizados nas superfícies apicais dos enterócitos na borda do intestino (Forte, 1999). Fontes et al.(1998) demonstraram que uroguanilina e guanilina possuem atividades natriuréticas, kaliuréticas e diuréticas no rim perfundido isolado. Um fator natriurético intestinal foi postulado existir por Carey e colegas, no sistema digestivo, como explicação para a natriurese que é acentuada após a ingestão de sal. Reid (2002), descreve uma síndrome associada a deficiência de zinco,

caracterizada por ascite e que leva a uma desordem do transporte transepitelial, correlacionando-a a um incremento na produção de uroguanilina.

Um terceiro peptídeo da família foi identificado e nomeado linfoguanilina, por sua expressão em tecidos linfóides (Forte, 1999).

Yuge et al. em 2003, identificaram em salmões, três formas de peptídeos do tipo guanilina. Baseados na seqüência do peptídeo maduro e locais de produção, eles nomearam com sendo: guanilina, uroguanilina e renoguanilina. A renoguanilina foi descrita como possuidora das características dos dois primeiros peptídeos, entretanto não se localiza nas células enterocromafins do intestino (como a guanilina), e sim nas células produtoras de muco do intestino destes peixes.

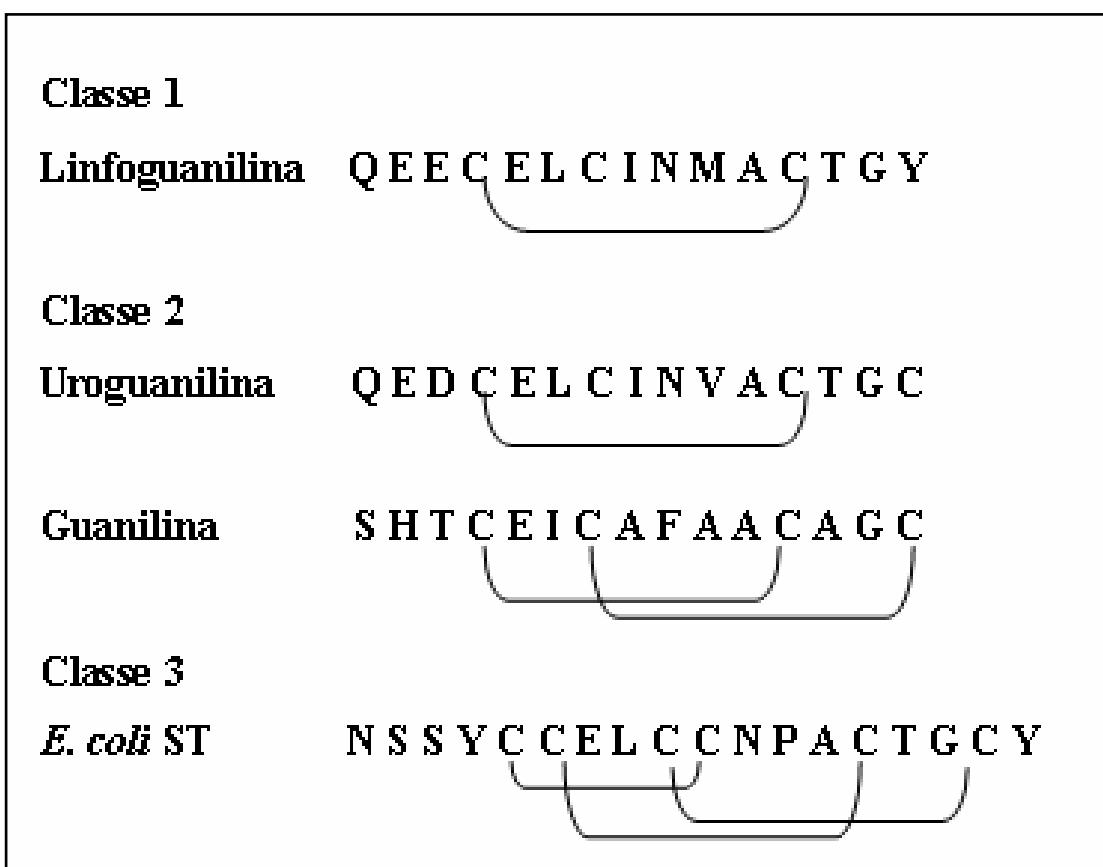
Desde a descoberta da uroguanilina e linfoguanilina, tornou-se claro que a guanilina pertence a família destes peptídeos. Através da ativação da guanilato-ciclase C, a guanilina induz o aumento da concentração de GMPc, que medeia a fosforilação e ativação do regulador de condutância transmembrana do canal de Cl<sup>-</sup> na fibrose cística. (D'este et al., 2000).

Fan et al. (1997) evidenciaram a expressão de cópias de mRNA codificando guanilina e uroguanilina em tecidos como o digestivo, renal, do sistema nervoso central, reprodutor e linfóide. Estes achados sugerem que o transporte de íons pode também ser regulado por GMPc como um mecanismo fisiológico presumível nestes tecidos, criando um campo fértil para a pesquisa de outras funções celulares diferentes das previamente documentadas no intestino e no rim.

### **3.1.2 Estrutura dos peptídeos guanilina**

Os peptídeos da família guanilina podem ser classificados em três grupos de acordo com o número de pontes dissulfeto contidas nas moléculas destes peptídeos. Linfoguanilina tem somente uma ponte dissulfeto, guanilina e uroguanilina exibem duas pontes; a toxina STs possui três. Na guanilina e uroguanilina, as pontes são formadas entre o primeiro e terceiro, e entre o segundo e quarto radicais cisteinil em cada peptídeo (Forte, 2000).

Duas diferenças são observadas nas moléculas de guanilina e uroguanilina (figura 1). Uroguanilina apresenta um par de aminoácido acídico na posição NH<sub>2</sub> – terminal e um resíduo interno de asparagina não encontrado na guanilina. Os aminoácidos acídicos da uroguanilina contribuem para o amplo espectro de atividade biológica do peptídeo sob condições fisiológicas moduladas e variações de pH na superfície da mucosa intestinal. A asparagina faz uroguanilina e peptídeos ST muito resistentes ao ataque de quimiotripsinas, enquanto guanilina é prontamente clivada e inativada pelas enzimas(Forte, 1999).



**Figura. 1.** Subclasses da família de peptídeos biologicamente ativos guanilina. A classe 1 representa peptídeos com uma única ponte dissulfeto ( as linhas conectando o par de cisteínas). Os peptídeos da classe 2 apresentam duas pontes dissulfeto e na classe 3, três pontes dissulfeto intramoleculares. (Forte, 1999)

### **3.1.3 Precursors**

Proguanilina e prouroguanilina são polipeptídeos secretados com pouca ou nenhuma atividade biológica até sofrerem clivagem por enzimas conversoras que liberam os peptídeos ativos para a interação com os receptores alvo GCs . Algumas endoproteases como a quimiotripsina podem servir como enzima conversora para a ativação da prouroguanilina em tecidos alvo. Os pro-peptídeos são removidos por hidrólise da ligação peptídica entre os resíduos Ser-Val da preproguanilina e preprouroguanilina. Os sítios de clivagem da preproguanilina no rato e no homem, são os da ligação peptídica Gly-Val; os sítios para preprouroguanilina, são os resíduos Ser-Val ( Forte, 1999).

### **3.1.4 Mecanismos Celulares e Moleculares**

#### **3.1.4.1 Receptores**

Guanilina, uroguanilina e enterotoxinas(ST) da *Escherichia coli* se ligam e ativam receptores guanilato-ciclase da membrana apical localizados no intestino, rim e em outros epitélios (Fontes, 1998).

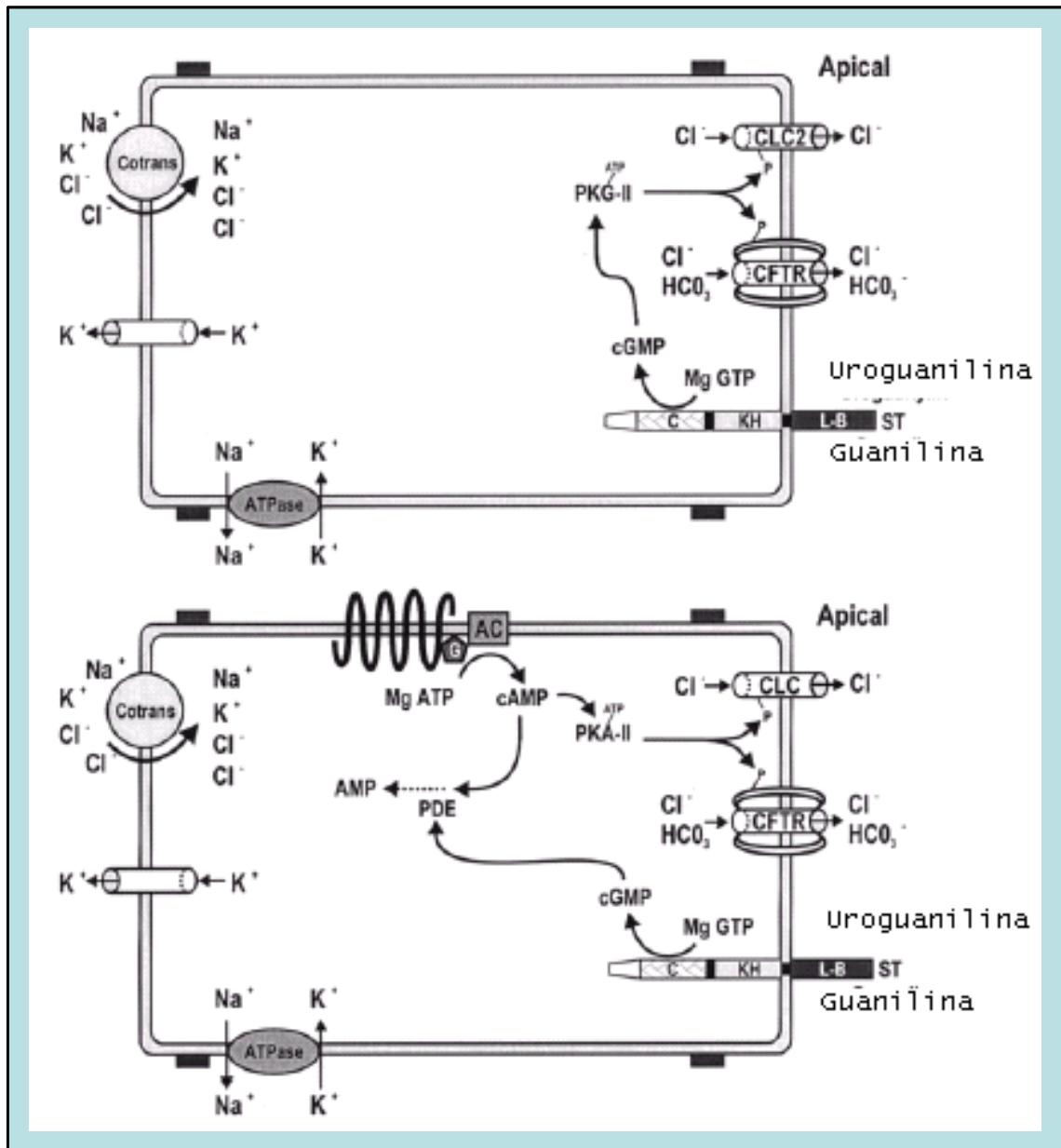
O primeiro receptor para peptídeos guanilina identificado no plano molecular foi o GC-C. Conforme relatado por Forte (1999), GC-C é expresso em toda mucosa gastrintestinal. Este autor demonstra claramente ser o mesmo um receptor alvo para guanilina e uroguanilina secretadas no lúmen intestinal, bem como, em condições patológicas para peptídeos ST secretados pelos micro-organismos indutores da diarréia. Entretanto, mRNA de GC-C é pouco encontrado no rim e pode não participar na sinalização do GMPc dentro das células alvo renais responsáveis pelas ações diuréticas e natriuréticas da uroguanilina “*in vivo*”. Um receptor GC renal expresso em células de rim de opossum (OK) foi identificado por clonagem molecular de cDNAs derivados de células OK e córtex renal, codificando uma proteína de 1049 aminoácidos. A maior diferença entre os receptores GC-C e OK-GC ocorre entre seus domínios de ligação, com a proteína OK-GC exibindo 57-59% de identidade com as formas de GC-C intestinal no rato, homem e suíno.

Schulz (1992) e Fan (1997), estudando a existência de guanilina nos diversos tecidos dos mamíferos, observaram por meio de “Northern Analysis” e reação de cadeia polimerase ou clonagem de DNA, a presença de GC-C no intestino, na glândula adrenal, nas células epiteliais do pulmão, no cérebro, na mucosa olfatória e traqueal.

### **3.1.4.2 Mecanismos Sinalizadores**

A ligação de um peptídeo do tipo guanilina ou da enterotoxina ST com o receptor GC-C acentua a produção e o acúmulo intracelular do segundo mensageiro GMPc, que por sua vez influencia o estado de fosforilação e a atividade do canal de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) putativo da proteína reguladora de condutância transmembrana na fibrose cística(CFTR), servindo como um mecanismo de efluxo para a secreção de  $\text{Cl}^-$  na mucosa intestinal. O efeito da ativação do receptor no intestino é estimular a secreção transepitelial de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$ , incrementando assim, a secreção de fluido e modulando o pH intraluminal (Fan et al, 1997).

A CFTR serve como um canal para a passagem do cloreto através das membranas apicais dos enterócitos secretores do mesmo. Esta proteína é ativada por proteínas quinases GMPc dependentes (figura 2) (Forte et alli,1996). A proteína quinase-II dependente de GMPc( PKG-II), muito abundante nas células BBM ao longo do intestino delgado, parece ser um receptor chave para o GMPc no trato intestinal superior. A ausência de genes codificando PKG-II resulta na perda de respostas secretoras de fluido à E. coli ST. Outro receptor intracelular importante para o GMPc tem sido postulado, a PKA-II, que parece também se ligar ao GMPc e é ativada por sua alta concentração “*in vivo*”, e/ou uma AMPc fosfodiesterase (PDE) regulada por GMPc (Forte et al,2000).



**Figura 2.** Modelo proposto para o mecanismo de transdução intracelular do GMPc para células alvo de guanilina no epitélio (Forte et al., 2000)

As proteínas PKG-II, PKA-II e PDE reguladas por GMPc, estão também presentes nos rins. Carrithers et al., em 2000, estudando a distribuição do receptor GC-C nas porções do néfron de rato, observaram a expressão de RNAm de PKG-II por toda essa estrutura renal.

Outro possível candidato canal funcional de  $\text{Cl}^-$  no intestino delgado de animais nocauteados para CFRT é ClC<sup>-2</sup>, um membro da crescente família ClC de canais de  $\text{Cl}^-$ . A expressão do ClC<sup>-2</sup> proporciona um mecanismo de condutância alternativo que pode ser regulado pela uroguanilina via GMPc *in vivo* (Forte, 2000).

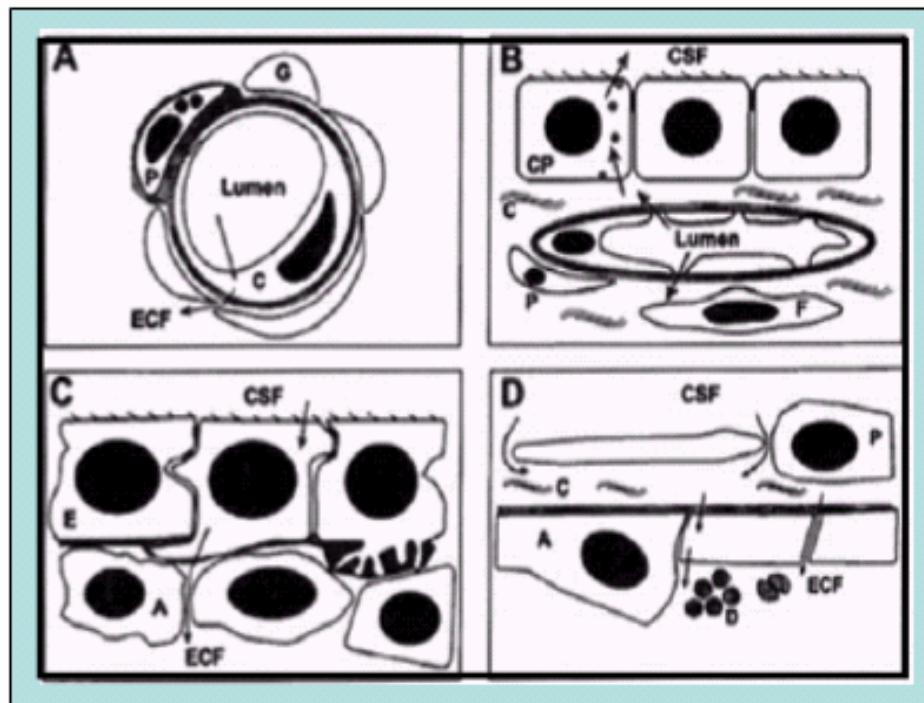
### **3.2 Líquido Céfalo-Raquidiano (LCR) e Sistema Nervoso Central (SNC)**

#### **3.2.1 Barreiras Encefálicas**

As barreiras encefálicas podem ser conceituadas como sendo dispositivos que impedem ou dificultam a passagem de substâncias do sangue para o tecido nervoso, do sangue para o líquido céfalo raquidiano (LCR) ou do LCR para o tecido nervoso. Poder-se-ia dizer, que são dispositivos que dificultam a troca de substâncias entre tecido nervoso e os diversos compartimentos de líquido do sistema nervoso central. Machado (1991) cita que a primeira noção de que os capilares do sistema nervoso central teriam uma permeabilidade diferente dos demais foi verificada no início do século, quando por meio de injeção de corantes vitais, como o azul de tripan, todos os órgãos se coravam, exceto o cérebro. Porém, ao injetar-se o corante no líquor, havia coloração do tecido nervoso cerebral. Observou-se também, que ao injetar-se toxina tetânica ou bile no LCR, os sintomas de intoxicação eram dez vezes mais graves, que da substância tóxica injetada no sangue. Dessa maneira surgiu o conceito de que qualquer substância que cai no LCR já estaria em contato com o tecido nervoso, entretanto, hoje é sabido que também existe uma barreira entre o líquor (LCR) e o tecido nervoso, a barreira líquor-encefálica e outra entre o sangue e o líquor, barreira hemo-liquórica.

A barreira hematoencefálica(BHE) é composta de uma monocamada de células endoteliais capilares cerebrais(figura 3) que se fundem juntas por “tight

junctions”. Sob condições fisiológicas normais, estas tight junctions formam uma barreira celular contínua, quase impermeável, que previne o influxo passivo de uma variedade de substâncias, com exceção de moléculas lipídicas menores. A ausência de fenestrações, tráfico vesicular e pinocitose nos endotélios capilares cerebrais restringem ainda mais o fluxo livre entre interstício e cérebro. As células endoteliais da BHE contêm numerosos transportadores de membrana envolvidos no influxo e efluxo de vários substratos essenciais como eletrólitos, nucleosídeos, aminoácidos e glicose. Em adição a estes mecanismos carreadores, tem sido relatado transocitose de macromoléculas para dentro e para fora do cérebro ou do LCR. As células endoteliais da BHE também expressam numerosas enzimas metabólicas, tais como fosfatase alcalina, peptidases, etc (Lee et allii,2001).



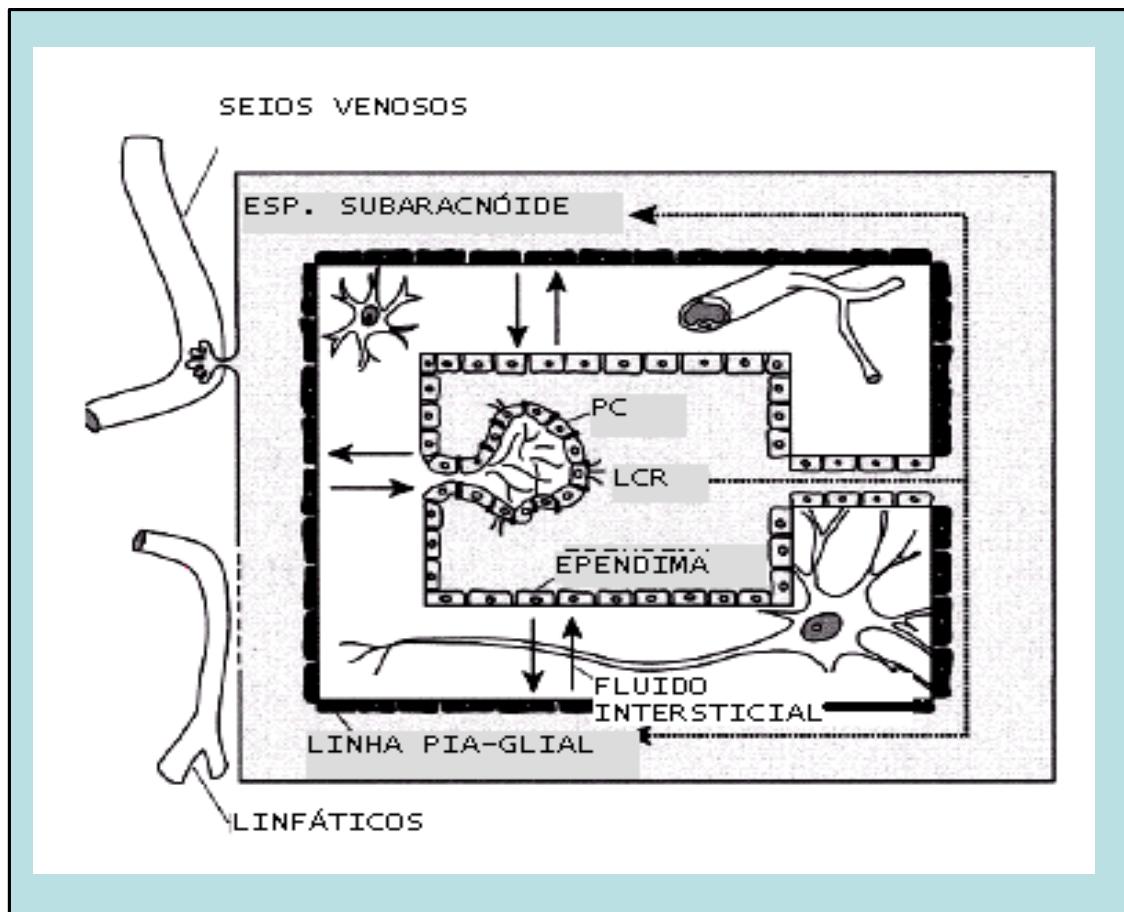
**Figura 3** – Anatomia das interfaces hematoencefálica e hematoliquórica. A: a BHE é formada por células endoteliais dos capilares cerebrais que estão justapostas pô “tight junctions”. B: Capilares do plexo coróide (PC) são fenestrados e cercados por uma membrana basal. Solutos que saem dos capilares coróides chegam ao espaço extracelular que contem fibroblastos e colágeno e devem atravessar o PC antes de entrar no LCR. C: As superfícies ventriculares são margeadas por células ciliadas ependimárias(E) ligadas por “tight junctions”. Uma membrana basal está presente entre as células ependimárias e os processos astrocísticos. Solutos do LCR podem atravessar ou passar entre as células ependimárias para entrar no fluido extracelular cerebral (ECP). D: Margem das superfícies cerebrais, o LCR filtra-se através espaço subaracnóide ( contendo colágeno e a pia-máter) e vem em contato com os limites da glia(que consiste de processos astrocísticos achatados) O LCR pode fazer trocas com o fluido extracelular cerebral atravessando ou por entre os processos gliais(Lee et al.,2001)

### **3.2.2 Plexo Coróide (PC)**

A barreira hemo-liquórica desempenha um papel vital na seletividade e permeabilidade das membranas do plexo coróide (figura 4) para vários nutrientes e xenobióticos . Lee et allii(2001) caracterizam o plexo coróide como um órgão altamente vascularizado em forma de folha que se estende para dentro dos ventrículos. Fisherman (1980) caracteriza sua formação como resultado da invaginação do epêndima para dentro das cavidades ventriculares por células sanguíneas da *pia mater*.

Estudos concernentes a composição do LCR datam da primeira metade do século 20. Houve muito interesse sobre aspectos como o seu volume, local de formação, composição iônica, equilíbrio ácido-básico e o papel na regulação de várias funções autonômicas. O LCR seria mais que a “urina” do cérebro e teria funções significantes além do papel de filtrado (Kazemi et al.,1986).

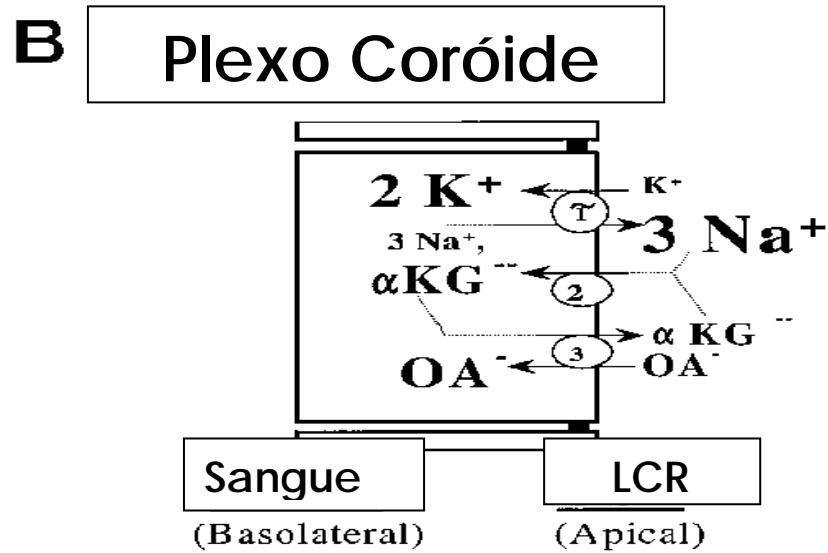
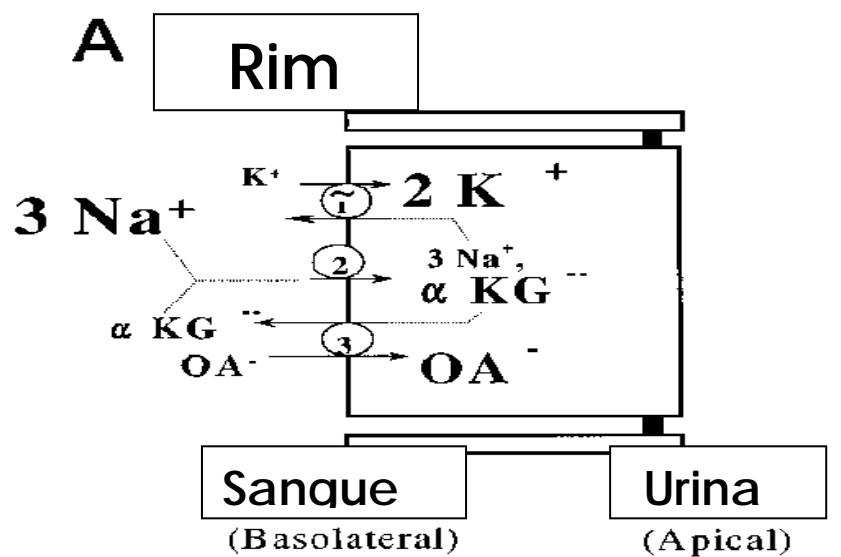
O papel primário do plexo coróide é produzir e manter a composição homeostática do LCR(Lee,2001). Fisherman (1980) cita a enzima sódio-potássio ATPase como tendo função na formação do fluido ventricular. A secreção de fluido coroidal é dependente do transporte ativo de sódio via bomba de sódio, que está presente provavelmente tanto na superfície apical, quanto nas fendas intercelulares. Chobdobski et al.(2001) cita que o LCR é gerado predominantemente pelo tecido coroidal, porém, 10-30% são de origem extracoroidal, e representados pelo volume de fluxo do fluido intersticial do parênquima para dentro dos ventrículos e espaço subaracnóide.



**Figura 4** – Figura esquemática representando o sistema plexo coróide(PC) – LCR  
(Chodobska et al., 2001)

O epêndima margeando as paredes ventriculares não é uma população de células homogêneas. Existem diferentes tipos de células ependimares, margeando regiões distintas do sistema ventricular, sendo que células ependimais cubóides ciliares são as mais abundantes (Pérez-Fígares et al, 2001).

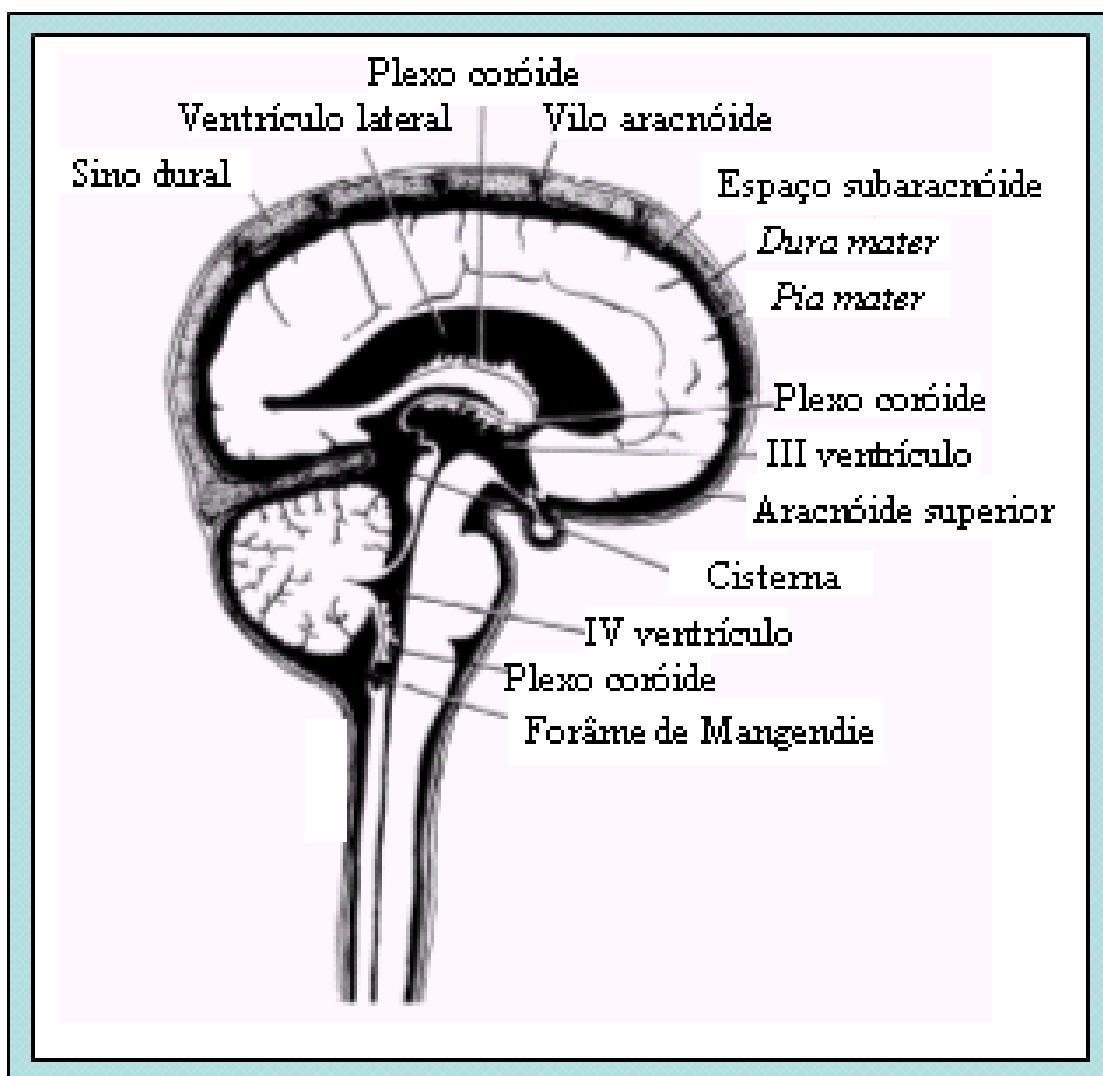
O transporte eletricamente neutro de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  tem sido demonstrado em muitos tecidos dentro do SNC. Estudos usando inibidores de furosamida e bumetanida têm proporcionado evidências para este modo de transporte iônico dos capilares cerebrais e do plexo coróide e a produção de LCR. O transporte de  $\text{Na}^+$  acoplado ao  $\text{Cl}^-$  pode ser um dos meios de regulação da composição iônica e, portanto, do equilíbrio ácido-básico do LCR (Kazemi at al., 1986). Pritchard et al. em 1999, citam que nos rins está bem estabelecido que drogas aniônicas e outros xenobióticos são ativamente transportados do sangue para a urina e que outros epitélios também são capazes de fazer o transporte ativo de ânions orgânicos, destes o plexo coróide é particularmente importante. O transporte de ânions orgânicos como um mecanismo de clearance do LCR foi convincentemente demonstrado por Pappenheimer et al. (1961), os quais sugeriram que o plexo coróide poderia ser o local de transporte, através da observação de que a cultura de epitélio do plexo coróide formava sacos nos quais os componentes se concentravam (Angeletti, 1997). A presença de mecanismos de transporte, isto é, transportadores no plexo coróide levaram a sugestão de Friedheim et al. em 1983, de que o plexo coróide era o rim do sistema nervoso central (figura 5).



**Figura 5** –Diagrama demonstrando os mecanismos de transporte intracelulares renal e coroidal (Pritchard, 199)

### **3.2.3 Compartimentos anatômicos do LCR**

Em vertebrados superiores, o CSF circula através de um compartimento interno (ventrículos e canais comunicantes) e de um externo (espaço subaracnóide). Além disso, estes compartimentos se comunicam abertamente com o fluido intercelular cerebral. O sistema ventricular dos mamíferos consiste de quatro cavidades interconectadas (figura 6), nomeadas como os dois ventrículos laterais que se abrem, através do forame de Monro interventricular, adentrando o terceiro ventrículo. O terceiro ventrículo se comunica com o quarto ventrículo através do arqueduto de Silvius. O quarto ventrículo se abre na cisterna magna do espaço subaracnóide e no canal central da medula espinhal (Pérez- Fígares, 2001).



**Figura 6.** Compartimentos de LCR e sua relação com o cérebro(Kazemi et alli.,1986)

No rato, métodos para acesso ventricular desenvolvidos no passado são apropriados para a retirada de LCR, bem como, para a administração de substâncias. O aparelho estereotáxico é útil para permitir acesso anatomicamente seguro aos espaços contendo LCR (Krinke et al.2000).

### **3.3 Canais Iônicos**

Neurônios e células musculares são excitáveis, ou seja, são capazes de autogerar impulsos eletroquímicos e, em alguns casos, usar esses impulsos para a transmissão de sinais ao longo de suas membranas. A membrana neuronal funciona como uma barreira com permeabilidade seletiva entre o espaço intracelular e extracelular e, em repouso, a membrana é eletricamente polarizada, ou seja, apresenta uma diferença de potencial entre seus dois lados. A polarização da membrana é consequência do fluxo iônico através dos canais transmembrana, que abrem e fecham dependendo da voltagem intra e extracelular(Guyton, 1989; Kandel et al., 1995).

Canais iônicos são compostos por proteínas transmembrana, pelos quais determinados íons podem passar para o interior ou exterior da célula. Existem canais iônicos que possuem um “portão”(gated), também chamados de canais regulados, e canais que não o possuem(non-gated), ou canais de repouso. O fluxo passivo de íons pelos canais sem portão é regulado pela concentração de íons no meio intra e extracelular e pela bomba ativa de sódio e potássio. O fluxo iônico através dos canais com portão é regulado por mecanismos moleculares complexos que variam de acordo com a composição genética de cada subunidade do canal. Essa é uma das bases moleculares que explica os diferentes padrões de comportamento “especializado” dos neurônios (Montenegro et al.,2001).

### **3.4 Canais de Cloreto**

Baljit et alli.(1999), em seu trabalho sobre a seletividade em canais iônicos, demonstra que células excitáveis têm um rico repertório de canais regulados dinamicamente, e esta riqueza e plasticidade permite a elas usar os canais de acordo com suas necessidades. Canais aniônicos são poros de proteína nas membranas biológicas que permitem a difusão passiva de íons negativamente carregados ao longo

de seu gradiente eletroquímico (Jentsch et al.,2001). Embora estes canais possam conduzir outros ânions melhor que o cloreto( $\text{Cl}^-$ ), o ânion predominante do meio extracelular é o cloreto, sendo que vários transportadores e canais participam no processo de translocação deste íon através das membranas celulares plasmáticas e das membranas de organelas intracelulares (Waldegger et alli, 2000).

Jentsch et al.(2001), relata que canais de cloreto estão envolvidos em muitos processos fisiológicos desde a regulação do volume celular e acidificação de vesículas intracelulares até mecanismos intracelulares mais especializados tais como, transporte transepitelial vetorial e regulação da excitabilidade celular. Estudos com “patch-clamp” têm revelado uma variedade de canais iônicos que diferem na sua condutância individual, seletividade de ânions e nos mecanismos de regulação. Eles podem ser classificados também pela sua localização (membrana plasmática ou vesicular).

Canais de  $\text{Cl}^-$  desempenham um papel crucial no controle da composição iônica do citoplasma, o pH é regulado através das trocas de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e das trocas de  $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-/\text{H}^+\text{Cl}^-$  que necessitam de um desvio paralelo de  $\text{Cl}^-$  para a reciclagem do cloreto. Em adição, algumas células também usam próton-ATPases. A regulação do volume das células, é feito em face da hipotonicidade externa, envolvendo abertura de canais de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ativados por volume, resultando no efluxo de sal em rede. Canais de cloreto realizam o transporte de sal e fluido através de muitos epitélios, como nos pulmões, células acinares de várias glândulas e intestino, onde as células apicais secretamativamente  $\text{Cl}^-$ . Na alça de Henle também existe um mecanismo de transporte de  $\text{Cl}^-$ (Jentsch et allii.,2001).

Outra importante função destes canais é a regulação da excitabilidade da membrana elétrica, o que em se tratando de canais de  $\text{Cl}^-$  faz-se óbvia em músculos esqueléticos. A perda da função do canal nestes músculos leva a miotonia, uma hiperexcitabilidade muscular intensa. Existem diversas enfermidades clínicas em que a miotonia é manifestação importante (como a doença de Thomsen) que fazem parte de um grupo de doenças catalogadas como canalopatias, entre elas poderiam ser destacadas a epilepsia e a enxaqueca. Nas células do músculo liso, a abertura de canais de  $\text{Cl}^-$  leva a uma despolarização forte o bastante para causar influxo de  $\text{Ca}^+$  através dos canais de

$\text{Ca}^+$  ativados por voltagem; isso pode ter importância para a resposta da resistência vascular ao estresse mecânico ou para reguladores de vasoconstricção tais como a norepinefrina (Jentsch, 2001).

Fahlke (2001) estudando a permeabilidade e a seletividade de canais de cloreto dependentes de voltagem cita as dificuldades de se estudar em preparações nativas. A clonagem molecular e a subsequente expressão de heterólogos foi o que contribuiu grandemente na investigação das classes de canais iônicos, e isto foi pioneiramente realizado por Jentsch e colegas em 1990, quando descobriram uma família de canais de  $\text{Cl}^-$ , a família ClC de canais de cloro com nove membros nos mamíferos (Jentsch, 2002). Até hoje, somente três classes estruturais distintas de canais de cloreto foram identificadas: canais de cloreto ativados por ligantes (GabaA e receptores de glicina), o regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFRT) (um membro da família de proteínas transportadoras ATP ligantes), e a família ClC de canais de cloreto (Waldecker et al., 2000). Jentsch et allii. (2002) citam ainda os canais de cloreto ativados pelo volume, os canais de cloreto ativados por cálcio e a família do gene p64 de canais de cloreto presumivelmente intracelulares.

### **3.4.1 Canais de Cloreto ativados por ligantes**

Neurotransmissão inibidora rápida no sistema nervoso central de mamíferos é mediada pelos neurotransmissores GABA e glicina. Sua ligação aos receptores abre canais aniônicos intrínsecos, sendo que no sistema nervoso central dos adultos, a maioria conduz ao influxo de  $\text{Cl}^-$ , o qual hiperpolariza o neurônio, inibindo assim a atividade neuronal (Jentsch, 2001). Mihic & Harris (1997), em um artigo de revisão, relatam que quando as moléculas de GABA se ligam aos receptores ativando-os, abrem o canal de cloreto temporariamente e permitem a passagem de moléculas negativamente carregadas, tais como o íon  $\text{Cl}^-$ , passando do meio exterior para o interior celular. Este fluxo iônico faz com que a excitabilidade celular reduza. Existem três subtipos básicos de receptores GABA, GABA-a, GABA-b e GABA-c. GABA-a é o que mais prevalece no cérebro de mamíferos. O receptor GABA-a é similar ao receptor de nicotínico que é relatado como um canal iônico. As classes A e C destes receptores são ligantes de canais de cloreto, enquanto classe B ativa outros canais via

proteína G. Estes receptores possuem sítios de ligação para drogas anti-epilépticas, sedativos e anestésicos.

### **3.4.2 Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística(CFRT)**

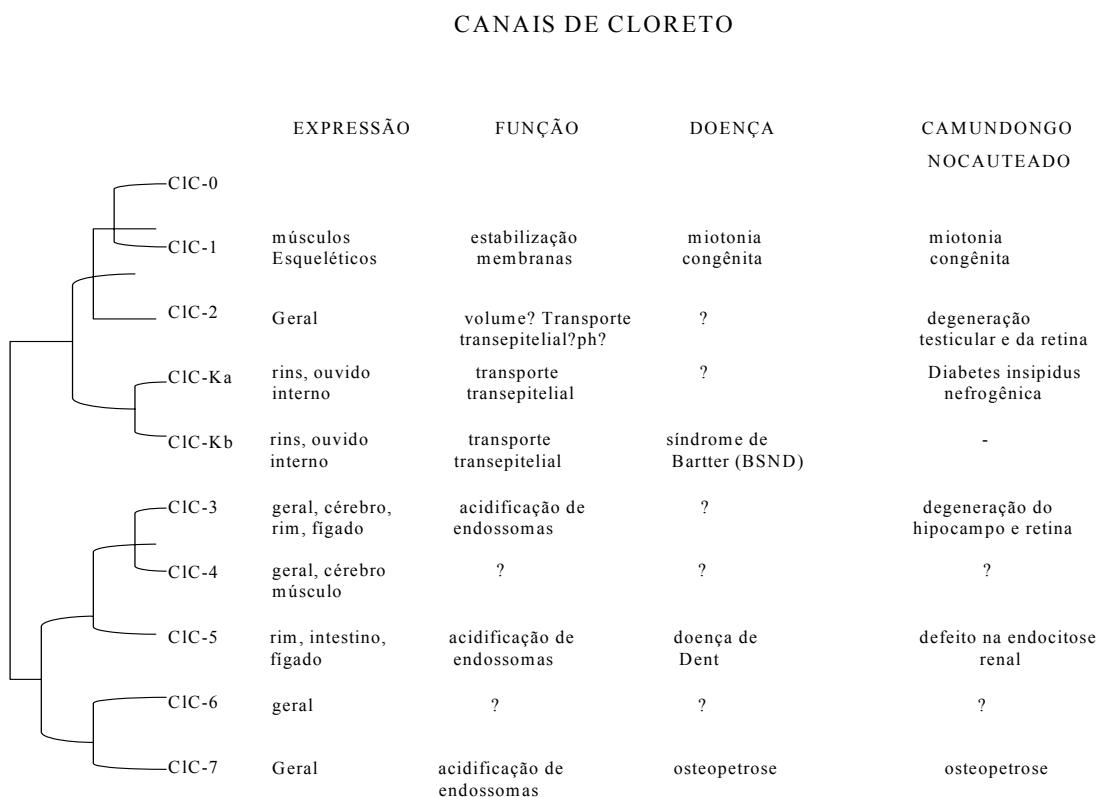
O primeiro canal aniónico a ser identificado por clonagem de posição foi o CFRT. Ele surgiu através da busca pelo “lócus” da fibrose cística (FC) em 1989 (Jentsch et al.,2001). A FC é uma doença genética fatal que afeta primariamente a população caucasiana, embora casos tenham sido reportados em outros grupos étnicos; ela é de uma etiologia complexa, mas é, sobretudo, uma condição que afeta o transporte epitelial e se caracteriza por defeitos na secreção de fluidos de vários epitélios, incluindo glândulas sudoríparas, pâncreas exócrino e vias pulmonares (Fuller et alli, 1992). Ela resulta de mutações em um único gene que codifica uma grande proteína de membrana, o CFRT, que é expresso em múltiplos tecidos de origem epitelial, onde desempenha várias funções presumíveis, sendo a mais conhecida delas, a formação de um mecanismo de transporte de  $\text{Cl}^-$ . Nestes tecidos, CFRT forma um canal de  $\text{Cl}^-$  que é responsável por estabelecer o movimento transcelular apropriado de sal e água para dentro dos espaços luminais. Ele se encontra dentro da superfamília de proteínas transportadoras ABC (McCarty, 2000).

Em alguns epitélios como no cólon, o CFRT pode ser responsável por toda condutância apical de cloreto (Jentsch, 2002). O CFRT age tanto como canal de cloreto, quanto como regulador do transporte epitelial interagindo com  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , canal de  $\text{K}^+$  renal e co-transportadores. Ele parece participar da regulação dos canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) identificados imuno-histoquimicamente e funcionalmente em cérebros de rato, camundongo e homem (Hong-Long et alli., 2002).

### 3.4.3 A família CLC de canais de cloreto

A família CLC de canais de cloreto compreende nove membros (figura 7) em mamíferos que diferem em relação às suas propriedades biofísicas, aos compartimentos celulares e à distribuição nos tecidos. A primeira clonagem de uma canal CLC ocorreu do órgão elétrico da arraia marinha *Torpedo marmorata* e foi crucial para a descoberta dos genes desta grande família. A estrutura destes canais não mostra qualquer homologia com outros canais iônicos e nem guarda semelhanças com canais de cloreto ativados por ligante ou CFRT(Waldegg et al.2000)

**Figura 7** - Classificação das diversas famílias CLC (Jentsch,2002).



No sistema nervoso central, o canal ClC-2 é abundantemente expresso em células piramidais do hipocampo e em células de Purkinje do cerebelo e menos expresso em outros neurônios e glia. Ele pode ser ativado por hiperpolarização, por volume celular e por acidificação extracelular. A seqüência de seletividade por halogênios do ClC-2 é  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ . Ele é inibido inespecificamente por  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Correntes de  $\text{Cl}^-$  ativadas por hiperpolarização tem sido observadas em vários tecidos e células do SNC, incluindo neurônios, glia e células epiteliais do plexo coróide (Jentsch, 2002).

Schmidt-Rose et al.(1997) cita que ClC-2 pode desempenhar papéis no controle do volume celular e na concentração de cloreto intracelular, o que seria importante para a transmissão sináptica em certos neurônios. Gyömörey et allii (2000), estudando os canais ClC-2 no intestino de camundongos, relata que este canal de cloreto não CFRT contribui para a secreção de cloreto ativada pelo volume em íleo de camundongo. Gründer et allii.(1992) propuseram que canais ClC-2 possuem um papel na resposta celular ao volume e estímulo osmótico. Staley et allii.(1996) cita que este canal pode ser co-optado para modulação da excitabilidade elétrica em alguns neurônios. Wills et al.(2001) em um trabalho de revisão sobre ClC, relatam que o ClC-2 está presente na maioria das células que expressam o canal CFRT e pode ser considerado como uma opção para correção do mal funcionamento do transporte de cloreto em epitélios afetados pela fibrose cística. Também é citada a possível função de modulação da excitabilidade da membrana nos neurônios. Speake at al. (2002), estudando camundongos nocauteados para o ClC-2, verificaram que correntes retificadoras da condutância de ânions para o interior das células do plexo coróide persistem nestes animais, propondo que possivelmente haveria um outro canal responsável por esta função.

Debska et alliin (2001) cita na família P64 encontrada em muitas membranas intracelulares, canais agindo em conformação com bombas próton eletrogênicas, regulando o pH no interior das vesículas, expressos por “Northern analysis”, abundantemente no cérebro e retina, com alto nível de expressão no sistema límbico da formação hipocampal, amygda, hipotálamo e septum.

### **3.5 Conceitos básicos sobre o EEG**

A eletroencefalografia é a ciência que estuda a atividade elétrica do cérebro. Os registros da atividade elétrica cerebral são obtidos por meio de eletrodos localizados superficialmente na cabeça (Chatrian et al., 1974). O eletroencefalógrafo clínico correlaciona as funções do SNC, bem como as definições e doenças com certos padrões do EEG sobre uma base empírica (Niedermeyer, 1999).

Caton em 1875, trabalhando com macacos e coelhos, foi o primeiro a usar o EEG como identificador da atividade sensorial do cérebro. Ele analisou a atividade neurológica diretamente no cérebro destes animais enquanto estes recebiam estimulação visual. Ele verificou que a zona occipital do encéfalo respondia sempre que uma luz passava em frente dos olhos dos animais. A eletroencelografia entrou na prática clínica depois que Adrian e Mathews demonstraram, em 1934, a veracidade dos registros e trabalhos de Berger. A Berger, portanto, corresponde a paternidade do método e sua aplicação clínica (apresentada em 1924). Entre os pioneiros da aplicação da eletroencefalografia clínica destacam-se no estudo das epilepsias os nomes de Gibbs, Davis e Lennox, assim como o de Walter na localização de tumores intracranianos(Silveira, 2002).

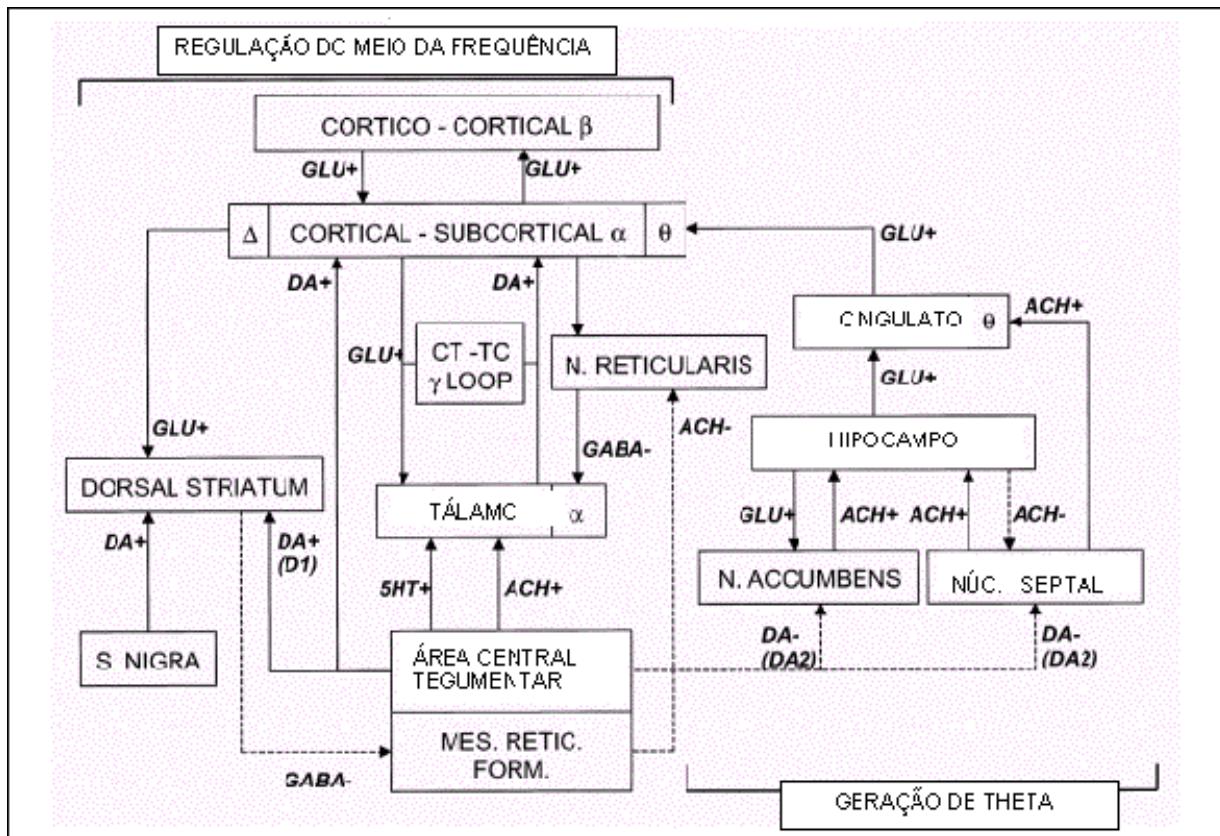
Os neurônios têm a habilidade de se comunicar de forma extremamente rápida e precisa, por longos trajetos. Em média, um neurônio forma mil sinapses e recebe mais de 10 mil conexões. Os principais geradores elétricos cerebrais são os neurônios piramidais, posicionados em forma de paliçada predominante nas camadas corticais III e V, de forma paralela a superfície do escâlpo. Durante o EEG, os eletrodos no escâlpo registram a atividade elétrica extracelular de um grupo de neurônios corticais, que são potenciais de campo na zona dendrítica e potenciais de polarização oposta na zona dos corpos celulares, produzindo um dipolo. A atividade elétrica cerebral é espontânea e contínua, podendo ser evidenciada durante a vigília, o sono, a anestesia e o coma, cessando apenas nos estados extremos de anoxia cerebral. É captada sobre o couro cabeludo, base do crânio, sobre o cérebro exposto ou na profundidade do mesmo (Montenegro et al. 2001).

Neurônios marca-passos distribuídos pelo tálamo oscilam sincronicamente no espectro de freqüência alfa (7.5 – 12.5 Hz), estes produzem o ritmo

alfa, o qual domina o EEG de uma pessoa normal alerta em repouso. O núcleo reticular pode hiperpolarizar as membranas celulares de neurônios talâmicos pela liberação de GABA, diminuindo o ritmo alfa dominante, passando ao espectro teta, mais lento (3.5 – 7.5 Hz), e diminuindo a produtividade sensorial para o córtex. A atividade teta também pode ser gerada pelo sistema límbico, possivelmente por células marca-passo teta no núcleo do septo, o qual pode ser inibido pelas influências entorrinais e hipocampais. Acredita-se que a lenta atividade delta (1.5 – 3.5 Hz) é originada em neurônios oscilatórios de camadas corticais profundas no tálamo, inibidas normalmente pela entrada de ascendentes reticulares ativando o sistema de meio cérebro. A atividade delta pode refletir a hiperpolarização de neurônios corticais resultando em desdiferenciação da atividade neural. A atividade da banda beta (12.5 – 20 Hz) parece refletir transações córtico-corticais e tálamo-corticais relacionadas ao processamento da informação específica. A atividade da banda gama (25 – 50 Hz) pode refletir circuitos reverberatórios córtico-tálamo-corticais, bem como propagação antiga de descargas axonais para os dendritos de células piramidais corticais, que podem desempenhar importante papel na percepção (John, 2002).

O EEG denota variação da voltagem no tempo. A voltagem registrada determina a amplitude da onda, e uma escala é necessária no traçado. A medida de voltagem de cada onda é ineficaz, sem finalidade prática e sujeita a erros. Geralmente a amplitude é considerada baixa, média ou alta, após uma avaliação geral do traçado. Amplitudes altas são frequentes em crianças, durante a hiperpnéia, e em ritmos de frequência inferior a 13Hz. Amplitudes baixas são registradas em situações de ansiedade, dor, e por vezes lesões cerebrais importantes. A interpretação dos achados na variação de amplitude é muito importante devido ao grande número de situações que podem acarretar tal variações. As anormalidades paroxísticas do EEG podem ser ictais ou interictais. Costumam se iniciar por alterações na frequência do traçado, denotando que um novo evento eletrofisiológico está ocorrendo. A alteração de frequência pode ocorrer também com alteração da amplitude das ondas, por rápidas quedas ou incrementos de voltagem. Vale ressaltar que descargas paroxísticas no EEG são indicadores de um desvio do comportamento neuronal que pode ou não estar relacionado a crises epilépticas.

## REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DO EEG



**Figura 8.** Representação esquemática do sistema homeostático que regula os parâmetros definindo o estado basal da atividade elétrica cerebral (John, 2002).

No esquema da figura 8 vemos uma hipótese que demonstra um complexo de interações relevantes para a consciência. Assumindo-se que um indivíduo esteja sonolento, com diminuição na atividade do sistema de ativação reticular ascendente, o EEG é dominado por lentas ondas delta e teta, refletindo a inibição do tálamo por núcleos reticulares e consequente diminuição da entrada de sinais para o córtex. A ativação da formação reticular mesencefálica e do núcleo do relé talâmico por um rápido aumento do estímulo ambiental resulta em inibição do núcleo reticular via colateral por um mediador colinérgico ou serotoninérgico, liberando assim, as células talâmicas da inibição pelo núcleo reticular. A atividade dominante do espectro de força do EEG torna-se mais rápida, com o retorno da atividade alfa. O fluxo de informação aumentado do tálamo para o córtex é facilitado, resultando em interações córtico-corticais refletidas pelo aumento da atividade beta. A detecção coincidente por células piramidais, comparando esta entrada exógena com a saída de impulsos elétricos da atividade endógena, ativa “loops” córtico-talâmicos gerando atividade gama e mediando a percepção da informação sensorial (John, 2002).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais de laboratório utilizados**

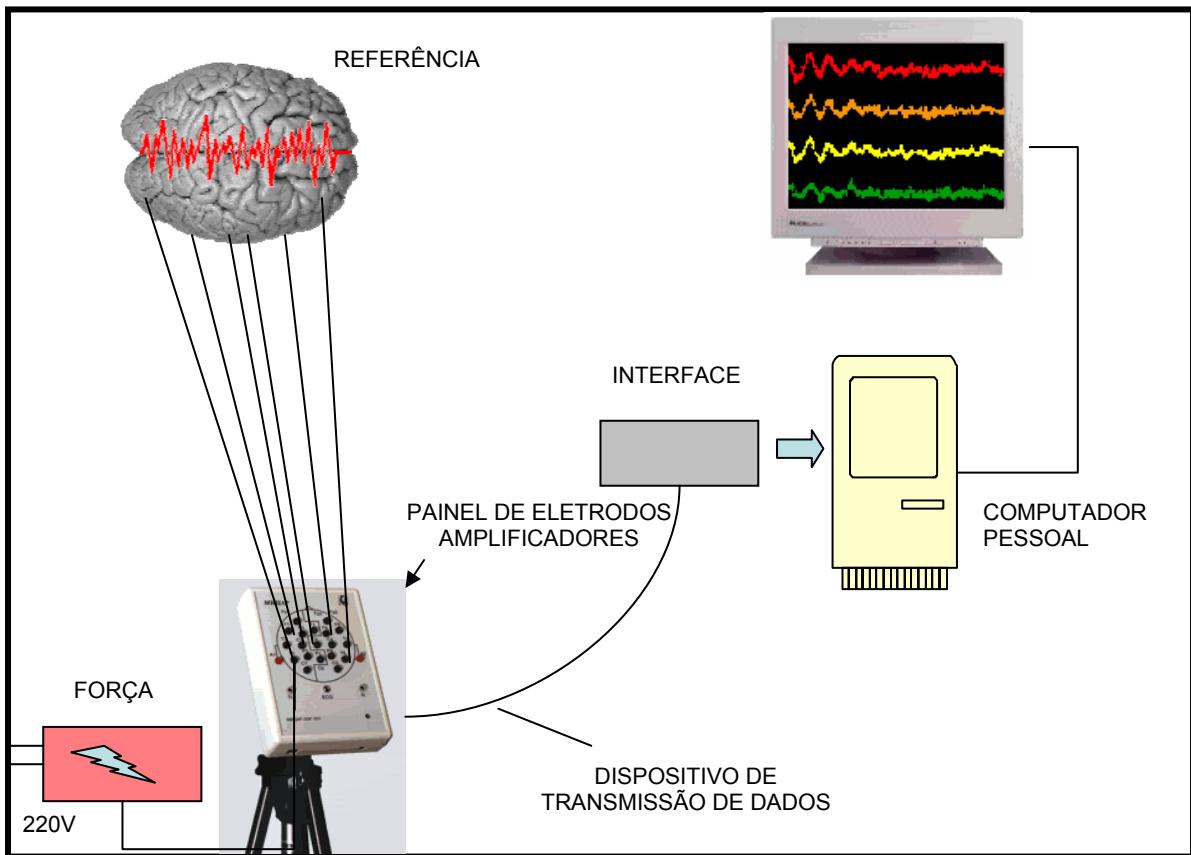
Ratos Wistar machos sadios, pesando entre 220-270 gramas, provenientes do Biotério Central da UFC, foram mantidos em jejum durante vinte e quatro horas antes dos procedimentos experimentais, com livre acesso à água. O anestésico utilizado foi uma mistura de quetamina(100mg/kg I.P.) e xilazina (50mg/kg I.M.) (Virbac-Brasil).

### **4.2 Avaliação eletrofisiológica: eletroencefalograma e eletrocardiograma**

Para avaliar qualitativamente os padrões eletroencefalográficos e eletrocardiográficos, como o aparecimento de pontas e a amplitude absoluta média, foi feita uma monitorização dos grupos controle e tratamento por infusão intracisternal de guanilina e uroguanilina, considerando-se subgrupos antes, durante e após a infusão das drogas.

O EEG reflete mudanças instantâneas no estado da atividade do SNC e assim indica primariamente o estado de despertar, anestesia ou atividade excitatória caracterizada por spikes(pontas) e fusos(Krinke,2000).

Usou-se o sistema EMSA®, formado por um pré-amplificador, amplificador e conversor analógico digital, além de um microcomputador compatível com a marca IBM. Para o estudo da atividade espectral e da amplitude absoluta média das diversas faixas de freqüência do eletroencefalograma foi usado o “software” Braintech®.O programa Braintech faz a análise matemática do sinal e informa os resultados através de gráficos, mapas, tabelas, etc.



**Figura 9.** - Sistema de captação, análise e armazenamento dos sinais eletroencefalográficos e eletrocardiográficos. Este sistema originalmente é utilizado para realização de EEG digital em pacientes humanos. Foi adaptado para uso em animais, com utilização de um menor número de eletrodo (dez) (Cardoso do Vale, 2000).

#### **4.3 Cirurgia estereotáxica**

O procedimento cirúrgico com o objetivo da implantação de uma cânula guia no cérebro, para infusão da guanilina e uroguanilina, foi realizado através de estereotaxia, sendo a técnica de abordagem da cisterna magna feita de acordo com o método proposto por Consiglio & Lucion (2000) destinado à coleta de líquido céfalo-raquidiano.

Os pontos de referência externos utilizados para localizar núcleos e regiões cerebrais no rato tomam por base certas características craniais, como por exemplo os pontos de intersecção entre os ossos, isto é, encontro de suturas ósseas; três pontos de referência usados são o bregma, o lambda e a linha interaural.

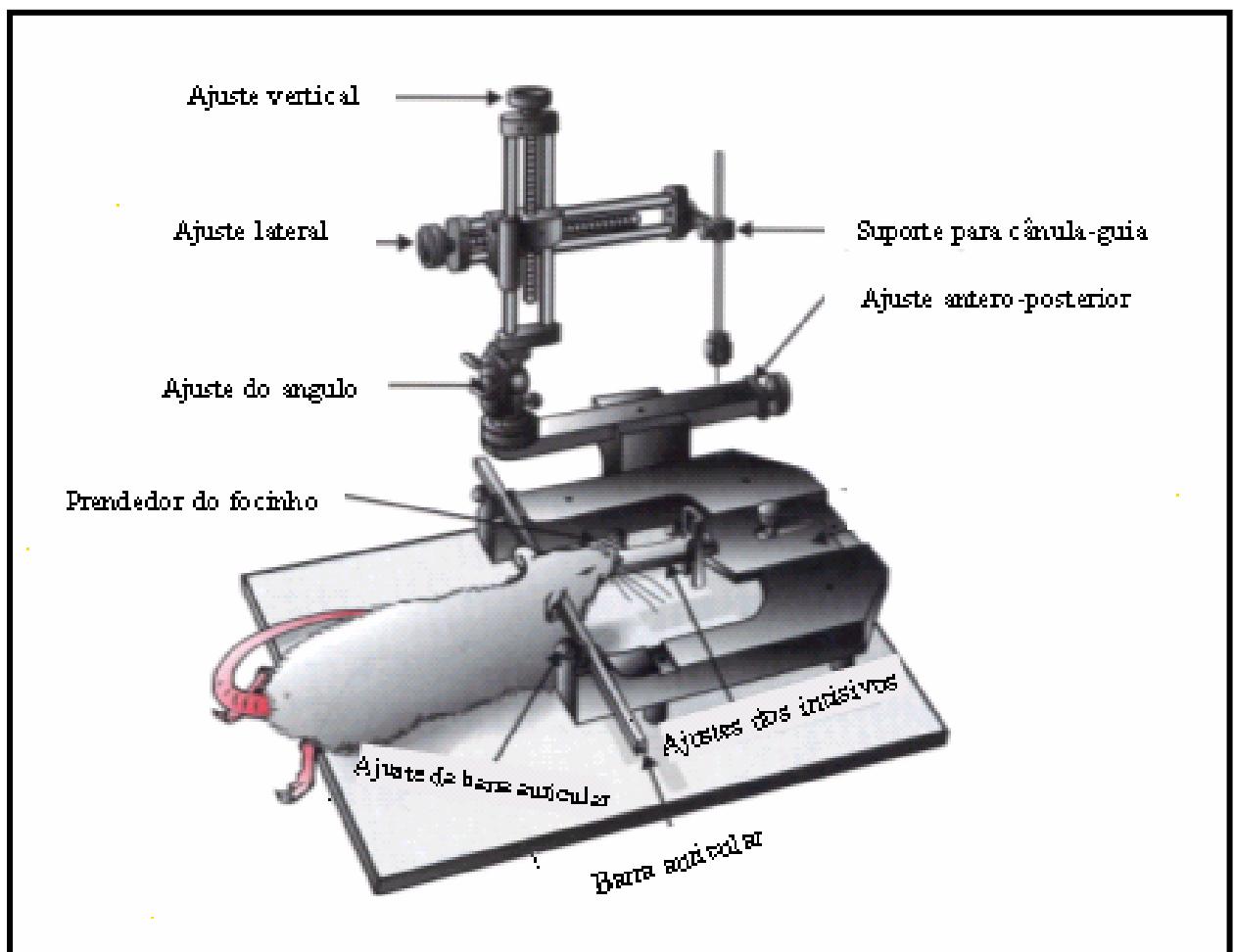
O aparelho estereotáxico se constitui de uma estrutura metálica formada por um fixador de cabeça, uma torre estereotáxica (o que possibilita a localização das coordenadas desejadas) e um suporte para acoplamento de microseringas. O animal tem sua cabeça imobilizada no aparelho através de duas barras auriculares introduzidas no meato auditivo externo e uma barra que fixa os dentes incisivos (Campos & Renault, 1999).

Além do aparelho estereotáxico, (figura 10), utilizou-se em cada cirurgia, uma cânula guia de metal medindo aproximadamente 16mm de comprimento e 0,6mm de diâmetro (agulha B-D cortada 27 G), dois parafusos “âncoras” de aço inoxidável (parafusos para ótica) para fixação da cânula guia e acrílico dental autopolimerizável (B-D São Paulo).

Após a anestesia, os animais experimentais foram tricotomizados e posicionados no aparelho, a pele foi desinfetada, excisada e rebatida. Os animais sofreram uma incisão na região superior do crânio de aproximadamente 2 cm de comprimento, sendo em seguida retirado o periôsteo. Para uma boa fixação da cânula guia, foram implantados os dois parafusos próximos ao bregma (figuras 11 e 12) utilizando-se uma broca odontológica para perfurar dois orifícios no osso e uma pequena chave de fenda para o encaixe das duas “âncoras”. A cânula guia, colocada em uma haste de aço, presa à torre estereotáxica, foi posicionada em direção ao bregma

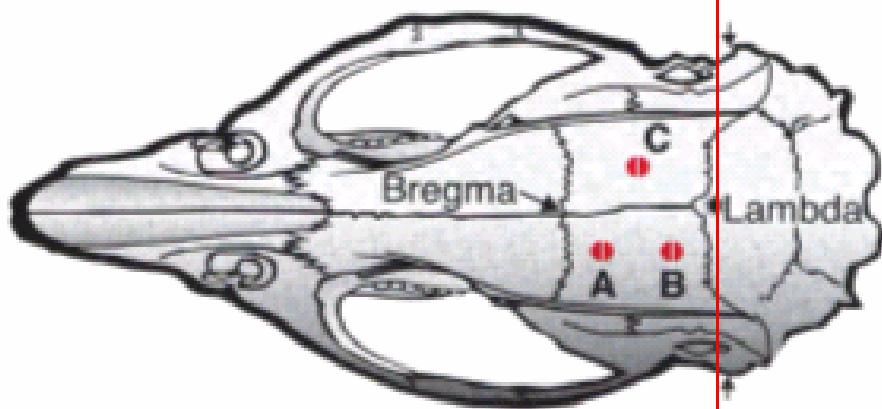
(figura 11). Os parâmetros estereotáxicos para a canulação da cisterna magna do rato foram: Antero posterior(AP) = -2,7 mm (posterior a linha inter-aural); vertical (V) = -6,2 (abaixo da dura-mater); lateral (L) = 0; ângulo ( $\theta$  = 31°); incisivo superior = - 3,2 mm sob a linha inter-aural.

Quando o estereotáxico foi inclinado ( $\theta$  =31°) sobre o ponto (AP) = - 2,7 mm, a ponta da cânula foi deslocada do ponto AP original. Assim moveu-se acima da linha anterior- posterior de modo a atingir o alvo previsto. Depois da introdução da cânula guia, a mesma e os parafusos foram fixados com o acrílico autopolimerizável deixando exposta uma porção de aproximadamente 0,5cm da porção superior da cânula-guia (figuras 13 e 14).

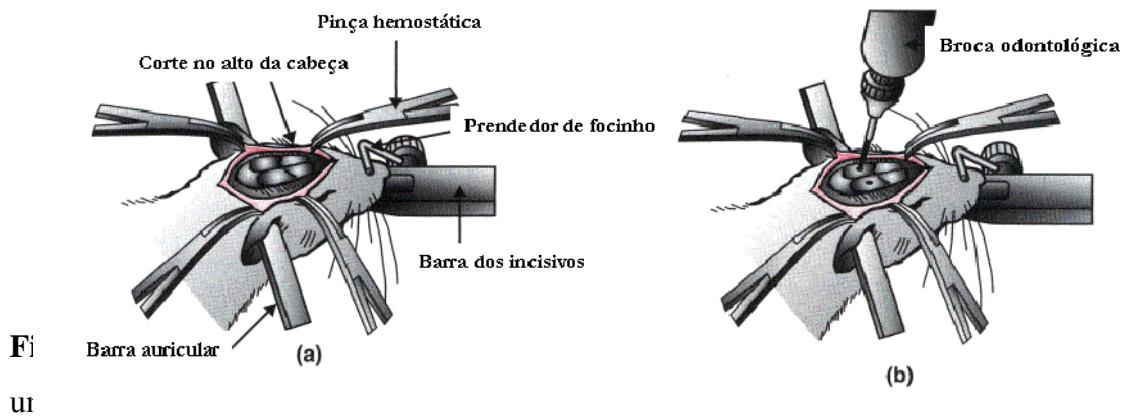


**Figura 10:** Aparelho Estereotáxico

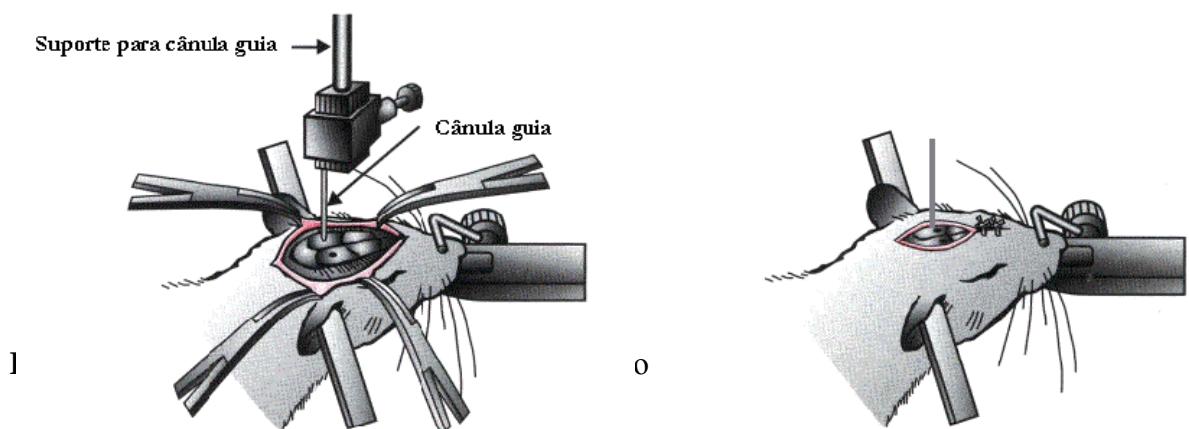
**D**

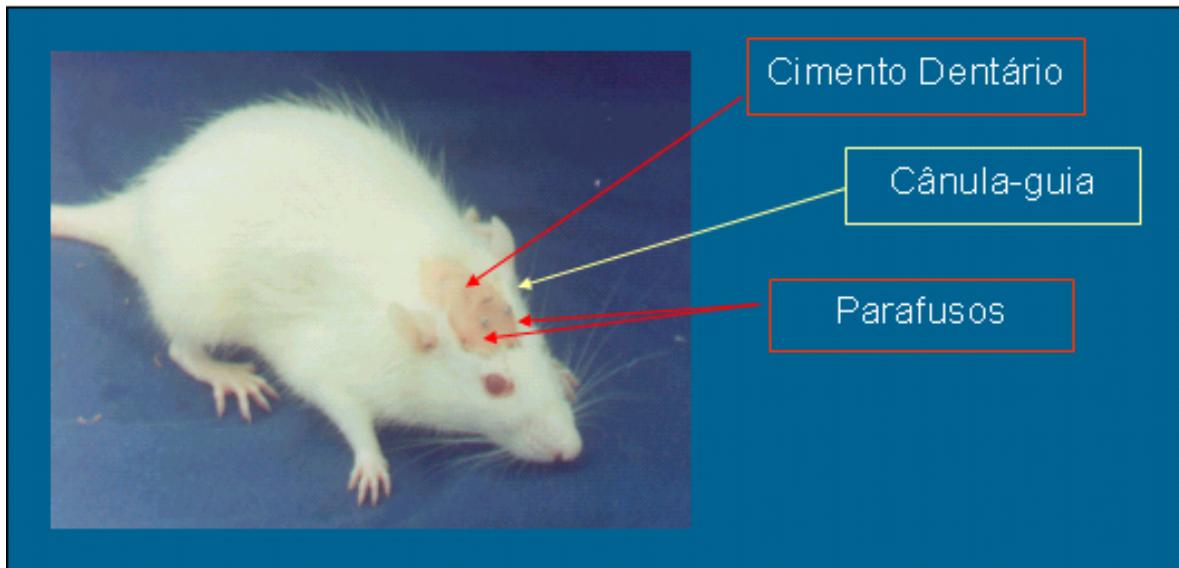


**Figura 11:** Suturas ósseas; A, B e C pontos para implantação de parafusos; D – linha interaural



UI





**Figura 14:** Rato wistar não anestesiado com cânula-guia implantada na cisterna magna

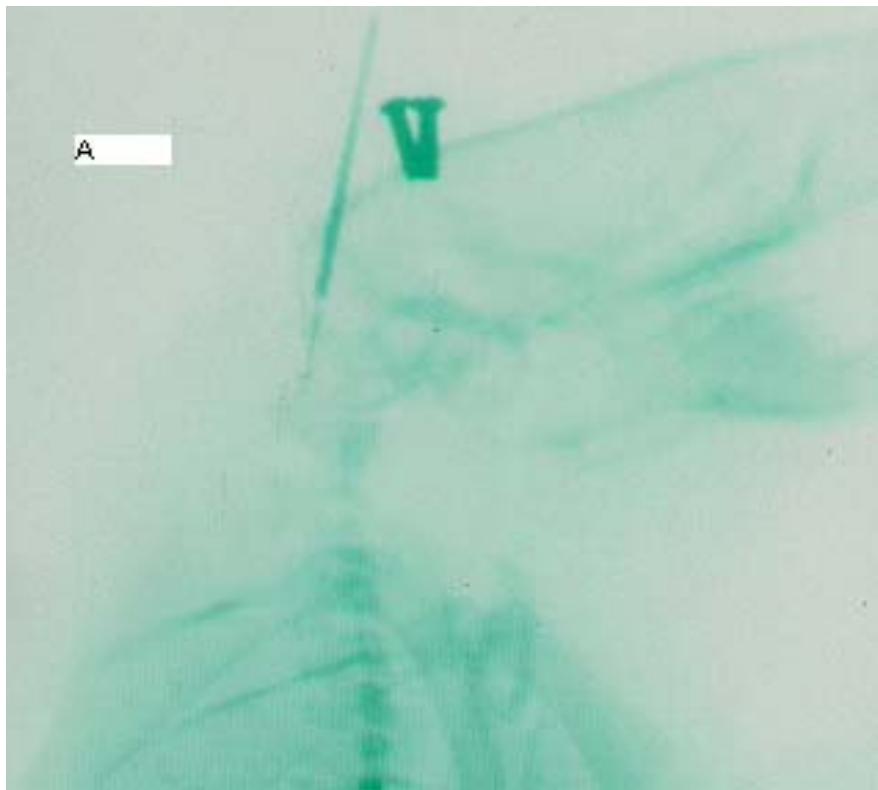
#### 4.4 Coleta de Líquido Céfalo-Raquidiano (LCR)

Passados dois a três dias após a cirurgia para a implantação das cânulas guia, procedeu-se a tentativa de coleta de líquido céfalo-raquidiano por meio de um escalpe (tamanho 25x8, marca B-D) acoplado a uma seringa de 1ml. Para este procedimento, que confirma se a cânula foi corretamente implantada em direção a cisterna magna, os animais não necessitam estar anestesiados. Com a inserção da agulha do escalpe dentro da cânula guia, é possível verificar um aumento da resistência devido ao parênquima cerebelar e demais estruturas da cisterna magna e posteriormente um decréscimo da resistência é sentido quando a agulha do escalpe penetra na cisterna magna, surgindo um líquido transparente, o LCR.

#### 4.5 Cisternografia

Para atestar a eficácia do procedimento cirúrgico de implantação da cânula, realizou-se uma radiografia (figura 14) utilizando-se contraste iodado(100 $\mu$ l), sendo este injetado na cânula-guia(cisternografia). Um grupo de ratos, n=5, sofreu este procedimento radiográfico, os animais foram posicionados ventralmente durante a infusão do contraste, e para as radiografias eles foram mantidos em posição lateral. A

infusão foi feita através de uma seringa acoplada à cânula-guia e a cisternografia sucedeu-se após 5 minutos. Este método permitiu a visualização do contraste distribuindo-se através da cisterna magna para o espaço sub-aracnóide e cavidades ventriculares dos animais.



**Figura 15.** Cisternografia. Radiografia A: Contraste não se distribuiu pela canal medular do rato; Radiografia B: Contraste se distribuiu pela medula espinhal.

#### **4.6 Infusão de Guanilina e Uroguanilina**

A infusão intracisternal de guanilina e uroguanilina foi realizada sob monitorização eletoencefalográfica e eletrocardiográfica. Os animais foram divididos em grupos: o controle no qual foi infundido 100 $\mu$ l de salina na cisterna magna, o grupo guanilina, dois grupos uroguanilina, o grupo com ácido niflúmico e o último grupo com nedocromil sódico.

Usou-se uma bomba de infusão (Hamburg) na velocidade de 150 $\mu$ l/ 30 minutos acoplada a um escalpe cuja cânula permaneceu inserida na cânula guia, atingindo a cisterna magna. Foram gravados os registros eletoencefalográficos realizados antes, durante (aproximadamente 30 minutos) e após a infusão das drogas.

#### **4.7 Bloqueadores**

Com o objetivo de se investigar o mecanismo de ação, realizou-se a infusão (pré-tratamento) intracisternal de duas drogas que apresentam possíveis propriedades inibitórias sobre os canais de Cl<sup>-</sup>, sendo elas: o ácido niflúmico e o nedocromil sódico.

#### **4.8 Análise Estatística**

Os dados brutos foram analisados para diferenças estatisticamente significativas por testes paramétricos. As amplitudes das amplitudes médias absolutas dos diversos espectros de onda ( $\mu\text{V}$ ) e das pontas, além da média do número de pontas, foram comparados com seus respectivos controles internos pelo teste t de student pareado bicaudal com significância estabelecida quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula for menor que 5%.

Quando conveniente, para analisar dose-dependência e diferenças entre grupos, foi utilizada a análise de variância “one way” ANOVA seguido do teste de contraste de Tukey com confiança de 95%.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Efeito da guanilina sobre a amplitude absoluta média dos espectros alfa e teta e sobre o número de pontas por minuto encontradas no EEG**

As tabelas 1 e 2 demonstram os valores das amplitudes médias nos espectros de freqüência alfa e teta do EEG obtidos a partir da avaliação quantitativa do grupo controle guanilina (antes da infusão), do grupo durante a infusão e após a infusão. A tabela 3 demonstra o número de pontas por minuto obtidos do EEG da região frontal nos três momentos da infusão (antes, durante e após) em ratos anestesiados.

**Tabela 1-** Amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Os valores são expressos em  $\mu\text{V}$  (microvolts).

ANTES		DURANTE		APÓS	
F3	F4	F3	F4	F3	F4
R1 150,0	110,870	163,040	123,040	156,520	130,430
R2 156,52	150,000	176,090	156,520	143,480	130,430
R3 163,4	163,040	195,650	176,080	182,600	176,080
R4 117,39	78,260	176,090	91,300	169,560	78,260
R5 182,61	97,830	163,040	91,300	143,750	280,430

**Tabela 2-** Amplitude absoluta média do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Os valores são expressos em  $\mu\text{V}$ (microvolts).

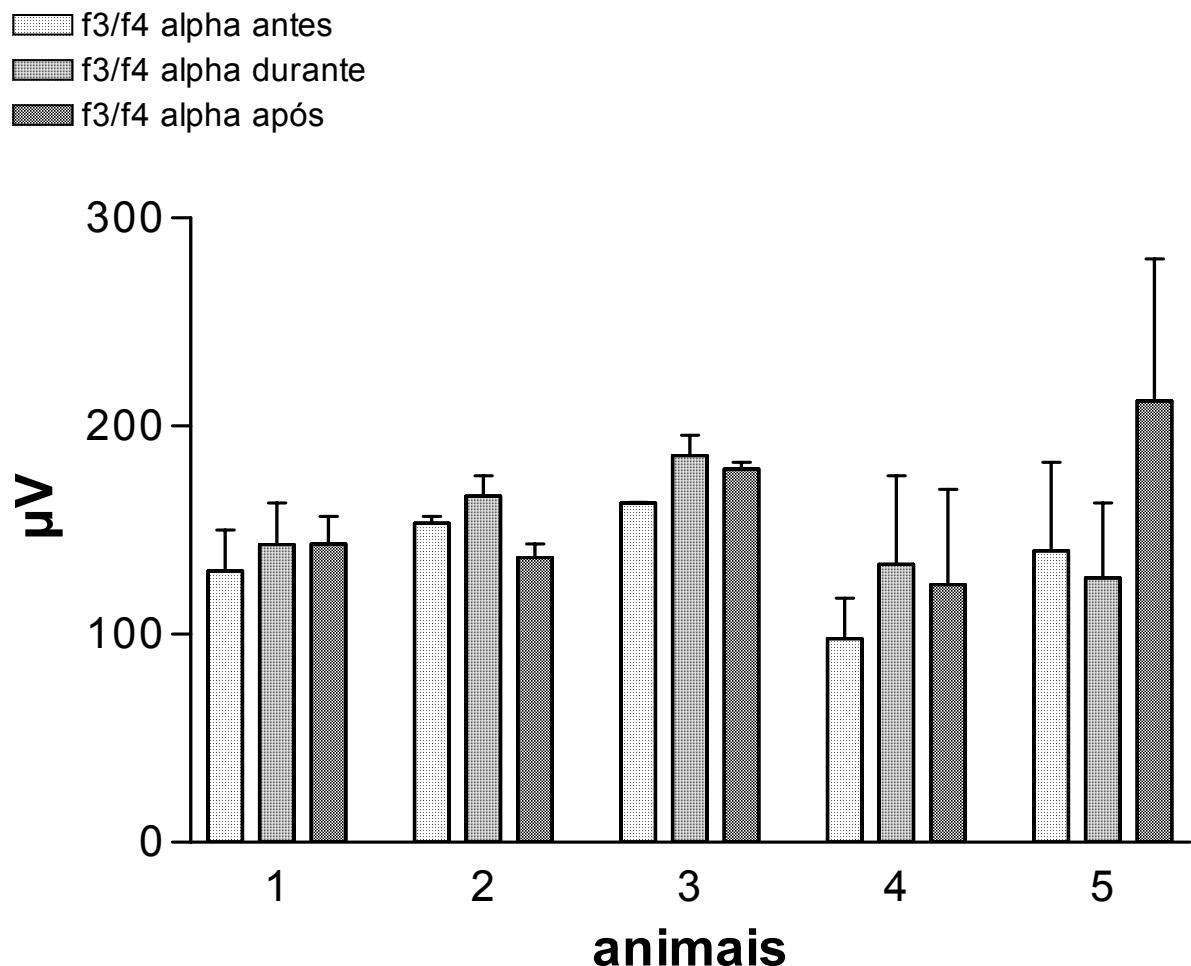
ANTES		DURANTE		APÓS	
F3	F4	F3	F4	F3	F4
R1 211,20	160,90	201,00	159,80	234,30	209,20
R2 206,10	148,30	248,30	166,40	171,60	156,10
R3 224,50	196,90	272,80	237,20	273,00	240,00
R4 162,10	106,10	193,60	129,50	177,20	102,30
R5 211,40	112,80	205,30	110,10	171,80	416,80

**Tabela 3-** Número de pontas por minuto observadas no EEG da região frontal antes, durante e após a infusão de guanilina ( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em cinco animais.

ANTES	DURANTE	APÓS
R1 74,130	58,280	79,620
R2 62,400	67,450	70,960
R3 80,010	142,200	167,200
R4 57,140	64,070	52,850
R5 80,000	64,630	72,100

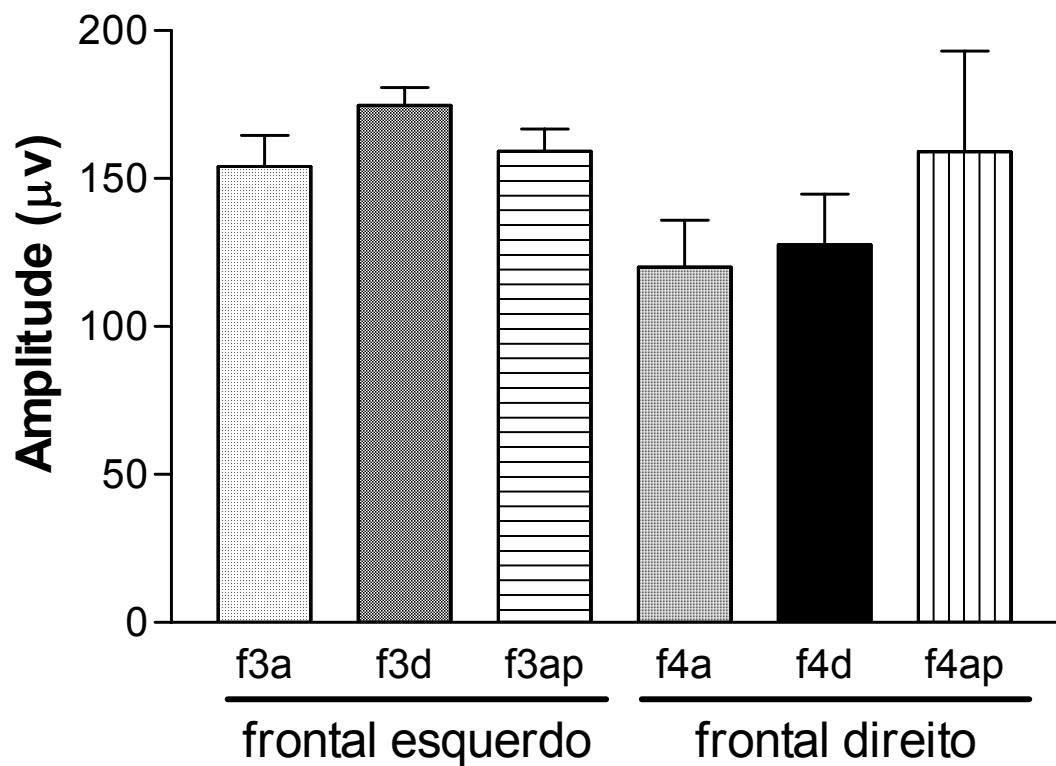
Observa-se na figura 16 as amplitudes absolutas médias ( $\mu\text{V}$ ) do espectro alfa do EEG de cinco animais antes, durante e após a infusão intracisternal de guanilina na dose  $2\mu\text{g}/\text{min}$ . As amplitudes absolutas médias ( $\mu\text{V}$ ) do espectro alfa do EEG nas regiões frontais esquerda (F3) e direita (F4), estão demonstradas na figura 17: antes(f3a e f4a), durante (f3d e f4d) e após (f3ap e f4ap); em cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ). Na Figura 18 vemos as amplitudes absolutas médias ( $\mu\text{V}$ ) do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão.

### Amplitude Absoluta Média espectro alfa



**Figura 16 – Amplitudes absolutas médias ( $\mu$ V) do espectro alfa** do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{g}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão.

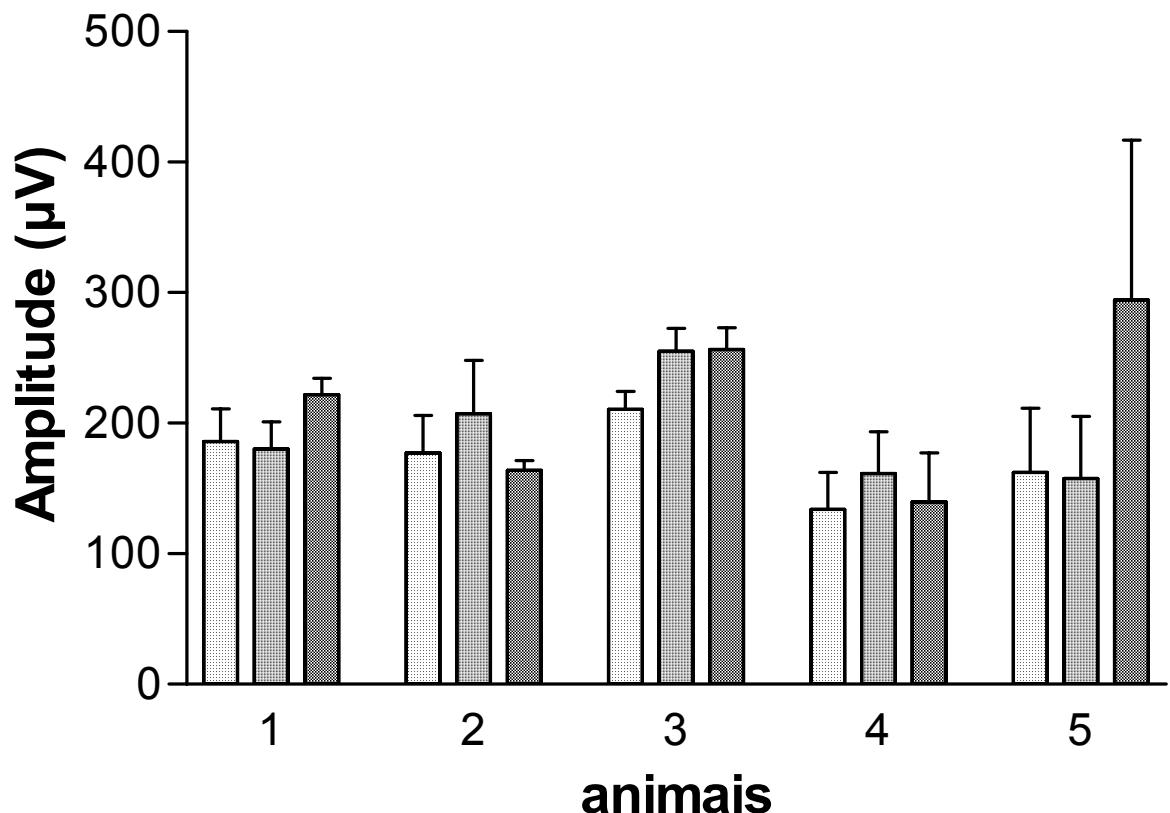
## **Amplitudes Absolutas médias nas regiões frontais esquerda e direita**



**Figura 17** - Amplitudes absolutas médias ( $\mu$ V) do espectro alfa do EEG nas regiões frontais esquerda (F3) e direita (F4), antes(f3a e f4a), durante (f3d e f4d) e após (f3ap e f4ap); em cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{g}/\mu\text{g}/\text{min}$ ).

### Amplitude Absoluta Média espectro teta

■ f3/f4 teta antes  
■ f3/f4teta durante  
■ f3/f4 teta após



**Figura 18** - Amplitudes absolutas médias ( $\mu$ V) do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de guanilina ( $2\mu\text{g}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão.

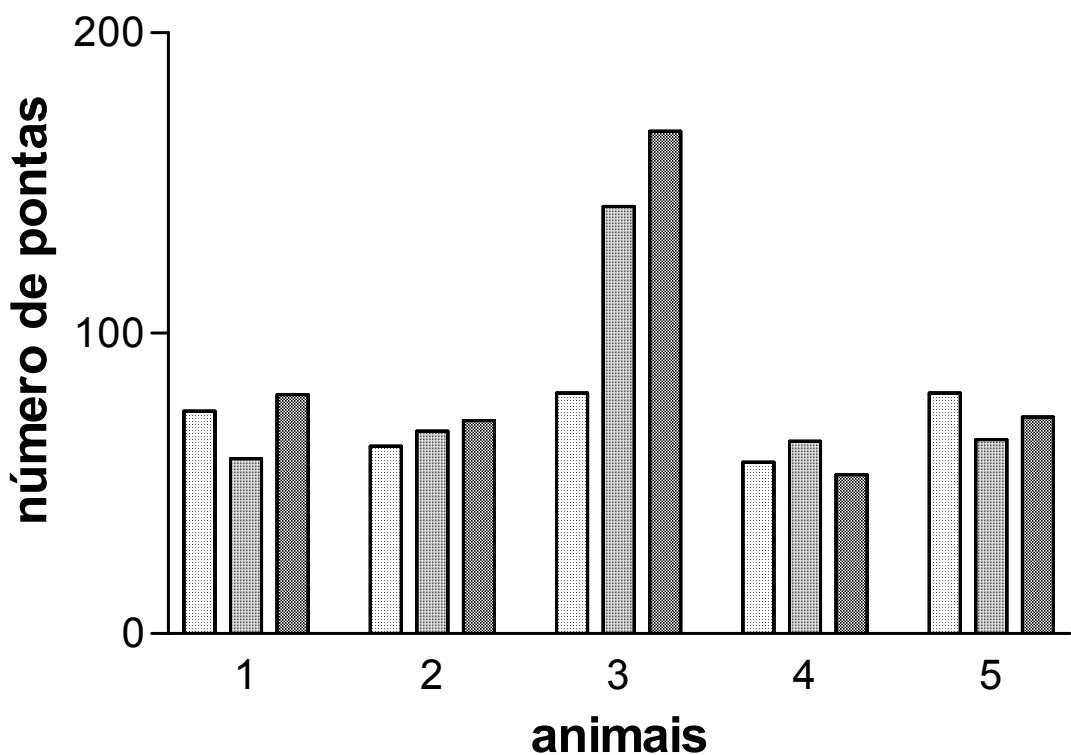
O número de pontas por minuto observadas no EEG da região frontal está demonstrado na figura 19 em três momentos: antes, durante e após a infusão de guanilina ( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em cinco animais.

Número de pontas guanilina

■ antes

■ durante

■ depois



**Figura 19** – Número de pontas por minuto observadas no EEG da região frontal antes, durante e depois da infusão de guanilina ( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em cinco animais.

Nos resultados com a guanilina ( $2\mu/\mu\text{g}/\text{min}$ ), não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas quanto à amplitude absoluta média nos espectros de freqüência alfa e teta. Na análise do número de pontas por minuto observamos uma tendência de aumento no número de pontas por minuto durante e após a infusão, sem significação estatística.

Vemos na tabela 4 o número de pontas por minutos presentes no EEG de seis animais que receberam a dose de  $2\mu/\mu\text{g}/\text{min}$  de uroguanilina intracisternal.

O número de pontas por minuto no EEG de cinco animais é demonstrado na tabela 5 na dose de  $6\mu/\mu\text{g}/\text{min}$  de uroguanilina por via intracisternal; antes, durante e após a infusão.

**Tabela 4-** Número de pontas por minutos observadas no EEG de seis animais que receberam a dose de  $2\mu\text{g}/\text{min}$  de uroguanilina intracisternal; antes, durante e após a infusão.

ANTES	DURANTE	APÓS
305,0	322,0	553,0
161,0	382,0	385,0
77,0	114,0	315,0
522,0	576,0	623,0
248,0	247,0	316,0
574,0	625,0	460,0

**Tabela 5** - Número de pontas por minuto observadas no EEG de cinco animais que receberam a dose de  $6\mu\text{g}/\text{min}$  de uroguanilina intracisternal; antes, durante e após a infusão.

<b>ANTES</b>	<b>DURANTE</b>	<b>APÓS</b>
396,0	549,0	316,0
464,0	542,0	563,0
582,0	575,0	567,0
397,0	484,0	466,0
580,0	613,0	613,0

A amplitude absoluta média do espectro teta do EEG de seis animais submetidos a infusão intracisternal de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) é observada na tabela 6 onde os valores expressos em  $\mu\text{V}$ . Na tabela 7 -vemos amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de seis animais submetidos a infusão intracisternal de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ). Na tabela 8 demonstra-se a amplitude da média de pontas observadas no EEG da região frontal promovida pela infusão de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em seis animais - Amplitude da média de pontas observadas no EEG da região frontal é vista na tabela 9 na dose de uroguanilina( $6\mu\text{g}/\text{min}$ ) em cinco animais. A amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de salina ( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) é demonstrada na tabela 10 com os valores em  $\mu\text{V}$ .

**Tabela 6-** Amplitude absoluta média do espectro teta do EEG de seis animais submetidos a infusão intracisternal de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Valores expressos em  $\mu\text{V}$ .

ANTES		DURANTE		APÓS	
F3	F4	F3	F4	F3	F4
165,0	190,0	90,0	100,0	90,0	120,0
105,0	90,0	135,0	195,0	150,0	180,0
180,0	180,0	90,0	120,0	135,0	150,0
195,0	150,0	165,0	135,0	150,0	135,0
120,0	270,0	75,0	150,0	120,0	180,0
150,0	165,0	120,0	135,0	120,0	150,0

**Tabela 7** - Amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de seis animais submetidos a infusão intracisternal de uroguanilina( $2\mu\text{g}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Valores expressos em  $\mu\text{V}$ .

ANTES		DURANTE		APÓS	
F3	F4	F3	F4	F3	F4
176,0	190,0	105,0	88,0	105,0	90,0
60,0	90,0	180,0	225,0	180,0	210,0
135,0	150,0	120,0	135,0	165,0	180,0
180,0	135,0	180,0	120,0	180,0	135,0
120,0	195,0	75,0	180,0	120,0	255,0
165,0	165,0	135,0	180,0	135,0	150,0

**Tabela 8-** Amplitude da média de pontas observadas no EEG da região frontal antes, durante e após a infusão de uroguanilina( $2\mu/\mu\text{g}/\text{min}$ ) em seis animais

ANTES	DURANTE	APÓS
45,730	57,580	35,950
22,280	53,070	47,090
24,860	39,590	46,590
45,930	57,250	45,360
37,090	39,970	59,170
47,060	46,170	41,250

**Tabela 9-** Amplitude da média de pontas observadas no EEG da região frontal antes, durante e após a infusão de uroguanilina( $6\mu\text{g}/\text{min}$ ) em cinco animais.

ANTES	DURANTE	APÓS
39,50	40,440	40,440
33,70	50,730	69,880
45,33	64,970	51,410
37,87	46,870	41,370
35,64	62,730	42,000

**Tabela 10-** Amplitude absoluta média do espectro alfa do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de salina ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Os valores são expressos em  $\mu\text{V}$ .

ANTES		DURANTE		APÓS	
F3	F4	F3	F4	F3	F4
130,430	143,470	189,130	195,650	182,610	195,650
163,040	136,950	143,470	143,470	91,300	88,630
130,430	117,400	136,950	130,430	147,470	143,470
202,170	143,470	215,210	130,430	143,470	97,820
104,340	123,910	104,340	130,430	104,340	123,910

Na tabela 11 são observadas as amplitudes absolutas médias do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de salina(2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min) em três momentos: antes, durante e após a infusão ( $\mu$ V).

As amplitudes médias absolutas dos espectros alfa e teta do EEG sob efeito da uroguanilina nas doses de 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min e 6 $\mu$ g/min, são vistas na tabela 12 incluindo o erro da média.

**Tabela 11-** Amplitudes absolutas médias do espectro teta do EEG de cinco animais submetidos a infusão intracisternal de salina(2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min) em três momentos: antes, durante e após a infusão. Os valores estão expressos em  $\mu$ V.

ANTES		DURANTE		APÓS	
F3	F4	F3	F4	F3	F4
117,390	130,420	182,610	195,0	195,650	215,210
176,090	163,040	150,000	156,52	104,350	104,350
136,960	110,870	117,390	110,87	123,910	117,390
182,610	247,830	221,730	150,0	136,960	91,300
110,870	150,000	104,350	117,39	84,780	110,870

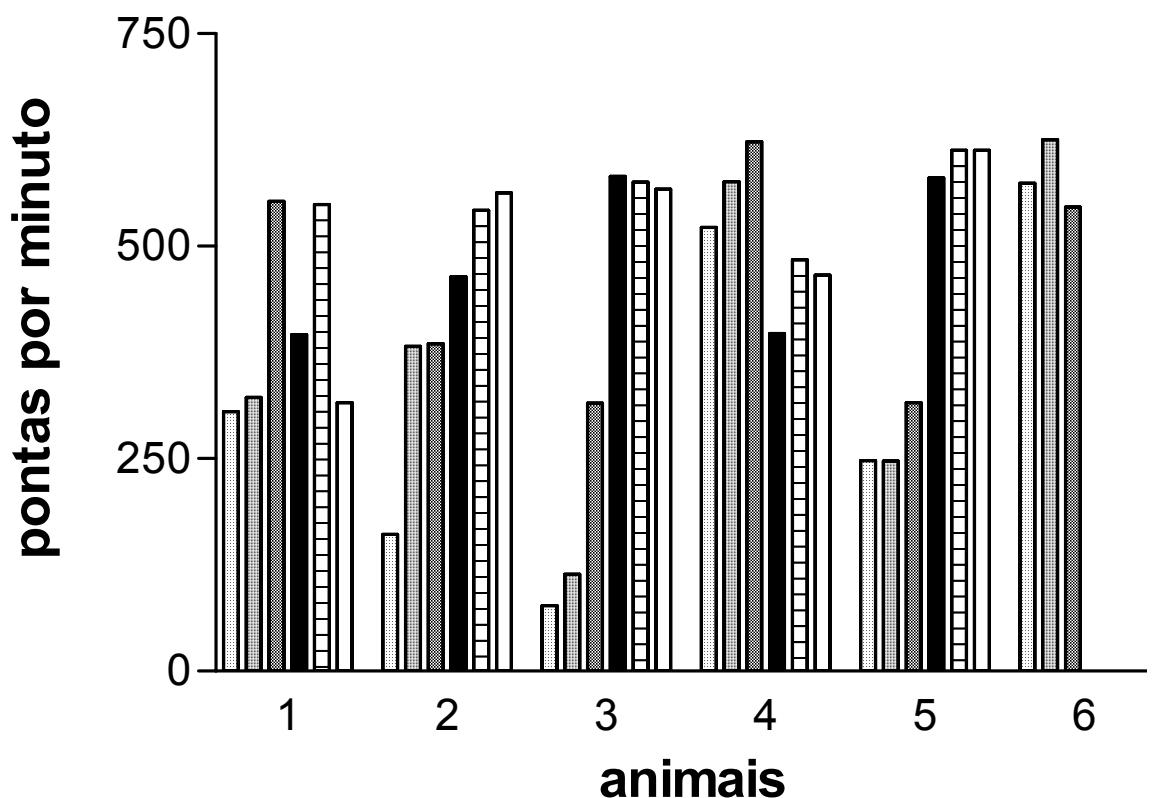
**Tabela 12** - Amplitudes médias absolutas dos espectros alfa e teta do EEG sob efeito da uroguanilina nas doses de 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min e 6 $\mu$ g/min, incluindo o erro da média. Valores expressos em  $\mu$ V (microvolts).

<b>Amplitude Absoluta (<math>\mu</math>V<math>\pm</math>SD)</b>		
<b>ALFA</b>	<b>Controle</b> <b>Uro 2</b>	<b>Controle</b> <b>Uro 6</b>
<b>F3</b>	139.3 $\pm$ 18.6 147.5 $\pm$ 13.0	138.0 $\pm$ 11.9 141.0 $\pm$ 11.2
<b>F4</b>	154.7 $\pm$ 15.9 170.0 $\pm$ 23.8	189.0 $\pm$ 33.7 189.0 $\pm$ 46.3
<b>TETA</b>	<b>Controle</b> <b>Uro 2</b>	<b>Controle</b> <b>Uro 6</b>
<b>F3</b>	152.5 $\pm$ 34.7 127.5 $\pm$ 9.3	174 $\pm$ 10.1 147 $\pm$ 9.9
<b>F4</b>	174.2 $\pm$ 23.9 152.5 $\pm$ 9.8	237 $\pm$ 25.2 198 $\pm$ 42.7

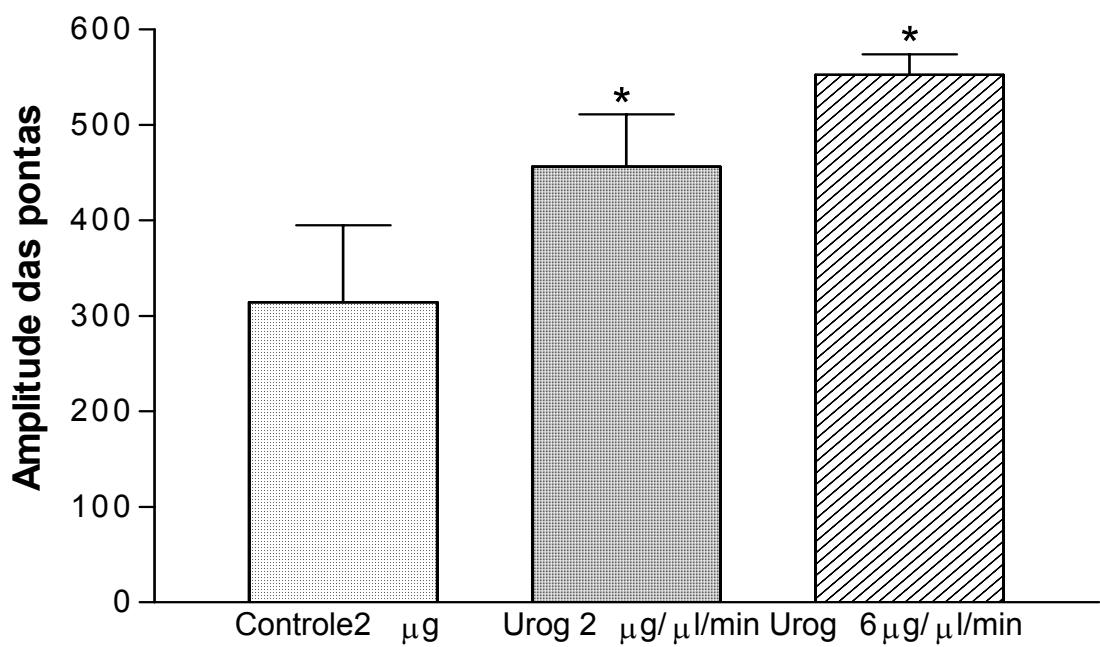
A Figura 20 demonstra o número de pontas por minuto observadas na infusão intracisternal de uroguanilina nas duas doses. O efeito da infusão de uroguanilina na cisterna magna sobre a amplitude das pontas registrado com eletrodos inseridos na região frontal (F3 e F4). é visto na figura 21 P<0.05, ANOVA com Tukey.

### Número de pontas por minuto urog 2 $\mu$ / $\mu$ g/min e 6 $\mu$ / $\mu$ g/min

■ 2antes  
■ 2durante  
■ 2após  
■ 6antes  
■ 6durante  
■ 6após

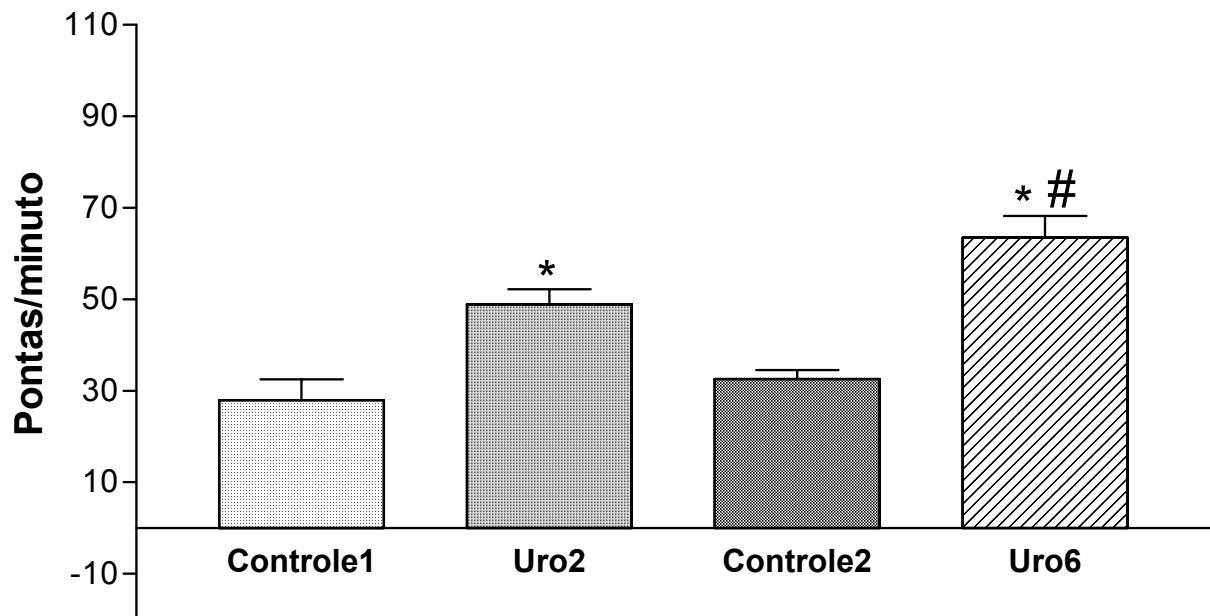


**Figura 20** - Número de pontas por minuto observadas na infusão intracisternal de uroguanilina nas duas doses



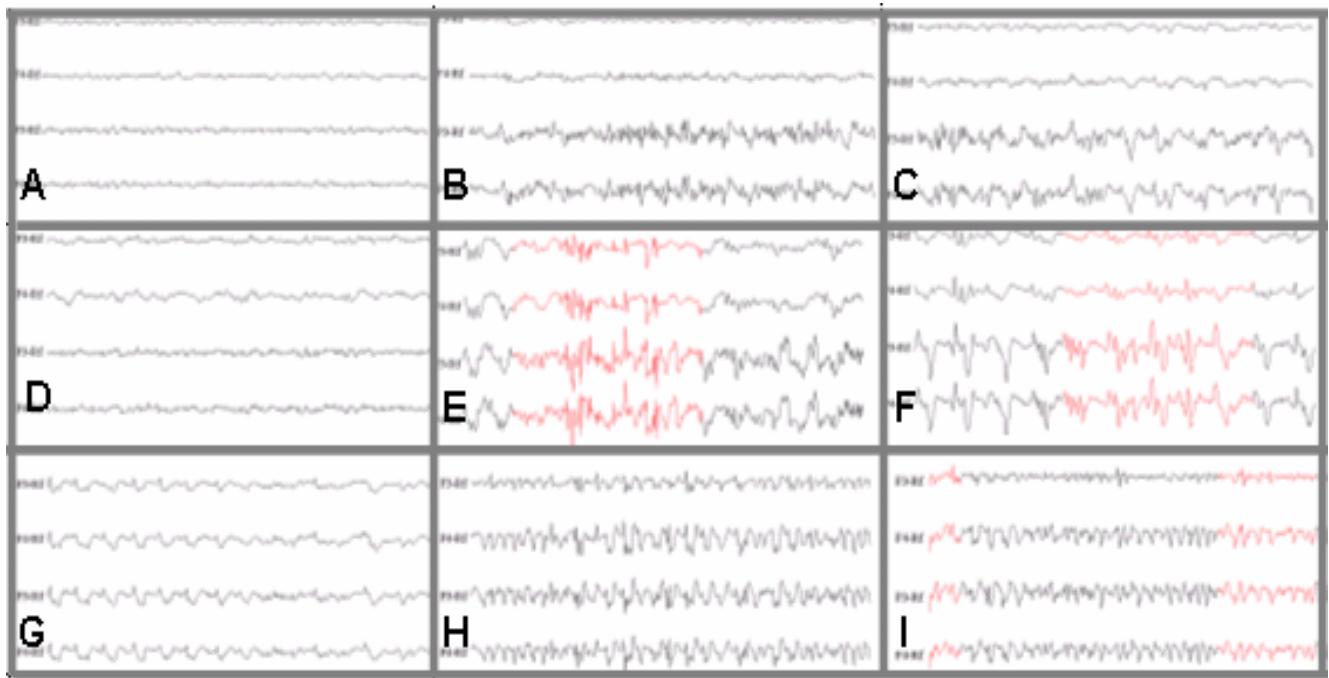
**Figura 21** - Efeito da infusão de uroguanilina na cisterna magna sobre a amplitude das pontas registrado com eletrodos inseridos na região frontal (F3 e F4). P<0.05, ANOVA com Tukey

O efeito da infusão de uroguanilina (  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$  ou  $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) na cisterna magna sobre o número de pontas por minuto registradas por eletrodos implantados na região frontal (F3-F4). é visto na figura 22 .



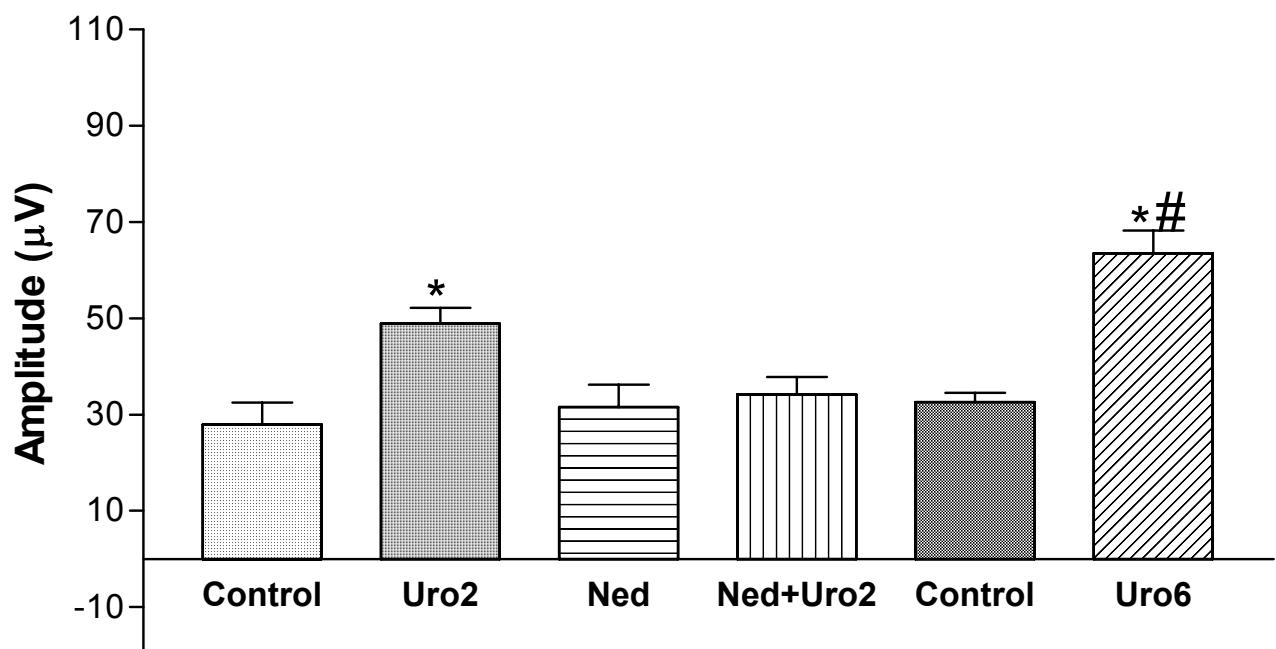
**Figura 22.** Efeito da infusão de uroguanilina (  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$  ou  $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) na cisterna magna sobre o número de pontas por minuto registradas por eletrodos implantados na região frontal (F3-F4). Test t pareado bicaldal com nível de significância de 5%. As informações são expressas como media  $\pm$  de seis ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) e cinco ( $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) animais.

A figura 23 demonstra um EEG representativo do registro dos efeitos em ratos anestesiados sob o efeito da infusão de salina.



**Figure 23.** EEG representative do registro dos efeitos em ratos anestesiados da infusão de salina: controle (**A**), durante  $6\mu\text{L}/\text{min}$  infusão de salina(**B**) e vinte minutos após o término da infusão de salina infusão (**C**). Os outros traçados representam a mesma seqüência de eventos para a infusão de uroguanilina ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) (**E,F,G**) uroguanylin ( $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) (**H,I,J**).

A figura 24 mostra o número de pontas por minuto observadas na infusão intracisternal nos grupos 1: controle 1 (antes da infusão de uroguanilina 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min); 2: infusão de uroguanilina 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min; 3: controle 2 (antes da infusão de uroguanilina 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min); 4: Infusão de uroguanilina 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min; 5. Infusão de nedocromil sódio; 6: Infusão de nedocromil sódio + uroguanilina.



**Figura 24** – Representação do número de pontas por minuto observadas na infusão intracisternal nos grupos 1: controle 1 (antes da infusão de uroguanilina 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min); 2: infusão de uroguanilina 2 $\mu$ g/ $\mu$ l/min; 3: controle 2 (antes da infusão de uroguanilina 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min); 4: Infusão de uroguanilina 6 $\mu$ g/ $\mu$ l/min; 5. Infusão de nedocromil sódio; 6: Infusão de nedocromil sódio + uroguanilina.

## 6. Discussão

A idéia central do nosso trabalho surgiu através de três observações sobre os peptídeos guanilina e uroguanilina. Primeiramente, vimos que estes hormônios atuam na regulação de fluidos do intestino e do rim através de mecanismos sinalizadores envolvendo canais de Cl<sup>-</sup>(Forte et al.,2000). Uma segunda observação também nos chamou atenção: cópias de RNAm codificando guanilina e uroguanilina estariam presentes em tecidos extra-intestinais e extra-renais, como no sistema nervoso central (Fan et al., 1997). A terceira observação diz respeito à semelhança entre os sistemas de transporte eletrolíticos renal, e cerebral (Angeletti et al., 1997). Estas informações sugerem um possível papel fisiológico destes peptídeos no equilíbrio eletrolítico do tecido cerebral, envolvendo sinalização de canais de Cl<sup>-</sup>, entretanto nenhum estudo foi realizado neste sistema, e existe pouca ou nenhuma informação acerca dos mecanismos envolvidos na regulação de fluidos cerebrais. Portanto, considerando as observações aqui relatadas, o presente estudo avaliou a ação neurofisiológica dos peptídeos guanilina e uroguanilina a nível cerebral, a partir da avaliação eletrofisiológica de animais submetidos à infusão intracisternal, investigando possíveis mecanismos de ação pelo uso de antagonistas específicos de canais de Cl<sup>-</sup>.

No presente trabalho, o registro do EEG foi um instrumento que ofereceu uma medida sensível, objetiva e, contínua dos efeitos neurofisiológicos dos peptídeos estudados. Os métodos comumente utilizados em estudos animais *in vivo* para o registro da atividade neuronal são: (1) registro de potenciais evocados de nervos periféricos e áreas corticais,(2) registros neuronais extracelulares de descargas de potencial de ação (pontas) que refletem a excitabilidade dos neurônios em face de estímulos e (3) registros intracelulares de potenciais pós-sinápticos e potenciais de ação (Hinz-Vahle et alli., 2002)

## **6.1 Avaliação eletrofisiológica da infusão intracisternal de guanilina**

A descrição dos efeitos eletrofisiológicos da guanilina e da uroguanilina em cérebro de ratos *in vivo* é um estudo pioneiro, pois, até então, relatou-se os efeitos destes hormônios em rim perfundido isolado (Fonteles et al., 1998; Carrithers at al., 1999), em células neuroendócrinas pancreáticas *in vitro* (John et al., 1998), sobre a secreção intestinal (Joo et al. 1998), sobre a broncoconstricção *in vivo*( Ohbayashi et al., 1998), dentre outros trabalhos desenvolvidos nestes mesmos tecidos citados.

Os resultados com a guanilina demonstram que o peptídeo administrado via intracisternal promoveu alterações na amplitude e o aparecimento de pontas, porém não houve significância estatística. De acordo com a Federação Internacional das Sociedades para Eletroencefalografia e Neurofisiologia Clínica (IFSECN) (1974), uma ponta se apresenta de forma transiente, claramente distinta da atividade de “background”(atividade de fundo, o ritmo predominante do EEG), com um pico e uma duração de 20 a 70 ms; o componente principal é geralmente negativo; a diferença da atividade de “background” é baseada na morfologia e amplitude das ondas ( Niedermeyer, 1999).McCormick et allii, em 2001, descrevem pontas interictais, como sendo breves (80–200 ms); grandes pontas agudas no EEG que ocorrem isoladamente sobre a atividade de “background”, diferente da atividade normal. Elas aparecem em uma subpopulação de pacientes com epilepsia focal e não estão associadas com mudanças francas nas habilidades cognitivas ou comportamentais. Pontas interictais podem servir para localizar focos epilépticos, mas nem sempre são detectadas no foco primário onde a epilepsia se origina.

As amplitudes médias absolutas dos espectros de onda alfa e teta, na região frontal sofreram um discreto incremento, durante e após a infusão intracisternal de guanilina. Segundo Douglas (2002), o córtex frontal medeia funções corticais de grande importância, sua desativação é uma característica definida do sono, os anestésicos tem o poder de prejudicar suas funções. Lopes da Silva e colaboradores (Niedermeyer, 1999), descrevem o ritmo alfa, que acontece na freqüência de 8 – 13 Hz, como presente durante um estado de relaxamento e redução da atenção visual, e sugerem que ele se origina e se propaga principalmente no córtex cerebral.

## **6.2 Avaliação eletrofisiológica da infusão intracisternal de uroguanilina**

A uroguanilina demonstra possuir um espectro de ação biológico maior do que a guanilina, visto que ela exibe resíduos acídicos adicionais, que conferem a ela a propriedade de alta potência e eficácia sob condições ácidas da superfície das mucosas de células epiteliais (Forte, 1999). Estas diferenças também sugerem diferentes receptores para cada peptídeo, o receptor guanilato ciclase nas células T84, por exemplo, parece ser seletivo para a uroguanilina, pois ele foi dez vezes mais potente que a guanilina em estimular o acúmulo de GMPc ou inibir a ligação I-ST (Hamra et al., 1993). De acordo com Forte (1999), o primeiro receptor identificado foi o GC-C, ligante da guanilina, isolado do intestino do rato, já a uroguanilina parece ter maior afinidade por um outro receptor de guanilato ciclase. Isto levanta a hipótese de que a uroguanilina apresentou uma melhor performance nestes experimentos, devido a presença de receptores específicos situados no tecido cerebral, com maior afinidade para este peptídeo. Outro ponto a ser observado, é que a uroguanilina evidenciou um maior surgimento de pontas

em comparação a guanilina, sendo que a amplitude destas pontas aumentou significativamente na dose maior ( $6\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ) comparando-se com os controles. Seu efeito demonstrou ser dose dependente.

### **6.3 Avaliação do bloqueador de canais de $\text{Cl}^-$ : ácido niflúmico**

Para investigar o causa do aparecimento de pontas no EEG de ratos que sofreram infusão intracisternal de uroguanilina, utilizamos duas substâncias que têm apresentado propriedades inibitórias sob canais de  $\text{Cl}^-$ .

Estudos têm relatado que os peptídeos do tipo guanilina agem se ligando ao receptor específico guanilato ciclase, estimulando a produção e o acúmulo de GMPc, promovendo assim, a abertura do canal de  $\text{Cl}^-$ , o que leva ao efluxo de  $\text{Cl}^-$  (Fan et al, 1997). Desta forma o peptídeo seria responsável pela secreção de eletrólitos, equilibrando o pH e o volume dos fluidos. No SNC, encontramos alguns tipos de diferentes canais de  $\text{Cl}^-$ , como aqueles ativados por ligantes, que são os neurotransmissores GABA e glicina, capazes de regular a excitabilidade neuronal (Jentsch, 2001). Um outro tipo de canal de  $\text{Cl}^-$  presente no cérebro, que se relaciona aos peptídeos aqui estudados, é o CFRT, que parece estar relacionado a regulação dos canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) presentes em cérebros de rato, camundongo e homem (Hong-Long et allii., 2002). Um terceiro tipo de canal encontrado sistema nervoso central, o canal ClC-2 (da família ClC de canais de  $\text{Cl}^-$ ) é abundantemente expresso em células piramidais do hipocampo e em células de Purkinje do cerebelo e menos expresso em outros neurônios e glia. Schmidt-Rose et al.(1997) cita que ClC-2 pode desempenhar papéis no controle do volume celular e na concentração de cloreto intracelular, o que seria importante para a transmissão sináptica em certos neurônios. Supomos que o mecanismo de

ação da guanilina e/ou da uroguanilina seja baseado em um ou mais de um destes exemplares de canal aqui citados.

Primeiramente, para investigar o possível mecanismo de ação por canais de  $\text{Cl}^-$ , empregamos um bloqueador, o ácido niflúmico. Cai et al.(2002), investigando os mecanismos de ação dos moduladores de CFRT, cita que bloqueadores possuidores da característica “very fast speed”, isto é, um bloqueador de canal que diminua amplitude da corrente e aumente o ruído na abertura do canal, assim interferindo com o processo, seria uma das alternativas no estudo dos mecanismos de ação do CFRT. Ele frisa que o ácido niflúmico apresenta esta característica e sobretudo, se dissocia rapidamente do canal.

Os resultados foram negativos em relação ao ácido niflúmico, entretanto não se deve descartar a possibilidade deste agente desempenhar o papel de inibição do peptídeo, haja visto, um crescente número de trabalhos correlacionando o canal CFRT ao ácido niflúmico. Necessita-se de um estudo mais detalhado acerca destes mecanismos e também em relação a diferentes doses do bloqueador quando administradas intracisternalmente.

Um importante dado foi observado durante a infusão de uroguanilina, com o pré-tratamento de ácido niflúmico, o aparecimento de ritmos rápidos (20 – 50 Hz), também chamados de oscilações gama, que estão relacionados a estados de atenção e também a sonhos no estado de movimento rápido dos olhos (REM) (Niedermeyer, 1999).

#### **6.4 Avaliação do inibidor de correntes de $\text{Cl}^-$ : nedocromil sódico**

Na busca do bloqueador ideal capaz de demonstrar inibição sob canais de  $\text{Cl}^-$ , decidimos utilizar o nedocromil sódico, uma droga antiinflamatória empregada no tratamento de doenças respiratórias obstrutivas como a asma, a partir de um estudo demonstrado por Alton e

Norris em 1996, no qual é descrita a capacidade do nedocromil em inibir o efluxo de  $\text{Cl}^-$  em células da superfície da mucosa do epitélio pulmonar. Neste trabalho, ele comenta que a droga age através destes mecanismos, mediando a liberação de mastócitos, bem como, também age sob neurônios sensoriais e eferentes.

O resultado deste experimento foi bastante promissor, o nedocromil parece ter inibido o aparecimento das pontas do EEG nos animais pré-tratados com a droga que receberam a infusão de uroguanilina. Isso nos leva a concluir que a uroguanilina atua sobre a fisiologia cerebral possivelmente através de mecanismos que envolvem canais de  $\text{Cl}^-$ . Essa afirmativa pode ser considerada prematura, haja vista, a pequena amostra testada; contudo, ela abre caminho para maiores estudos, onde seja possível investigar com profundidade os mecanismos envolvidos. Uma boa alternativa seria um estudo para avaliação de potenciais intracelulares.

O estudo da pressão intracraniana, que seria parte complementar do trabalho, foi inviabilizado devido à falta de equipamentos podendo vir a integrar parte do aprofundamento da pesquisa no futuro. D'Este et al.(2000), estudando a expressão de guanilina em adeno-hipófise de ratos, sugerem um papel regulatório da guanilina no tráfego de fluidos entre veias portas hipotálamo-hipofiseais e o LCR, em direção ao espaço subaracnóide e o terceiro ventrículo. Outro parâmetro interessante a ser comparado, seria em relação aos peptídeos natriuréticos cerebrais, hormônios produzidos primariamente no ventrículo cardíaco, que parecem estar envolvidos em uma variedade de processos homeostáticos e também se ligam a receptores do tipo guanilato ciclase (Chusho et al., 2000).

## **6.5 Avaliação do modelo experimental**

O modelo experimental utilizado no estudo, que inclui a colocação da cânula-guia nos animais, a avaliação eletrofisiológica das infusões dos peptídeos e o pré-tratamento com drogas bloqueadoras, foi adaptado às condições do laboratório de metabolismo renal da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

O modelo da cirurgia estereotáxica proposto foi criado nos moldes de um trabalho destinado a coleta de LCR desenvolvido por Consiglio & Lucion (2000), e foi realizado sem dificuldades. Existem muitos outros modelos para infusão de drogas no cérebro dentro da literatura científica, entretanto este modelo foi escolhido pela praticidade e eficiência, de 10 animais submetidos a cirurgia, oito tiveram LCR coletado da cânula-guia após dois dias da cirurgia.

A análise do EEG é uma interessante abordagem do estudo neurofarmacológico de uma substância, sobretudo quando esta demonstra um potencial epileptogênico; se há envolvimento de canais, sobretudo aqueles ativados por ligantes, como no nosso trabalho, onde suspeitamos que o peptídeo estudado possa conter esta característica. É uma técnica que não requer muita tecnologia e pode-se treinar uma pessoa a usá-la num espaço de tempo pequeno. Tem ainda a grande vantagem de não ser invasiva e ser econômica. A sua resolução rápida e a consistência dos seus resultados são de enorme ajuda na identificação de eventos cerebrais rápidos e complexos como os processos cognitivos. Contudo a sua maior deficiência reside ainda na sua incapacidade de apontar a fonte da atividade cerebral.

A utilização de possíveis drogas bloqueadoras, complementou e enriqueceu o nosso estudo. A partir dos resultados obtidos existe a

possibilidade de se investigar melhor os componentes moleculares envolvidos no mecanismo de ação do hormônio.

## **7-Conclusões**

Os peptídeos guanilina e uroguanilina demonstraram exercer atividades eletrofisiológicas sobre o sistema nervoso central.

A uroguanilina induziu o surgimento de pontas no EEG.

O nedocromil sódico bloqueou o aparecimento de pontas durante a infusão de uroguanilina.

Os resultados com o nedocromil sugerem que os mecanismo de ação dos peptídeos guanilina e uroguanilina envolvem canais iônicos de  $\text{Cl}^-$ .

Um estudo mais aprofundado, com um maior número de animais, e investigações a nível intracelular elucidará com clareza os mecanismos e as funções destes peptídeos no sistema nervoso central.

## **8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADRIAN, E.D., & MATTHEWS, B.H.C. The Berger rhythm: Potential changes from the occipital lobes in man. **Brain.** V. 57, p.355-385, 1934.

ALTON, E. W. F. W. AND NORRIS, A. A. Chloride transport and actions of nedocromil sodium and cromolyn sodium in asthma. **J allergy clin immunol** V. 98, n. 5, parte 2, p. S102-S106, 1996.

ANGELETTI, R.H.; NOVIKOFF, P.M.; JUVVADI, S.R.; FRITSCHY, J.; MEIER, P.T. AND WOLKOFF, A.W. The choroids plexus epithelium is the site of the organic anion transport protein in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 94, p. 283-286, 1997.

BALJIT S. KHAKH, WILLIAM R. PROCTOR, THOMAS V. DUNWIDDIE, CESAR LABARCA, AND HENRY A. LESTER.

**Allosteric Control of Gating and Kinetics at P2X<sub>4</sub> Receptor Channels**  
J. Neurosci. V. 19, p. 7289-7299, 1999.

BERGER, H., 1929. “Über das Electrenkephalogramm des Menschen”, traduzido por P. Gloor, “The electroencephalogram of man”. Arch Psychiat Nervenkr 1937;106:577-584.

CAI, Z. AND SHEPPARD, D.N. Phloxine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity. **J Biol Chem.** V. 277, Nº22, p. 19546-53, 2002.

CAMPOS, A. de AND RENAULT, L. M. P. Produção de Lesões Seletivas pela aplicação múltipla e tópica de neurotoxinas. Xavier, G.F. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. Ed. Plêiade, São Paulo, 1999.

CAREY, R.M. Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man: lack of dependence upon aldosterone. **Circ. Res.** v.43, p. 19 – 23, 1978.

CARRITHERS, S. L.; TAYLOR, B; CAI, W.Y.; JOHNSON, B.R.; OTT, C.E.; GREENBERG, R.N.; JACKSON, B.A. Guanylyl cyclase-C receptor mRNA distribution along the rat nephron. **Regulatory Peptides.** v. 95, p. 65- 74, 2000.

CARRITHERS, S. L.; HILL, M. J.; JOHNSON, B. R.; O'HARA, S.M.; JACKSON, B. A.; OTT, C. E. ; LORENZ, J.; MANN, E. A. ; GIANNELLA, R. A. ; FORTE, L. R. AND GREENBERG, R. N. Renal effects of uroguanylin and guanylin *in vivo*. effects of uroguanylin and guanylin *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** V. 32, p.1337-1344, 1999.

CATON, R. The electric currents of the brain. **British Medical Journal.** V. 2, p. 278, 1895

CHATRIAN, G.E.; BERGAMINI, L.; DONDEY, M. ET AL. A glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol** 1974; v. 37 p 538 – 48.

CHODOBSKI, A. AND CHODOBSKA, J.S. Choroid Plexus: Target for Polypeptides and Site of their Synthesis. **Microscopy Research and Technique.** V. 52, p. 65-82, 2001.

CHUSHO, H.; OGAWA, Y.; TAMURA, N.; SUDA, M.; YASODA, A.; MIYAZAWA, T.; KISHIMOTO, I.; KOMATSU, Y.; ITOH, H.; TANAKA, K.; SAITO, H.; GARBERS, D. L. AND NAKAO, K. Genetic Models Reveal That Brain Natriuretic Peptide Can Signal through Different Tissue-Specific Receptor-Mediated Pathways. **Endocrinology.** V. 141, No. 10, p.3807-3813, 2000.

CONSIGLIO, A. R. AND LUCION, A. B. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non anesthetized rats. **Brain Research Protocols.** v. 5, p. 109-114, 2000.

CURRIE, M.G.; FOK, K.F.; KATO, J; MOORE, R.J.; HAMRA, F.K.; DUFFIN, K.L., AND SMITH, C.E. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** V. 89(3), p. 947-51. 1992 Feb 1.

DĘBSKA, G.; KICIŃSKA, A.; SKALSKA, J. AND SZEWCZYK, A.

Intracellular potassium and chloride channels: An update. **Acta Bioquimica Polonica.** v.48, No. 1/2001, p. 137–144, 2001.

D'ESTE, L.; KULAKSIZ, H.; RAUSCH, U.; VACCARO, R.; WENGER, T.; TOKUNAGA, Y.; RENDA,T.G.AND CETIN, Y. Expression of guanylin in “pars tuberalis-especific cells” and gonadotrophs of rat adenohypophysis. **PNAS.** v.97 , p. 1131- 1136, 2000.

DOUGLAS, C. L.; BAGHDOYAN, H. A. AND LYDIC, R.Prefrontal Cortex Acetylcholine Release, EEG Slow Waves, and Spindles Are Modulated by M2 Autoreceptors in C57BL/6J Mouse. **J Neurophysiol** V.87, p. 2817–2822, 2002.

FAHLKE, C. Ion permeation and selectivity in ClC-type chloride channels. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 280, p. F748- F757, 2001.

FAN, X ; WANG, Y ; LONDON, R.M.; EBER, S.L.; KRAUSE, W.J.; FREEMAN, R.H. AND FORTE, L.R. Signaling Pathways for Guanylin and Uroguanylin in the Digestive, Renal, Central Nervous, Reproductive, and Lymphoid Systems. **Endocrinology.** V. 138 , p. 4636-4648, 1997a.

FAN, X.; HAMRA, F.K; LONDON, R.M.; EBER, S.L; KRAUSE, W.J.;  
FREEMAN, R.H.; SMITH, E.C.; CURRIE, M.G. AND FORTE, L.R.  
Structure and activity of uroguanylin and guanylin from the intestine and  
urine rat. **Am. J. Physiol.** v. 273, p. E957-E964, 1997b.

FISHMAN, R. A. Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system.  
W.B. Saunders Company. Philadelphia, PA, 1980.

FONTELES, M.C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H.S.A., CURRIE,  
M.G. AND FORTE, L.R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin  
and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.** v.275,  
p.191 – 197, 1998.

FORTE, L.R.; FREEMAN, R.H.; KRAUSE, W.J. AND LONDON, R.M.  
Guanylin peptides: cyclic GMP signaling mechanisms. **Braz. J. Med. Res.**,  
v. 32, p. 1329 - 1336, 1999a.

FORTE, L.R.; Guanylin regulatory peptides: structures, biological  
activities mediated by cyclic GMP and pathobiology. **Regulatory  
Peptides**, v 81, p 25-39, 1999b.

FORTE, L.R.; LONDON, R.M. ; KRAUSE, W.J. AND FREEMAN, R.H.

Mechanisms of guanylin action via cyclic GMP in the kidney. **Annu. Rev. Physiol.** v 62, p. 673 – 695, 2000.

FORTE ,L.R. AND HAMRA, F.K. Guanylin and Uroguanylina: Intestinal Peptide Hormones that regulate epithelial transport. **News Physiol. Sci.** v 11, p. 17-24, 1996.

FRIEDHEIM, E., CORVI, C., GRAZIANO, J., DONNELLI, T., AND BRESLIN,D. Choroid plexus as protective sink for heavy metals? **Lancet April**. P.981–982, 1983.

FULLER, C. M. & DALE, J.B. CFRT! **The American Physiological Society**. V. 92, p. C267-C287, 1992.

GRÜNDER S., THIEMANN A., PUSCH M. AND JENTSCH T.J.: Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. **Nature**, v.360, p. 759-762, 1992.

GUYTON, A. C.. Potenciais de membrana e potencial de ação. IN; GUYTON AC (ed). Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro; Guanabara 1989,p. 83 – 97.

GYÖMÖREY, K. YEGER, H. ACKERLEY, C, GARAMI, E. AND BEAR, C. E. Expression of the chloride channel ClC-2 in the murine small intestine epithelium. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.279, p. C1787–C1794, 2000.

HAMRA, F.K.; FORTE, L.R.; EBER, S.L.; PIDHORODECKYJ, N. V.; KRAUSE, W. J.; FREEMAN, R. H.; CHIN, D.T.; TOMPKINS, J.A.; FOK, K.F.; SMITH, C.E.; DUFFIN, K.L.; SIEGEL, N.R. AND CURRIE, M.G. Uroguanylin: Structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V. 90, p. 10464-10468, 1993.

HINZ-VAHLE, C. AND DETSCH, O. What can *in vivo* electrophysiology in animals models tell us about mechanisms of anaesthesia. **British Journal of anaesthesia**. V. 89, Nº 1, p. 123 – 142, 2002.

HONG-LONG, J. ; BILJANA J.; FU,J., BISHOP, L.R.; MEBANE, H.C.  
FULLER, C.M.; STANTON, B.A., AND. BENOS, J.D. Up-regulation of  
Acid-gated Na<sub>+</sub> Channels (ASICs) by Cystic Fibrosis Transmembrane  
Conductance Regulator Co-expression in *Xenopus* Oocytes\*. **The Journal  
of Biological Chemistry.** V. 277, n. 10, p.8395 – 8405, 2002.

JENTSCH T.J., STEIN V., WEINREICH F., ZDEBIK A.A.  
Molecular structure and physiological function of chloride channels.  
**Physiol. Rev.** V.82, p. 503-568, 2002

JENTSCH,T.J. Neuronal KCNQ potassium channels: Physiology and role  
in disease. **Nature Reviews Neuroscience,** V. 1, 21-30, 2000

JOO, N. S.; LONDON, R. M.; KIM, H. D.; FORTE, L. R. AND  
CLARKE, L. L. Regulation of intestinal Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by  
uroguanylin. **Am. J. Physiol. 274 (Gastrointest. Liver Physiol. )** V. 37, p.  
G633–G644, 1998.

KANDEL, E.R.; SIEGELBAUM, S. An introduction to synaptic transmission. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (eds). Essentials of Neural Science and Behaviour. London: Appleton & Lange, 1995: 183 – 96.

KRINKE, G. J. The Laboratory Rat JOHN, M.; WIEDENMANN,B.; KRUHØFFER, M.; ADERMANN, K.; ANKORINA-STARK, I.; SCHLATTER, E.; AHNERT-HILGER, G.; FORSSMANN, W. AND KUHN, M. Guanylin Stimulates Regulated Secretion From Human Neuroendocrine Pancreatic Cells. **Gastroenterology** V.114, p 791–797, 1998.

JOHN, M; WIEDENMANN, B; KRUHØFFER, M; ADERMANN, K; ANKORINA-STARK, I; SCHLATTER, E; AHNERT-HILGER, G; FORSSMANN, W.G. AND KUHN, M. Guanylin stimulates regulated secretion from human neuroendocrine pancreatic cells. **Gastroenterology**. V. 114, p. 791-797, 1998.

JOO, N. S.; LONDON, R. M.; KIM, H. D.; FORTE, L. R. AND CLARKE, L. L. Regulation of intestinal Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by uroguanylin. **Am. J. Physiol. 274 (Gastrointest. Liver Physiol. )** V. 37, p. G633–G644, 1998.

LEE, G.; Dallas, S.; HONG, M. AND BENDAYAN, R. Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations. **Pharmacological Reviews.** V. 53, p. 569 – 596, 2001.  
MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia Funcional. Livraria Atheneu Editora. São Paulo. Cap IX. B p.76, 1991

McCARTY, N. A. Permeation through the CFRT chloride channel. **The journal of experimental biology.** V. 203, p. 1947- 1962, 2000.  
MIHIC, J. S. AND HARRIS, A. R. GABA and GABAA Receptor. **Alcohol Health & Research World.** V. 21, Nº 2 , 1997.

MCCORMICK, D. A. AND CONTRERAS, D. On The cellular and network bases of epileptic seizures. **Annu. Rev. Physiol.** V. 63, p.815–46, 2001.

MIYAZATO, M.; NAKABAZATO,M.; MATZUKURA,S.;

KANGAWA,K. AND MATZUO,H. Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra-gastrintestinal tissues. **FEBS Letters**, v 398, p 170-174, 1996.MONTENEGRO, M.A.; CENDES, F.; GUERREIRO, M. M.; GUERREIRO, C.A.M. Neurofisiologia e Geradores Corticais. In.EEG na prática clínica. Lemos Editorial e Gráficos Ltda. São Paulo, 2001,p 37-41.

NIEDERMEYER, E. & LOPES DA SILVA, F. Chapter 6: Technological Basis of EEG Recording; Chapter 7: EEG Recording and Operation of the Apparatus; Chapter 8: The EEG Signal: Polarity and Field Determination. In Electrocephalography. Lippincott, Philadelphia, 4<sup>th</sup> Ed., pp. 110-148, 1999.

OHBAYASHI, H; YAMAKI, K; SUZUKI, R. AND TAKAGI, K. Effects of uroguanylin and guanylin against antigen-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in sensitized guinea-pigs. **Life Sci.** V. 62, N°20, p.1833-44, 1998.

PAPPENHEIMER, J.R.; HEISEY, S.R. & JORDAN, E.F. **Am. J. Physiol.**  
v. 200, p.1-10, 1961.

PÉREZ-FÍGARES, J. M.; JIMENEZ, A. j. AND RODRÍGUEZ, E. M.  
Subcommissural Organ, Cerebrospinal Fluid Circulation, and  
Hydrocephalus. **Microscopy Research and Technique**. V. 52, p. 591-  
607, 2001.

PRITCHARD, J.B.; SWEET, D.H.; MILLER, D.S. AND WALDEN, R.  
Mechanism of Organic Anion Transport across the Apical Membrane of  
Choroid Plexus. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 274, pp. 33382-  
33387, 1999.

PROESCHOLDT MG ET AL. Studies of CSF flow and penetration into  
brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of tracer  
[14C] inulin in rat. **Neuroscience**. V. 95 pp. 577 – 592, 2000.

PUTMAN, J. Technical issues involving Bipolar (Sequential) EEG  
Training Protocols. **Journal of Neurotherapy**. Vol.5, No.3.,p. 51-58,  
2002.

SANTOS-NETO, M.S.; CARVALHO, A.F.; FORTE, L.R. AND FONTELES, M.C. Relationship between the actions of atrial natriuretic peptide (ANP), guanylin and uroguanylin on the isolated kidney. **Braz J Med Biol Res.** v 32, p. 1015 – 1019, 1999.

SCHMIDT-ROSE, T. AND JENTSCH, T. J. Transmembrane topology of a CLC chloride channel. **Neurobiology Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 94, pp. 7633–7638, 1997.

SCHULZ, S.; CHRISMAN, T.D. AND GARBERS, D.L. Cloning and Expression of Guanylin. **The of Biological Chemistry**, v 267, nº23, p 16019- 16021, 1992.

SILVEIRA, P. R. Para entender o eletroencefalograma E.E.G. **IBEMOL**. [www.malthus.com.br](http://www.malthus.com.br) 2002.

SPEAKE, T.; KAJITA, H.; SMITH, C.P. AND BROWN, P. D.Inward-rectifying anion channels are expressed in the epithelial cells of choroid plexus isolated from ClC-2 “knock-out” mice. **Journal of Physiology**. v.539.2, p. 385 – 390, 2002.

STALEY, K.; SMITH, R; SCHAACK, J.; WILCOX, C.; JENTSCH, T.J.: Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. **Neuron**, v.17, p.543-551, 1996.

WALDEGGER, S. & JENTSCH, J.T. From Tonus to Tonicity: Physiology of CLC Chloride Channels. **J. Am. Soc. Nephrol.** V. 11, p. 1331 – 1339, 2000.

WILLS, N. K. AND FONG, P. ClC Chloride Channels in Epithelia: Recent Progress and Remaining Puzzles. **News Physiol. Sci.** v. 16 ,p. 161-166, 2001.

WIEGAND, R. C.; KATO, J. AND CURRIE, M. G. Rat guanylin cDNA: characterization of the precursor of an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v175, p. 812- 817, 1992.

YUGE, S.; INOUE, K.; HYODO, S. AND TAKEI, Y. A Novel Guanylin Family (Guanylin, Uroguanylin, and Renoguanylin) in Eels. **Biol. Chem.**, V. 278, Issue 25,p. 22726-22733, 2003.

