



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALINE SANTANA DA SILVA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS  
DE RATOS COM PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA  
E TRATADOS COM L-DOPA**

ALINE SANTANA DA SILVA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS  
DE RATOS COM PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA  
E TRATADOS COM L-DOPA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Cardoso Martins  
Pinge

Co-orientadora: Ms. Deborah Ariza.

Londrina  
2014

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S586a Silva, Aline Santana da.  
Alterações cardiovasculares e autonômicas de ratos com parkinsonismo induzido por 6-OHDA e tratados com L-Dopa / Aline Santana da Silva. – Londrina, 2014.  
51 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pingé.  
Coorientador: Deborah Ariza.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Pressão arterial – Teses. 2. Dopamina – Teses. 3. Parkinson, Doença de – Teses. 4. Variabilidade do batimento cardíaco – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Pingé, Marli Cardoso Martins. II. Ariza, Deborah. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

ALINE SANTANA DA SILVA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS DE RATOS  
COM PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA E TRATADOS COM  
L-DOPA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Cardoso Martins  
Pinge  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziela Scaliante Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Décio Sabbatini Barbosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de Agosto de 2014.

Dedico este trabalho a Deus que mostrou sua fidelidade em minha vida, a minha família com todo seu apoio incondicional, em especial meu marido e meus pais que sempre me apoiaram, e a minha princesinha Sophia que só por existir alegre todos meus dias e faz valer à pena todo esforço.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sua presença constante em minha vida, por ser minha fortaleza em todo tempo, por toda sabedoria que me tem dado.

A minha orientadora Profa. Marli por toda paciência, compreensão e que com toda sua sabedoria me auxiliou para o desenvolvimento desse trabalho, e pelos seus conselhos que me fortaleceram no decorrer do trabalho.

A minha co-orientadora Deborah Ariza, não tenho como agradecer, você foi muito além do seu papel, e me apoiou imensamente, você foi companheira, amiga e me ensinou com muita dedicação e carinho, ensinamentos estes que foram primordiais para conclusão desse trabalho, esse trabalho não existiria sem sua ajuda.

Ao meu marido que em todos os momentos me incentivou e com todo teu carinho me apoiou, obrigada por todo sacrifício pra me apoiar.

A minha filhinha Sophia, que me incentivava simplesmente com um sorriso seu, por me presentear por poder ser sua mãe, e por fazer valer a pena todo esforço.

A minha família com todo amor e compreensão, me apoiando em todas etapas da minha vida, vocês me ensinaram quem sou hoje e me orgulho de tê-los na minha vida e na vida da minha filha.

A todos os professores do departamento de Patologia e Fisiologia pelos ensinamentos e conhecimentos cedidos.

Aos funcionários do departamento e do biotério, essenciais na jornada de trabalho.

Ao apoio financeiro CAPES.

"Deus, conceda-me serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar as coisas que posso, e sabedoria para discernir a diferença".

*Autor: Reinhold Niebuhr*

SILVA, Aline Santana. ARIZA, Deborah. CRESTANI, Carlos Cesar. MARTINS-PINGE, Marli Cardoso. **Alterações cardiovasculares e autonômicas de ratos com parkinsonismo induzido por 6-ohda e tratados com l-dopa.** 2012-2014. 51f. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os efeitos causados por medicamentos antiparkinsonianos sobre parâmetros cardiovasculares no modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA. **Métodos:** Ratos Wistar adultos pesando entre 280-320g, foram colocados no aparelho estereotáxico para microinfusão bilateral de 6-OHDA na substância negra. O grupo sham foi submetido ao mesmo procedimento, sendo infundido somente salina. Foram tratados por gavagem com L-Dopa ou água no período de 7 dias. Um dia após o cateterismo da artéria femoral foi realizado o registro basal nos animais acordados. Em seguida foram submetidos ao "tilt teste". Foram avaliadas a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A análise espectral da variabilidade cardiovascular, foi realizada utilizando-se o Cardioseries V2.4. Para confirmação da lesão foi quantificado os níveis de dopamina no estriado por HPLC. **Resultados:** Os níveis de dopamina estavam diminuídos no estriado, comprovando a lesão. Os valores basais da PAM e FC não foram diferentes entre os grupos. Durante o tilt observamos aumento da PAM e da FC, atenuado nos grupos 6-OHDA água, prolopa e no controle prolopa. No basal, a variância da pressão sistólica (PAS) foi menor nos grupos 6-OHDA e sham prolopa, sem alterações para o intervalo de pulso (IP) entre os grupos. Já na análise do baroreflexo espontâneo basal, o grupo 6-OHDA apresentou um maior ganho quando comparado aos outros grupos. Na análise espectral da variabilidade da PAS, do IP, e na análise baroreflexa durante o tilt, não foram observadas diferenças entre os 6 grupos experimentais. **Conclusões:** Nossos dados sugerem que o tratamento com prolopa não interferiu nas variáveis cardiovasculares já alteradas pela lesão, porém durante o tilt os animais 6-OHDA água e prolopa tiveram uma menor compensação cardiovascular, sugerindo um possível comprometimento do sistema nervoso autônomo no parkinsonismo induzido por 6-OHDA.

**Palavras-chave:** Pressão arterial. Frequência cardíaca. Prolopa. Variabilidade. Tilt.

SILVA, Aline Santana. ARIZA, Deborah. CRESTANI, Carlos Cesar. MARTINS-PINGE, Marli Cardoso. **Cardiovascular and autonomic changes of rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA.** 2012-2014. 51p. Dissertation. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

**Objective:** Evaluate the effects caused by anti-Parkinson drugs on cardiovascular parameters in an animal model of Parkinsonism induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **Methods:** Adult male Wistar rats were placed in the stereotaxic apparatus for bilateral microinfusion of 6-OHDA or saline (sham group) in the substantia nigra. The groups were treated by gavage with L-Dopa or water within 7 days after surgery. On the 6<sup>th</sup> day the rats were submitted to catheterization of the femoral artery for cardiovascular recording in conscious animals. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were evaluated at baseline and during head up tilt (HUT) protocol. Spectral analysis of cardiovascular variability was performed using the V2.4 Cardioseries. For confirmation of the lesion were quantified dopamine levels in the striatum by HPLC. **Results:** Dopamine levels in the striatum were decreased in 6-OHDA rats. Baseline values of MAP and HR were not different between groups. During HUT we observed an increase in MAP and HR, that were attenuated in 6-OHDA and in Prolopa treated animals. At baseline, the variance of systolic arterial pressure (SAP) was lower in 6-OHDA and sham Prolopa without changes in the pulse interval (PI) between groups. Baseline spontaneous baroreflex was increased in 6-OHDA group compared with all groups. **Conclusions:** Our data suggest that treatment with Prolopa did not interfere on cardiovascular variables at baseline. However, during HUT, the 6-OHDA and Prolopa control animals had a lower cardiovascular compensation, suggesting a possible impairment of the autonomic nervous system in Parkinsonism induced by 6-OHDA .

**Key words:** Arterial pressure. Heart rate. Prolopa. Variability. Tilt.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A), da via nigroestriatal na Doença de Parkinson (B) e em (C) imunohistoquímica dos corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos na SNpc (Dauer and Przedborski 2003) .....12

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COMT	Catecol-O -Metiltransferase
DA	Dopamina
DOPAC	3,4 Ácido Dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DV	Dorsoventral
FC	Frequência Cardíaca
HO	Hipotensão Ortostática
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HVA	Ácido Homovanílico
LCR	Líquido Cefalo Raquidiano
LEVODOPA	3,4 Dihidroxifenilalanina
LL	Latero-Lateral
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO	Monoamina Oxidase
MPTP	1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidroperidina
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SN	Substância Negra
SNpc	Substância Negra Porção Compacta
TH	Tirosina Hidroxilase
6 OHDA	6-Hidroxidopamina
5 HT	5 Hidroxitriptamina (serotonina)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>21</b>
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

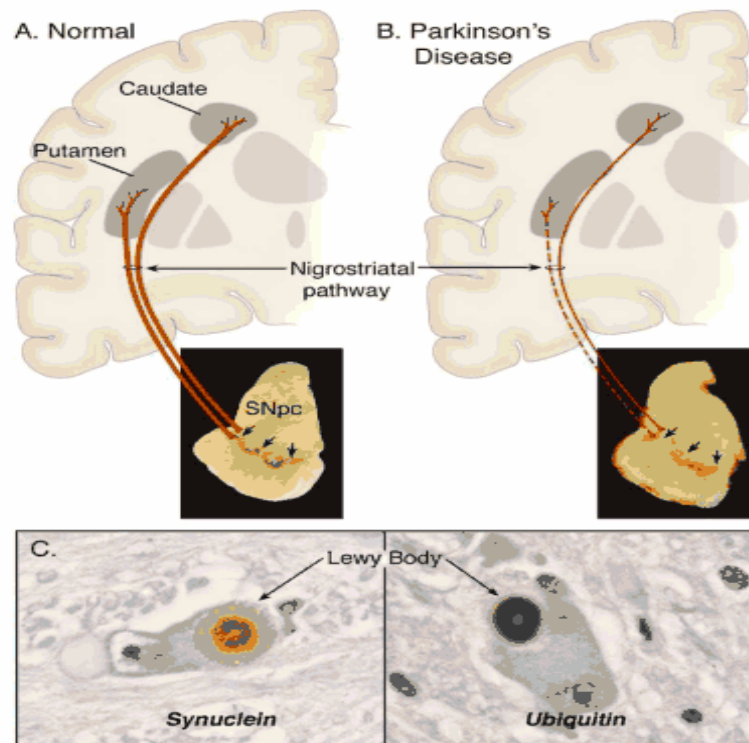
## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é conhecida principalmente pelos seus sinais e sintomas motores tais como fraqueza muscular, escassez de movimentos voluntários, rigidez, tremor e instabilidade postural. Esses sinais clínicos foram primeiramente descritos em 1817 por James Parkinson em sua publicação: “Ensaio sobre a paralisia agitante”, mas foi somente em 1920, que Jean-Martin Charcot reconheceu o trabalho de James Parkinson na descrição da paralisia agitante e em sua homenagem chamou a doença pelo nome de seu descobridor (Dauer e Przedborski 2003, Burch e Sheerin, 2005).

A DP é caracterizada como uma doença neurodegenerativa progressiva em que ocorre a perda de neurônios dopaminérgicos na Substância Negra porção compacta (SNpc), localizada no mesencéfalo, associada a inclusões citoplasmáticas denominadas de corpos de Lewy, constituídos principalmente pela proteína neural chamada  $\alpha$ -sinucleína (Figura 1). Esses agregados protéicos acumulam-se nos neurônios, onde ao ultrapassar um determinado limiar resultam na neurotoxicidade com consequente morte neuronal e redução da aferência dopaminérgica para o estriado (Hornykiewicz 1966, Orr, et al. 2002, Dauer e Przedborski 2003, Teismann, et al. 2003, Przedborski 2005, Mattson, et al. 2008, Peng, et al. 2009, Truong, et al. 2009).

Os corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas arredondadas formadas por diferentes proteínas como:  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos (Togo, et al. 2001, Dauer e Przedborski 2003). A deposição dessas proteínas pode ser tóxica aos neurônios, por causar danos celulares, sequestrando outras proteínas importantes para a sobrevivência da célula nervosa (Schulz e Falkenburger 2004, Mattson, et al. 2008).

**Figura 1** – (A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal (os neurônios dopaminérgicos se localizam na SNpc e se projetam para o estriado (núcleo caudado e putâmem) e (B) via nigroestriatal de um paciente com DP (a via nigroestriatal se degenera e ocorre a despigmentação da SNpc com a perda de neurônios dopaminérgicos. E em (C) imuno-histoquímica dos corpúsculos de Lewy (sinucleína e ubiquitina) em neurônios dopaminérgicos na SNpc. Adaptado de (Dauer e Przedborski 2003).



Os neurônios afetados pela formação dos corpos de Lewy se mantêm funcionais por um tempo, porém morrem prematuramente, e os neurônios com axônios longos são mais vulneráveis do que neurônios de circuitos locais (Kidd 2000). A deposição dos corpúsculos de Lewy na DP ocorre previamente ao aparecimento dos sinais e sintomas motores (Braak, et al. 2003).

Os sinais da DP aparecem quando a morte neuronal ultrapassa o limiar crítico que resulta na diminuição de 70 a 80% de dopamina (DA) nos terminais nervosos do estriado (Meissner, et al. 2004, Warraich, et al. 2009). A redução da atividade dopaminérgica no estriado e no lobo frontal na DP pode levar a falha na memória de trabalho, dificultando o processo da memória declarativa que requer estratégias operacionais (Stebbins, et al. 1999). Essa doença tem seu início geralmente próximo dos 60 anos de idade e afeta ambos os gêneros e diferentes

raças. Os casos que iniciam antes dos 40 anos são chamados como parkinsonismo de início precoce (Fearnley e Lees 1991, Horstink e Morrish 1999). A degeneração nesses neurônios é irreversível e ocasiona a diminuição da produção de DA, sendo esse um neurotransmissor essencial no controle dos movimentos. Essa redução dopaminérgica resulta em alterações funcionais nos núcleos da base, principalmente o caudado e putâmen, que são estruturas envolvidas também no controle dos movimentos, provocando o aparecimento das principais manifestações da doença (Horstink e Morrish 1999, Berg, et al. 2001). A via dopaminérgica nigroestriatal contém neurônios dopaminérgicos, cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para os núcleos da base, ou seja, corpo estriado (Przedborski 2005). A redução na densidade neuronal gera uma diminuição na projeção de fibras dopaminérgicas que se projetam para o estriado dorsal causando redução dos níveis de DA e de seus metabólitos: ácido homovanílico (HVA) e 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (Gerlach e Riederer 1996, Rubio-Osornio, et al. 2009).

Essa doença afeta principalmente o sistema motor, porém sinais não motores como distúrbios do sistema nervoso autônomo, alterações do sono, de memória e depressão, também podem ocorrer (Buob, et al. 2010, Marrachelli, et al. 2010). Além desses sintomas, há também os distúrbios cardiovasculares como a hipotensão ortostática (HO), hipotensão pós-prandial, arritmias cardíacas, livedo reticularis (descoloração cianótica que aparece como resultado de uma resposta fisiológica provocado pela depleção das reservas de catecolaminas em terminais de nervos periféricos) e edema de membros posição dependente (Nicaretta, et al. 1998, Ziemssen e Reichmann 2010). Estes sinais não motores podem estar relacionados ao envolvimento do Sistema Nervoso Central, bem como das vias pós-ganglionares periféricas do Sistema Nervoso Autônomo (Goldstein, et al. 2002, Jost 2003, Adhiyaman, et al. 2008).

A literatura tem mostrado controvérsias sobre o envolvimento do sistema nervoso simpático nas disfunções autonômicas na DP. Já em 1817, James Parkinson em sua monografia “Ensaio sobre a paralisia agitante” descreveu sobre a possível concomitância de fenômenos de alteração autonômica associados à doença de Parkinson (Nicaretta, et al. 1998, Ziemssen e Reichmann 2010). Ainda há muitas especulações quanto à fisiopatologia desses sinais não motores como a HO, assim como a gravidade do comprometimento hemodinâmico, que pode estar

envolvida a um distúrbio central com repercussão ao nível bulbar (Gross, et al. 1972, Rajput e Rozdilsky 1976, Singer, et al. 1992, Nicaretta, et al. 1998).

Na DP a neuropatologia ocorre inicialmente em estruturas periféricas, e ao longo da doença atinge as vias autonômicas para um posterior acometimento do sistema nervoso central. Dessa forma estudos relacionados às vias autonômicas são importantes, pois o sistema nervoso autônomo representa a porção mais constante e rapidamente acometida do sistema nervoso, proporcionando assim uma base patológica do início da disfunção pré-motora (Braak, et al. 2007, Marrachelli, et al. 2010, Jain 2011).

A DP evolui em seis estágios neuropatológicos (Braak, et al. 2003), envolvendo diferentes neurotransmissores como a dopamina, acetilcolina, serotonina, noradrenalina, entre outros e desencadeia múltiplas manifestações clínicas, como por exemplo as autonômicas. É importante salientar que o reconhecimento dos sintomas que antecedem ao quadro motor clássico (estágio inicial ou pré-motor) poderá auxiliar no diagnóstico precoce da DP, em razão de que os sinais motores parkinsonianos aparecem somente quando a morte neuronal excedeu um limiar crítico em que já houve perda de até 80% de DA nos terminais nervosos do estriado (Meissner, et al. 2004).

De acordo com Buob e colaboradores (2010) estudos de imagens revelam que há perda de nervos simpáticos cardíacos, nos estágios iniciais da DP, mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos de disfunção autonômica. Os resultados mostram que há uma relevante disfunção simpática, relacionados à determinação direta de catecolaminas. Isso ocorre possivelmente porque a desnervação simpática seria incompleta e as fibras restantes seriam suficientes para a manutenção do controle autonômico.

Em contrapartida, a depressão de diversos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca resiste a uma alteração significativa da atividade parassimpática quando há falha autonômica subclínica, isso em uma fase precoce da DP (Buob, et al. 2010). Contudo, (Oka, et al. 2011) descreveram que há disfunção cardíaca na fase inicial da DP, mesmo sem HO, sendo esse sintoma decorrente da alteração vasomotora simpática, e não parassimpática.

A causa da DP ainda permanece desconhecida, e seu tratamento se mantém sintomático, mas acredita-se que está relacionada a diversos fatores etiopatogênicos, como as alterações genéticas, neurotoxinas ambientais,

excitotoxicidade, anormalidades mitocondriais, neuroinflamação e estresse oxidativo (Lev, et al. 2003, Przedborski 2005).

O cérebro representa o órgão mais sensível ao estresse oxidativo, isso devido a algumas características específicas, tais como: alto consumo de oxigênio (20% de todo organismo); altos níveis de ferro e ascorbato (forma ionizada do ácido ascórbico), sendo ambos cruciais para peroxidação lipídica da membrana; níveis baixos de agentes antioxidantes; tendência a acumular metais; capacidade da micróglia (macrófagos do SNC) de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) sob ativação e secretar citocinas inflamatórias; altas concentrações de neurotransmissores auto-oxidáveis, tais como dopamina e noradrenalina, que reagem com  $O_2$  produzindo ROS; presença de aminoácidos excitotóxicos (glutamato); presença de enzimas como a monoamina oxidase (MAO) e tirosina, que produzem  $H_2O_2$  como produtos finais de suas atividades; alto tráfego de  $Ca^{+2}$  através da membrana neuronal, seguindo interferência com transporte de íons, pela ruptura de metabolismo energético (Gaeta e Hider 2005, Smith, et al. 2007).

A neuromelanina da SN acumula uma alta quantidade de ferro que pode se deslocar progressivamente para o citosol durante a patogênese da DP, e dessa forma levar ao aumento de ROS, tornando os neurônios dopaminérgicos nigrais suscetíveis ao estresse oxidativo. Achados histológicos demonstraram que neurônios mais pigmentados são os primeiros a degenerarem na DP. O ferro contribui para o estresse oxidativo, como também induz a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, resultando na formação de corpos de Lewy. Um quelante de ferro demonstrou-se efetivo como neuroprotetor em um modelo de degeneração nigral induzido por inibidor de proteossomo, resultando numa menor perda de neurônios dopaminérgicos e reduzindo a presença de  $\alpha$ -sinucleína em corpos de Lewy, e confirmando a influência do ferro nas alterações neuropatológicas da DP (Fasano, et al. 2003, Cole, et al. 2005, Zhang, et al. 2005).

Os tratamentos existentes para DP não interferem na progressão da doença. Contudo, o controle dos sintomas pode ocorrer pela administração de diferentes drogas que podem tanto aumentar os níveis de DA no encéfalo ou mimetizarem os mecanismos desse neurotransmissor (Dunnet e Björklund 1999, Kitamura, et al. 2002, Samii, et al. 2004, Singh, et al. 2007, Warraich et al. 2009). As drogas que são utilizadas para o tratamento da DP são principalmente as que substituem a DA como: inibidores da dopa descarboxilase de ação periférica,

inibidores da catecol-o-metiltransferase (COMT), agonistas dos receptores de DA, inibidores da MAO-B, drogas que liberam dopamina, amantadina e antagonistas de receptores colinérgicos, sendo esses tratamentos destinados a equilibrar a alteração neuroquímica provocada principalmente pela degeneração da via nigroestriatal dopaminérgica, além de somente minimizar os sintomas da doença (Poewe e Wenning 1996, Kitamura, et al. 2002, Warraich, et al. 2009).

A administração do L-DOPA tem como objetivo a reposição dos níveis de DA, que estão comprometidos devido ao grau de neurodegeneração (Sarre, et al. 1998, Kostrzewa, et al. 2005) e continua a ser o tratamento mais eficaz para sinais motores da DP (Fahn 2008, Olanow 2008). O mecanismo de ação da L-Dopa baseia-se na capacidade dela ser convertida em dopamina no cérebro e dessa forma corrigir o estado de deficiência de DA presente nos pacientes com parkinsonismo (Poewe e Wenning 1998). Ela é rapidamente absorvida no duodeno e jejuno proximal e apresenta uma meia vida plasmática de 50 a 120 minutos. Periféricamente essa droga é descarboxilada pela dopa descarboxilase (convertida em dopamina) e pela catecol-O-metil-transferase (COMT), e convertida em 3-O-metil-dopa. A fórmula da L-Dopa vêm associada aos inibidores da dopa descarboxilase periférica para não permitir a conversão em dopamina na corrente sanguínea. A levodopa disponível comercialmente é associada à benserazida (Prolopa) e à carbidopa (Sinemet). Há formulações que permitem uma liberação gradual da droga no tubo digestivo, com uma duração maior do seu efeito (Prolopa HBS e Cronomet) (Ferraz 1999).

Os pacientes normalmente iniciam o tratamento da DP com agonista dos receptores da DA, porém em alguns anos, se fará necessário a administração do precursor dopaminérgico 3,4-dihidroxifenilalanina (levodopa), sendo esse tratamento realizado desde a década de 60. Essa droga é efetiva no tratamento da bradicinesia e rigidez muscular, porém, não é eficiente no tratamento do tremor de repouso (Ehringer e Hornykiewicz 1960, Rajput 2001, Deleu, et al. 2002, Schapira, et al. 2006).

O tratamento com o prolopa se inicia com doses pequenas, com o intuito de diminuir os possíveis efeitos colaterais, e com a progressão da doença essas doses são aumentadas e o uso crônico da droga, acarreta no desenvolvimento de complicações motoras que são resistentes a terapia, como movimentos involuntários incapacitantes, ou seja, aumento na instabilidade de

movimentos (Ehringer e Hornykiewicz 1960, Rajput 2001, Deleu, et al. 2002, Schapira, et al. 2006). Outra consequência decorrente da administração da L-DOPA são flutuações motoras, em que a hipocinesia e a rigidez muscular pioram repentinamente de poucos minutos a horas e em seguida voltam a melhorar (Nutt 2003, Lundblad, et al. 2004, Brotchie, et al. 2005, Cenci e Lundblad 2006, Jenner 2008, Obeso, et al. 2008).

Mesmo que a etiologia da discinesia induzida por L- DOPA continue incerta, sintomas semelhantes são reproduzidos em roedores e primatas que sofreram lesões neurotóxicas da via dopaminérgica nigroestriatal, e que foram submetidos ao tratamento crônico com L-DOPA (Henry, et al. 1998, Cenci, et al. 1998, Mura, et al. 2002, Carta, et al. 2006). Há estudos com diferentes abordagens para o tratamento da DP, tais como glutamato, 5-hidroxitriptamina (5-HT), canabinóides, adenosina, agonistas adrenérgicos, histaminérgicos e opióides (Chase, et al. 2000, Silverdale, et al. 2003, Brotchie 2005, Jenner 2008).

Na DP, os transportadores de noradrenalina e serotonina estão diretamente envolvidos na depuração da dopamina nos terminais sinápticos, isso devido à degeneração dopaminérgica que ocorre nessa doença. O aumento extracelular de dopamina originado pela L-Dopa pode interferir nos níveis plasmáticos e em consequência na recaptação de noradrenalina sináptica, e, dessa forma alterar a contratilidade cardíaca. Dados recentes da literatura evidenciam que a L-Dopa promove efeitos hipotensores causados primariamente por mecanismo inotrópico negativo, e não por um mecanismo vasodilatador periférico (Noack, et al. 2014). No entanto, se esse efeito é iniciado periféricamente ao nível cardíaco ou por um efeito mediado por vias simpáticas inibitórias de origem central, ainda precisa ser esclarecido.

O estresse gravitacional ou mudança postural representa uma variável importante capaz de afetar a homeostase circulatória, responsável pela redistribuição sanguínea através da ortostase, sendo que a oposição hidrostática ao retorno venoso, a perda de fluido para o terceiro espaço, a redução do retorno venoso e a diminuição do débito cardíaco, são alterações hemodinâmicas secundárias ao efeito gravitacional que agem como estímulos múltiplos, resultando numa variedade de efeitos compensatórios (Schutzman, et al. 1994, Gabbett, et al. 2001).

O teste de inclinação (TI) ou teste tilt em humanos é muito utilizado para o diagnóstico de síncope, pré-síncope, tonturas, palpitações relacionadas ao ortostatismo e disautonomias. No TI o paciente deve permanecer deitado previamente à inclinação por, pelo menos, dez minutos. Na mesa do exame há suporte para os pés e cintos de segurança e é inclinável até 60 ou 70 graus. Esse método dura em torno de 20 a 40 minutos em que ocorre passagem da posição supina para posição inclinada de 60° a 70°, dependendo do protocolo do exame. Durante o exame, o paciente é monitorado pelo eletrocardiograma e medidas da PA (Wolf, et al. 2006).

O teste de hipotensão postural (tilt) em humanos induz a redução no volume sanguíneo central e no débito cardíaco, levando à inibição das vias baroreflexas arteriais e cardiopulmonares, permitindo dessa forma a manutenção da PA durante o estresse ortostático (Bahjaoui, et al. 2000, Ramirez, et al. 2007). Na DP há relatos de distúrbios cardiovasculares como a HO (Nicaretta, et al. 1998, Ziemssen e Reichmann 2010), que não se sabe se ocorre pela doença ou pelo tratamento. Dessa forma, torna-se relevante estudar os efeitos cardiovasculares durante o tilt em modelos animais de parkinsonismo e avaliar se o tratamento ou a doença são responsáveis por essas alterações.

Diferentes modelos que resultam na morte neuronal na SN são utilizados para o estudo da DP, como por exemplo o MPTP (1-metil-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahidropiridina), a 6-OHDA (6-hydroxydopamine) e o LPS (Lipopolisacarídeo). A neurotoxina escolhida como ferramenta de estudo para esse trabalho foi a 6-OHDA que é uma toxina que induz a morte de neurônios dopaminérgicos na DP, sendo a maior perda de neurônios dopaminérgicos visualizada na região ventral do mesencéfalo (Luthman, et al. 1989, Dauer, et al. 2003). Essa neurotoxina apresenta estrutura semelhante à DA e a norepinefrina, além de possuir uma alta afinidade pelos transportadores da membrana plasmática destas catecolaminas (Breese e Traylor 1971, Meredith, et al. 2008). A quantidade de perda de neurônios dopaminérgicos e seus terminais estriatais nesses modelos estão relacionados tanto pela localização, quanto pela dose da toxina, assim como o tempo de duração da lesão (Dauer e Przedborski 2003, Meredith, et al. 2008).

A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, e para utilizá-la como modelo de parkinsonismo é necessário que essa neurotoxina seja administrada diretamente no local por meio de cirurgia estereotáxica, seja na SNpc

ou no feixe prosencefálico medial, responsável por levar projeções ascendentes dopaminérgicas e serotoninérgicas ao encéfalo ou ao estriado, que é a via dopaminérgica nigroestriatal. Após a administração os neurônios dopaminérgicos se degeneram em 24 horas. Essa toxina também pode ser injetada diretamente no estriado, sendo que a 6-OHDA resulta na degeneração mais retrógrada de neurônios nigroestriatais que demoram em torno de três semanas. A administração da 6-OHDA não leva à formação de corpúsculos de Lewy (Dauer, et al. 2003).

A injeção da 6-OHDA resulta numa lesão diferente da lesão na DP, sendo que seu mecanismo ainda não é compreendido. A 6-OHDA pode induzir lesão em qualquer tecido cerebral que apresente neurônios catecolaminérgicos, sendo que a morte desses neurônios pode ocorrer por três mecanismos como: a geração de ROS por auto-oxidação intra ou extracelular; pela ação da MAO produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou pela inativação da cadeia respiratória mitocondrial (Blum, et al. 2001, Dauer e Przedborski 2003).

A DP tem sido associada a eventos de alterações cardiovasculares, porém não está ainda esclarecido se esses efeitos como a HO são resultantes da doença ou do seu tratamento. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar possíveis correlações cardiovasculares com a DP, ou seu tratamento, no modelo animal de lesão com 6-OHDA.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os parâmetros cardiovasculares e autonômicos em um modelo animal de parkinsonismo induzido por 6- OHDA após o tratamento com L-Dopa.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar parâmetros cardiovasculares basais em todos os grupos experimentais;
- Verificar aspectos autonômicos basais em todos os grupos experimentais;
- Estudar as variações hemodinâmicas após o tratamento com L-Dopa e avaliar a influência desse tratamento no sistema cardiovascular dos animais não lesados;
- Avaliar os efeitos cardiovasculares e autonômicos decorrentes de um protocolo de estresse ortostático em todos os grupos experimentais.

**ARTIGO CIENTÍFICO****ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS DE RATOS COM  
PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA E TRATADOS COM L-DOPA.**

Silva, A. S.<sup>1</sup>; Ariza, D.<sup>1</sup>; Crestani, C. C.<sup>2</sup>; Martins-Pinge, M. C.<sup>1</sup>

Correspondência para Marli C. Martins-Pinge, PhD, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina; Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86055-900 Londrina, PR, Brazil. Tel.: +55 43 3371 5927; fax: +55 43 3371 4467. E-mail: martinspinge@uel.br (M.C. Martins-Pinge).

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina/PR, Brasil;

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara/SP, Brasil

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os efeitos causados por medicamentos antiparkinsonianos sobre parâmetros cardiovasculares no modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA. **Métodos:** Ratos Wistar adultos pesando entre 280-320g, foram colocados no aparelho estereotático para microinfusão bilateral de 6-OHDA na substância negra. O grupo sham foi submetido ao mesmo procedimento, sendo infundido somente salina. Foram tratados por gavagem com L-Dopa ou água no período de 7 dias. Um dia após o cateterismo da artéria femoral foi realizado o registro basal nos animais acordados. Em seguida foram submetidos ao “tilt teste”. Foram avaliadas a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A análise espectral da variabilidade cardiovascular, foi realizada utilizando-se o Cardioseries V2.4. Para confirmação da lesão foi quantificado os níveis de dopamina no estriado por HPLC.

**Resultados:** Os níveis de dopamina estavam diminuídos no estriado, comprovando a lesão. Os valores basais da PAM e FC não foram diferentes entre os grupos. Durante o tilt observamos aumento da PAM e da FC, atenuado nos grupos 6-OHDA água, prolopa e no controle prolopa. No basal, a variância da pressão sistólica (PAS) foi menor nos grupos 6-OHDA e sham prolopa, sem alterações para o intervalo de pulso (IP) entre os grupos. Já na análise do baroreflexo espontâneo basal, o grupo 6-OHDA apresentou um maior ganho quando comparado aos outros grupos. Na análise espectral da variabilidade da PAS, do IP, e na análise baroreflexa durante o tilt, não foram observadas diferenças entre os 6 grupos experimentais. **Conclusões:** Nossos dados sugerem que o tratamento com prolopa não interferiu nas variáveis cardiovasculares já alteradas pela lesão, porém durante o tilt os animais 6-OHDA água e prolopa tiveram uma menor compensação cardiovascular, sugerindo um possível comprometimento do sistema nervoso autônomo no parkinsonismo induzido por 6-OHDA.

**Palavras-chave:** Pressão arterial. Frequência cardíaca. Prolopa. Variabilidade. Tilt.

## INTRODUÇÃO

Clinicamente, a doença de parkinson (DP) é caracterizada principalmente por sinais e sintomas motores tais como bradicinesia, rigidez, tremor e instabilidade postural. É uma doença neurodegenerativa progressiva em que há a perda irreversível de neurônios dopaminérgicos na substância negra porção compacta (SNpc) localizada no mesencéfalo. Essa degeneração acarreta em alterações funcionais nos núcleos da base (caudado e putâmen), que estão envolvidos no controle dos movimentos, levando ao aparecimento dos principais sintomas dessa doença (Horstink e Morrish 1999, Paulson e Stern 2004).

Na DP o sistema motor é o mais visivelmente acometido, porém há sinais não motores como distúrbios do sistema nervoso autônomo, e entre eles os distúrbios cardiovasculares como a hipotensão ortostática (HO) (Birkmayer e Riederer 1985, Calne 2001). Esses sinais podem estar relacionados ao envolvimento do sistema nervoso central bem como das vias pós-ganglionares periféricas do sistema nervoso autônomo (Jost 1999, Goldstein, et al. 2002, Jost 2003, Adhiyaman, Hobson, e Meara 2008). A interferência dos tratamentos da DP resultando nas disautonomias, ainda é um fator muito discutido. Os fármacos utilizados no tratamento da DP, entre elas o prolopa podem ocasionar distúrbios cardiovasculares como a HO (Korczyn 1990, Nicaretta, Pereira e Pimentel 1998). Dessa forma, acredita-se que o envolvimento do Sistema Nervoso Autônomo na DP possa decorrer da própria doença, da medicação em uso ou de uma combinação destes fatores (Stoessl 1992, Nicaretta, Pereira e Pimentel 1998).

A administração do L-DOPA tem como objetivo a reposição dos níveis de DA, que estão comprometidos devido ao grau de neurodegeneração (Sarre, et al. 1998, Kostrzewa, et al. 2005). A L-DOPA ainda continua a ser o tratamento mais eficaz para a DP (Fahn 2008, Olanow 2008), sendo a droga mais eficiente utilizada para o controle dos sinais motores, porém esse mesmo fármaco causa várias complicações motoras, principalmente as discinesias.

Ainda não há um modelo experimental que represente todas as manifestações da DP. O modelo adotado para este estudo foi a 6-OHDA (6-hydroxydopamine) que é um modelo clássico de parkinsonismo. A maior degeneração dos neurônios dopaminérgicos é observada na região ventral do mesencéfalo (Luthman, et al. 1989, Dauer, et al. 2003, Schulz e Falkenburger 2004).

A mudança postural em condições normais ou induzidas como no “*head up tilt*” resulta no deslocamento do sangue para os membros inferiores diminuindo o fluxo sanguíneo para a cabeça. Essa condição demanda ajustes compensatórios que se não ocorrerem prontamente podem levar a queda da pressão arterial, podendo ocasionar sintomas como à intolerância ortostática, e até a perda súbita da consciência (Streeten e Scullard 1996). A modulação pelo sistema nervoso autônomo garante um adequado débito cardíaco, que acarrete em respostas às oscilações do volume sanguíneo impostas pela postura ortostática. Em situações que induzam disfunção autonômica, como no parkinsonismo, pode levar à hipotensão ortostática, e interferir na homeostase circulatória (Smith e Fasler 1983, Wing e Tonkin 1997).

Considerando todos os aspectos mencionados, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tratamento com L-DOPA associada à benserazida (Prolopa) nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos basais, bem como durante um protocolo de “*head up tilt*”, em ratos com parkinsonismo induzido por 6-OHDA.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Foram utilizados, ratos Wistar adultos provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pesando entre 280-320 gramas no início do experimento. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (45X25X25 cm), em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) num ciclo claro/escuro de 12/12 horas com comida e água a vontade.

Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (processo número: 1288.2012.55) e todos os cuidados foram tomados no intuito de minimizar o número de animais utilizados ao longo dos experimentos sem, no entanto, comprometer a análise estatística dos resultados.

### **Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais: (1) controle tratado com água (n=7); (2) controle tratado com prolopa (n=7); (3) sham água (n=8); (4) sham prolopa (n=8); (5) 6-OHDA água (n=6) e (6) 6-OHDA prolopa (n=8). Os grupos controles não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico. Enquanto que os grupos sham e 6-OHDA foram submetidos à mesma cirurgia, sendo que o primeiro recebeu somente salina estéril e o grupo 6-OHDA recebeu a infusão da toxina. Todos os grupos foram tratados por gavagem com água ou L-Dopa associada à benserazida (prolopa), que foi escolhida por incluir o inibidor da dopa descarboxilase periférica impedindo a conversão em dopamina na corrente sanguínea.

### **Cirurgia Estereotáxica**

Previamente a cirurgia, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) mais cloridrato de xylasina (20mg/kg, i.p.). Os animais dos grupos sham e 6-OHDA foram colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, modelo 957L). Em seguida foram feitas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão da salina ou da neurotoxina diretamente na SNpc, utilizando as seguintes coordenadas estereotáxicas determinadas a partir do bregma: - 5,0 mm do bregma; latero-lateral (LL)  $\pm$  2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 8,0 mm do crânio segundo (Paxinos e Watson 1998).

O grupo sham recebeu a microinfusão bilateral de 1 $\mu$ l de salina estéril, enquanto que o grupo 6-OHDA foi microinfundido com a neurotoxina 6-OHDA na dose: 6mg/mL; Sigma Chemical Co., EUA, dissolvido em salina estéril complementada com ácido ascórbico, ambos na substância negra (SN). A microinfusão de 1 $\mu$ l da toxina foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma micro-seringa de 10  $\mu$ l (Hamilton, EUA) que, por sua vez, foi encaixada em uma bomba de infusão (Havard Apparatus, EUA). Seguida a infusão da toxina (3 minutos), a agulha permanece no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo da substância. A seguir, o escalpo foi suturado e os animais retirados do estereotáxico. Todos os animais receberam no final da cirurgia uma dose profilática de 0,1 mL de antibiótico veterinário. Foram

colocados em gaiolas individuais com ambiente aquecido para recuperação da anestesia e posteriormente encaminhado à sala de manutenção dos animais.

Para esse experimento padronizou-se o tempo de 7 dias, sendo que o modelo e o tempo após a lesão foram selecionados a partir da bibliografia já existente (Ariza, et al. 2010).

### **Tratamento com 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa)**

Com intuito de avaliar a influência no sistema cardiovascular e possíveis efeitos colaterais causados por medicamentos antiparkinsonianos, os grupos sham e 6-OHDA foram tratados por gavagem com levodopa (L-Dopa) associada à benserazida (Prolopa HBS) 100mg/kg ou água no período de 7 dias (Padovan-Neto, et al. 2009). O tratamento foi iniciado no dia da cirurgia estereotáxica.

### **Canulação da Artéria Femoral**

Após 7 dias da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos à nova cirurgia sob anestesia de cloridrato de cetamina (100mg/kg) mais cloridrato de xylasina (20mg/kg, i.p.), para canulação crônica da artéria femoral, com o objetivo de registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). Após 24 horas da canulação, os animais foram submetidos ao registro basal da pressão arterial, seguido do protocolo experimental.

### **Registro da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca**

O registro direto da PA e FC realizou-se através da cânula arterial previamente implantada na artéria femoral e de acordo com trabalhos prévios do laboratório (Martins-Pinge, et al. 2005, 2007, Mehanna, et al. 2007, De Abreu, et al. 2009). O registro foi feito com os animais acordados e com livre movimentação. A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) e conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments). Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso.

### **Análise Espectral da Variabilidade da PA e da FC**

Durante o registro basal de 30 minutos de gravações da FC os ratos foram submetidos à análise espectral da Variabilidade no domínio da frequência. As gravações foram processadas utilizando-se software (CardioSeries v2.4), que se aplica um algoritmo para detectar a inflexão dos pontos ciclo-a-ciclo de uma onda periódica, determinando os valores de cada batimento da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD).

Os intervalos de pulso (IP) de séries temporais foram também gerados para medir o intervalo de tempo entre as leituras adjacentes da pressão diastólica. A variabilidade global dos IP foi avaliada com base na variância das séries temporais. A variabilidade dos IP no domínio da frequência foi avaliada pela análise espectral. A variabilidade da frequência cardíaca é decomposta em componentes oscilatórios fundamentais (*High Frequency* - HF, com variação de 0,15 a 0,4Hz, que corresponde à modulação parassimpática; *Low Frequency* - LF, com variação entre 0,04 e 0,15Hz, que é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do simpático. A relação LF/HF reflete as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração (Rubini, et al. 1993).

### **Análise da sensibilidade baroreflexa**

A sensibilidade baroreflexa (SBR) foi avaliada por meio do Método da Sequência, utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>). Séries temporais batimento-a-batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para análise da SBR. As séries temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos progressivos do IP, ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após detecção de uma rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos ou reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não, de aumentos ou reduções do IP), o programa computacional buscava por alterações no IP sem qualquer intervalo, ou seja, *delay* de zero batimento. Uma sequência baroreflexa só foi utilizada quando

o coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os valores de PAS e IP foi maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média da inclinação da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência baroreflexa encontrada (Oosting, et al. 1997).

### **Teste de Hipotensão Postural (“head up tilt”)**

Os animais foram submetidos ao “*head up tilt*” de acordo com Bedette et al. (2008). Ratos dos 6 grupos experimentais foram estimulados a entrar em um compartimento cilíndrico de aproximadamente 30 cm, descrito como contensor, para o registro da PA e FC por aproximadamente 10 minutos. O teste de hipotensão postural foi conduzido através da elevação da plataforma de “tilt”, pelo lado onde está posicionada a cabeça do animal de uma posição horizontal para uma inclinação de  $75^\circ$ , em aproximadamente 1 segundo. Os ratos, conectados ao sistema de registro cardiovascular, foram mantidos nessa posição por 15 minutos. Após esse período, os animais retornam a posição horizontal (em 1 segundo) e permaneceram por mais outro período de 15 minutos, até a estabilização dos parâmetros cardiovasculares (período de recuperação).

### **Determinação dos Níveis de Monoaminas por HPLC-ED do Estriado**

Para o controle da lesão na SNpc com as toxinas avaliou-se os níveis de dopamina no estriado. Para esta mensuração, ao final dos experimentos, os estriados dos cérebros dos animais foram extraídos, pesados e armazenados em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até a realização da análise por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performace) com detecção eletroquímica.

As amostras foram suspendidas com ácido perclórico 0,1M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 15  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de material cerebral. Esta amostra foi fragmentada com caneta sonicadora e centrifugada a 10.000 G por 40 minutos. O sobrenadante (20  $\mu\text{L}$ ) foi injetado em uma estação de HPLC. As áreas de pico foram comparadas às áreas dos padrões externos (SIGMA) para identificação das monoaminas e metabólitos. Os resultados foram expressos como ng/g de peso úmido do tecido.

### **Análise estatística**

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  o erro padrão da média (SEM). As diferenças entre os grupos experimentais e controle foram analisados por análise de variância ANOVA para comparações múltiplas, seguido de pós test Tukey-Kramer, com  $p < 0,05$  para indicar diferenças significativas entre os grupos experimentais.

## **RESULTADOS**

### **Análise da dopamina no estriado**

A análise do nível de dopamina (Figura 1) no estriado indicou que os níveis de dopamina nos grupos 6-OHDA (tratados com água:  $1,99 \pm 0,68$  ng/mg; 6-OHDA prolopa:  $1,10 \pm 0,32$  ng/mg) mostrou uma redução quando comparado aos grupos sham (sham água:  $4,79 \pm 0,49$  ng/mg; sham prolopa:  $3,92 \pm 0,58$  ng/mg) e aos grupos controle (controle água:  $5,52 \pm 0,66$  ng/mg; controle prolopa:  $6,34 \pm 0,31$  ng/mg). Estes resultados indicam que houve uma perda maior que 50% de DA, confirmando a lesão que não é recuperada pelo tratado com prolopa.

### **Parâmetros cardiovasculares basais**

A análise dos efeitos do tratamento por gavagem com prolopa ou água durante 7 dias e após infusão bilateral de veículo ou 6-OHDA intranigral sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos acordados (Tabela 1), mostrou que não houve diferença na PAM e FC basal entre os 6 grupos experimentais.

### **Análise da variabilidade**

Na análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) basal mostrou que a variância foi menor nos grupos 6-OHDA e sham prolopa (Figura 2). Em relação ao intervalo de pulso (IP) não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 3).

### **Análise do baroreflexo espontâneo basal**

Na análise do baroreflexo espontâneo observamos que em relação à efetividade não houve diferença significativa entre os grupos. Em relação ao ganho

baroreflexo, houve diferença entre os grupos controle água ( $0,9\pm 0,2$ ) e 6-OHDA água ( $2,4\pm 0,6$ ) enquanto que os grupos controle prolopa ( $1,5\pm 0,2$ ), sham água ( $1,6\pm 0,2$ ) sham prolopa ( $1,3\pm 0,1$ ) e 6-OHDA tratados com prolopa ( $1,6\pm 0,2$ ) não diferiram entre si (Figura 4).

### **Parâmetros cardiovasculares durante o tilt test**

Os valores de PAM e FC antes do tilt (período final do contensor) não foram diferentes entre os grupos controle, sham e 6-OHDA tratados com água ou prolopa (controle água: PAM:  $111\pm 1,5$ mmHg; FC:  $398\pm 24,2$ bpm; e prolopa: PAM:  $111\pm 1,8$ mmHg; FC:  $377\pm 15,4$ bpm; sham água: PAM:  $117\pm 3,8$ mmHg; FC:  $416\pm 15,3$ bpm; prolopa: PAM:  $110\pm 3,3$ mmHg; FC:  $384\pm 25,2$ bpm; 6-OHDA água: PAM:  $111\pm 2,9$ mmHg; FC:  $396\pm 20,9$ bpm; 6-OHDA prolopa: PAM:  $107\pm 2,7$ mmHg; FC:  $416\pm 15,5$  bpm).

Todos os animais responderam durante o tilt com aumento da PAM e da FC. Os valores de variação da PAM e FC foram considerados através da diferença nessas variáveis no período do tilt (pico) comparado ao final do contensor, sendo que durante o tilt test, o aumento da PAM foi atenuado nos grupos controle tratado com prolopa, 6-OHDA água e prolopa, e o aumento da FC foi atenuado nos grupos sham e 6-OHDA prolopa, conforme observados na Figura 5.

### **Análise da variabilidade durante o tilt test**

Na análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) durante o tilt não observamos diferença significativa entre os 6 grupos experimentais (Figura 6). Em relação ao intervalo de pulso (IP) também não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos componentes LF, HF e na relação LF/HF (Figura 7).

### **Análise do baroreflexo espontâneo durante o tilt test**

Na análise do baroreflexo espontâneo durante o tilt em relação à efetividade não foram observadas diferenças entre os grupos. Em relação ao ganho baroreflexo, também não houve diferença entre os grupos controles, sham ou 6-OHDA tratados com água ou prolopa durante o tilt test (Figura 8).

## DISCUSSÃO

Nossos dados sugerem que o modelo de parkinsonismo por 6-OHDA apresenta alterações cardiovasculares e o tratamento com prolopa não interferiu nas variáveis cardiovasculares já alteradas pela lesão. No presente trabalho foi utilizado a injeção bilateral na SNpc, sendo esse modelo suficiente para produzir a perda de cerca de 70% de depleção de dopamina do estriado no decorrer de alguns dias. Este é o tamanho da lesão estimada para estudos de lesão parcial que tentam imitar a DP em que há o aparecimento dos sinais motores (Duty e Jenner 2011). Dessa forma, o modelo de parkinsonismo utilizado nesse estudo teve como objetivo causar uma deficiência de dopamina no estriado e assim correlacionar a interferência do tratamento com prolopa nos parâmetros cardiovasculares.

A administração da L-DOPA ou prolopa foi feita durante 7 dias após a cirurgia esterotáxica, com a finalidade de reposição dos níveis de DA, devido ao grau de neurodegeneração causado pela lesão por 6-OHDA. Porém, ainda há controvérsias na literatura quanto ao efeito desse tratamento, e não se tem certeza se essa droga pode aumentar ou impedir a perda de DA. Ainda há discussões quanto ao real papel desse precursor da DA, pois não se sabe ao certo a resposta dessa droga em condições ideais, muito menos em uma situação de lesão tecidual, em que há a presença de radicais livres, além de citocinas pró-inflamatórias que tornam o ambiente inóspito para a sobrevivência dos neurônios.

Há estudos sobre o L-DOPA como sendo somente uma substância protetora dos neurônios dopaminérgicos (Sarre, et al. 1998, Kostrzewa, et al. 2005). Porém no presente trabalho o grupo 6-OHDA tratado com prolopa apresentou os níveis de dopamina menores quando comparados aos grupos controles, conforme já descrito no trabalho de Muller e colaboradores (2004), em que demonstraram que a administração de L-DOPA em modelos de neurodegeneração in vitro apresentou efeitos neurotóxicos. Assim como o trabalho de Reksidler et al. (2009), que demonstrou que a administração concomitante de MPTP e L-DOPA resultou em compensação dos efeitos de prejuízo motor, contudo não pelo aumento dos níveis de DA estriatal (ocasionada pela L-DOPA) e sim pelo aumento da expressão da TH (tirosina hidroxilase). Esses resultados demonstraram evidências para um possível papel duplo antagônico exercido pela L-DOPA, que pode ser classificado como

neurotóxico ou neuroprotetor, dependendo do grau de integridade da via nigroestriatal, dose e tempo de tratamento com essa droga antiparkinsoniana.

No nosso estudo não foi observado diferença entre os valores de PA e FC nos níveis basais entre os grupos. É possível que o método de administração de drogas por meio da gavagem possa resultar em estresse para os animais e confundir medidas experimentais, em especial quando a PA e FC são parâmetros de interesse. No estudo de Walker e colaboradores (2012) desenvolveu-se uma pílula para que os ratos consumissem voluntariamente a droga, e dessa forma testou-se a hipótese se a administração da pílula seria significativamente menos estressante do que a gavagem. A PAM e FC foram analisadas por radiotelemetria continuamente por 5 horas após o tratamento, e coletou-se as fezes no período de 6 a 10 horas após o tratamento para análise de metabólitos de corticosterona. Os resultados demonstraram que tanto a pílula como a gavagem aumentaram significativamente a PAM durante a primeira hora, comparado ao controle. No entanto, o aumento da PAM foi significativamente maior após a administração por gavagem e permaneceu elevado até 5 horas, enquanto que com a pílula a PAM voltou ao normal dentro de 2 horas. Pode ser que a ausência de alterações cardiovasculares basais em nosso estudo tenha a interferência do tratamento por gavagem.

A análise da variabilidade da FC e PA no domínio da frequência, por meio da análise espectral, permite a identificação, em sequência de sucessivos valores de IP ou PAS, de oscilações rítmicas em diversas frequências, as quais podem refletir a modulação simpática, ou parassimpática, sobre o sistema cardiovascular, em condições fisiológicas e fisiopatológicas (Akselrod, et al. 1981, Pagani, et al. 1986, Malliani et al. 1991, Task Force 1996). Em nosso estudo os animais 6-OHDA apresentaram queda da variabilidade na PAS, sugerindo a uma menor modulação simpática vascular.

Embora o organismo seja capaz de corrigir variações abruptas de parâmetros fisiológicos, sabe-se da existência de certa variabilidade da PA e FC em torno dos níveis normais (Baselli, et al. 1986, Cerutti, et al. 1991). A sensibilidade baroreflexa (SBR) pode ser avaliada por meio da análise das alterações espontâneas da PAS e IP utilizando-se o método da sequência (Oosting, et al. 1997).

Uma característica importante dos mecanorreceptores em geral e dos pressoreceptores em particular é a chamada adaptação. Por esse processo,

alterações para mais ou para menos, desde que sustentadas, deslocam a faixa de funcionamento dos pressorreceptores para o novo nível de PA (hipertensão ou hipotensão), que passa a ser reconhecido como normal, não privando os indivíduos hipertensos, por exemplo, desse importante mecanismo de controle das variações momento a momento da PA, ao mesmo tempo colaborando para manter o nível elevado da PA. A literatura mostra que, em animais de experimentação, a adaptação dos pressorreceptores na hipertensão é acompanhada de queda de sensibilidade dos pressorreceptores. Isso determina que, para uma igual variação de PA, os hipertensos tenham uma menor atividade dos baroreceptores e, conseqüentemente uma deficiência na regulação reflexa da PA (Irigoyen, et al. 2001). É possível que embora não evidente em nosso estudo, os animais 6-OHDA tenham menor tônus simpático (Ariza, et al. 2014), e esse fato possa ser determinante para o aumento na sensibilidade baroreflexa nesses animais.

A piora na instabilidade postural com o tratamento do L-dopa foi relatada em estudos que avaliaram a amplitude de oscilação como uma medida de instabilidade postural, como o estudo de Bronte-Stewart e colaboradores (2002). Em contrapartida a melhoria das funções motoras no tratamento com L-dopa foram relatados em estudos que utilizavam diferentes tipos de avaliações clínicas, como a escala de classificação unificado da DP (UPDRS). O estudo de Bejjani e colaboradores (2000) descreve uma melhoria parcial com a terapia com L-dopa para os “sinais axiais” da DP que são: postura, marcha, estabilidade postural, e para os sinais relacionados as atividades da vida diária, como exemplo virar na cama, com a maioria das pontuações consideradas significantes. Porém, ainda há controvérsias quanto ao efeito do tratamento com L-dopa para diminuição da instabilidade postural, sendo que essa droga torna-se cada vez menos satisfatória após vários anos de progressão da doença (Maure, et al. 2003).

No trabalho de Wolf et al. (2006), foi realizado o teste de mudança postural (tilt 60°) em dois grupos que faziam a terapia com L-Dopa, o primeiro com pacientes que faziam o uso regular dessa droga e no outro grupo pacientes que interromperam o tratamento 12 horas antes do teste. A terapia com L-dopa reduziu a noradrenalina plasmática e, dessa forma resultou no aumento da distensibilidade venosa em que avalia os membros inferiores frente a mudanças na perna (compressão da coxa) nos membros inferiores, sendo este efeito colateral do tratamento venoso prejudicial para o retorno venoso e débito cardíaco.

O sistema nervoso autônomo é capaz de manter um comportamento adaptativo dinâmico que permita um adequado débito cardíaco que resulte em respostas às oscilações do volume sanguíneo impostas pela postura ortostática. Dessa forma condições clínicas que causem interferência na resposta do sistema baroreflexo podem interferir na homeostase circulatória (Smith e Fasler 1983, Wing e Tonkin 1997).

## **CONCLUSÃO**

Nossos dados mostraram que o tratamento com prolopa não interferiu nas variáveis cardiovasculares basais já alteradas pela lesão, sugerindo que possivelmente as alterações cardiovasculares não provêm do tratamento com prolopa nos animais e sim da própria lesão. Contudo, no período do teste de hipotensão postural, os animais 6-OHDA tratados com água ou prolopa tiveram uma menor compensação pressórica, sugerindo dessa forma um possível comprometimento do SNA nos ratos lesionados com 6-OHDA, bem como no tratamento com prolopa.

## **AGRADECIMENTOS**

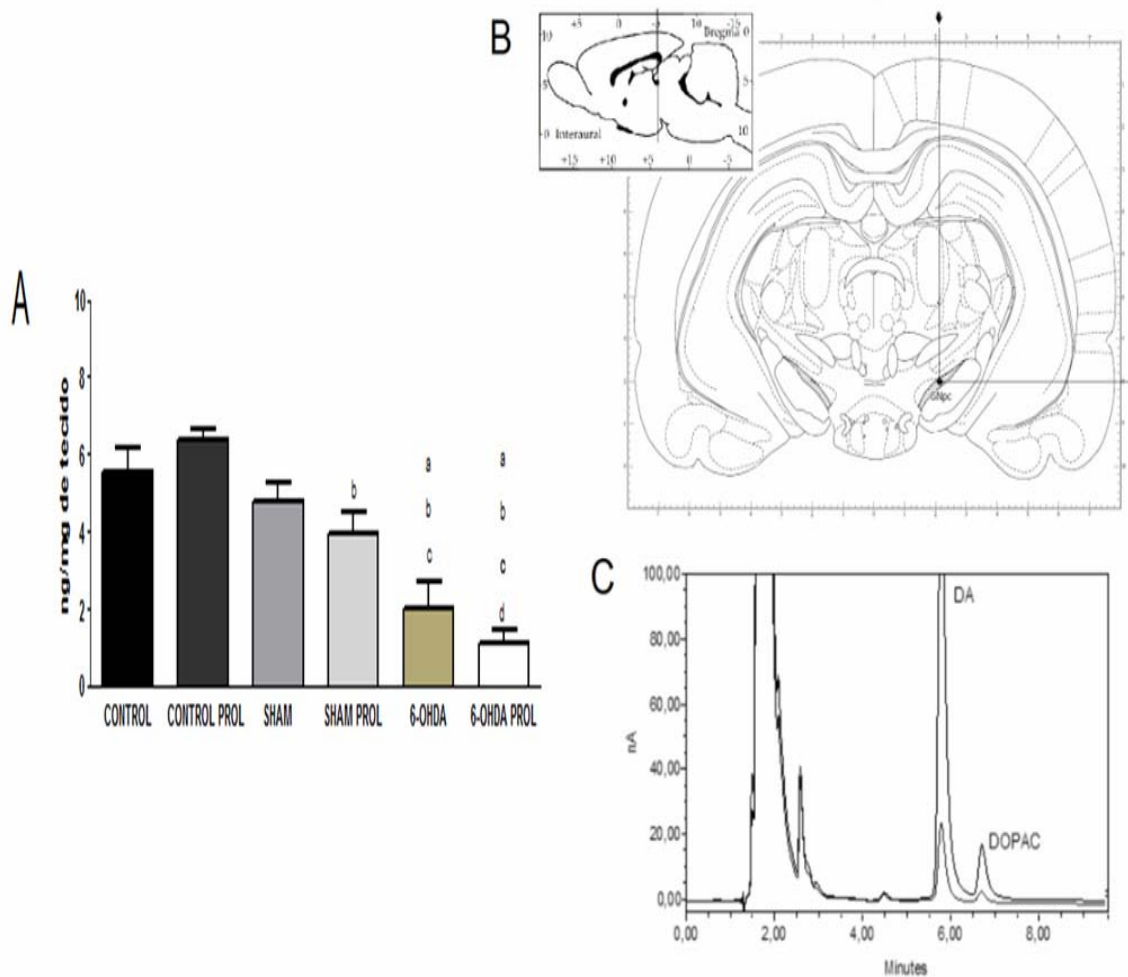
Os autores agradecem a técnica de laboratório Elisabete Zocal que nos auxiliou na determinação dos níveis de dopamina e ao Dr. Daniel Penteado por toda ajuda e suporte com a análise da variabilidade utilizando o software CardioSeries V2.4.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

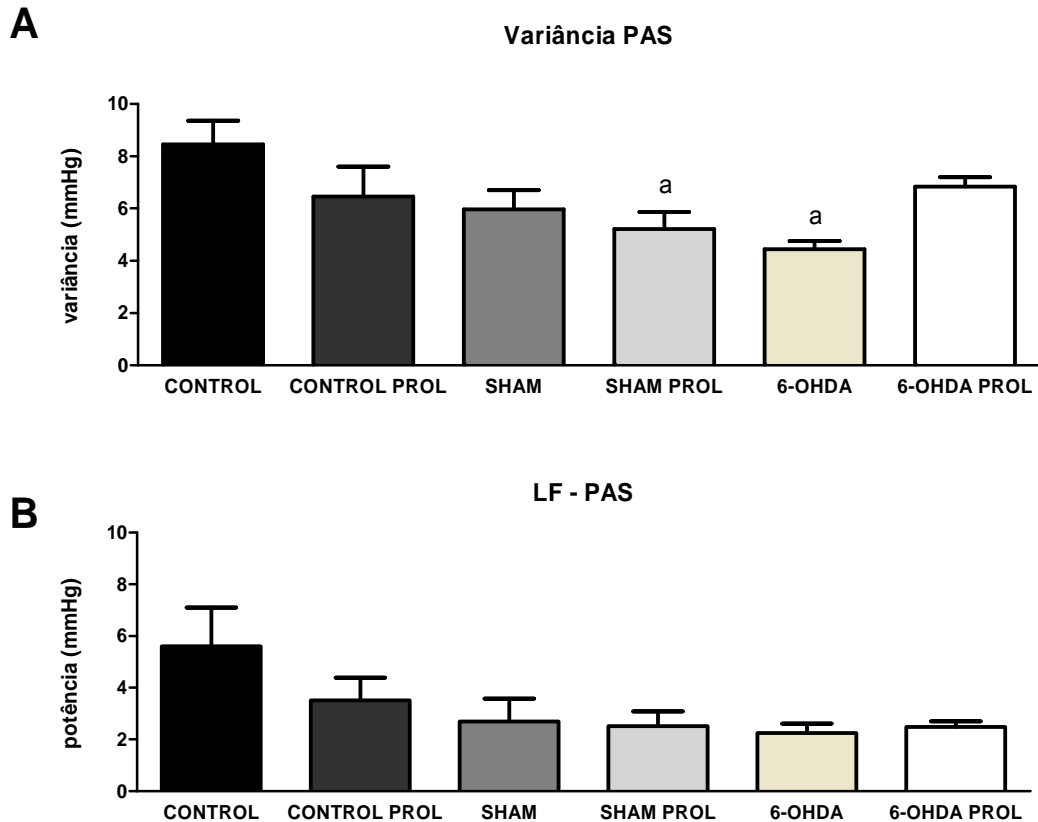
Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

## LEGENDA DAS FIGURAS

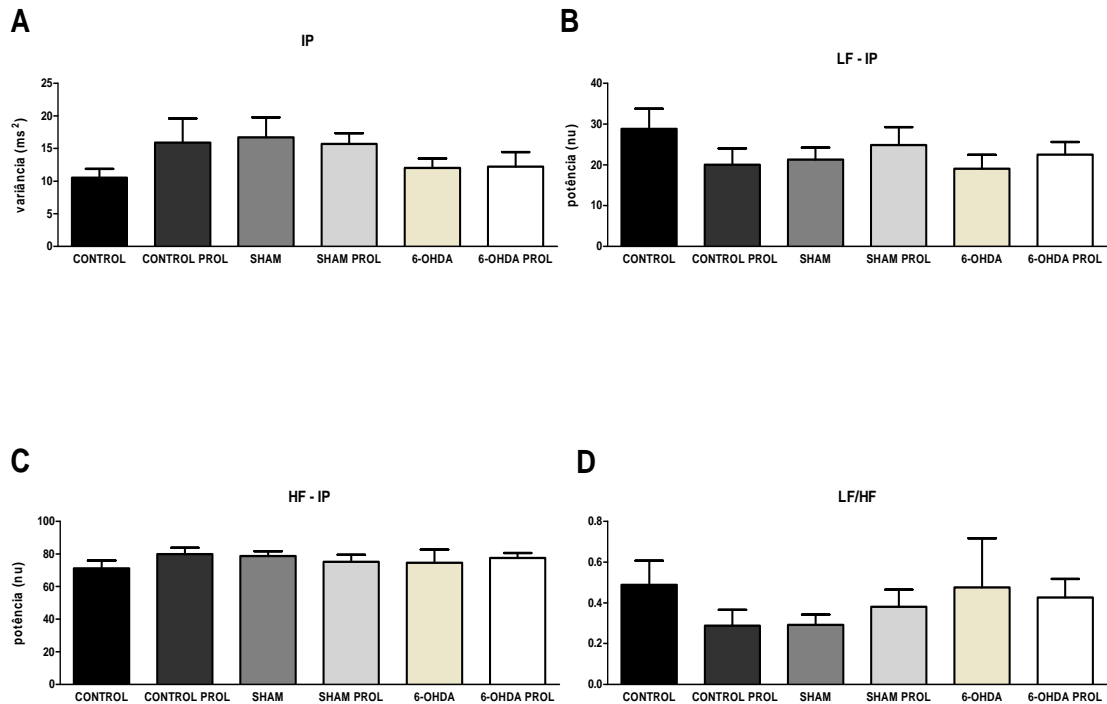
**Figura 1** – **A.** Nível de dopamina no estriado quantificado por HPLC. **a)** difere do controle água; **b)** difere do controle prolopa; **c)** difere do sham água; **d)** difere do sham prolopa. **B.** representação esquemática das coordenadas e local da infusão da toxina. Adaptado de Paxinos e Watson. **C.** representação gráfica da detecção de DA por HPLC, em que o pico mais alto indica os resultados de uma amostra de controle (placebo) e o pico menor de uma amostra de tecido lesado por 6-OHDA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM e a diferença considerada significativa foi de  $p < 0,05$ , foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.



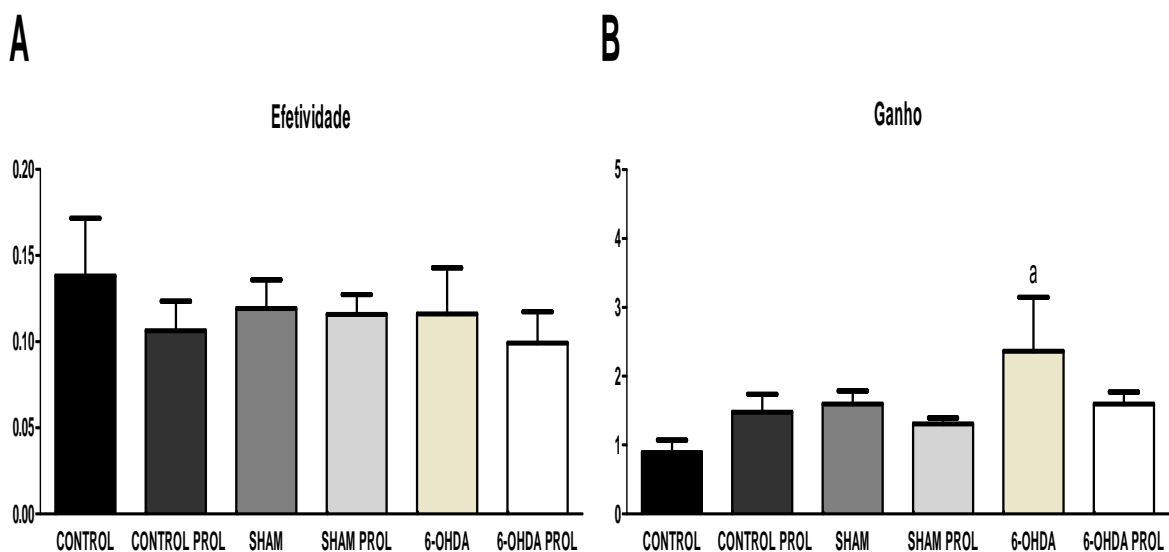
**Figura 2** – Análise espectral: a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão bilateral de salina intranigral (sham) ou 6-OHDA. **A.** Variância; **B.** LF. **a)** difere do controle água. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM, e a diferença considerada significativa foi de  $p < 0,05$ , foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.



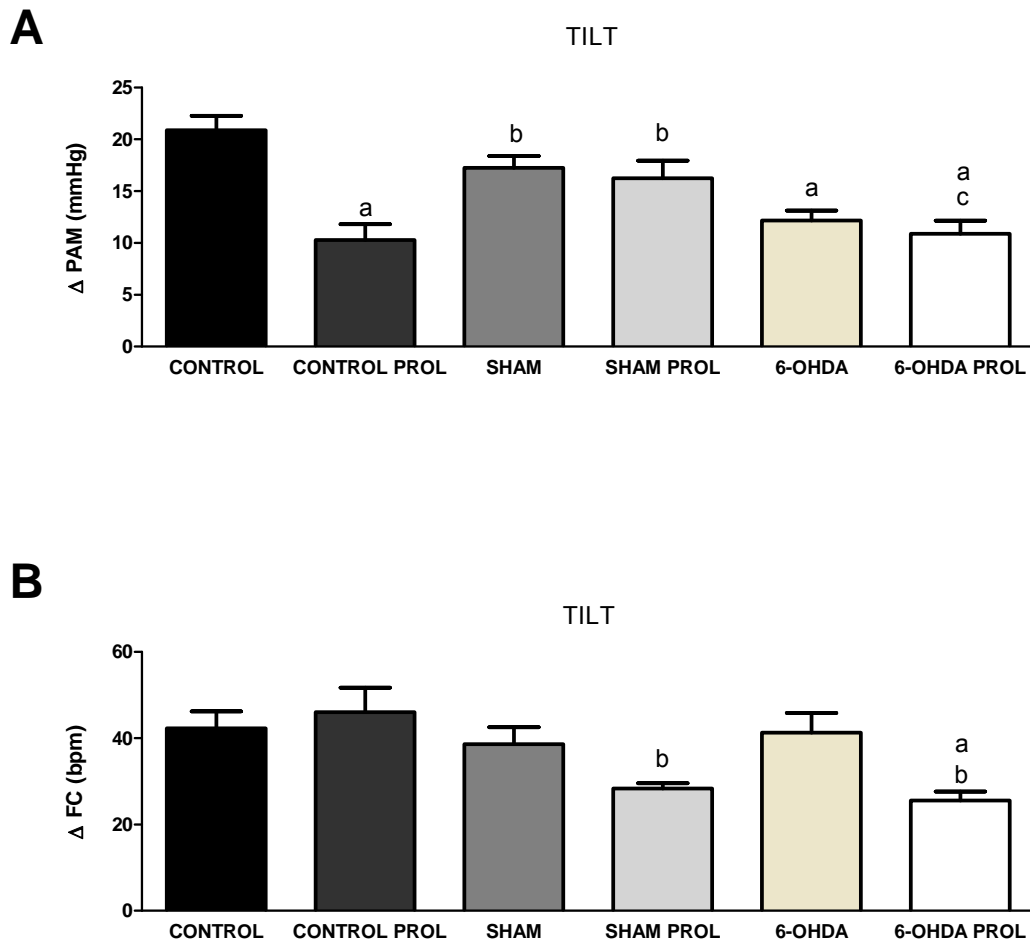
**Figura 3** – Análise da modulação autonômica cardíaca: variabilidade do intervalo de pulso (IP) em animais sham ou 6-OHDA. **A.** Variância; **B.** LF; **C.** HF; **D.** LF/HF. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM, e a diferença considerada significativa foi de  $p < 0,05$ , foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. LF: baixa frequência; HF: alta frequência.



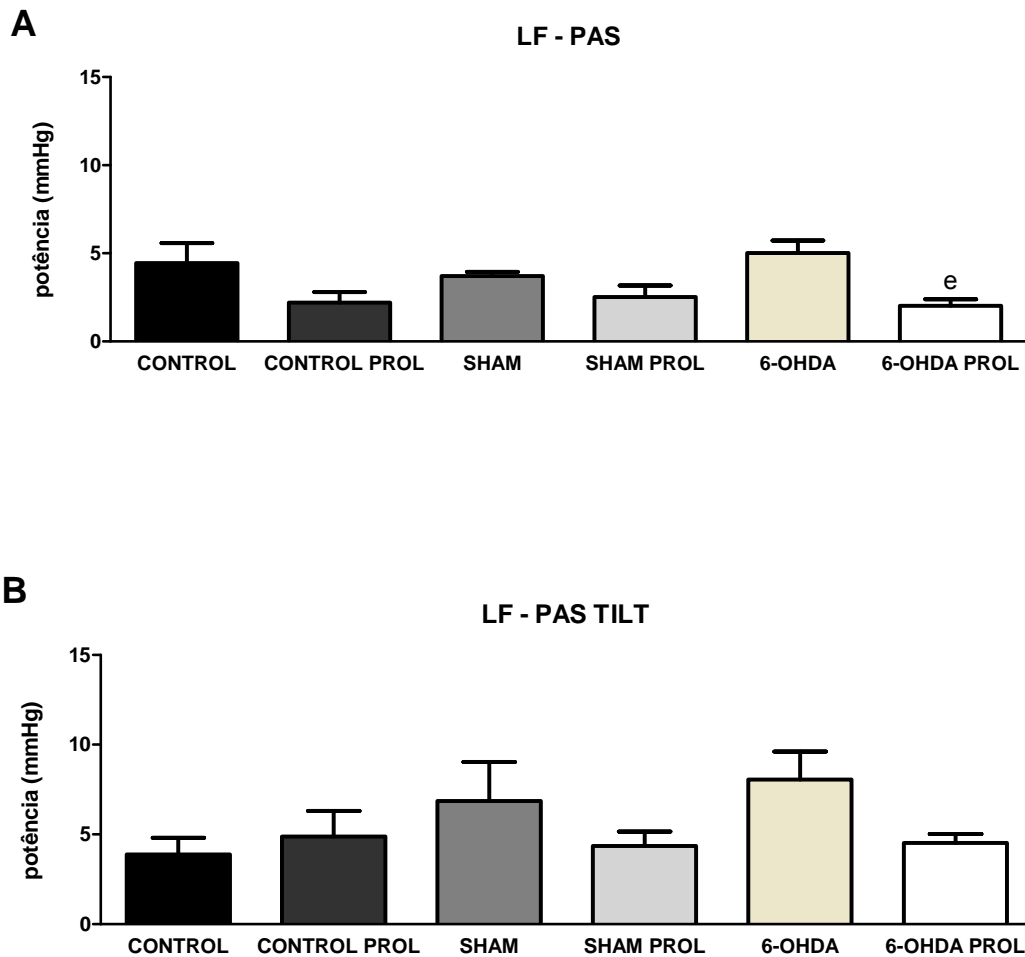
**Figura 4** – A análise do baroreflexo espontâneo basal: efetividade e ganho. **A.** Efetividade; **B.** Ganho. **a)** difere do controle água. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM, e a diferença considerada significativa foi de  $p < 0,05$ , foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.



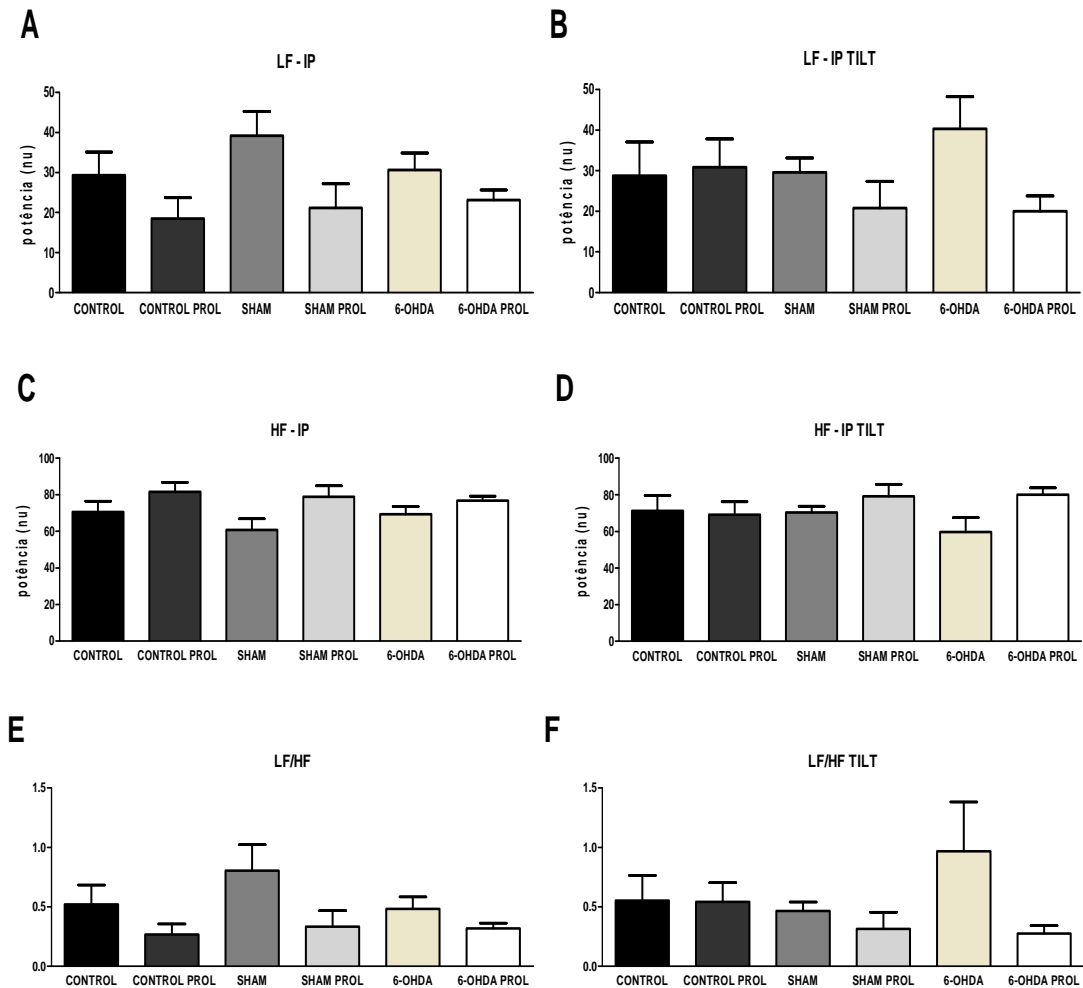
**Figura 5** – Análise dos efeitos cardiovasculares do tratamento com prolopa ou água em ratos acordados após a lesão com 6-OHDA analisados no período do tilt comparado ao final do contensor sobre **A.**  $\Delta$ PAM (variação da pressão arterial média) e **B.**  $\Delta$ FC (variação da frequência cardíaca). **a)** difere do controle água; **b)** difere do controle prolopa; **c)** difere do sham água; **d)** difere do sham prolopa. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM e a diferença considerada significativa foi de  $p < 0,05$ , foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.



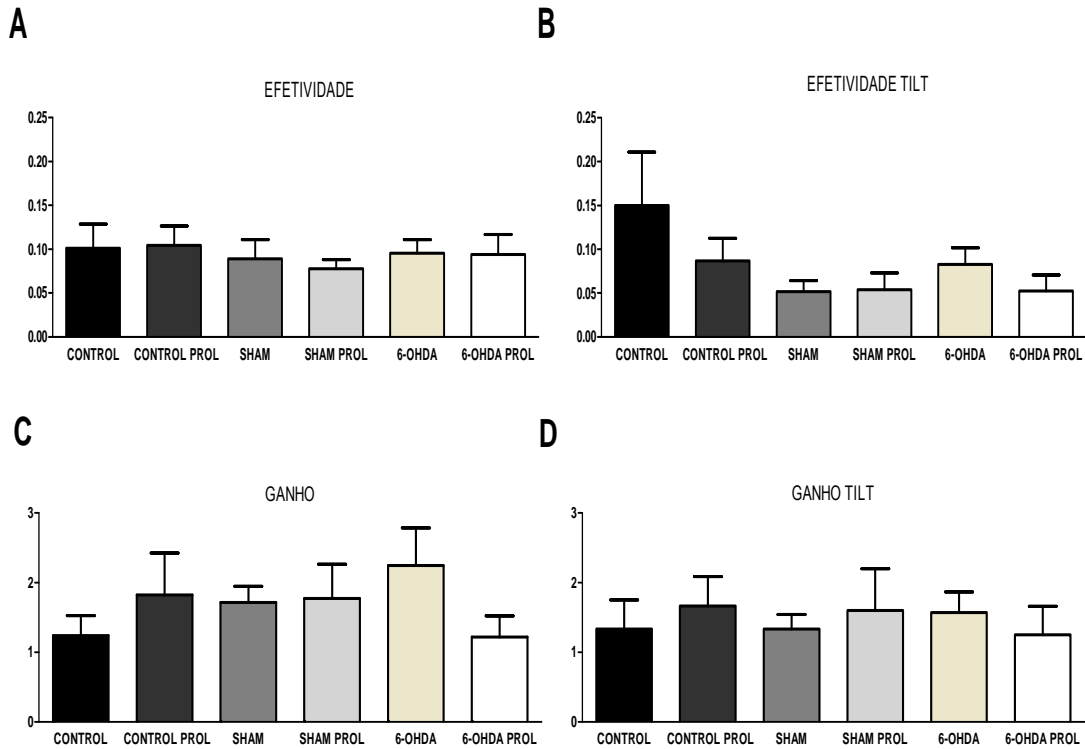
**Figura 6** – Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) durante o tilt test em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão bilateral de salina intranigral (sham) ou 6-OHDA. **A.** LF no final do contensor (5 minutos antes do tilt); **B.** LF durante o tilt test. **e)** difere do 6-OHDA água. Os valores foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey e são expressos como média  $\pm$  SEM, com  $p < 0,05$ .



**Figura 7** – Análise da modulação autonômica do intervalo de pulso (IP) em animais sham ou 6-OHDA durante o tilt test. **A.** LF no final do contensor (5 minutos antes do tilt); **B.** LF durante o tilt; **C.** HF no final do contensor; **D.** HF durante o tilt; **E.** LF/HF no final do contensor; **F.** LF/HF durante o tilt. Os valores foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey e são expressos como média  $\pm$  SEM, e com  $p < 0,05$ . LF: baixa freqüência; HF: alta freqüência.



**Figura 8** – A análise do baroreflexo espontâneo durante o tilt: efetividade e ganho. **A.** Efetividade no final do contensor (5 minutos antes do tilt); **B.** Efetividade durante o tilt test; **C.** Ganho total no final do contensor; **D.** Ganho total durante o tilt test. Os valores foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey e são expressos como média  $\pm$  SEM, e com  $p < 0,05$ .



## TABELA

**Tabela 1** – Efeitos do tratamento por gavagem com prolopa ou água sobre os valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais lesados com 6-OHDA ou sham.

	Controle água (n = 7)	Controle prolopa (n = 7)	Sham água (n = 8)	Sham prolopa (n=8)	6-OHDA água (n=6)	6-OHDA prolopa (n =8)
<b>BASAL</b>						
PAM (mmHg)	104 ± 1	106 ± 3	111 ± 2	106 ± 2	108 ± 2	103 ± 2
FC (bpm)	348 ± 10	330 ± 8	338 ± 10	327 ± 18	335 ± 9	343 ± 10

## CONCLUSÃO

Quanto aos efeitos dos tratamentos na DP os quais esses pacientes precisam ser submetidos, nossos dados sugerem que o tratamento com prolopa não interferiu nas variáveis cardiovasculares já alteradas pela lesão nos valores basais, sugerindo que possivelmente as alterações cardiovasculares nos animais com parkinsonismo não provêm do tratamento com prolopa e sim da própria lesão.

Porém, durante o teste de hipotensão postural, tanto os animais 6-OHDA quanto os tratados com prolopa tiveram uma menor compensação pressórica durante o tilt, sugerindo um possível comprometimento do SNA no parkinsonismo, assim como no tratamento com L-Dopa.

O estudo dos parâmetros cardiovasculares em modelos animais se faz muito importante para a compreensão da fisiopatologia da DP e das interferências das disfunções autonômicas nas disautonomias dessa doença, devido ao possível envolvimento do sistema nervoso simpático nessas disfunções. Faz-se necessário mais estudos relacionados a esse tema para possíveis discussões quanto ao real papel desses parâmetros e disfunções na DP e sua importância para o desenvolvimento de novos modelos terapêuticos.

Parte final do artigo, onde deve responder às questões da pesquisa, correspondente aos objetivos e hipóteses, podendo tecer recomendações e sugestões para trabalhos futuros.

## REFERÊNCIAS

- Adhiyaman V, Hobson P, Meara RJ. Central and peripheral autonomic integrity in Parkinson's disease. *Age Ageing* 37(5), 578-81, 2008.
- Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213(4504), 220-2, 1981.
- Ariza, D, Sisdeli, L, Crestani, CC, Martins-Pinge, MC. Alterações cardiovasculares tônicas em ratos acordados induzidos ao Parkinsonismo por 6-OHDA. Livro de programa de resumos: VIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, p.103, 2014.
- Bahjaoui-Bouhaddi M, Cappelle S, Henriët MT, Dumoulin G, Wolf JP, Regnard J. Graded vascular autonomic control versus discontinuous cardiac control during gradual upright tilt. *J Auton Nerv Syst* 79(2-3), 149-55, 2000.
- Baselli G, Cerutti S, Civardi S, Liberati D, Lombardi F, Malliani A, Pagani M. Spectral and cross-spectral analysis of heart rate and arterial blood pressure variability signals. *Comput Biomed Res* 19(6), 520-34, 1986.
- Bedette D, Santos RA, Fontes MA. Cardiovascular reactivity after blockade of angiotensin AT1 receptors in the experimental model of tilting test in conscious rats. *Br J Pharmacol* 153(5), 966-71, 2008.
- Bejjani BP, Arnulf I, Demeret S, Damier P, Bonnet AM, Houeto JL, Agid Y. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: is sensitization reversible? *Ann Neurol* 47(5), 655-8, 2000.
- Berg D, Siefker C, Becker G. Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings. *J Neurol* 248(8), 684-9, 2001.
- Birkmayer W, Knoll J, Riederer P, Youdim MB, Hars V, Marton J. Increased life expectancy resulting from addition of L-deprenyl to Madopar treatment in Parkinson's disease: a longterm study. *J Neural Transm* 64(2), 113-27, 1985.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65(2), 135-72, 2001.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24(2), 197-211, 2003.
- Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 113(4), 421-9, 2007.

Breese GR, Traylor TD. Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol* 42(1), 88-99, 1971.

Bronte-Stewart HM, Minn AY, Rodrigues K, Buckley EL, Nashner LM. Postural instability in idiopathic Parkinson's disease: the role of medication and unilateral pallidotomy. *Brain* 125(Pt 9), 2100-14, 2002.

Brotchie JM, Lee J, Venderova K. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 112(3), 359-91, 2005.

Brotchie JM. Nondopaminergic mechanisms in levodopa-induced dyskinesia. *Mov Disord* 20(8), 919-31, 2005.

Buob A, Winter H, Kindermann M, Becker G, Moller JC, Oertel WH, Bohm M. Parasympathetic but not sympathetic cardiac dysfunction at early stages of Parkinson's disease. *Clin Res Cardiol* 99(11), 701-6, 2010.

Burch D, Sheerin F. Parkinson's disease. *Lancet* 365(9459), 622-7, 2005.

Carta M, Lindgren HS, Lundblad M, Stancampiano R, Fadda F, Cenci MA. Role of striatal L-DOPA in the production of dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J Neurochem* 96(6), 1718-27, 2006.

Cenci MA, Lee CS, Bjorklund A. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 10(8), 2694-706, 1998.

Cenci MA, Lundblad M. Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem* 99(2), 381-92, 2006.

Cerutti C, Gustin MP, Paultre CZ, Lo M, Julien C, Vincent M, Sassard J. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol* 261(4 Pt 2), H1292-9, 1991.

Chase TN, Oh JD, Konitsiotis S. Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms. *J Neurol* 247 Suppl 2, II36-42, 2000.

Cole NB, Murphy DD, Lebowitz J, Di Noto L, Levine RL, Nussbaum RL. Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: helping to define the relationship between oligomers, protofibrils, and filaments. *J Biol Chem* 280(10), 9678-90, 2005.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39(6), 889-909, 2003.

de Abreu SB, Lenhard A, Mehanna A, de Souza HC, Correa FM, Hasser EM, Martins-Pinge MC. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. *Auton Neurosci* 148(1-2), 28-35, 2009.

Deleu D, Northway MG, Hanssens Y. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease. *Clin Pharmacokinet* 41(4), 261-309, 2002.

Dunnett SB, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399(6738 Suppl), A32-9, 1999.

Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 164(4), 1357-91, 2011.

Ehringer H, Hornykiewicz O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 38, 1236-9, 1960.

Fahn S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3, S497-508, 2008.

Fasano M, Giraud S, Cocha S, Bergamasco B, Lopiano L. Residual substantia nigra neuromelanin in Parkinson's disease is cross-linked to alpha-synuclein. *Neurochem Int* 42(7), 603-6, 2003.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 ( Pt 5), 2283-301, 1991.

Ferraz, HB. Tratamento da Doença de Parkinson. *Rev. Neurociências* 7(1): 06-12, 1999.

Gabbett TJ, Weston SB, Barrett RS, Gass GC. Cardiovascular regulation during head-up tilt in healthy 20-30-year-old and 70-75-year-old men. *Clin Sci (Lond)* 100(2), 199-206, 2001.

Gaeta A, Hider RC. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol* 146(8), 1041-59, 2005.

Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103(8-9), 987-1041, 1996.

Goldstein DS, Holmes CS, Dendi R, Bruce SR, Li ST. Orthostatic hypotension from sympathetic denervation in Parkinson's disease. *Neurology* 58(8), 1247-55, 2002.

Gross M, Bannister R, Godwin-Austen R. Orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Lancet* 1(7743), 174-6, 1972.

Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 17(3), 354-81, 1996.

Henry B, Crossman AR, Brotchie JM. Characterization of enhanced behavioral responses to L-DOPA following repeated administration in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 151(2), 334-42, 1998.

Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev* 18(2), 925-64, 1966.

Horstink MW, Morrish PK. Preclinical diagnosis of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 80, 327-33, 1999.

Irigoyen, MC, Colombo, FMC, Krieger, EM. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Rev Bras Hipertens* 8: 55-62, 2001.

Jain S. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 17(2), 77-83, 2011.

Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci* 9(9), 665-77, 2008.

Jost WH. Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 250 Suppl 1, I28-30, 2003.

Kidd PM. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev* 5(6), 502-29, 2000.

Kitamura Y, Kakimura J, Taniguchi T. Antiparkinsonian drugs and their neuroprotective effects. *Biol Pharm Bull* 25(3), 284-90, 2002.

Korczyn AD. Autonomic nervous system disturbances in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 53, 463-8, 1990.

Kostrzewa RM, Nowak P, Kostrzewa JP, Kostrzewa RA, Brus R. Peculiarities of L-DOPA treatment of Parkinson's disease. *Amino Acids* 28(2), 157-64, 2005.

Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2), 245-50, 2003.

Lundblad M, Picconi B, Lindgren H, Cenci MA. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 16(1), 110-23, 2004.

Luthman J, Fredriksson A, Sundstrom E, Jonsson G, Archer T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33(3), 267-77, 1989.

Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84(2), 482-92, 1991.

Marrachelli VG, Miranda FJ, Alabadi JA, Milan M, Cano-Jaimez M, Kirstein M, Alborch E, Farinas I, Perez-Sanchez F. Perivascular nerve fiber alpha-synuclein regulates contractility of mouse aorta: a link to autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 56(8), 991-8, 2010.

Martins-Pinge MC, Becker LK, Garcia MR, Zoccal DB, Neto RV, Basso LS, de Souza HC, Lopes OU. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. *Auton Neurosci* 122(1-2), 21-8, 2005.

Martins-Pinge MC, Garcia MR, Zoccal DB, Crestani CC, Pinge-Filho P. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. *Auton Neurosci* 131(1-2), 65-9, 2007.

Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60(5), 748-66, 2008.

Maurer C, Mergner T, Xie J, Faist M, Pollak P, Lucking CH. Effect of chronic bilateral subthalamic nucleus (STN) stimulation on postural control in Parkinson's disease. *Brain* 126(Pt 5), 1146-63, 2003.

Mehanna A, Vitorino DC, Panis C, Blanco EE, Pinge-Filho P, Martins-Pinge MC. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. *Life Sci* 81(16), 1301-8, 2007.

Meissner W, Hill MP, Tison F, Gross CE, Bezard E. Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. *Trends Pharmacol Sci* 25(5), 249-53, 2004.

Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol* 115(4), 385-98, 2008.

Muller T, Hefter H, Hueber R, Jost WH, Leenders KL, Odin P, Schwarz J. Is levodopa toxic? *J Neurol* 251 Suppl 6, VI/44-6, 2004.

Mura A, Mintz M, Feldon J. Behavioral and anatomical effects of long-term L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) administration in rats with unilateral lesions of the nigrostriatal system. *Exp Neurol* 177(1), 252-64, 2002.

Nicaretta DH, Pereira JS, Pimentel ML. [Autonomic disorders in Parkinson's disease]. *Rev Assoc Med Bras* 44(2), 120-2, 1998.

Noack C, Schroeder C, Heusser K, Lipp A. Cardiovascular effects of levodopa in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014.

Nutt JG. Long-term L-DOPA therapy: challenges to our understanding and for the care of people with Parkinson's disease. *Exp Neurol* 184(1), 9-13, 2003.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3, S548-59, 2008.

Oka H, Toyoda C, Yogo M, Mochio S. Cardiovascular dysautonomia in de novo Parkinson's disease without orthostatic hypotension. *Eur J Neurol* 18(2), 286-92, 2011.

Olanow CW. Levodopa/dopamine replacement strategies in Parkinson's disease--future directions. *Mov Disord* 23 Suppl 3, S613-22, 2008.

Oosting J, Struijker-Boudier HA, Janssen BJ. Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats. *J Hypertens* 15(4), 391-9, 1997.

Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 68(5), 325-40, 2002.

Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Tumas V, Del-Bel EA. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 159(3), 927-35, 2009.

Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 59(2), 178-93, 1986.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*, San Diego, California, USA, 1998.

Peng J, Stevenson FF, Oo ML, Andersen JK. Iron-enhanced paraquat-mediated dopaminergic cell death due to increased oxidative stress as a consequence of microglial activation. *Free Radic Biol Med* 46(2), 312-20, 2009.

Poewe W, Antonini A, Zijlmans JC, Burkhard PR, Vingerhoets F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clin Interv Aging* 5, 229-38, 2010.

Poewe WH, Wenning GK. The natural history of Parkinson's disease. *Neurology* 47(6 Suppl 3), S146-52, 1996.

Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1, S3-7, 2005.

Rajput AH, Rozdilsky B. Dysautonomia in Parkinsonism: a clinicopathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 39(11), 1092-100, 1976.

Rajput AH. Levodopa prolongs life expectancy and is non-toxic to substantia nigra. *Parkinsonism Relat Disord* 8(2), 95-100, 2001.

Ramirez-Marrero FA, Charkoudian N, Zhong L, Hesse C, Eisenach JH. Balance between sympathetic response to head-up tilt and cardiac vagal factors in healthy humans. *Clin Auton Res* 17(4), 227-30, 2007.

Reksidler AB, Lima MM, Dombrowski PA, Barnabe GF, Andersen ML, Tufik S, Vital MA. Distinct effects of intranigral L-DOPA infusion in the MPTP rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* (73), 259-68, 2009.

Rubini R, Porta A, Baselli G, Cerutti S, Paro M. Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats. *J Auton Nerv Syst* 45(3), 181-90, 1993.

Rubio-Osornio M, Montes S, Perez-Severiano F, Aguilera P, Floriano-Sanchez E, Monroy-Noyola A, Rubio C, Rios C. Copper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation induced by MPP+ in rats. *Neurochem Int* 54(7), 447-51, 2009.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 363(9423), 1783-93, 2004.

Sarre S, Vandeneede D, Ebinger G, Michotte Y. Biotransformation of L-DOPA to dopamine in the substantia nigra of freely moving rats: effect of dopamine receptor agonists and antagonists. *J Neurochem* 70(4), 1730-9, 1998.

Sawka MN, Convertino VA, Eichner ER, Schnieder SM, Young AJ. Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness. *Med Sci Sports Exerc* 32(2), 332-48, 2000.

Schapira AH, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge GL, Ferger B, Hengerer B, Hirsch E, Jenner P, Le Novere N, Obeso JA, Schwarzschild MA, Spampinato U, Davidai G. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov* 5(10), 845-54, 2006.

Schulz JB, Falkenburger BH. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 318(1), 135-47, 2004.

Schutzman J, Jaeger F, Maloney J, Fouad-Tarazi F. Head-up tilt and hemodynamic changes during orthostatic hypotension in patients with supine hypertension. *J Am Coll Cardiol* 24(2), 454-61, 1994.

Silverdale MA, Fox SH, Crossman AR, Brotchie JM. Potential nondopaminergic drugs for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91, 273-91, 2003.

Singer C, Weiner WJ, Sanchez-Ramos JR. Autonomic dysfunction in men with Parkinson's disease. *Eur Neurol* 32(3), 134-40, 1992.

Singh N, Pillay V, Choonara YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 81(1), 29-44, 2007.

Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 1768(8), 1976-90, 2007.

Smith SA, Fasler JJ. Age-related changes in autonomic function: relationship with postural hypotension. *Age Ageing* 12(3), 206-10, 1983.

Stoessel AJ. Prevention and management of late stage complications in Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* 19(1 Suppl), 113-6, 1992.

Streeten DH, Scullard TF. Excessive gravitational blood pooling caused by impaired venous tone is the predominant non-cardiac mechanism of orthostatic intolerance. *Clin Sci (Lond)* 90(4), 277-85, 1996.

Teismann P, Vila M, Choi DK, Tieu K, Wu DC, Jackson-Lewis V, Przedborski S. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 272-7, 2003.

Togo T, Iseki E, Marui W, Akiyama H, Ueda K, Kosaka K. Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci* 184(1), 71-5, 2001.

Tripathi A, Shi X, Wenger CB, Nadel ER. Effect of temperature and baroreceptor stimulation on reflex venomotor responses. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 57(5), 1384-92, 1984.

Truong L, Allbutt HN, Coster MJ, Kassiou M, Henderson JM. Behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in rats with unilateral 6-OHDA+parafascicular lesions. *Brain Res Bull* 78(2-3), 91-6, 2009.

Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, Wolf V, Trujillo A, Duke MS, Palme R, Felton LA. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 260(1), 65-9, 2012.

Warraich ST, Allbutt HN, Billing R, Radford J, Coster MJ, Kassiou M, Henderson JM. Evaluation of behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in the unilateral 6-OHDA lesion rat model. *Brain Res Bull* 78(2-3), 85-90, 2009.

Wing LM, Tonkin AL. Orthostatic blood pressure control and ageing. *Aust N Z J Med* 27(4), 462-6, 1997.

Wolf JP, Bouhaddi M, Louisy F, Mikehiev A, Mourot L, Cappelle S, Vuillier F, Andre P, Rumbach L, Regnard J. Side-effects of L-dopa on venous tone in Parkinson's disease: a leg-weighting assessment. *Clin Sci (Lond)* 110(3), 369-77, 2006.

Zhang X, Xie W, Qu S, Pan T, Wang X, Le W. Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 333(2), 544-9, 2005.

Ziemssen T, Reichmann H. Cardiovascular autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 289(1-2), 74-80, 2010.