



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERIC DIEGO TUROSSI AMORIM

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA
E GLUTAMATÉRGICA NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR
DO HIPOTÁLAMO EM PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS DE RATOS
INDUZIDOS AO PARKINSONISMO POR 6-
HIDROXIDOPAMINA**

Londrina
2018

ERIC DIEGO TUROSSI AMORIM

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA
E GLUTAMATÉRGICA NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR
DO HIPOTÁLAMO EM PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS DE RATOS
INDUZIDOS AO PARKINSONISMO POR 6-
HIDROXIDOPAMINA**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia /Instituição Associada, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Londrina
2018

ERIC DIEGO TUROSSI AMORIM

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA E
GLUTAMATÉRGICA NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E
AUTONÔMICOS DE RATOS INDUZIDOS AO PARKINSONISMO POR
6-HIDROXIDOPAMINA**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia /Instituição Associada, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marli Cardoso Martins
Pinge
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Daniel Penteado Martins Dias
Centro Universitário Barão de Mauá - CBM

Prof^a Dr^a. Célio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de julho de 2018.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Amorim, Eric Diego Turossi.

ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA E GLUTAMATÉRGICA NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS DE RATOS INDUZIDOS AO PARKINSONISMO POR 6-HIDROXIDOPAMINA / Eric Diego Turossi Amorim. - Londrina, 2018.
87 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Pressão arterial - Tese. 2. Frequência cardíaca - Tese. 3. PVN - Tese. 4. Variabilidade da frequência cardíaca - Tese. I. Martins Pinge, Marli Cardoso . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe (*in memorian*) Geni e à minha tia-mãe Tuti (*in memorian*) por terem me dado todo o amor e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado até aqui e por ter colocado minha orientadora em meu caminho, uma pessoa que além de ser uma grande profissional, é uma pessoa humana e que admiro muito.

Agradeço também (*in memoriam*) à minha mãe e minha tia Tuti, que infelizmente não puderam participar deste momento tão importante de minha vida. Mas a elas agradeço por terem me dado todo o amor e por terem me ensinado a não desistir de meus sonhos.

À minha irmã e minha avó por me apoiarem em minhas decisões e ao meu sobrinho, por me mostrar o amor puro de uma criança.

À Ananda, por ter colaborado ativamente durante a realização dos experimentos e a todos os colegas de laboratório que colaboraram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, por todo apoio e companheirismo.

Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem 'Por quê?' Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo 'Por que não?'

George Bernard Shaw.

AMORIM, E. D. T. **Envolvimento da neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica no núcleo paraventricular do hipotálamo em parâmetros cardiovasculares e autonômicos de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-hidroxidopamina.** 2018. 87 f. Tese (Doutorado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que se manifesta clinicamente após atingir um estágio patológico avançado. Além dos sinais motores, os pacientes com DP apresentam alterações cardiovasculares e autonômicas. Dados recentes mostraram que ratos induzidos ao parkinsonismo pela administração de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na substância negra *pars compacta* (SNpc) apresentaram menor pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), e redução da modulação simpática. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é um local importante para o controle autonômico e cardiovascular em situações fisiológicas e patológicas, e as neurotransmissões gabaérgica e glutamatérgica possuem um papel fundamental nesse controle. Desta forma, avaliou-se a participação da neurotransmissão mediada pelos receptores GABA_A e NMDA no PVN no controle cardiovascular, autonômico e barorreflexo de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA. Ratos Wistar foram submetidos a implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN e a toxina 6-OHDA ou solução salina estéril foi administrada bilateralmente no SNpc. Após 6 dias, foi realizado o cateterismo da artéria femoral e 24 horas após recuperação do cateterismo, foram realizados os registros dos parâmetros cardiovasculares dos animais não anestesiados. Os valores basais da PAM e FC dos ratos lesados com 6-OHDA (99 ± 3 mmHg, 291 ± 4 bpm) mostraram-se reduzidos quando comparados ao grupo SHAM (111 ± 6 mmHg, 350 ± 4 bpm). A administração de bicuculina (antagonista dos receptores GABA_A) no PVN promoveu um aumento na PAM e FC no grupo sham e acentuou os aumentos de PAM e FC no grupo 6-OHDA, bem como acentuou o aumento da modulação simpática no grupo 6-OHDA. A administração de muscimol (agonista dos receptores GABA_A) ou NBQX (antagonista dos receptores não-NMDA) no PVN não promoveu alterações cardiovasculares e autonômicas em ambos os grupos. Já a microinjeção bilateral de LY235959 (antagonista dos receptores NMDA) no PVN do grupo sham não induziu alterações cardiovasculares, mas diminuiu a PAM e a FC no grupo 6-OHDA, bem como reduziu a modulação autonômica no grupo 6-OHDA. Os resultados sugerem que as alterações cardiovasculares e autonômicas observadas nos animais 6-OHDA são decorrentes do aumento do tônus gabaérgico no PVN e que através dos receptores glutamatérgicos NMDA no PVN, a neurotransmissão glutamatérgica está envolvida nesta modulação. Do mesmo modo, os resultados sugerem que através de sua ligação aos receptores NMDA, o glutamato promove uma maior ativação do sistema nervoso simpático pelo PVN e participa da manutenção da PAM e da FC em animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA.

Palavras-chave: Pressão arterial. Frequência cardíaca. PVN. Variabilidade da frequência cardíaca. Barorreflexo.

AMORIM, E. D. T. **Involvement of gabaergic and glutamatergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in cardiovascular and autonomic parameters of rats induced to 6-hydroxydopamine parkinsonism.** 2018. 87 p. Thesis (Multicenter Program in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease that is clinically manifested after reaching an advanced pathological stage. In addition to the motor signals, patients with PD present cardiovascular and autonomic alterations. Recent data have shown that rats induced to parkinsonism by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the substantia nigra pars compacta (SNpc) showed lower mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR), and reduced sympathetic modulation. The paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) is an important site of autonomic and cardiovascular control in physiological and pathological situations, and gabaergic and glutamatergic neurotransmission play a fundamental role in this control. In this way, the participation of the neurotransmission mediated by the GABA_A and NMDA receptors in PVN in the cardiovascular, autonomic and baroreflex control of rats induced to 6-OHDA parkinsonism was evaluated. Male Wistar rats were submitted to implantation of PVN-directed cannulae and the 6-OHDA toxin or sterile saline solution was administered bilaterally in the SNPC. After 6 days, the femoral artery catheterization was performed and 24 hours after surgery recovery, the cardiovascular parameters of non-anesthetized animals were recorded. The baseline values of MAP and HR of 6-OHDA animals (99 ± 3 mmHg, 291 ± 4 bpm) were reduced when compared to the SHAM group (111 ± 6 mmHg, 350 ± 4 bpm). Administration of bicuculline (GABA_A receptor antagonist) in PVN promoted an increase in MAP and HR in the sham group and accentuated the increases in MAP and HR in the 6-OHDA group, as well as accentuated the increase in sympathetic modulation in the 6-OHDA group. Administration of muscimol (GABA_A receptor agonist) or NBQX (non-NMDA receptor antagonist) in PVN did not promote cardiovascular and autonomic changes in both groups. However, bilateral microinjection of LY235959 (NMDA receptor antagonist) into sham PVN did not induce cardiovascular changes, but decreased MAP and HR in the 6-OHDA group, as well as reduced autonomic modulation in the 6-OHDA group. The results suggest that the cardiovascular and autonomic changes observed in 6-OHDA animals are due to the increase of gabaergic tonus in PVN and that through glutamatergic NMDA receptors in PVN, glutamatergic neurotransmission is involved in this modulation. Likewise, the results suggest that through its binding to NMDA receptors, glutamate promotes a greater activation of the sympathetic nervous system by PVN and participates in the maintenance of MAP and HR in animals induced by 6-OHDA parkinsonism.

Keywords: Blood pressure. Heart rate. PVN. Heart rate variability. Baroreflex.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo da via nigroestriatal de uma pessoa saudável (A) e de um portador da doença de Parkinson (B).....18
- Figura 2.** Esquema ilustrativo representando as projeções neuronais do PVN. (A) Neurônios do PVN se projetando diretamente para a RVLM. (B) Neurônios do PVN se projetando diretamente para a coluna intermédio-lateral (IML). (C) Neurônios do PVN se projetando colateralmente para ambas RVLM e IML27
- Figura 3.** (A) Concentração de dopamina (DA) no estriado (avaliada por HPLC) 7 dias após a infusão bilateral de salina (Sham) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*. Valores expressos como média \pm EPM, n = 30-32 ratos por grupo, $p \leq 0,05$. #Comparado ao grupo sham (teste t-student), $p < 0,05$. (B) Representação esquemática dos sítios de microinjeção no PVN (•): Microinjeção na região rostral (1,8 mm) à caudal (2,12 mm) da região do PVN. Distância posterior ao bregma é mostrado para cada secção de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007). (C) Fotomicrografia de uma lâmina histológica do PVN.....44
- Figura 4.** (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a microinjeção de bicuculina (Bic, 1 mM/100 nL) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substantia negra *pars compacta*.....47

Figura 5. (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a administração de muscimol (Mus, 15 mM/100 nL) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. Veículo (solução salina). (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções bilaterais no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*.....48

Figura 6. (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a microinjeção bilateral de LY 235959 (LY, 2 mM/100 nL) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*.....49

Figura 7. (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) pré e pós-droga no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. Veículo (solução salina). (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*.....50

Figura 8. Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de bicuculina no

	PVN (1 mM / 100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA.....	53
Figura 9.	Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de muscimol no PVN (15 mM /100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA.....	55
Figura 10.	Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de LY235959 (LY) no PVN (2 mM /100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA.....	57
Figura 11.	Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de NBQX no PVN (2 mM /100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA.....	59
Figura 12.	Análise do barorreflexo espontâneo durante o período basal e após administração de drogas no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de salina (Sham) ou 6-OHDA na substância negra <i>pars compacta</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores basais de PAM e FC dos ratos sham e 6-OHDA45
------------------	--

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
ATP	Adenosina trifosfato
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HF	Componente de alta frequência
HFnu	Componente de alta frequência em unidades normalizadas
HO	Hipotensão ortostática
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IML	Coluna intermédio-lateral
IP	Intervalo de pulso
LF	Componente de baixa frequência
LFnu	Componente de baixa frequência em unidades normalizadas
LF/HF	Razão LF/HF
LPS	Lipopolissacarídeo
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDV	Núcleo motor dorsal do vago
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
SBR	Sensibilidade barorreflexa
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso parassimpático

SNS	Sistema nervoso simpático
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
HRV	Variabilidade da frequência cardíaca
VLf	componente de muito baixa frequência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	16
1.2	MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO	20
1.2.1	O modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA)	21
1.3	ALTERAÇÕES AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES NO PARKINSONISMO	22
1.4	CONTROLE CENTRAL DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	25
1.5	NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO	26
1.6	PAPEL DO GABA E GLUTAMATO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	ANIMAIS	33
3.2	CIRURGIAS	34
3.2.1	Cirurgia estereotáxica para indução do parkinsonismo	34
3.2.2	Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN	34
3.3	CATETERIZAÇÃO DE ARTÉRIA FEMORAL	36
3.4	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	36
3.5	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	37
3.5.1	Tratamento farmacológico do PVN	37
3.5.2	Identificação funcional do PVN	38
3.5.3	Dissecação do estriado e Histologia do Cérebro	38
3.5.3.1	Marcação e Histologia do PVN	39
3.5.3.2	Determinação dos níveis de DA no estriado por cromatografia líquida de alta performance	39

3.5.4	Variabilidade da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	40
3.5.5	Análise do Barorreflexo Espontâneo	41
3.6	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DOPAMINA NO ESTRIADO.....	43
4.2	CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO.....	43
4.3	PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) BASAIS DE RATOS SHAM E 6-OHDA	45
4.4	EFEITOS CARDIOVASCULARES APÓS A MICROINJEÇÃO DE VEÍCULO, BICUCULINA, MUSCIMOL, LY235959 OU NBQX NO PVN	46
4.5	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE BICUCULINA NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP	51
4.6	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE MUSCIMOL NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP	54
4.7	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE LY235959 NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP.....	56
4.8	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE NBQX NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP	58
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	700
	ANEXO	86
	ANEXO 1.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que se manifesta clinicamente somente ao atingir estágios patológicos avançados (FORNO, 1969; GOETZ, 2011), quando já houve a redução de aproximadamente 80% da dopamina (DA) do núcleo estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; PRZEDBORSKI, 2005; TIEU, 2011). Esta redução de DA é causada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; TIEU, 2011).

A DP foi descrita primeiramente como “paralisia agitante” pelo médico inglês James Parkinson, em seu estudo denominado “An Essay on the Shaking Palsy” (PARKINSON, 1817). Cerca de um século após Parkinson descrever a doença, Charcot contribuiu com novas descrições clínicas da doença, acrescentando os chamados sinais cardinais que são utilizados no diagnóstico diferencial da doença e em homenagem ao seu descobridor nomeou a patologia como doença de Parkinson (GOEDERT; COMPSTON, 2017; GOETZ, 1986, 2011). Atualmente, a DP permanece como uma doença de etiologia não conhecida e sua terapêutica consiste basicamente no tratamento sintomático (JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012; LEV; MELAMED; OFFEN, 2003; SHIMOHAMA et al., 2003)

A DP é a segunda doença neurodegenerativa de maior ocorrência, e suas manifestações clínicas, também chamadas de sinais cardinais, incluem bradicinesia, tremor ao repouso, rigidez, instabilidade postural e anormalidades na marcha (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; DUNNETT; BJÖRKLUND, 1999; EMBORG, 2004). Além dos sinais clássicos da DP, os pacientes com DP apresentam alterações

cardiovasculares (KHEDR et al., 2013; LOW, 2008), que inclui hipotensão ortostática (HO), hipotensão pós-prandial, arritmias cardíacas e edema de membros inferiores (NICARETTA; PEREIRA; PIMENTEL, 1992; ZIEMSEN; REICHMANN, 2010) e também disfunções autonômicas que sugerem que pacientes com DP apresentam processos degenerativos que afetam os gânglios autonômicos, tronco cerebral e hipotálamo (ZESIEWICZ et al., 2003).

A principal característica neuroquímica da DP é a redução progressiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc localizada no mesencéfalo (Figura 1), associada à presença de inclusões citoplasmáticas denominadas de corpúsculos de Lewy, que são constituídas principalmente pela proteína neural α -sinucleína. A α -sinucleína, em condições fisiológicas, atua no controle e regulação da proliferação celular em mamíferos – interagindo com diversas proteínas que regulam a homeostase da DA nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais. Entretanto, em condições patológicas, a α -sinucleína pode sofrer alterações conformacionais passando a se depositar, tornando-se tóxica e ocasionando a morte neuronal e a redução da aferência dopaminérgica para o estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; DUNNETT; BJÖRKLUND, 1999; EMBORG, 2004; PRZEDBORSKI, 2005; SCHULZ; FALKENBURGER, 2004; VALLDEORIOLA; NOBBE; TOLOSA, 1997).

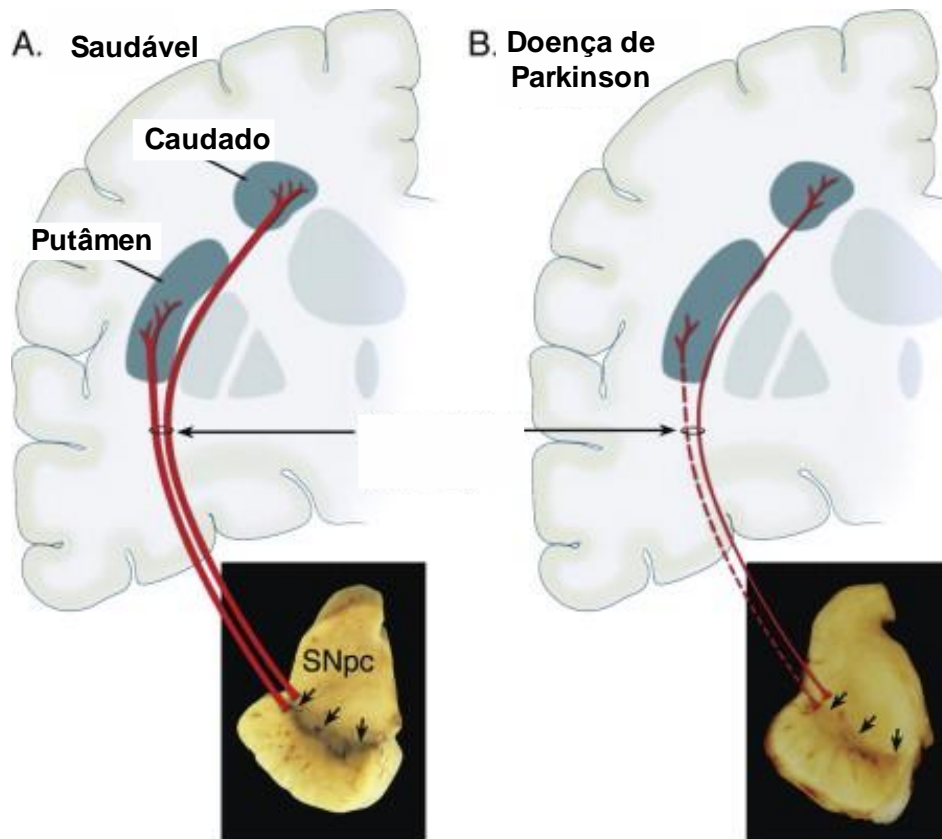


Figura 1. Esquema ilustrativo da via nigroestriatal de uma pessoa saudável (A) e de um portador da doença de Parkinson (B). (Adaptada de Dauer & Przedborski, 2003).

A DP, também conhecida como parkinsonismo primário, possui origem desconhecida, enquanto a etiologia do parkinsonismo secundário é atribuída ao uso de drogas, traumas, hidrocefalia, hipóxia, tumores, infecções, entre outras causas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; FAHN; SULZER, [s.d.]; HALD; LOTHARIUS, 2005; VILA; PRZEDBORSKI, 2003). Embora algumas manifestações clínicas sejam diferentes nas variadas formas de parkinsonismo, todas as formas apresentam as mesmas alterações bioquímicas, sobretudo em relação à redução da DA no mesencéfalo (PRZEDBORSKI, 2005).

A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o núcleo caudado e putâmen, ou corpo estriado (PRZEDBORSKI, 2005). A redução da

densidade dos neurônios da SNpc promove uma diminuição na projeção de fibras dopaminérgicas para o estriado dorsal, causando uma redução dos níveis de DA. Além disso, ocorre uma redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase e DOPA-descarboxilase (GERLACH; RIEDERER, 1996).

Estudos correlacionando as alterações clínicas e bioquímicas que ocorrem na DP mostram que os sinais e sintomas característicos da DP têm início quando cerca de 60 a 80% dos conteúdos de DA na SNpc e no putâmen são perdidos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Além da perda neuronal dopaminérgica, outras rotas neurais, como a via noradrenérgica (através a perda de neurônios do *locus coeruleus*), via serotoninérgica (por intermédio da redução de serotonina no Núcleo da Rafe) e a via colinérgica (por meio da redução de acetilcolina nos Núcleos Basais de Meynert), estão relacionadas às alterações neuroquímicas e neuropatológicas da DP (SCHULZ; FALKENBURGER, 2004).

Diversas pesquisas, incluindo estudos clínicos, *post-mortem* e experimentos com modelos animais de parkinsonismo, indicam que alterações conformacionais de proteínas citoplasmáticas, bem como disfunções mitocondriais e aumento do estresse oxidativo resultam em morte neuronal. Além disso, diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, devem estar envolvidos na patogênese da DP, como a excitotoxicidade, neuroinflamação e a desregulação de eventos apoptóticos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; SINGH; DIKSHIT, 2007). Desta forma, a neurodegeneração dos neurônios da SNpc parece ser o resultado da ação de diversos fatores patogênicos atuando concomitantemente (ESPOSITO et al., 2007; GAGNE; POWER, 2010).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO

Modelos animais de experimentação são importantes instrumentos de estudo nas ciências biomédicas, permitindo a avaliação dos mecanismos patogênicos e ajudando a compreender os princípios terapêuticos no tratamento dos distúrbios funcionais de doenças humanas (FRANCARDO, 2017; GERLACH; RIEDERER, 1996). Um modelo de estudo animal deve manifestar propriedades semelhantes à doença em humanos, representando as alterações patológicas, histológicas e bioquímicas da doença e os distúrbios funcionais decorrentes da mesma (GERLACH; RIEDERER, 1996; TIEU, 2011).

Nas últimas duas décadas, modelos animais de déficits neurológicos foram desenvolvidos na tentativa de avaliar novas opções terapêuticas e reduzir os efeitos colaterais das terapias utilizadas no tratamento da DP. Nenhum modelo animal disponível até o momento é capaz de reproduzir todas as alterações observadas em humanos portadores da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Entretanto, cada modelo possui características complementares, que propiciam o esclarecimento da fisiopatologia e favorecem a reflexão a respeito de novas abordagens de estudo no meio científico (ARIZA et al., 2015b; FRANCARDO, 2017; SILVA et al., 2015).

A DP não se manifesta espontaneamente em animais, portanto, para o estudo da doença em animais é necessário que o parkinsonismo seja induzido através da administração de agentes neurotóxicos como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), metanfetamina, rotenona, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), o paraquat e o lipopolissacarídeo (LPS) (DUTY; JENNER, 2011; FRANCARDO, 2017; GERLACH; RIEDERER, 1996; TIEU, 2011). As diferentes neurotoxinas utilizadas para indução do parkinsonismo em animais objetivam lesar a via nigroestriatal,

sendo que algumas delas devem ser administradas diretamente na região a ser lesada, por não serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, como o 6-OHDA e o LPS (DUTY; JENNER, 2011).

A maioria das neurotoxinas utilizadas para induzir o parkinsonismo inibem o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou diminuição na síntese de adenosina trifosfato (ATP), resultando em apoptose. A 6-OHDA e o MPP⁺ (derivado ativo do MPTP) são capazes de induzir a produção de EROS no citoplasma, enquanto o LPS ativa as células microgliais, levando à produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (DUTY; JENNER, 2011; KIM-HAN; ANTENOR-DORSEY; O'MALLEY, 2011). Além disso, estudos sugerem que o mal funcionamento do sistema ubiquitina-proteassoma possui importante papel na formação dos agregados proteicos na DP, levando a danos no DNA celular (GRÜNBLATT et al., 2017; JOSEPH; SCHULZ; STEGMÜLLER, 2017).

1.2.1 O modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

A indução do parkinsonismo em ratos pela administração de 6-OHDA foi realizada pela primeira vez no ano 1968, pelo pesquisador sueco Ungerstedt (UNGERSTEDT, 1968) e, desde então, a administração de 6-OHDA intracerebral se tornou o método mais utilizado para lesionar a via nigroestriatal, devido ao fato deste ser um modelo de parkinsonismo reprodutível e ao mesmo tempo econômico. Além disso, devido à previsibilidade temporal em relação à extensão da desnervação dos neurônios dopaminérgicos, as lesões por 6-OHDA podem ser usadas para mimetizar os estágios precoces e tardios da DP, conforme a concentração e local de injeção da

toxina (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; BLESA; PRZEDBORSKI, 2014; FRANCARDO et al., 2011).

A administração de 6-OHDA na SNpc induz à degeneração das células produtoras de DA da SNpc, resultando em alterações semelhantes à DP, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, inflamação, degeneração da via nigroestriatal, redução da síntese de DA e acinesia (DUTY; JENNER, 2011; FRANCARDO et al., 2011; WILLNER, 1986). Além disso, estudos referem que o parkinsonismo induzido em roedores por 6-OHDA ocasiona déficits motores significativos quando a perda de DA estriatal excede 50% e que a gravidade do déficit motor é proporcional ao grau de degeneração dos neurônios dopaminérgicos (FRANCARDO, 2017; FRANCARDO et al., 2011).

O modelo de parkinsonismo por 6-OHDA possui a vantagem de apresentar não somente uma degeneração acentuada da via dopaminérgica, mas por manifestar outras propriedades patológicas importantes para a DP, como ativação da micróglia e produção de peróxido de hidrogênio e derivados de oxi-radicaís (CICCHETTI et al., 2002; COHEN, 1984). Desta maneira, o modelo de parkinsonismo por 6-OHDA foi o modelo de escolha para mimetizar a depleção monoaminérgica característica da DP.

1.3 ALTERAÇÕES AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES NO PARKINSONISMO

O sistema nervoso autônomo (SNA) regula a atividade de todos os sistemas do organismo, modulando a frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) através

de duas vias eferentes principais: o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP). O SNA recebe sinais aferentes de diversas regiões do corpo, como dos neurônios medulares, hipotalâmicos, mesencefálicos, do tronco cerebral (ASAHINA et al., 2013; ZIEMSEN; REICHMANN, 2007), e neurônios dos núcleos da base (GUYENET, 2006; ZIEMSEN; REICHMANN, 2007).

Ao descrever a DP pela primeira vez, Parkinson registrou que possivelmente existiam alterações autonômicas associadas à doença (NICARETTA; PEREIRA; PIMENTEL, 1998; PARKINSON, 1817; ZIEMSEN; REICHMANN, 2010). Inicialmente, acreditava-se que as disfunções autonômicas estavam presentes somente em estágios avançados da DP, no entanto, atualmente se sabe que as disautonomias são observadas em diversos estágios da DP, independentemente de tratamento medicamentoso (ASAHINA et al., 2013; REICHMANN; BRANDT; KLINGELHOEFER, 2016).

Além dos sinais clássicos que acometem o paciente com DP, diversas alterações cardiovasculares e autonômicas estão presentes, como hipotensão ortostática, hipotensão pós-prandial, arritmias cardíacas e edema de membros inferiores (KHEDR et al., 2013; LOW, 2008; NICARETTA; PEREIRA; PIMENTEL, 1992; ZIEMSEN; REICHMANN, 2010). As disfunções autonômicas apresentadas pelos pacientes com DP sugerem que existem processos degenerativos que afetam os gânglios autonômicos, hipotalâmicos e do tronco cerebral (ZESIEWICZ et al., 2003). Logo, estudos relacionados às vias autonômicas são fundamentais, pois, acredita-se que na DP, a neuropatologia afeta inicialmente as estruturas periféricas e, posteriormente, acomete o SNC (BRAAK et al., 2003, 2004; JAIN; GOLDSTEIN, 2012).

Estudos clínicos mostram que pacientes com DP apresentam menor pressão

arterial média (PAM) do que os pacientes controle, bem como menor modulação simpática. Do mesmo modo, a sensibilidade barorreflexa (SBR) está diminuída, indicando uma desregulação da função autonômica nestes pacientes (CHEN et al., 2016). Dados recentes de nosso laboratório mostram que ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA apresentam menor PAM e FC comparado aos controles, bem como redução da modulação simpática (ARIZA et al., 2015a, 2015b). Alguns estudos atribuem estas alterações as alterações que ocorrem no SNC e também ao acometimento das vias ganglionares periféricas do SNA (ADHIYAMAN; HOBSON; MEARA, 2008; GOLDSTEIN et al., 2002).

O barorreflexo espontâneo vem sendo vastamente utilizado para examinar a efetividade e sensibilidade do barorreflexo através de técnicas simples, nas quais pequenas alterações espontâneas de PA podem promover alterações no intervalo RR (SCHWARTZ et al., 2013). É possível detectar através deste método a presença de rampas barorreflexas, sendo denominadas rampas “up”, os aumentos da PAS seguido de aumento do intervalo de pulso; e rampas “down” quando diminuições da PAS levam a diminuições do intervalo de pulso. Essas alterações barorreflexas podem ser influenciadas tanto por mecanismos periféricos quanto centrais (DE ANDRADE et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que o barorreflexo está alterado em pacientes com DP (NICARETTA; PEREIRA; PIMENTEL, 1998; RAHMAN; GOLDSTEIN, 2014) e também em animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA (ARIZA et al., 2015b; SILVA et al., 2015)

Embora existam diversas explorações acerca da DP, a fisiopatologia das alterações autonômicas e cardiovasculares relacionadas à doença permanece desconhecida, podendo estar associada a um distúrbio central a nível bulbar (NICARETTA; PEREIRA; PIMENTEL, 1992; SINGER; WEINER; SANCHEZ-

RAMOS, 1992).

1.4 CONTROLE CENTRAL DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

O controle geral do sistema cardiovascular é organizado de forma hierárquica e pode ser dividido em três níveis: controles locais, exercidos pelas atividades miogênicas do músculo liso vascular e do miocárdio, assim como por substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio vascular; controle exercido por estruturas neurais bulbares e controle exercido por centros neurais suprabulbares (FOLKOW, 1987).

Já é conhecido que diversas áreas do SNC participam da regulação da resistência vascular periférica (RVP), dentre elas, importantes áreas bulbares estão envolvidas no controle da PA, como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo motor dorsal do vago (NMDV), bulbo ventrolateral caudal (CVLM) e bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (BADOER, 2001; DAMPNEY, 1994; GUYENET, 2006; SWANSON; KUYPERS, 1980). O estímulo da RVLM provoca vasoconstrição (DAMPNEY; GOODCHILD; TAN, 1985), enquanto o estímulo de áreas caudais e ventromediais do bulbo aumenta a dilatação dos vasos sanguíneos (BLESSING; LI, 1989).

A RVLM é uma das regiões cerebrais primárias envolvidas na geração da condução simpática e contém neurônios bulbo-espinhais que inervam neurônios pré-ganglionares simpáticos responsáveis pela regulação do tônus simpático cardiovascular (DAMPNEY, 1994; GUERTZENSTEIN; SILVER, 1974). A atividade dos neurônios da RVLM é regulada por neurotransmissores excitatórios e inibitórios e alterações tanto na excitação quanto na inibição destes neurônios influenciam diversos estados fisiológicos e fisiopatológicos (MUELLER, 2007; PATEL et al., 2001). Em relação às áreas suprabulbares, o hipotálamo é um importante núcleo

que atua na modulação cardiovascular (FONTES et al., 2011; MCDOWALL et al., 2006), sendo que o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) desempenha papel fundamental nesta regulação (COOTE, 2005; MARTINS-PINGE et al., 2013; PYNER, 2009) através de suas sinapses para a RVLM e coluna intermédio-lateral (IML) (BADOER, 2001).

O controle da PA ocorre a partir da detecção das alterações da pressão sanguínea através dos barorreceptores arteriais que estão localizados no arco aórtico e no seio carotídeo. Os barorreceptores arteriais, quando sofrem estiramento (aumento da PA), transformam esta informação em potenciais de ação, que chegam até o bulbo através de aferências dos nervos vago e glossofaríngeo. No bulbo as informações são integradas na região do núcleo do trato solitário (NTS), cujas projeções para o núcleo ambíguo ou CVLM levarão à ativação parassimpática e inibição simpática, respectivamente. A ativação do reflexo barorreceptor pelos sinais aferentes dos barorreceptores carotídeos, aórticos e do reflexo cardiopulmonar é integrada no SNC, resultando na resposta eferente ao coração e vasos sanguíneos por meio do sistema nervoso autônomo (SNA) (DAMPNEY, 1994).

O PVN é influenciado pelo SNA, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo em condições fisiológicas e patológicas (KENNEY; WEISS; HAYWOOD, 2003) controlando o sistema cardiovascular em diferentes condições (AMORIM et al., 2015; DE ANDRADE et al., 2014).

1.5 NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO

O PVN é uma importante estrutura de integração da função autonômica na manutenção da homeostase e do controle da PAM e FC em diferentes situações

comportamentais, fisiológicas e fisiopatológicas (DAMPNEY, 1994; MARTINS-PINGE et al., 2013; ZESIEWICZ et al., 2003). Estudos demonstram a participação do PVN na modulação da atividade eferente simpática, sugerindo que esta regulação pode ser feita diretamente pela ação dos neurônios do PVN sobre a coluna IML e/ou indiretamente através dos neurônios da RVLM (BADOER, 2001) (Figura 2). No PVN, diversos neurotransmissores participam da regulação cardiovascular e autonômica, como o glutamato, que aumenta a atividade nervosa simpática e o ácido gama-aminobutírico (GABA) que reduz (GABOR; LEENEN, 2012; XU et al., 2011a).

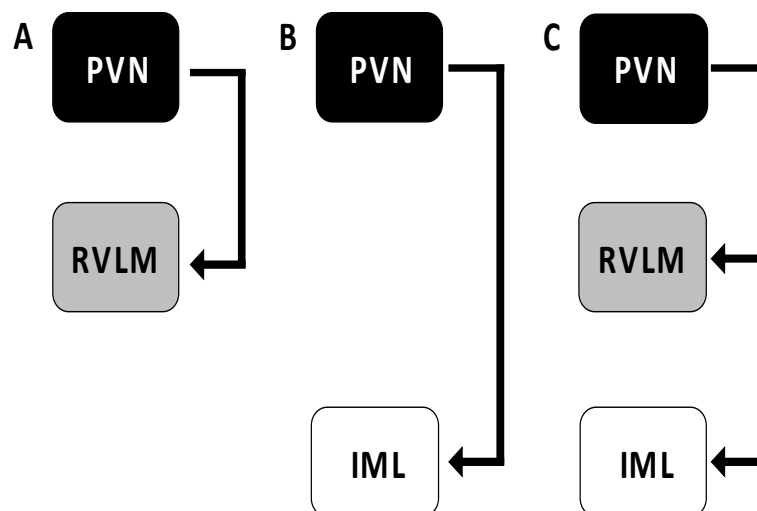


Figura 2. Esquema ilustrativo representando as projeções neuronais do PVN. (A) Neurônios do PVN se projetando diretamente para a RVLM. (B) Neurônios do PVN se projetando diretamente para a coluna intermédio-lateral (IML). (C) Neurônios do PVN se projetando colateralmente para ambas RVLM e IML. (Adaptado de Badoer, 2001).

O PVN se encontra localizado bilateralmente ao terceiro ventrículo e pode ser dividido em duas regiões principais compostas por neurônios magnocelulares e neurônios parvocelulares (Swanson e Sawchenko, 1983; Badoer, 2001). Os neurônios parvocelulares estão localizados na região medial do PVN. Estes neurônios controlam a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRF) no

sangue porta hipofisário (Swanson e Sawchenko, 1983; Hamamura *et al.*, 1986), um importante hormônio regulador do estresse.

A região parvocelular do PVN é composta de diversos neurotransmissores com múltiplas funções, sendo que os neurônios localizados na região dorsal e ventral do núcleo se projetam para outras regiões do SNC que participam do controle das funções autonômicas, como a área RVLM e a coluna IML, onde estão localizados os neurônios motores pré-ganglionares (Swanson e Kuypers, 1980; Blair *et al.*, 1996; Badoer, 2001). Estas conexões podem desencadear alterações reflexas na atividade simpática que estão envolvidas na regulação cardiocirculatória (Dampney, 1994; Badoer, 2001) e por isso o PVN foi denominado núcleo pré-motor simpático (Strack *et al.*, 1989; Dampney, 1994). A RVLM contém neurônios que se projetam diretamente para os neurônios pré-ganglionares simpáticos na medula espinhal tóraco-lombar, sendo extremamente importante para a regulação tônica da atividade simpática e para os reflexos cardiovasculares simpáticos (Dampney, 1994).

Estudos mostram que o PVN possui projeções que regulam o sistema neurosecretor magnocelular, afetando outros grupos celulares, e desta maneira, influencia as respostas autonômicas e adenohipofisárias que agem de modo a liberar hormônios que produzem respostas viscerais integradas (Kuypers e Maisky, 1975; Swanson e Kuypers, 1980; Swanson e Sawchenko, 1983). Os neurônios magnocelulares se localizam nas porções laterais do PVN e são especializados na síntese de vasopressina e ocitocina. Estes hormônios são conduzidos por meio de projeções axonais até a hipófise posterior, onde são liberados na circulação (BLAIR *et al.*, 1996; JAPUNDI-IGON, 2013). A vasopressina, além de possuir um importante papel hormonal na regulação do volume sanguíneo (BURBACH *et al.*, 2001; STOCKER; HUNWICK; TONEY, 2005), atua como neurotransmissor, diminuindo a

atividade nervosa simpática renal (FUJISAWA et al., 1994; PEULER et al., 1990).

Grande parte dos neurotransmissores presentes no SNC é encontrada no PVN, sendo o GABA (Zhang e Patel, 1998; Allen, 2002) um mediador inibitório que influencia respostas cardiovasculares, e o glutamato (Bains e Ferguson, 1997) o principal mediador excitatório da atividade simpática (Herman *et al.*, 2004; Mueller, Foley, *et al.*, 2006).

1.6 PAPEL DO GABA E GLUTAMATO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Como dito, existe um amplo número de neurotransmissores no SNC e grande parte deles é encontrada no PVN, sendo o GABA (PATEL et al., 2001; ZHANG; PATEL, 1998) e o glutamato (BAINS; FERGUSON, 1997) os principais aminoácidos neurotransmissores presentes no SNC (HERMAN; MUELLER; FIGUEIREDO, 2004; MUELLER et al., 2006). O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no PVN (BAINS; FERGUSON, 1997; HERMAN; MUELLER; FIGUEIREDO, 2004) e diversos estudos demonstram que existem vários tipos de receptores glutamatérgicos no PVN (BUSNARDO et al., 2013; CRESTANI et al., 2010; MEEKER; GREENWOOD; HAYWARD, 1994).

A ação excitatória do glutamato ocorre por meio de dois tipos de receptores denominados ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são classificados em N-metil-D-aspartato (NMDA) e não-NMDA. Os receptores não-NMDA se subdividem em α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e cainato (BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009; KC; DICK, 2010). Estudos demonstram que a ativação dos receptores NMDA no PVN aumenta a atividade nervosa simpática, PA, frequência cardíaca e modula a atividade barorreflexa

(BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009; LI et al., 2006). Por outro lado, a ativação dos receptores não-NMDA no PVN promove a regulação do sistema cardiovascular através da liberação de vasopressina na circulação (BUSNARDO et al., 2012; BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009). Além disso, estudos apontam que o NO modula a ação do glutamato através dos receptores NMDA (LEI et al., 1992; ZANZINGER; CZACHURSKI; SELLER, 1997; ZHANG; PATEL, 1998), sugerindo que a ativação dos receptores NMDA leva a um aumento da produção de óxido nítrico (NO) no PVN, que por sua vez, modula negativamente a ativação simpática mediada pela ativação dos receptores NMDA (LI; MAYHAN; PATEL, 2001).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC (DAMPNEY, 1994; WU; SUN, 2015; XU et al., 2011b) e o neurotransmissor em maior quantidade no hipotálamo (DECAVEL; VAN DEN POL, 1990), conhecido por sua função simpatoinibitória no PVN (MARTIN; SEGURA; HAYWOOD, 1991; ZHANG; PATEL, 1998). Os dois principais tipos de receptores gabaérgicos são os ionotrópicos ($GABA_A$) e os metabotrópicos ($GABA_B$), sendo que o GABA atua principalmente pela ativação dos receptores $GABA_A$ (WU; SUN, 2015). A ativação do sistema gabaérgico tem uma importante função na resposta simpatoinibitória mediada pelo NO no PVN (HORN et al., 1994; ZHANG; PATEL, 1998), visto que a perfusão do PVN com líquido cefalorraquidiano contendo NO aumenta a concentração local de GABA (HORN et al., 1994).

Diversas regiões do hipotálamo contêm altas concentrações de GABA, incluindo a área hipotalâmica anterior, área hipotalâmica posterior e PVN (ELEKES et al., 1986; HEYDEN et al., 1979). Estudos sugerem que o GABA e o glutamato interagem no PVN de ratos, tendo em vista que o bloqueio da inibição mediada por receptores GABA no PVN promove aumento da PA e FC (DE ABREU et al., 2009;

MARTINS-PINGE et al., 2013) a qual, acredita-se que ocorra através da participação de outros neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (CHEN; HAYWOOD; TONEY, 2003; MARTINS-PINGE et al., 2013).

Sendo o PVN uma importante área de integração das respostas cardiovasculares e autonômicas e, considerando que os neurotransmissores: GABA e glutamato possuem importante papel no controle central da circulação no PVN, e que animais com parkinsonismo apresentam tônus cardiovascular diminuído, assim como menor modulação simpática para a PA, este estudo foi proposto para se avaliar o possível envolvimento tônico desses neurotransmissores nas alterações cardiovasculares e autonômicas de animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA. Além disso, nenhum estudo até o momento avaliou essas alterações e a possível participação do PVN, sejam elas em animais ou humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a participação dos neurotransmissores GABA e glutamato do PVN, na regulação cardiovascular e autonômica de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar os efeitos da microinjeção de muscimol (agonista dos receptores GABA_A) no PVN no controle cardiovascular, autonômico e barorreflexo de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA.

2. Analisar os efeitos da microinjeção de bicuculina (antagonista dos receptores GABA_A) no PVN no controle cardiovascular, autonômico e barorreflexo de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA.

3. Analisar os efeitos da microinjeção de LY (antagonista dos receptores NMDA para o glutamato) no PVN no controle cardiovascular, autonômico e barorreflexo de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA.

4. Analisar os efeitos da microinjeção de NBQX (antagonista dos receptores não-NMDA para o glutamato) no PVN no controle cardiovascular, autonômico e barorreflexo de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e os Princípios Éticos na Experimentação Animal estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Londrina com registro no CEEA sob o nº 7570.2015.11.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos, pesando entre 280-320 gramas no início dos protocolos. Esses animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). No biotério setorial, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (45X25X25cm) em sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com comida e água a vontade, exceto durante os experimentos.

3.2 CIRURGIAS

3.2.1 Cirurgia estereotáxica para indução do parkinsonismo

Os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (100:20 mg/Kg, IP; Ceva Santé Animale®, São Paulo, Brasil) e posicionados em aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA). Em seguida, foi realizada a abertura da pele no sentido rostro-caudal, deixando em evidência a sutura bregma. Posteriormente, foram feitas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão bilateral da neurotoxina 6-OHDA (6 mg/mL em 0,2% de ácido ascórbico diluído em solução salina estéril) diretamente na SNpc. Foram utilizadas para a perfuração 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, 2007). A microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de 10 μ l (Hamilton, EUA) encaixada em uma bomba de infusão. Seguida a infusão da toxina (3 minutos), a agulha permanecia no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo da substância. O grupo sham era submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto, não recebeu a infusão de nenhuma toxina, sendo infundido somente veículo nas mesmas coordenadas estereotáxicas.

3.2.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia direcionadas ao

PVN

Imediatamente após a finalização da cirurgia estereotáxica descrita anteriormente no item 3.2.1, e com o animal ainda anestesiado e posicionado no estereotáxico foi realizado o implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN, conforme já descrito na literatura (DE ABREU et al., 2009). Para isto, a barra incisiva foi posicionada 5,0 mm abaixo da linha interaural. Feito isso, foram produzidos dois forâmes bilaterais e equidistantes da linha média, para o implante das cânulas-guia (de 20 mm de comprimento), cujas coordenadas estereotáxicas (PAXINOS e WATSON, 1998) utilizaram como referência a sutura bregma (AP= -1,4 mm, L= 0,5 mm; DV= 6,5 mm). A torre foi posicionada sem inclinação (0 grau). Para dar suporte às cânulas-guia, foi utilizada uma peça (“pé de pato”) com encaixe para as cânulas-guia separados por uma distância de 1 mm. Foram colocados dois parafusos pequenos, um em cada extremidade da abertura no sentido rostro-caudal, com o objetivo de reforçar a fixação das cânulas-guia pelo acrílico. Essas cânulas foram fixadas no crânio com resina acrílica. Após a completa fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida e com o objetivo de não obstruir as cânulas-guia até a realização dos experimentos, foi introduzido nas mesmas um oclisor. Após a cirurgia cerebral foi administrada uma dose de penicilina (30.000 UI) por via intramuscular e os animais foram colocados em gaiolas individuais com ambiente aquecido para recuperação da anestesia e posteriormente eram encaminhados à sala de manutenção dos animais. No biotério os animais operados permaneciam por 6 dias.

3.3 CATETERIZAÇÃO DE ARTÉRIA FEMORAL

Seis dias após a cirurgia estereotáxica e vinte e quatro horas antes do registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados com tribromoethanol (250 mg/Kg IP) e submetidos à uma cirurgia para cateterização da artéria femoral, para monitorização dos parâmetros cardiovasculares de forma direta.

Uma incisão de 1,0 cm foi realizada na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral foi dissecada. Uma linha de sutura foi utilizada para isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi inserida a fim de obstruir temporariamente o fluxo arterial. Em seguida, um pequeno corte foi feito na artéria femoral e a cânula introduzida e cuidadosamente fixada na artéria. O mesmo procedimento foi realizado para a veia femoral. Após esse procedimento, as cânulas foram exteriorizadas na região dorsal do animal através de um trocar por via subcutânea e fixadas à pele por sutura cirúrgica. As cânulas foram fechadas com oclusores.

As cânulas eram confeccionadas a partir de 4 cm de polietileno PE-10 conectado a um segmento de 17 cm de PE-50. Após o retorno da anestesia, cada rato foi colocado em uma gaiola individual com água e ração, onde permaneceu até o momento do experimento no dia seguinte.

3.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Após 24 horas da cateterização, os animais foram submetidos ao registro basal da PAP, seguido do protocolo experimental. O registro direto da PAP foi realizado através de uma cânula previamente implantada na artéria femoral. O

registro foi feito com os animais não anestesiados e com livre movimentação de acordo com trabalhos prévios (MARTIN; HAYWOOD, 1992; MARTINS-PINGE et al., 2013). A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments), obtendo-se assim a pressão arterial pulsátil (PAP) e consecutivamente a PAM e a FC eram registradas em um segundo e terceiro canal, respectivamente.

Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso e desprovidos de estímulos estressantes. Experimentos pilotos já evidenciaram que os procedimentos utilizados neste trabalho não causam reações dolorosas ou outro tipo de comportamento que interfira no registro cardiovascular ou que não seja previsível pela administração de certas substâncias no PVN. Caso isso ocorresse, os animais eram imediatamente eutanasiados e descartados como sujeitos experimentais.

3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após o registro basal da PAP por aproximadamente 30 minutos, foi realizado o tratamento farmacológico no PVN.

3.5.1 Tratamento farmacológico do PVN

Em grupos experimentais diferentes foi realizada a microinjeção bilateral no PVN de uma das seguintes drogas: salina fisiológica 0,9% (100 nL; n = 9), bicuculina (antagonista dos receptores GABA_A, 1 mM/100 nL; n = 9), muscimol (agonista dos

receptores GABA_A, 15 mM/100 nL; n = 8), LY235959 (antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA, 2 mM/100 nL; n = 8), NBQX (antagonista dos receptores glutamatérgicos não-NMDA, 2 mM/100 nL; n = 8).

Uma cânula microinjetora com comprimento de 21 mm, conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e este a uma seringa Hamilton (modelo 701), foi colocada no interior da cânula guia, injetando-se manualmente 100 nL de cada droga. O volume injetado foi verificado pelo deslocamento de bolhas de ar. As concentrações das substâncias microinjetadas foram baseadas em trabalhos prévios (BUSNARDO et al., 2016; BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009; MARTINS-PINGE et al., 2013; SCHLENKER et al., 2001; ZHANG; PATEL, 1998).

3.5.2 Identificação funcional do PVN

Ao final do protocolo experimental, todos os animais (exceto o grupo que recebeu muscimol, que não responde à bicuculina, pois atuam no mesmo sítio receptor) receberam centralmente a administração bilateral de bicuculina (1mM/100nL) no PVN, afim de se obter a marcação funcional do PVN, que consiste em aumento da PAM e FC e comportamento de autolimpeza (MARTIN; SEGURA; HAYWOOD, 1991).

3.5.3 Dissecção do estriado e Histologia do Cérebro

Previamente à decapitação dos animais, foi realizada a microinjeção de azul de Evans bilateralmente no PVN e após a decaptação as amostras de tecido cerebral contendo o PVN foram armazenadas em formaldeído para futura análise

histológica. Já os estriados dos animais foram dissecados manualmente e pesados, para serem então armazenados a - 80° C para posterior análise.

3.5.3.1 Marcação e Histologia do PVN

Após o término do protocolo experimental e eutanásia dos animais, foram retirados os cérebros dos animais e a parte do cérebro contendo o PVN foi retirada e armazenada em formalina (10%) para realização de corte histológico e análise das lâminas. Os cérebros foram seccionados em criostato através de cortes de 40 µm da região do PVN. Os cortes obtidos foram posicionados e fixados em lâminas de vidro e corados pela técnica de vermelho neutro 1%. Estes cortes foram analisados ao microscópio óptico e comparados ao Atlas cerebral de ratos (PAXINOS, 2007). Somente os animais que tiveram os sítios marcados na área do PVN foram considerados como animais experimentais.

3.5.3.2 Determinação dos níveis de DA no estriado por cromatografia líquida de alta performance

As amostras do estriado dissecado foram suspendidas com ácido perclórico 0,1 M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 15 µL/mg de material cerebral. Após sonicação, os homogenatos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 10 min a 4° C e 30 µl. O sobrenadante foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector eletroquímico. As áreas de pico foram comparadas às áreas dos padrões externos (Sigma-Aldrich, EUA) para identificação das monoaminas e metabólitos. As

concentrações das substâncias foram corrigidas pela massa das amostras de tecido que foram dissecados e foram expressos como ng de substância por mg de tecido.

3.5.4 Variabilidade da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

A análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS) no domínio da frequência foi realizada utilizando o software computacional CardioSeries v2.4 (TEZINI; DIAS; SOUZA, 2013). Uma vez que este programa computacional não realiza aquisição de dados, os registros de PAP basal e após tratamento farmacológico, foram processados pelo programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco.

As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). A estacionariedade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e os segmentos com artefatos ou transientes foram excluídos.

Após a inspeção visual dos segmentos com valores interpolados de IP e PAS e da inspeção dos espectros, os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3,00 Hz), e os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos por meio de

cálculos da potência relativa das bandas de LF e HF levando em consideração a potência total de espectro menos a potência de banda de muito baixa frequência (VLF: < 0,20 Hz). Para avaliar o balanço simpátovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP (DUTRA et al., 2013; TEZINI; DIAS; SOUZA, 2013).

3.5.5 Análise do Barorreflexo Espontâneo

A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio do tempo por meio do método da sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4, 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, nas 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 a 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 barorreflexa só foi utilizada quando o coeficiente de correlação (r) entre os valores de PAS e IP for maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média de inclinação da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

3.6 Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória de cada variável para analisar a normalidade da distribuição (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). Para estas análises foi utilizado o programa IBM® SPSS® Statistics, versão 22. As análises subsequentes foram conduzidas através do programa estatística Prism® versão 6.0 (GraphPad®, San Diego, CA). Todas as variáveis se apresentaram com distribuição normal e homogêneas foram analisadas por testes estatísticos paramétricos. A análise paramétrica foi conduzida e os valores demonstrados como média \pm erro padrão da média. A análise de diferenças entre os grupos controle e tratado, e o efeito de cada droga foi realizada através da análise de variância de duas vias (Two-Way Anova) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância assumido foi de 95% ($p < 0,05$).

As diferenças entre os grupos experimentais e sham foram comparados utilizando-se o teste t de Student para amostras não pareadas. Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DOPAMINA NO ESTRIADO

A análise neuroquímica no estriado (Figura 3A) indica que os níveis de DA no grupo 6-OHDA ($1,13 \pm 0,18$; $n = 32$) apresentou-se reduzido comparado ao grupo sham ($5,35 \pm 0,3$; $n = 34$). Estes resultados indicam uma diminuição de DA maior que 70%, confirmando a lesão nos animais submetidos à infusão de 6-OHDA.

4.2 CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO

A confirmação dos sítios de microinjeção no PVN (Figura 3B e 3C) foi realizada através de análise histológica, utilizando-se a técnica de coloração do vermelho neutro. A visualização dos cortes histológicos possibilitou confirmar que os efeitos das drogas administradas centralmente sobre os parâmetros cardiovasculares e autonômicos eram decorrentes da microinjeção no PVN dos ratos, conforme coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (PAXINOS, 2007).

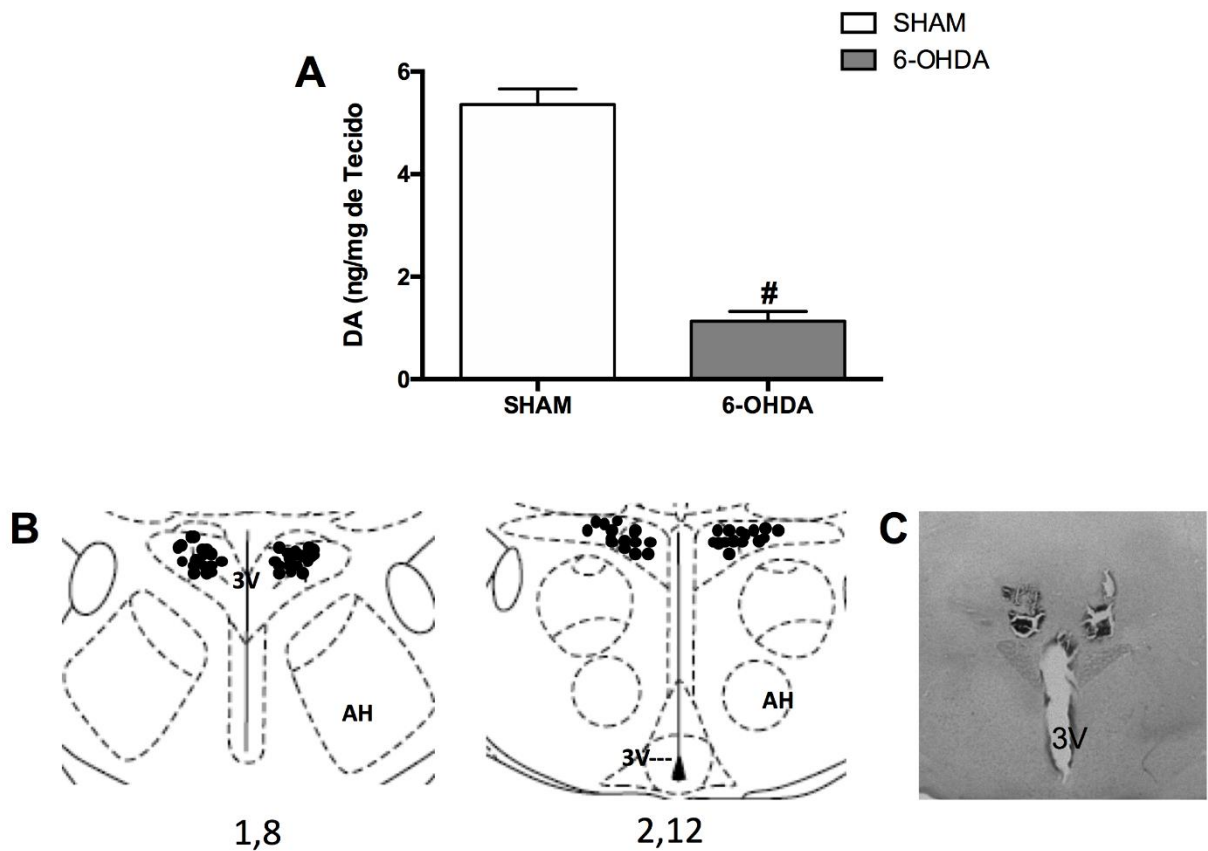


Figura 3. (A) Concentração de dopamina (DA) no estriado (avaliada por HPLC) 7 dias após a infusão bilateral de salina (Sham) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*. Valores expressos como média \pm EPM, $n = 30-32$ ratos por grupo, $p \leq 0,05$. #Comparado ao grupo sham (teste t-student), $p < 0,05$. (B) Representação esquemática dos sítios de microinjeção no PVN (•): Microinjeção na região rostral (1,8 mm) à caudal (2,12 mm) da região do PVN. Distância posterior ao bregma é mostrado para cada secção de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007). (C) Fotomicrografia de uma lâmina histológica do PVN. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; AH, hipotálamo anterior.

4.3 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA BASAIS DE RATOS SHAM E 6-OHDA

Os valores de PAM e FC dos ratos sham e 6-OHDA no período basal (pré-droga) são apresentados na Tabela 1. Os valores basais da PAM e FC nos ratos lesados com 6-OHDA se mostraram reduzidos quando comparados ao grupo SHAM.

Tabela 1. Valores basais de PAM e FC dos ratos sham e 6-OHDA

	Sham		6-OHDA	
	PAM	FC	PAM	FC
Veículo	111±2	350±5	99±1 [#]	291±4 [#]
Bicuculina	109±2	355±5	100±1 [#]	298±3 [#]
Muscimol	110±2	346±9	99±1 [#]	297±5 [#]
LY235959	111±3	346±10	98±4 [#]	310±4 [#]
NBQX	107±2	346±10	95±4 [#]	310±4 [#]

PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca. [#]Diferença em relação ao grupo sham, p<0,05.

4.4 EFEITOS CARDIOVASCULARES APÓS A MICROINJEÇÃO DE VEÍCULO, BICUCULINA, MUSCIMOL, LY235959 OU NBQX NO PVN

Os valores basais da PAM e FC (Tabela 1) nos ratos lesados com 6-OHDA (99 ± 3 mmHg, 291 ± 4 bpm) se mostraram reduzidos quando comparados ao grupo SHAM (111 ± 6 mmHg, 350 ± 4 bpm) e a administração de veículo não afetou estes parâmetros. A administração de bicuculina no PVN do grupo sham promoveu um aumento da PAM (BIC: 123 ± 8 mmHg, Basal: 111 ± 6 mmHg) e da FC (BIC: 435 ± 9 bpm; Basal: 355 ± 5 bpm) e a microinjeção de bicuculina no grupo 6-OHDA acentuou o aumento da PAM observada no grupo sham (6-OHDA: 136 ± 11 mmHg; SHAM: 111 ± 6 mmHg) e também da FC (6-OHDA: 487 ± 15 bpm; SHAM: 435 ± 9 bpm) (Figura 4). O bloqueio do PVN com muscimol não promoveu alterações cardiovasculares em ambos os grupos (Figura 5).

O bloqueio dos receptores NMDA com LY no PVN do grupo sham não promoveu alterações nos parâmetros pressóricos (LY: 107 ± 2 mmHg; Basal: 111 ± 3 mmHg) e de frequência cardíaca (LY: 352 ± 4 bpm; Basal: 346 ± 10 bpm), porém, quando microinjetado no PVN do grupo 6-OHDA, o LY reduziu a PAM (LY: 83 ± 2 mmHg; Basal: 98 ± 4 mmHg) e a FC (LY: 251 ± 6 bpm; Basal: 310 ± 4 bpm) (Figura 6). A administração de NBQX não alterou os parâmetros cardiovasculares observados em ambos os grupos (Figura 7).

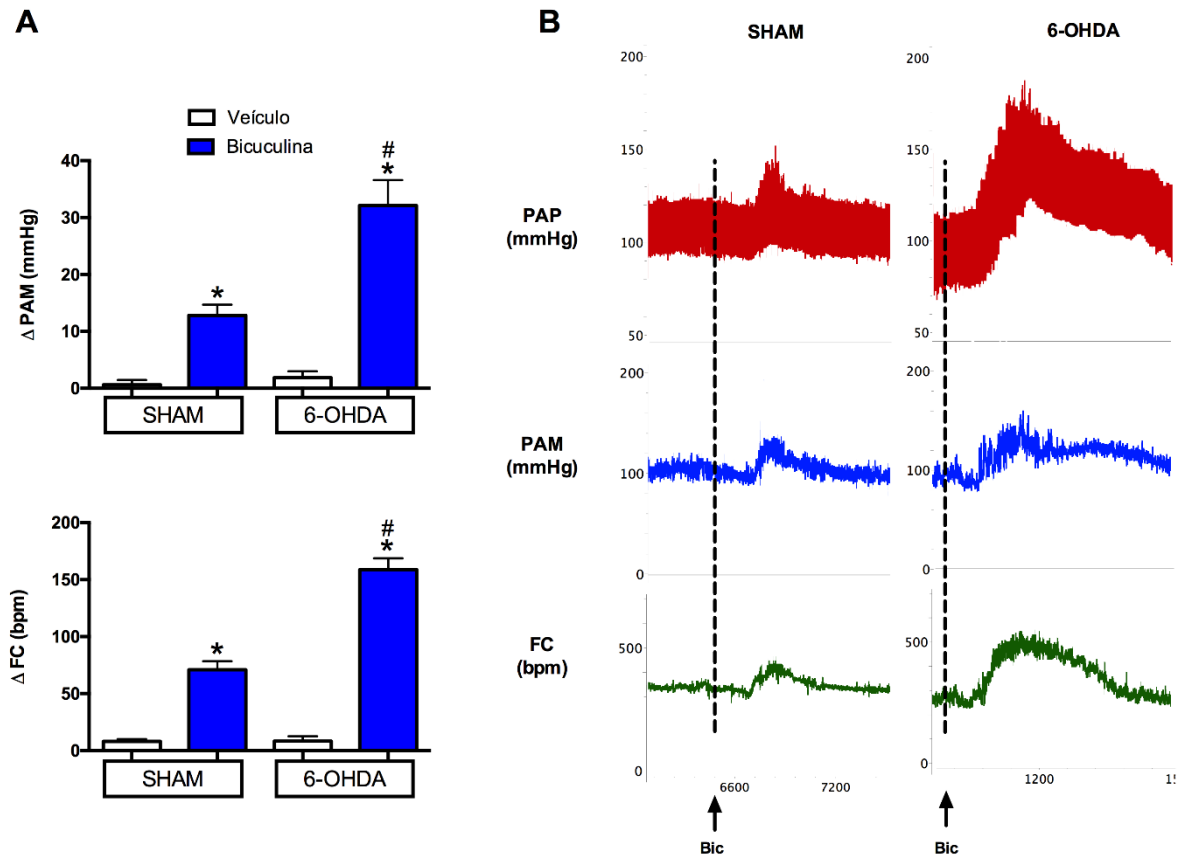


Figura 4. (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a microinjeção de bicuculina (Bic, 1 mM/100 nL) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*. Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), ilustrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de Bic no PVN. As setas indicam o tempo de injeção. * Diferença pré e pós-droga. #Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, n = 7-9 ratos por grupo, $p < 0,05$.

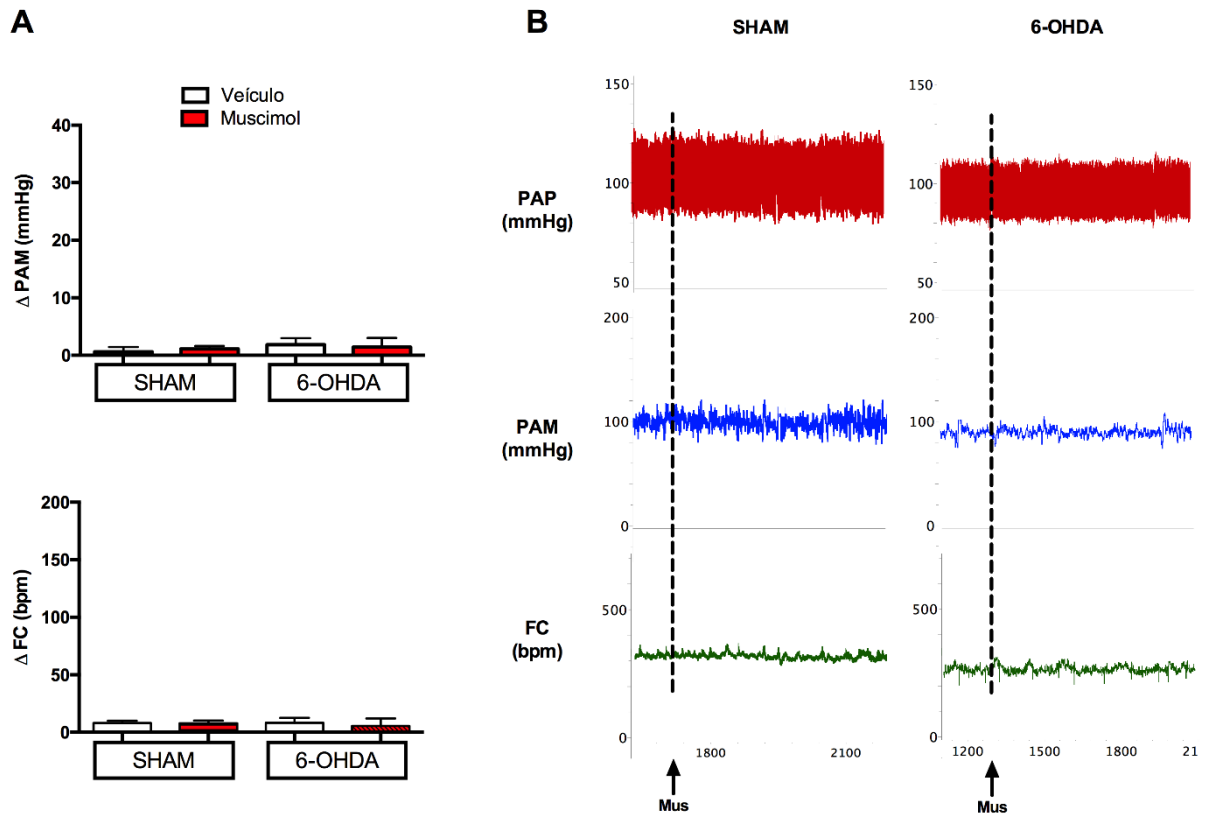


Figura 5. (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a administração de muscimol (Mus, 15 mM/100 nL) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. Veículo (solução salina). (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções bilaterais no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*. Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), ilustrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de Mus no PVN. As setas indicam o tempo de injeção. * Diferença pré e pós-droga. #Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, n = 7-9 ratos por grupo, p<0,05.

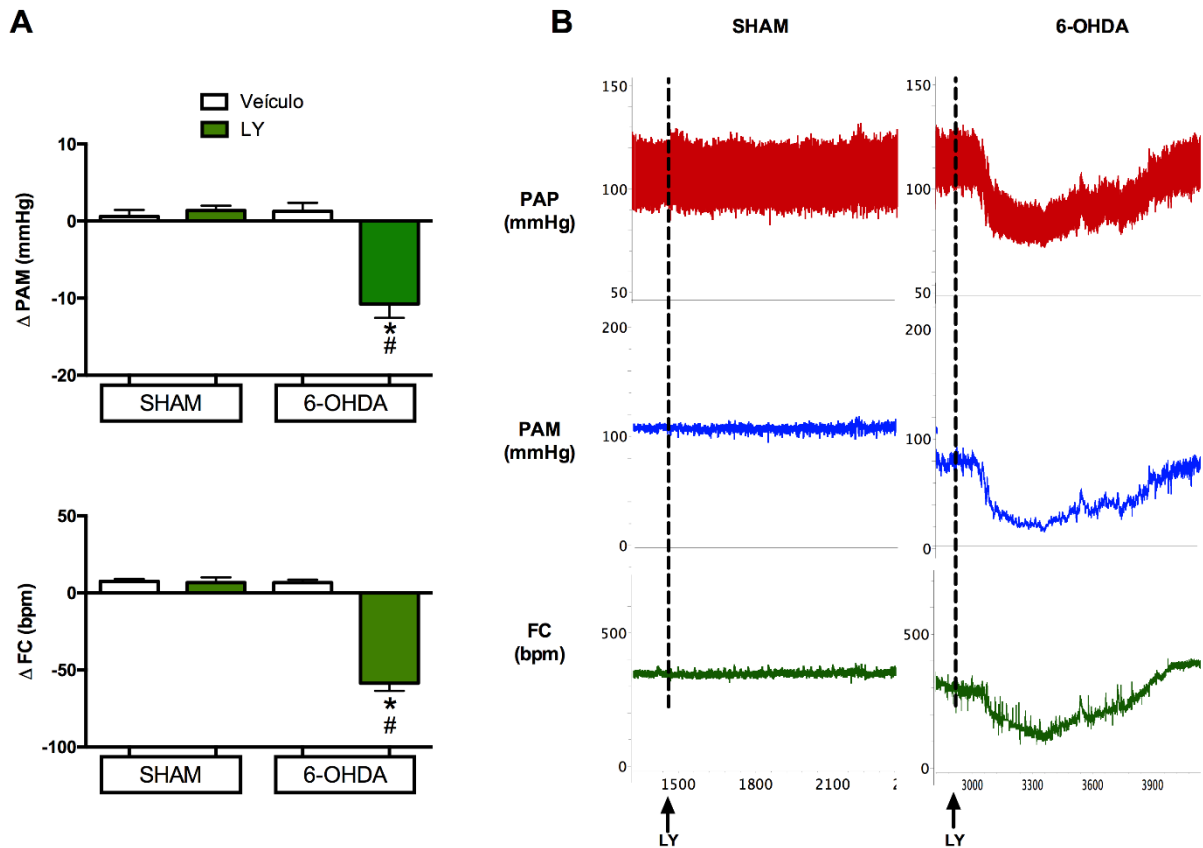


Figura 6. (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a microinjeção bilateral de LY 235959 (LY, 2 mM/100 nL) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substantia negra *pars compacta*. Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), ilustrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de LY no PVN. As setas indicam o tempo de injeção. * Diferença pré e pós-droga. #Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, n = 7-9 ratos por grupo, $p < 0,05$.

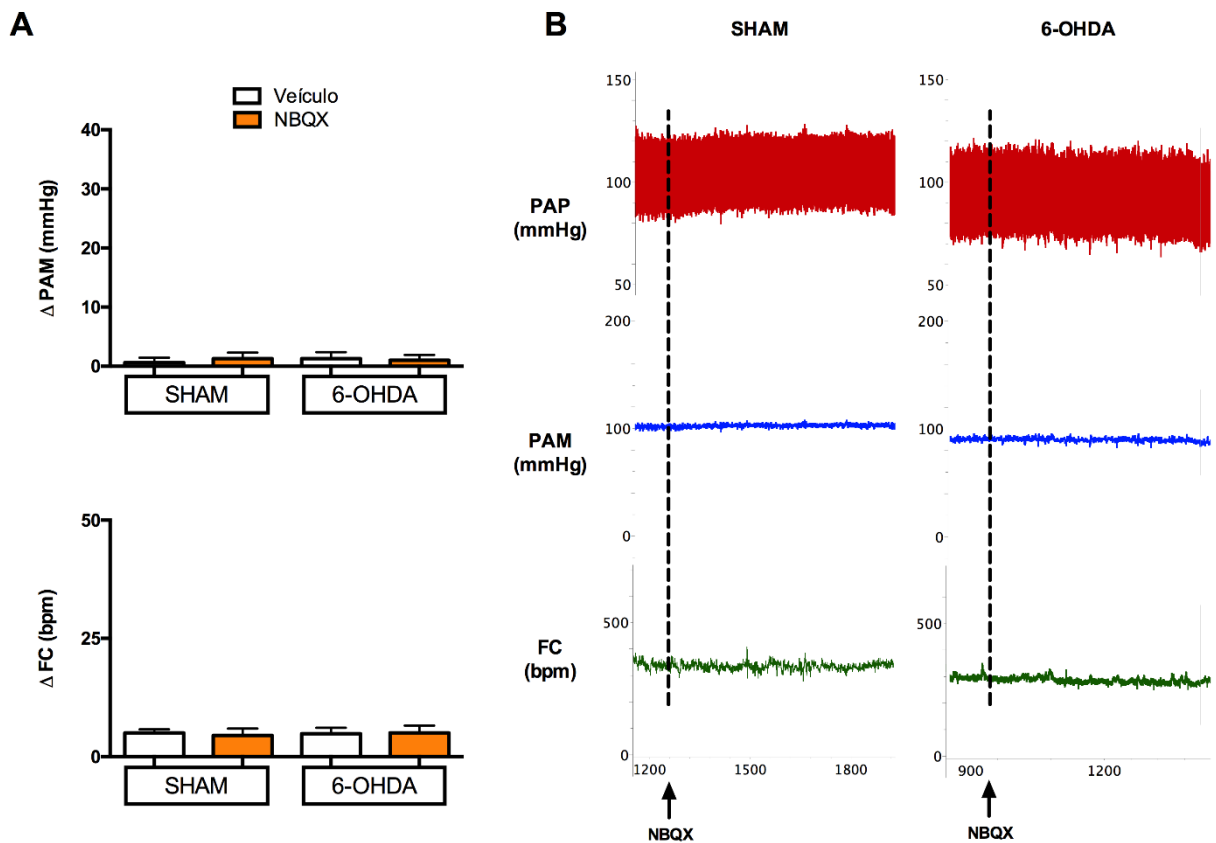


Figura 7. (A) Análise dos parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) pré e pós-droga no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão de solução salina (Sham) ou 6-OHDA bilateralmente na substância negra *pars compacta*. Veículo (solução salina). (B) Traçados típicos das alterações cardiovasculares produzidas por microinjeções no PVN de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de solução salina (SHAM) ou 6-OHDA na substantia negra *pars compacta*. Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), ilustrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de NBQX no PVN. As setas indicam o tempo de injeção. *Diferença pré e pós-droga. #Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, $n = 7-9$ ratos por grupo, $p < 0,05$.

4.5 EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE BICUCULINA NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP

Os resultados mostram uma menor variância da PAS no modelo 6-OHDA (6-OHDA: $9 \pm 0,7$ mmHg; SHAM: 24 ± 2 mmHg). A ativação do PVN com bicuculina aumentou a variância da PAS do grupo sham (BIC: 37 ± 4 mmHg; Basal: 23 ± 2 mmHg) e no grupo 6-OHDA, o efeito da bicuculina foi maior (BIC: 66 ± 5 mmHg; Basal: 8 ± 1 mmHg) do que o observado no grupo sham. Do mesmo modo, a bicuculina promoveu um aumento do LF da PAS no grupo sham (BIC: 8 ± 1 mmHg; Basal: $5 \pm 0,7$ mmHg) e este aumento foi maior no grupo 6-OHDA (BIC: $10 \pm 0,7$ mmHg; Basal: $2 \pm 0,4$ mmHg) (Figura 8).

A análise espectral do IP mostrou que a lesão provocada pela 6-OHDA promoveu uma redução da variância (6-OHDA: 22 ± 2 ms²; SHAM: 56 ± 4 ms²) e que a microinjeção de bicuculina no PVN levou a um aumento da variância no grupo sham (BIC: 85 ± 6 ms²; SHAM: 52 ± 4 ms²) e no grupo 6-OHDA. No entanto, a bicuculina no grupo 6-OHDA resultou em maior aumento da variância (BIC: 148 ± 16 ms²; Basal: 18 ± 2 ms²) do que no grupo sham. Portanto, a bicuculina teve seu efeito intensificado no grupo 6-OHDA (Figura 8).

A lesão por 6-OHDA promoveu uma redução da modulação simpática cardíaca dos ratos induzidos ao parkinsonismo (6-OHDA: $5 \pm 0,4$ ms²; SHAM: $2 \pm 0,3$ ms²) e ao mesmo tempo aumentou a modulação parassimpática (6-OHDA: 14 ± 2 ms², SHAM: $5 \pm 0,7$ ms²). A microinjeção de bicuculina nos ratos 6-OHDA teve um maior efeito sobre o LF do que o observado nos ratos sham (BIC: 12 ± 1 ms²; SHAM: $2 \pm 0,3$ ms²) e, ao mesmo tempo, nos ratos 6-OHDA, a bicuculina impediu o aumento do HF (BIC: $5 \pm 0,8$ ms²; pré-droga: 12 ± 2 ms²). A ativação do PVN com

bicuculina promoveu o aumento da razão LF/HF dos animais sham (BIC: $0,7 \pm 0,2$ ms²; Basal: $0,4 \pm 0,1$ ms²) e no grupo 6-OHDA promoveu um maior aumento (BIC: $1,2 \pm 0,4$ ms²; Basal: $0,5 \pm 0,1$ ms²) do que o observado nos ratos sham (Figura 8).

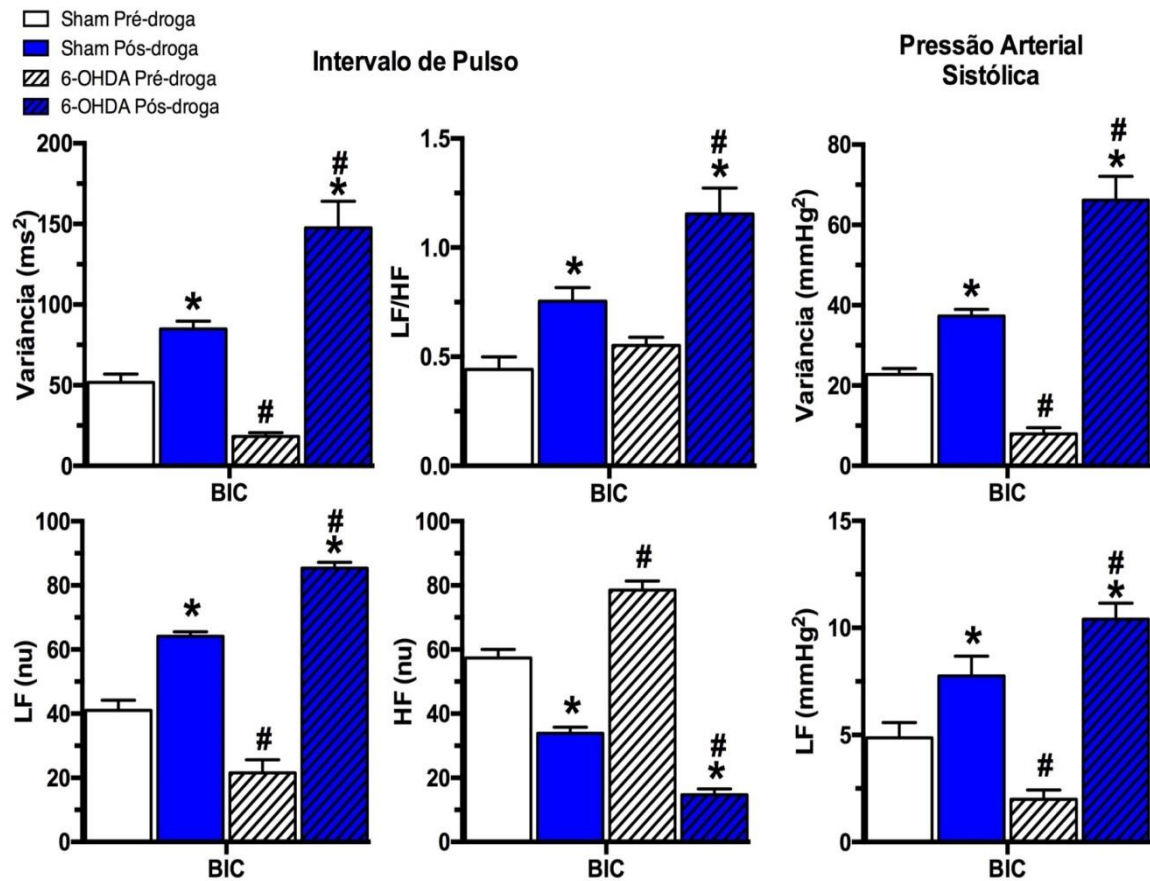


Figura 8. Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de bicuculina no PVN (1 mM / 100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA. Os valores são expressos como médias \pm EPM ($n = 7-9$ ratos por grupo, $P < 0,05$). LF, baixa frequência; LFnu, baixa frequência normalizada; HFnu, alta frequência normalizada; razão LF/HF. * Diferença pré e pós-droga. # Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, $n = 7-9$ ratos por grupo, $p < 0,05$.

4.6 EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE MUSCIMOL NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP

A modulação autonômica do IP e PAS apresentou-se diminuída no grupo 6-OHDA em comparação ao grupo sham no período basal. O bloqueio da neurotransmissão no PVN através da microinjeção de muscimol não promoveu alterações na variância da PAS do grupo sham (MUS: 21 ± 3 mmHg; Basal: 21 ± 2 mmHg) e do grupo 6-OHDA (MUS: 10 ± 1 mmHg; Basal: $9 \pm 0,8$ mmHg) e, do mesmo modo, não afetou o componente LF da PAS do grupo sham (MUS: $5 \pm 0,7$ mmHg; Basal: $6 \pm 0,5$ mmHg) e do grupo 6-OHDA (MUS: $2 \pm 0,3$ mmHg; Basal: $1,8 \pm 0,2$ mmHg) (Figura 9).

Semelhantemente, o muscimol não afetou a variância do IP do grupo sham (MUS: 62 ± 8 ms²; Basal: 61 ± 6 ms²) e do grupo 6-OHDA (MUS: 28 ± 2 ms²; Basal: 27 ± 2 ms²). Igualmente, o bloqueio com o muscimol não alterou o componente LF do IP do grupo sham (MUS: 50 ± 3 ms²; Basal: 48 ± 4) e do grupo 6-OHDA (MUS: 23 ± 4 ms²; Basal: 29 ± 3 ms²) e também não alterou o componente HF do grupo sham (MUS: 52 ± 3 ms²; Basal: 54 ± 2 ms²) e do grupo 6-OHDA (MUS: 75 ± 4 ms²; Basal: 69 ± 3). O balanço simpato-vagal não foi alterado pela administração de muscimol em nenhum dos grupos (6-OHDA: $0,6 \pm 0,06$ ms²; SHAM: $0,6 \pm 0,07$ ms²) (Figura 9).

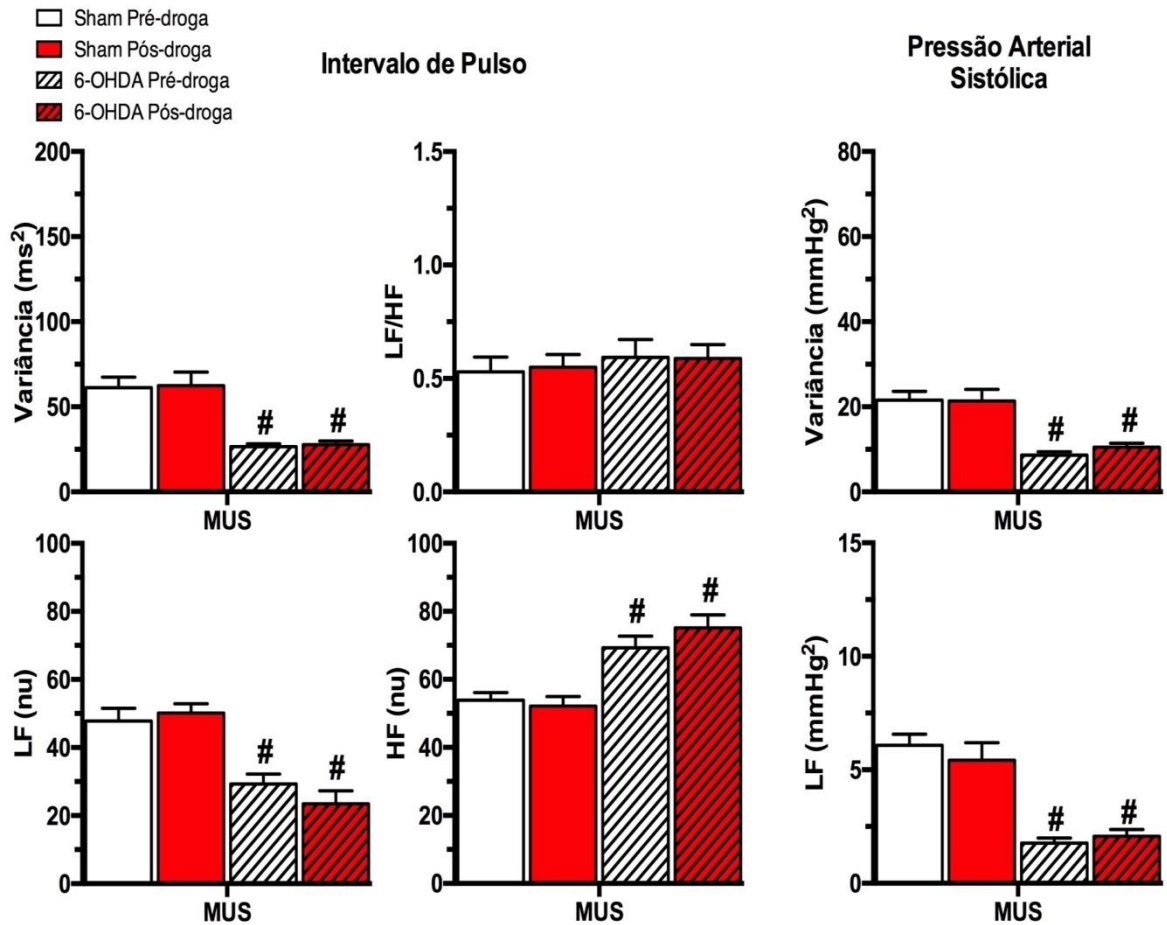


Figura 9. Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de muscimol no PVN (15 mM /100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA. Os valores são expressos como médias \pm EPM ($n = 7-9$ ratos por grupo, * $P < 0,05$). LF, baixa frequência; LFnu, baixa frequência normalizada; HFnu, alta frequência normalizada; razão LF/HF. * Diferença pré e pós-droga. #Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, $n = 7-9$ ratos por grupo, $p < 0,05$.

4.6.1 EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE LY235959 NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP

A microinjeção de LY não alterou a variância basal da PAS do grupo sham (SHAM: 27 ± 2 mmHg; Basal: 26 ± 2 mmHg), todavia, no grupo 6-OHDA promoveu uma redução da variância (6-OHDA: $5 \pm 0,8$ mmHg; Basal: 15 ± 1 mmHg, $P < 0,05$). A modulação simpática da PAS se mostrou reduzida nos animais 6-OHDA (6-OHDA: $2,3 \pm 0,3$ ms²; Sham: $5,3 \pm 0,5$ ms², $p < 0,05$) e a microinjeção de veículo não afetou estes resultados observados em ambos os grupos. Já a administração de LY no PVN, embora não tenha afetado a modulação simpática no grupo sham (LY: $6,7 \pm 0,5$ ms²; Basal: $6,5 \pm 0,5$ ms²), promoveu uma redução dessa modulação no grupo 6-OHDA (LY: $0,8 \pm 0,2$ ms²; Basal: $3,8 \pm 0,4$ ms²) (Figura 10).

A administração de LY no PVN do grupo sham não alterou a variância comparado aos valores basais do IP (LY: 54 ± 6 ms²; Basal: 60 ± 5 ms²). Já no grupo 6-OHDA, a microinjeção de LY promoveu uma redução da variância (LY: 7 ± 2 ms²; Basal: 31 ± 3 ms², $P < 0,05$). Além disso, o grupo 6-OHDA apresentou uma menor modulação simpática do IP (6-OHDA: $2,9 \pm 0,1$ ms²; SHAM: $5,5 \pm 0,5$ ms², $P < 0,05$) e maior modulação parassimpática (6-OHDA: 14 ± 1 ms²; SHAM: $5 \pm 0,5$ ms², $P < 0,05$). A administração do veículo não promoveu alterações em ambos os parâmetros. A microinjeção de LY no PVN do grupo sham não alterou a modulação autonômica do IP, no entanto, quando administrado no grupo tratado com 6-OHDA, o LY reduziu a modulação simpática (LY: $0,6 \pm 0,1$ ms²; Basal: $2,9 \pm 0,1$ ms², $P < 0,05$) e acentuou o aumento da modulação parassimpática basal observado no grupo 6-OHDA (LY: $16 \pm 1,4$ ms²; Basal: $12 \pm 0,8$ ms², $P < 0,05$) (Figura 10).

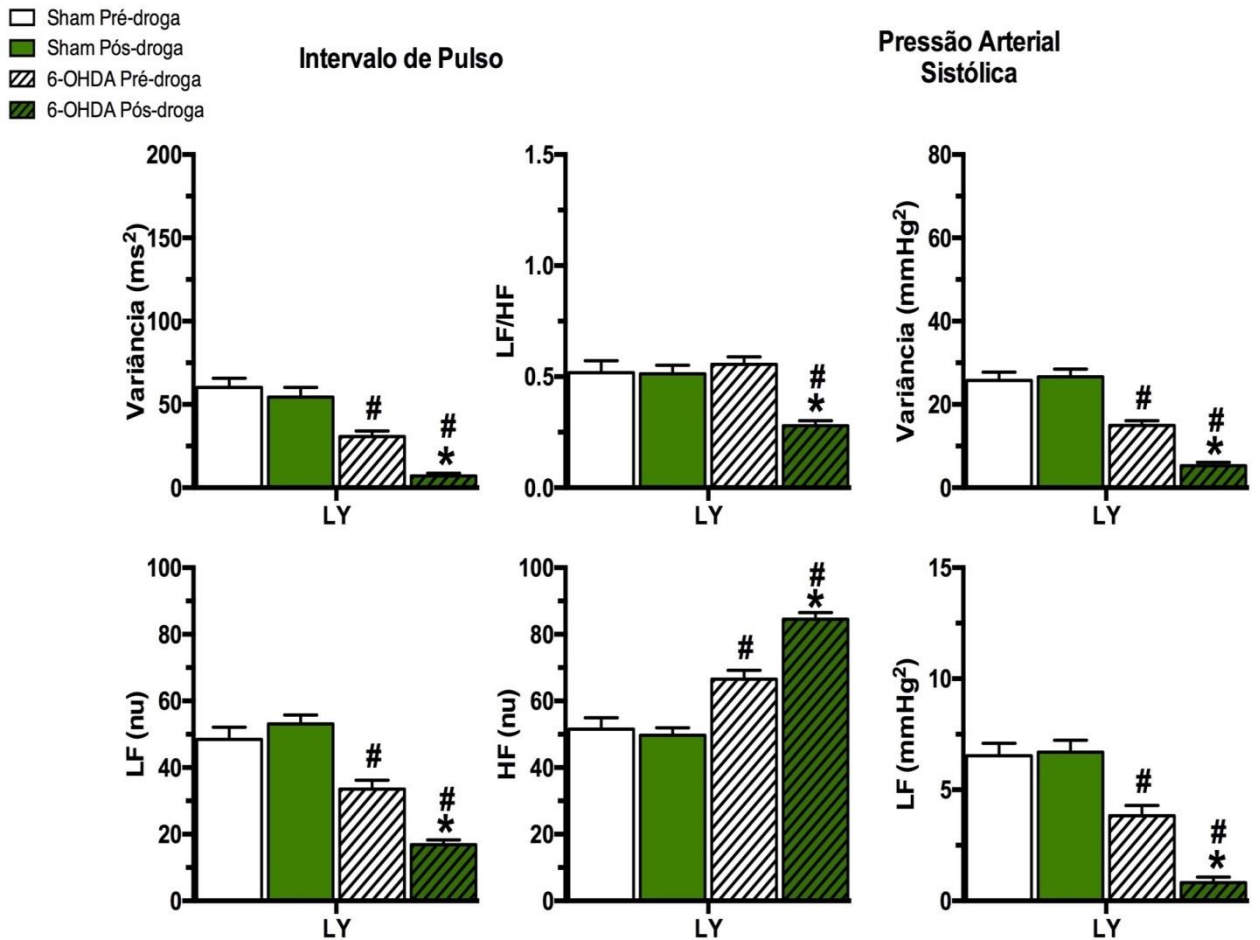


Figura 10. Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de LY235959 (LY) no PVN (2 mM /100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA. Os valores são expressos como médias \pm EPM ($n = 7-9$ ratos por grupo, $* P < 0,05$). LF, baixa frequência; LFnu, baixa frequência normalizada; HFnu, alta frequência normalizada; razão LF/HF. *Diferença pré e pós-droga. #Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, $n = 7-9$ ratos por grupo, $p < 0,05$.

4.7 EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE NBQX NO PVN SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PAS E IP

A modulação autonômica do IP e PAS se apresentou diminuída no grupo 6-OHDA e o bloqueio dos receptores não-NMDA do PVN, através da microinjeção de NBQX, não alterou a modulação autonômica sobre os parâmetros de PAS e IP de ambos os grupos (Figura 11).

A modulação autonômica do IP e PAS se apresentou diminuída no grupo 6-OHDA e o bloqueio dos receptores não-NMDA do PVN, através da microinjeção de NBQX, não alterou a variância da PAS do grupo sham (NBQX: 28 ± 2 mmHg; Basal: 27 ± 3 mmHg) e do grupo 6-OHDA (NBQX: 14 ± 2 mmHg; Basal: 13 ± 2 mmHg) e identicamente, não alterou o LF do grupo sham (NBQX: $5 \pm 0,8$ mmHg; Basal: $5 \pm 0,6$ mmHg) e do grupo 6-OHDA (NBQX: $2 \pm 0,7$ mmHg; Basal: $2 \pm 0,6$ mmHg) (Figura 11).

Da mesma maneira, a administração de NBQX no PVN não alterou a variância do IP do grupo sham (NBQX: 55 ± 7 ms²; Basal: 57 ± 8 ms²) e do grupo 6-OHDA (NBQX: 24 ± 2 ms²; Basal: 21 ± 2 ms²), não afetou o componente LF do IP do grupo sham (NBQX: $5 \pm 0,8$ ms²; Basal: $5 \pm 0,6$ ms²) e do grupo 6-OHDA (NBQX: $2 \pm 0,6$ ms²; Basal: $2 \pm 0,6$ ms²) e não modificou o componente HF do grupo sham (NBQX: $7 \pm 0,5$ ms²; Basal: $6 \pm 0,5$ ms²) e do grupo 6-OHDA (NBQX: 16 ± 1 ms²; Basal: 14 ± 1 ms²). Ainda, o balanço simpato-vagal não foi alterado pela administração de NBQX no grupo sham (NBQX: $0,5 \pm 0,06$ ms²; Basal: $0,5 \pm 0,07$ ms²) e no grupo 6-OHDA (6-OHDA: $0,5 \pm 0,02$ ms²; Basal: $0,5 \pm 0,04$ ms²) (Figura 11).

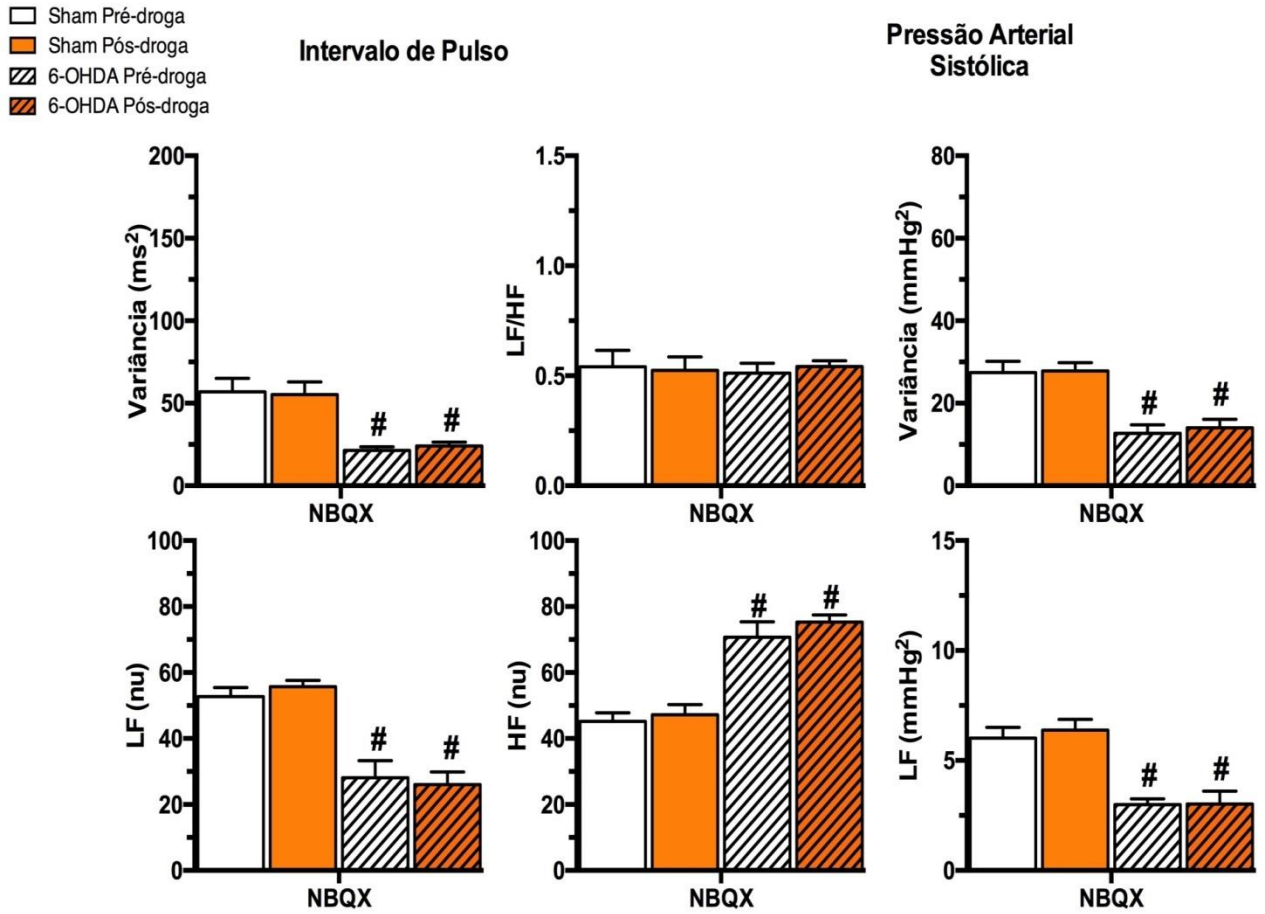


Figura 11. Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) pré e pós-microinjeção de NBQX no PVN (2 mM /100 nL). A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) foi realizada em ratos não anestesiados após 7 dias de infusão intranigral bilateral de solução salina (sham) ou 6-OHDA. Os valores são expressos como médias \pm SE (n = 7-9 ratos por grupo, * P <0,05). LF, baixa frequência; LFnu, baixa frequência normalizada; HFnu, alta frequência normalizada; razão LF/HF. *Diferença pré e pós-droga. #Diferença do grupo Sham. Valores são expressos como média \pm EPM, n = 7-9 ratos por grupo, p<0,05.

4.8 ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

O grupo que recebeu a infusão de 6-OHDA na SNpc apresentou um maior aumento no ganho total (6-OHDA: $2,1 \pm 0,1$ ms/mmHg; SHAM: $1,38 \pm 0,09$ ms/mmHg) e no índice de efetividade barorreflexa (BEI) (6-OHDA: $0,21 \pm 0,01$; SHAM: $0,12 \pm 0,01$ ms/mmHg) e a administração do veículo no PVN não alterou o ganho total e o BEI em ambos os grupos. Já a microinjeção de Bic aumentou o ganho total no grupo sham (BIC: $1,9 \pm 0,09$ ms/mmHg, Basal: $1,4 \pm 0,1$ ms/mmHg) e o BEI (BIC: $0,2 \pm 0,01$ ms/mmHg, Basal: $0,13 \pm 0,01$ ms/mmHg) e, o efeito da bicuculina foi ainda maior no grupo 6-OHDA, acentuando o ganho total (BIC: $2,7 \pm 0,08$ ms/mmHg; Basal: $1,9 \pm 0,08$ ms/mmHg) e o BEI (BIC: $0,27 \pm 0,1$ ms/mmHg; Basal: $0,2 \pm 0,01$ ms/mmHg). O bloqueio do PVN com muscimol não alterou o barorreflexo espontâneo de ambos os grupos. A administração de LY não promoveu alterações no ganho total e no BEI do grupo sham, enquanto no grupo 6-OHDA, o LY impediu o aumento do ganho total (LY: $1,7 \pm 0,1$ ms²; Basal: $2,3 \pm 0,1$ ms²) e reduziu o BEI (LY: $0,07 \pm 0,01$ ms²; Basal: $0,19 \pm 0,01$). A microinjeção de NBQX não alterou o barorreflexo espontâneo de ambos os grupos (Figura 12).

Sensibilidade Barorreflexa Espontânea

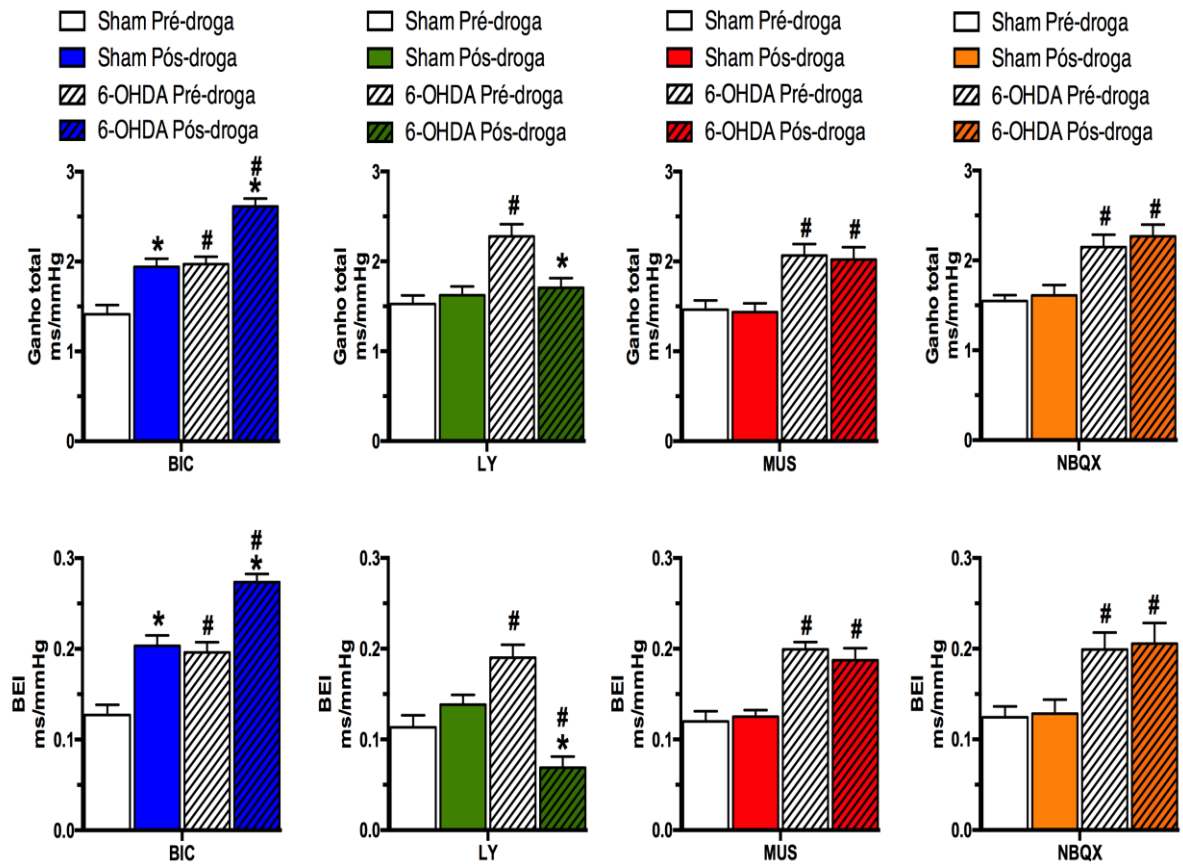


Figura 12. Análise do barorreflexo espontâneo durante o período basal e após administração de drogas no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratos não anestesiados, 7 dias após a infusão bilateral de salina (Sham) ou 6-OHDA na substância negra *pars compacta*. VEI (veículo), BIC (bicuculina) LY (LY235959), NBQX, BEI (Índice de efetividade baroreflexa). *Comparado ao período pré-droga. #Comparado ao grupo sham. Valores expressos como média \pm EPM, $n = 7-9$ ratos por grupo, $p \leq 0,05$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o envolvimento do PVN na regulação das alterações cardiovasculares e autonômicas de ratos não-anestesiados após a lesão bilateral da SNpc pela infusão de 6-OHDA ou salina (sham). A microinjeção de bicuculina (antagonista GABA_A) no PVN promoveu um aumento da PAM e FC no grupo sham e intensificou o aumento da PAM e FC no grupo 6-OHDA. O NBQX (inibidor não-NMDA), assim como o muscimol (agonista GABA_A), não promoveu alterações na PAM e FC no grupo sham ou no grupo 6-OHDA, todavia, a microinjeção de LY235959 (inibidor NMDA) no PVN não induziu alterações cardiovasculares no grupo sham, mas diminuiu a PAM e a FC no grupo 6-OHDA. Além disso, a modulação autonômica após a microinjeção de drogas no PVN corrobora com os dados cardiovasculares obtidos, indicando que o aumento da PAM e da FC está associado ao aumento do simpático e, diminuições nesses parâmetros está associada à diminuição do simpático ou aumento do parassimpático (para a frequência cardíaca) (CRUZ; MACHADO, 2009; DE ABREU et al., 2009; MARTIN; SEGURA; HAYWOOD, 1991; MARTINS-PINGE et al., 2013). Os dados sugerem que a diminuição da PA basal e da FC em animais com parkinsonismo pode ser devido a uma modulação central através do aumento do tônus gabaérgico no PVN. Além disso, as sinapses glutamatérgicas, através dos receptores NMDA, parecem também estar envolvidas neste efeito modulador.

Os resultados mostram uma diminuição superior a 70% dos níveis de DA no estriado dos animais 6-OHDA, caracterizando o modelo de parkinsonismo. Além disso, houve uma redução dos valores basais de PAM e FC, bem como alterações na modulação autonômica dos parâmetros cardiovasculares, com redução da variância e modulação simpática da PAS e IP e aumento da atividade

parassimpática do IP. Os resultados estão de acordo com estudos anteriores que avaliaram a modulação cardiovascular e autonômica em ratos induzidos ao parkinsonismo 6-OHDA (ARIZA et al., 2015a, 2015b; SILVA et al., 2015).

No grupo sham, a ativação do PVN através da administração de bicuculina promoveu aumento da PAM e FC, conforme descrito anteriormente na literatura (CRUZ; MACHADO, 2009; DE ABREU et al., 2009; MARTIN; SEGURA; HAYWOOD, 1991; MARTINS-PINGE et al., 2013). Ao mesmo tempo, foi observado o aumento da variância e modulação simpática da PAS no grupo sham, bem como aumento da variância e modulação simpática e redução da atividade parassimpática do IP, conforme observado em estudos prévios (DE ABREU et al., 2009; DIMICCO et al., 1986; MARTINS-PINGE et al., 2013; NISHIHARA; TAKESUE; HIROOKA, 2017). No entanto, os dados inéditos foram que a bicuculina administrada no PVN do grupo 6-OHDA resultou em um maior aumento da PAM e FC, assim como um aumento expressivo do componente LF da PAS e também do componente LF do IP, caracterizando um efeito tônico maior pelo GABA no PVN sobre o sistema cardiovascular, o qual está associado a um aumento da modulação simpática.

A microinjeção de muscimol no PVN não promoveu alterações cardiovasculares nos grupos sham, o que está de acordo com estudos previamente publicados (AMORIM et al., 2015; HOLBEIN; TONEY, 2015; RAMCHANDRA et al., 2013), sendo que o mesmo ocorreu com o grupo 6-OHDA. Entretanto, outros estudos mostraram que o bloqueio do PVN com muscimol reduz a PAM (HASSAN et al., 2013) e a FC (BADOER; NG; DE MATTEO, 2002; HASSAN et al., 2013) em condições basais ou patológicas (HASSAN et al., 2013). Além disso, um estudo avaliando os cérebros de pacientes com DP mostrou que a ligação do muscimol aos receptores GABA_A está alterada em diversas regiões, como a substância cinzenta,

globo pálido, núcleo caudado, putâmen, área 4, área 6 e área 9. A análise realizada revelou que essas mudanças de ligação foram causadas pela diminuição da densidade do receptor, e não por alterações na afinidade (NISHINO et al., 1988). É possível que, se o GABA já estiver aumentado no PVN de animais 6-OHDA, a adição de mais agonista não terá nenhum efeito.

Diversos estudos propõem que a neurotransmissão glutamatérgica do PVN na função autonômica e cardiovascular é predominantemente mediada por meio dos receptores NMDA (BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009; LI et al., 2006). Considerando que o glutamato desempenha um importante papel na manutenção de parâmetros autonômicos e cardiovasculares tônicos em condições fisiológicas e patológicas (BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009; LI; CORNISH; PATEL, 2003), e que a excitação simpática provocada pela microinjeção de bicuculina no PVN requer a ativação de aminoácidos excitatórios, visto que o bloqueio do receptor NMDA no PVN reduziu em grande parte a resposta cardiovascular e autonômica à bicuculina (CHEN; HAYWOOD; TONEY, 2003), os resultados sugerem que através da sua ligação aos receptores NMDA, o glutamato promove a ativação do SNS pelo PVN e participa da manutenção da PAM e da FC em animais sham e induzidos ao parkinsonismo pela 6-OHDA.

O bloqueio seletivo dos receptores glutamatérgicos NMDA ou n-NMDA com LY235959 e NBQX, respectivamente, não alterou os parâmetros cardiovasculares e autonômicos do grupo sham e estes resultados estão de acordo com estudos publicados anteriormente (BUSNARDO et al., 2013; BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009; CHEN; HAYWOOD; TONEY, 2003). Contudo, embora a microinjeção de NBQX no PVN de ratos 6-OHDA também não tenha alterado os parâmetros cardiovasculares e autonômicos, o tratamento com LY235959 induziu

hipotensão e bradicardia nos animais 6-OHDA e acentuou a diminuição da variância e da potência da banda LF do espectro da PAS. Do mesmo modo, o LY 235959 intensificou a diminuição da variância e o componente LF do IP, amplificou o aumento do componente HF e diminuiu a razão LF / HF do grupo 6-OHDA. Estes resultados sugerem a presença de um efeito tônico cardiovascular e autonômico pela neurotransmissão glutamatérgica no PVN, especificamente pelos receptores NMDA nos animais com parkinsonismo. Esta descoberta é inédita na literatura, uma vez que nenhum estudo até o momento avaliou os aspectos discutidos aqui. Todavia, estudos que avaliaram a via glutamatérgica em outras áreas centrais de animais com parkinsonismo observaram alterações acentuadas na densidade ou na afinidade por receptores NMDA (KAGAWA et al., 2002).

Na análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (HRV), o LF é conhecido por refletir a modulação mediada pelo sistema simpático, enquanto o HF reflete a atividade mediada pelo nervo vago (EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY, 1996; GOLDSTEIN et al., 2011). A redução da HRV é utilizada como um importante indicador de um amplo número de doenças, refletindo o papel vital do sistema nervoso autônomo na manutenção da saúde (VANDERLEI et al., 2009). Estudos recentemente publicados observaram que tanto pacientes com DP quanto animais induzidos ao parkinsonismo pela 6-OHDA apresentaram redução na HRV (ARIZA et al., 2015b; SOLLA et al., 2015; STRANO et al., 2016), além disso, os pacientes com DP têm valores de LF mais baixos do que os pacientes controle (DEVOS et al., 2003; OKA et al., 2011; SALSONE et al., 2016; SOLLA et al., 2015; YOON et al., 2016) e os resultados da presente pesquisa são consistentes com estes estudos.

A diminuição da eficiência barorreflexa está associada ao risco de morte

cardíaca (LA ROVERE; PINNA; RACZAK, 2008; SZILI-TOROK et al., 2001), além disso, alguns trabalhos demonstram que a atividade barorreflexa está diminuída em pacientes com DP, indicando comprometimento da função cardiovascular (CHEN et al., 2016; SZILI-TOROK et al., 2001). Pacientes com atividade barorreflexa prejudicada apresentam uma capacidade reduzida de antagonizar a ativação simpática através de mecanismos vagais (BUOB et al., 2010). O trabalho de Page mostra que a administração de bicuculina no PVN, além de aumentar a PAM, a FC e a atividade simpática, também promove aumento do ganho do barorreflexo (PAGE; CASSAGLIA; BROOKS, 2011). Os animais induzidos ao parkinsonismo pela 6-OHDA, no período basal apresentaram maior atividade barorreflexa do que o grupo sham; adicionalmente, a administração de bicuculina promoveu um maior aumento do ganho total dos ratos 6-OHDA em comparação ao grupo sham. Embora ainda não identificadas as razões pelas quais o ganho barorreflexo dos animais parkinsonianos está aumentado em comparação aos controles, a literatura mostra que o tônus simpático aumentado muitas vezes leva à deficiência do barorreflexo, como geralmente ocorre com indivíduos ou animais hipertensos. Considerando que os animais de 6-OHDA possuem tônus simpático diminuído, é razoável pensar que o ganho do barorreflexo destes animais pode estar aumentado. No entanto, os mecanismos pelos quais estes efeitos ocorrem ainda precisam ser investigados.

As alterações cardiovasculares e autonômicas obtidas pela microinjeção de bicuculina e LY no PVN de ratos com parkinsonismo no presente estudo fazem propor a seguinte hipótese mecanicista: os receptores NMDA estariam sofrendo um aumento da regulação (“up regulation”) devido à possível denervação originada pela lesão da SNpc, considerando que a via glutamatérgica envolvida entre substância negra, estriato e hipotálamo pode estar alterada após a lesão, como observado em

outros estudos (MURER et al., 2000; NOORI; SPANAGEL; HANSSON, 2012). Uma vez aumentados, em afinidade ou quantidade, esses receptores também levariam a uma maior atividade da enzima nNOS no PVN, cuja participação e ativação pelos receptores de glutamato NMDA foi comprovada em estudos anteriores (AFFLECK; COOTE; PYNER, 2012; MARTINS-PINGE et al., 2013; PYNER, 2009). O aumento da nNOS favoreceria uma maior produção de NO e aumentaria a liberação pré-sináptica de GABA, além disso, uma menor ativação glutamatérgica via NMDA também. Esse efeito levaria a uma maior inibição simpática da função cardiovascular pelas conhecidas projeções de PVN para IML e / ou RVLM, o que pode ser evidenciado pelo maior efeito pressórico da bicuculina nos animais lesados no presente estudo, assim como pelo efeito tônico pelo Ly. Esse mecanismo proposto poderia ser o determinante dos níveis reduzidos de PA encontrados em animais com parkinsonismo e também pode estar envolvido em humanos com DP. No entanto, estudos futuros são necessários para comprovar essa hipótese.

No presente estudo, a lesão da via nigroestriatal promovida pela toxina 6-OHDA promoveu alterações cardiovasculares e autonômicas nos ratos induzidos ao parkinsonismo. Os resultados sugerem que as alterações cardiovasculares e autonômicas observadas nos animais 6-OHDA são decorrentes de modulação central através do aumento do tônus gabaérgico no PVN e que, através de uma possível inibição dos receptores NMDA pelo NO, a neurotransmissão glutamatérgica diminuída pode estar envolvida nesta modulação. Deste modo, os resultados sugerem um efeito tônico cardiovascular e autonômico pela neurotransmissão glutamatérgica, especificamente pelos receptores NMDA, assim como gabaérgica no PVN de animais com parkinsonismo. Esta descoberta é inédita na literatura, uma vez que nenhum estudo até o momento avaliou os aspectos discutidos no presente

trabalho.

Por fim, este estudo foi pioneiro ao estudar as alterações dos aminoácidos neurotransmissores no PVN decorrentes do parkinsonismo induzido por 6-OHDA, porém, julga-se importante avaliar outros aspectos dessas alterações, como a participação das isoformas da NOS nessa interação das vias glutamatérgicas e gabaérgicas, bem como o envolvimento de outros neurotransmissores, como a Angiotensina II, cuja importância para o controle cardiovascular, tanto periférico como central é grande. O estudo desses mecanismos poderá trazer luz aos processos envolvidos no tratamento e melhoria da qualidade de vida de pacientes com DP, especialmente quanto às disfunções autonômicas e cardiovasculares relacionadas ao parkinsonismo.

6 CONCLUSÕES

Através do presente estudo pode-se concluir que os níveis reduzidos de PA e FC observados nos animais submetidos ao parkinsonismo por 6-OHDA, podem ser decorrentes de uma modulação central através do aumento do tônus gabaérgico e possivelmente de uma maior inibição glutamatérgica sobre o receptor NMDA na região do PVN.

REFERÊNCIAS

ADHIYAMAN, V.; HOBSON, P.; MEARA, R. J. Central and peripheral autonomic integrity in Parkinson's disease. **Age and Ageing**, v. 37, n. 5, p. 578–581, 16 maio 2008.

AFFLECK, V. S.; COOTE, J. H.; PYNER, S. The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 219, p. 48–61, 6 set. 2012.

AMORIM, E. D. T. et al. Functional evidence of paraventricular nucleus involvement in cardiovascular and autonomic modulation in response to acute microgravity (head-down tilt) in unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 93, n. 8, p. 1305–1312, ago. 2015.

ARIZA, D. et al. Chemoreflex and baroreflex alterations in Parkinsonism induced by 6-OHDA in unanesthetized rats. **Neuroscience Letters**, v. 607, p. 77–82, 2015a.

ARIZA, D. et al. Dysautonomias in Parkinson's disease: cardiovascular changes and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in substantia nigra. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 3, p. H250–H257, 1 fev. 2015b.

ASAHINA, M. et al. Autonomic dysfunction in parkinsonian disorders: assessment and pathophysiology. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 84, n. 6, p. 674–680, 1 jun. 2013.

BADOER, E. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society Symposium: The Hypothalamus Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 1–2, p. 95–99, 2001.

BADOER, E.; NG, C. W.; DE MATTEO, R. Tonic sympathoinhibition arising from the hypothalamic PVN in the conscious rabbit. **Brain Research**, v. 947, n. 1, p. 17–24, 2002.

BAINS, J. S.; FERGUSON, A. V. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. **The Journal of physiology**, v. 499 (Pt 3, n. 1997, p. 733–46, 1997.

BLAIR, M. L. et al. Role Of the Hypothalamic Paraventricular. n. April 1995, p. 161–165, 1996.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.-T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 14, p. S124–S129, jul. 2008.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, 15 dez. 2014.

BLESSING, W. W.; LI, Y. W. Inhibitory vasomotor neurons in the caudal ventrolateral region of the medulla oblongata. **Progress in brain research**, v. 81, p. 83–97, 1989.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, jan. 2003.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, 2004.

BUOB, A. et al. Parasympathetic but not sympathetic cardiac dysfunction at early stages of Parkinson's disease. **Clinical Research in Cardiology**, v. 99, n. 11, p. 701–706, 2010.

BURBACH, J. P. H. et al. Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo-Neurohypophysial System. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1197–1267, jul. 2001.

BUSNARDO, C. et al. Ionotropic Glutamate Receptors in Hypothalamic Paraventricular and Supraoptic Nuclei Mediate Vasopressin and Oxytocin Release in Unanesthetized Rats. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2323–2331, maio 2012.

BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1611–1622, 2013.

BUSNARDO, C. et al. NMDA and non-NMDA glutamate receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulate different stages of hemorrhage-evoked cardiovascular responses in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 149–159, 2016.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. DE A. Role of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the cardiovascular effects of L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus of unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 9, p. 2066–2077, jul. 2009.

CHEN, M.-H. et al. Association Between Autonomic Impairment and Structural Deficit in Parkinson Disease. **Medicine**, v. 95, n. 11, p. e3086, mar. 2016.

CHEN, Q. H.; HAYWOOD, J. R.; TONEY, G. M. Sympathoexcitation by PVN-Injected Bicuculline Requires Activation of Excitatory Amino Acid Receptors. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 725–731, 2003.

CICCHETTI, F. et al. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **The European journal of neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 991–8, mar. 2002.

COHEN, G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 77–82, 1984.

COOTE, J. H. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 2, p. 169–173, 2005.

CRESTANI, C. C. et al. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress**, v. 13, n. 1, p. 61–72, 27 jan. 2010.

CRUZ, J. C.; MACHADO, B. H. GABA and nitric oxide in the PVN are involved in arterial pressure control but not in the chemoreflex responses in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 146, n. 1–2, p. 47–55, 2009.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–364, abr. 1994.

DAMPNEY, R. A.; GOODCHILD, A. K.; TAN, E. Vasopressor neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 14, n. 3, p. 239–54, nov. 1985.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DE ABREU, S. B. et al. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 148, n. 1–2, p. 28–35, 15 jun. 2009.

DE ANDRADE, O. et al. Paraventricular nucleus of hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 1–7, jan. 2014.

DECAVEL, C.; VAN DEN POL, A. N. GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 302, n. 4, p. 1019–1037, 22 dez. 1990.

DEVOS, D. et al. Heart rate variability and parkinson's disease severity. **Journal of Neural Transmission**, v. 110, n. 9, p. 997–1011, 1 set. 2003.

DIMICCO, J. A. et al. Microinjection of GABA antagonists into posterior hypothalamus elevates heart rate in anesthetized rats. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 9, p. 1063–1066, 1986.

DUNNETT, S. B.; BJÖRKLUND, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. **Nature**, v. 399, n. 6738 Suppl, p. A32-9, 24 jun. 1999.

DUTRA, S. G. V. et al. Cardiac Autonomic Modulation Is Determined by Gender and Is Independent of Aerobic Physical Capacity in Healthy Subjects. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

DUTY, S.; JENNER, P. **Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease** **British Journal of Pharmacology**, 2011.

ELEKES, I. et al. Concentrations of GABA and glycine in discrete brain nuclei. Stress-induced changes in the levels of inhibitory amino acids. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 7, p. 703–9, jul. 1986.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, n. 2, p. 121–143, 30 out. 2004.

ESPOSITO, E. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 205, n. 2, p. 295–312, 1 jun. 2007.

EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. 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. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–65, 1 mar. 1996.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson Disease. [s.d.].

FOLKOW, B. Physiology of behavior and blood pressure regulation in animals. In: **Behavioral Factors in Hypertension**. 9. ed. New York: Elsevier, 1987.

FONTES, M. A. P. et al. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. **Neuroscience**, v. 184, p. 64–74, 2011.

FORNO, L. S. Concentric Hyalin Intraneuronal Inclusions of Lewy Type in the Brains of Elderly Persons (50 Incidental Cases): Relationship To Parkinsonism. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 17, n. 6, p. 557–575, jun. 1969.

FRANCARDO, V. et al. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 42, n. 3, p. 327–40, jun. 2011.

FRANCARDO, V. Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: potentials and pitfalls of the current options. **Behavioural Brain Research**, 10 dez. 2017.

FUJISAWA, Y. et al. Role of vasopressin on cardiovascular changes during hemorrhage in conscious rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, n. 5, p. H1713–H1718, nov. 1994.

GABOR, A.; LEENEN, F. H. H. Cardiovascular effects of angiotensin II and glutamate in the PVN of Dahl salt-sensitive rats. **Brain research**, v. 1447, p. 28–37, 4 abr. 2012.

GAGNE, J. J.; POWER, M. C. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. **Neurology**, v. 74, n. 12, p. 995–1002, 23 mar. 2010.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, n. 8–9, p. 987–1041, ago. 1996.

GOEDERT, M.; COMPSTON, A. Parkinson's disease — the story of an eponym. **Nature Reviews Neurology**, 8 dez. 2017.

GOETZ, C. G. Charcot on Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 1, n. 1, p. 27–32, 1986.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Orthostatic hypotension from sympathetic denervation in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 58, n. 8, p. 1247–55, 23 abr. 2002.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Low-frequency power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baroreflexes. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 12, p. 1255–1261, 2011.

GRÜNBLATT, E. et al. Differential Alterations in Metabolism and Proteolysis-Related Proteins in Human Parkinson's Disease Substantia Nigra. **Neurotoxicity Research**, 7 dez. 2017.

GUERTZENSTEIN, P. G.; SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **The Journal of physiology**, v. 242, n. 2, p. 489–503, out. 1974.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, maio 2006.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, p. 279–290, jun. 2005.

HASSAN, Z. et al. Blunted endogenous GABA-mediated inhibition in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Acta Neurologica Belgica**, v. 113, n. 3, p. 319–325, 14 set. 2013.

HERMAN, J. P.; MUELLER, N. K.; FIGUEIREDO, H. Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, n. 1, p. 35–45, jun. 2004.

HEYDEN, J. A. M. et al. GABA CONTENT OF DISCRETE BRATN NUCLEI AND SPINAL CORD OF THE RAT. **Journal of Neurochemistry**, v. 33, n. 4, p. 857–861, out. 1979.

HOLBEIN, W. W.; TONEY, G. M. Activation of the hypothalamic paraventricular nucleus by forebrain hypertonicity selectively increases tonic vasomotor sympathetic nerve activity. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 308, n. 5, p. R351-9, 2015.

HORN, T. et al. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 1, p. R306–R313, jan. 1994.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, p. S183–S185, jan. 2012.

JAIN, S.; GOLDSTEIN, D. S. **Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: From pathophysiology to pathogenesis** *Neurobiology of Disease*, 2012.

JAPUNDI-IGON, N. Vasopressin and Oxytocin in Control of the Cardiovascular System. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 218–230, 2013.

JOSEPH, S.; SCHULZ, J. B.; STEGMÜLLER, J. Mechanistic contributions of FBOX7 to Parkinson disease. **Journal of Neurochemistry**, 11 dez. 2017.

KAGAWA, S. et al. Effect of glutamatergic systems on in vivo binding of [125I]-CIT in the brain of a rat model of Parkinson's disease. **Synapse**, v. 46, n. 1, p. 38–44, out. 2002.

KC, P.; DICK, T. E. Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. **Respir Physiol Neurobiol Respir Physiol Neurobiol November**, v. 30, n. 17412, p. 55–64, 2010.

KENNEY, M. J.; WEISS, M. L.; HAYWOOD, J. R. The paraventricular nucleus: An important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 1, p. 7–15, 2003.

KHEDR, E. M. et al. Prevalence of non motor features in a cohort of Parkinson's disease patients. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 115, n. 6, p. 673–677, jun. 2013.

KIM-HAN, J. S.; ANTENOR-DORSEY, J. A.; O'MALLEY, K. L. The parkinsonian mimetic, MPP+, specifically impairs mitochondrial transport in dopamine axons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 19, p. 7212–21, 11 maio 2011.

LA ROVERE, M. T.; PINNA, G. D.; RACZAK, G. Baroreflex sensitivity: Measurement and clinical implications. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 13, n. 2, p. 191–207, 2008.

LEI, S. Z. et al. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. **Neuron**, v. 8, n. 6, p. 1087–99, jun. 1992.

LEV, N.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 245–250, abr. 2003.

LI, Y.-F. et al. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 6, p. H2847-56, 2006.

LI, Y.-F.; MAYHAN, W. G.; PATEL, K. P. NMDA-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 6, p. H2328–H2336, dez. 2001.

LI, Y. F.; CORNISH, K. G.; PATEL, K. P. Alteration of NMDA NR1 Receptors Within the Paraventricular Nucleus of Hypothalamus in Rats with Heart Failure. **Circulation Research**, v. 93, n. 10, p. 990–997, 23 out. 2003.

LOW, P. A. Prevalence of orthostatic hypotension. **Clinical Autonomic Research**, v. 18, n. SUPPL. 1, p. 8–13, 27 mar. 2008.

MARTIN, D. S.; HAYWOOD, J. R. Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. **Brain Research**, v. 577, n. 2, p. 261–267, 1992.

MARTIN, D. S.; SEGURA, T.; HAYWOOD, J. R. Cardiovascular Responses to Bicuculline in the Paraventricular Nucleus of the Rat. **Hypertension**, v. 18, p. 48–55, 1991.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: Interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. **Frontiers in Physiology**, v. 3 JAN, n. January, p. 490, jan. 2013.

MCDOWALL, L. M. et al. Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 4, p. R1020–R1026, abr. 2006.

MEEKER, R. B.; GREENWOOD, R. S.; HAYWARD, J. N. Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. **Endocrinology**, v. 134, n. 2, p. 621–629, fev. 1994.

MUELLER, P. J. et al. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the hypothalamus of hindlimb unloaded rats. **Brain Research**, v. 1115, n. 1, p. 65–74, out. 2006.

MUELLER, P. J. Exercise training attenuates increases in lumbar sympathetic nerve activity produced by stimulation of the rostral ventrolateral medulla. **J Appl Physiol**, v. 102, n. 2, p. 803–813, fev. 2007.

MURER, M. . et al. The indirect basal ganglia pathway in dopamine D2 receptor-deficient mice. **Neuroscience**, v. 99, n. 4, p. 643–650, 23 ago. 2000.

NICARETTA, D. H.; PEREIRA, J. S.; PIMENTEL, M. L. [Autonomic disorders in Parkinson's disease]. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 44, n. 2, p. 120–2, jan. 1992.

NICARETTA, D. H.; PEREIRA, J. S.; PIMENTEL, M. L. V. Autonomic disorders in Parkinson's disease. **Rev Assoc Med Bras**, v. 44, n. 2, p. 120–122, 1998.

NISHIHARA, M.; TAKESUE, K.; HIROOKA, Y. Renal denervation enhances GABA-ergic input into the PVN leading to blood pressure lowering in chronic kidney disease. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 204, p. 88–97, 2017.

NISHINO, N. et al. GABAA receptor but not muscarinic receptor density was decreased in the brain of patients with Parkinson's disease. **Japanese journal of pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 331–9, nov. 1988.

NOORI, H. R.; SPANAGEL, R.; HANSSON, A. C. Neurocircuitry for modeling drug effects. **Addiction Biology**, v. 17, n. 5, p. 827–864, set. 2012.

OKA, H. et al. Cardiovascular dysautonomia in de novo Parkinson's disease without orthostatic hypotension. **European Journal of Neurology**, v. 18, n. 2, p. 286–292, 15 fev. 2011.

PAGE, M. C.; CASSAGLIA, P. A; BROOKS, V. L. GABA in the paraventricular nucleus tonically suppresses baroreflex function: alterations during pregnancy. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 300, n. 6, p. R1452-8, 2011.

PARKINSON, J. **Essay on the Shaking Palsy**. [s.l: s.n.].

PATEL, H. et al. Silver syndrome is not linked to any of the previously established autosomal dominant hereditary spastic paraplegia loci. **American Journal of Medical Genetics**, v. 102, n. 1, p. 68–72, 22 jul. 2001.

PAXINOS, G. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. new york: academic press, 2007. v. 9

PEULER, J. D. et al. Inhibition of renal sympathetic activity and heart rate by vasopressin in hemorrhaged diabetes insipidus rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 258, n. 3, p. H706–H712, mar. 1990.

PRZEDBORSKI, S. **Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease**. Parkinsonism and Related Disorders. **Anais...**2005

PYNER, S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: Implications for cardiovascular regulation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 38, n. 3, p. 197–208, nov. 2009.

RAHMAN, F.; GOLDSTEIN, D. S. Quantitative indices of baroreflex-sympathoneural function: application to patients with chronic autonomic failure. **Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society**, v. 24, n. 3, p. 103–110, 5 jun. 2014.

RAMCHANDRA, R. et al. The role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the regulation of cardiac and renal sympathetic nerve activity in conscious normal and heart failure sheep. **The Journal of physiology**, v. 591, n. 1, p. 93–107, 1 jan. 2013.

REICHMANN, H.; BRANDT, M. D.; KLINGELHOEFER, L. The nonmotor features of Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 29, n. 4, p. 467–473, ago. 2016.

SALSONE, M. et al. Heart rate variability in patients with essential tremor: A cross sectional study. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 33, p. 134–137, dez. 2016.

SCHLENKER, E. et al. Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats. **Brain Research**, v. 895, n. 1–2, p. 33–40, 2001.

SCHULZ, J. B.; FALKENBURGER, B. H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 135–147, 8 out. 2004.

SCHWARTZ, C. E. et al. Spontaneous fluctuation indices of the cardiovagal baroreflex accurately measure the baroreflex sensitivity at the operating point during upright tilt. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 12, p. R1107–R1113, 15 jun. 2013.

SHIMOHAMA, S. et al. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in molecular medicine**, v. 9, n. 8, p. 360–5, ago. 2003.

SILVA, A. S. et al. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. **Life Sciences**, v. 127, p. 82–89, 2015.

SINGER, C.; WEINER, W. J.; SANCHEZ-RAMOS, J. R. Autonomic dysfunction in men with Parkinson's disease. **European neurology**, v. 32, n. 3, p. 134–40, jan. 1992.

SINGH, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 2, p. 233–250, jun. 2007.

SOLLA, P. et al. Heart rate variability shows different cardiovascular modulation in Parkinson's disease patients with tremor dominant subtype compared to those with akinetic rigid dominant subtype. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 10, p. 1441–1446, 2015.

STOCKER, S. D.; HUNWICK, K. J.; TONEY, G. M. Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. **The Journal of Physiology**, v. 563, n. 1, p. 249–263, 2005.

STRANO, S. et al. Cardiovascular dysfunction in untreated Parkinson's disease: A multi-modality assessment. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 370, p. 251–255, nov. 2016.

SWANSON, L. W.; KUYPERS, H. G. J. M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **Journal of Comparative Neurology**, v. 194, n. 3, p. 555–570, 1980.

SZILI-TOROK, T. et al. Depressed baroreflex sensitivity in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 22, n. 3, p. 435–438, 2001.

TEZINI, G. C. S. V.; DIAS, D. P. M.; SOUZA, H. C. D. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 147–153, 2013.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European journal of pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107–110, dez. 1968.

VALLDEORIOLA, F.; NOBBE, F. A.; TOLOSA, E. Treatment of behavioural disturbances in Parkinson's disease. In: [s.l.] Springer, Vienna, 1997. p. 175–204.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 2, p. 205–217, 2009.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Neurological diseases: Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 365–375, maio 2003.

WILLNER, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 10, n. 6, p. 677–90, 1986.

WU, C.; SUN, D. GABA receptors in brain development, function, and injury. **Metab Brain Dis**, v. 30, n. 2, 2015.

XU, B. et al. Responses of neurons in paraventricular nucleus to activation of cardiac afferents and acute myocardial ischaemia in rats. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 3, p. 295–304, mar. 2011a.

XU, G. et al. Late Development of the GABAergic System in the Human Cerebral Cortex and White Matter. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 70, n. 10, p. 841–858, 1 out. 2011b.

YOON, J. H. et al. Heart rate variability to differentiate essential tremor from early-stage tremor-dominant Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 368, p. 55–58, 15 set. 2016.

ZANZINGER, J.; CZACHURSKI, J.; SELLER, H. Neuronal nitric oxide reduces sympathetic excitability by modulation of central glutamate effects in pigs. **Circulation research**, v. 80, n. 4, p. 565–71, abr. 1997.

ZESIEWICZ, T. A. et al. Autonomic nervous system dysfunction in Parkinson's disease. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 5, n. 2, p. 149–160, mar. 2003.

ZHANG, K.; PATEL, K. P. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 3 Pt 2, p. R728-34, set. 1998.

ZIEMSEN, T.; REICHMANN, H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 13, n. 6, p. 323–332, ago. 2007.

ZIEMSEN, T.; REICHMANN, H. Cardiovascular autonomic dysfunction in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 289, n. 1–2, p. 74–80, 15 fev. 2010.

ANEXO

ANEXO 1

Ofício de aprovação de tese pelo CEUA



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 155/2015

Londrina, 31 de Julho de 2015.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 16 de Junho de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Alterações funcionais e de estresse oxidativo em áreas centrais de controle cardiovascular em ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA**", registrado sob o processo CEUA nº7570.2015.11, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 360 ratos Wistar machos, com 3 meses de idade, pesando entre 280 e 320 g, provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo estudar os efeitos funcionais tônicos e reflexos do PVN e RVLM no controle cardiovascular, bem com o estresse oxidativo, e avaliar a integridade vascular e o equilíbrio na produção de fatores contráteis e relaxantes pelo endotélio em animais controle ou submetidos à lesão da substância negra parte compacta (SNpc) com 6-OHDA. Para tanto, será realizada cirurgia estereotáxica precedida de anestesia intraperitoneal de Cloridrato de Cetamina (100 mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20 mg/kg) para microinfusão bilateral de 6-OHDA (6 mg/mL) e implante de cânulas na RVLM. Os animais também serão anestesiados com tribromoetanol 2,5% e submetidos à cirurgia para canulação crônica da artéria e veia femoral e para a retirada da aorta para o estudo de reatividade vascular. Ao final da primeira cirurgia será administrado uma dose única (30,000 UI) de pentabiótico veterinário e após a segunda cirurgia será administrado paracetamol na dose de 1,5 mg/100g de rato para analgesia. Os animais serão eutanasiados por decapitação e será realizada a marcação do cérebro (RVLM) com corante, extração do cérebro para histologia e retirada do estriado para dosagens de catecolaminas por HPLC. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 43 meses.

Cumprе orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

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

Waldiceu Ap. Verrri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.